مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره بیستم، شمارهٔ ۳، اسفند ۱۳۹۶، صفحه ۴۳-۳۶

# بررسی ارتباط میان حضور ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی کد کننده آنزیم AmpC و نوع نمونه بالینی در سودوموناس آئروژینوزا

حامد طهماسبی (Msc)[۱]، محمد یوسف علیخانی (PhD)[۲]، ساناز ده باشی (MSc)[۲]، محمدرضا عربستانی (PhD)[۳*]

۱-گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۲-گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۳-مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

دریافت: ۹۶/۶/۲۵، اصلاح: ۹۶/۹/۲۶، پذیرش: ۹۶/۱۰/۳

## خلاصه

**سابقه و هدف:** نمونه‌های بالینی مختلف نقش تعیین کننده‌ای در نوع و نحوه مقاومت ارگانسیم‌های بیماری‌زا در برابر درمان دارند. گاهی، حضور برخی ژن‌های عامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی با نوع نمونه بالینی ارتباط دارد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط میان حضور ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی کد کننده *AmpC* و نوع نمونه بالینی در *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی-تجربی ۱۱۴ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا*، نمونه‌های بالینی شامل خون، ادرار، ترشحات زخم، زخم بیماران سوختگی از بیمارستان‌های آموزشی شهر همدان جمع آوری گردید. حضور ژن‌های *AmpC* پلاسمیدی و کروموزومی با استفاده از تکنیک Multiplex PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته ها:** ژن‌های *AmpC* پلاسمیدی نسبت به ژن‌های کروموزومی در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* بیشتر مشاهده شد. در ژن‌های *AmpC* پلاسمیدی ژن *FOX* با تعداد ۲۹ (۳۷/۶۶ ٪) $p\leq ۰/۰۳۷$ و *DHA* و با تعداد ۵ (۶/۴٪) $p\leq ۰/۰۱۵$ و در ژن‌های *AmpC* کروموزومی *FOX* با تعداد ۳۹ (۴۸/۷۵٪) $p\leq ۰/۰۰۱$ و *MOX* با تعداد ۲ (۷/۳۶٪) $p\leq ۰/۰۱۵$ به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را داشتند.

**نتیجه گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که حضور ژن‌های کروموزومی-پلاسمیدی کدکننده آنزیم *AmpC* با توجه به نوع نمونه بالینی می‌تواند دارای فراوانی متفاوت باشد.

**واژه های کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، مقاومت دارویی، بتالاکتامازهای گروه آمبلر، پلاسمید، کروموزوم.**

## مقدمه

هر عامل بیماری‌زا که وارد بدن انسان می‌شود، برای ایجاد بیماری‌زایی باید در بافت هدف خود مستقر شود. باکتری‌های بیماری‌زا نیز از این امر مستثنی نمی‌باشند و هر کدام می‌توانند با توجه به بافت درگیر کننده و مقیم خود، میزان آسیب و عفونت‌زایی متفاوتی داشته باشند(۲و۱). جهت درمان عفونت‌های باکتریایی، با توجه به میزان عفونت و عضو درگیر، همیشه مقادیر مصرف آنتی‌بیوتیک و دز مصرفی آن متفاوت است(۳). از این رو، نمونه های بالینی مختلف همیشه نقش تعیین کننده ای در نوع و نحوه مقاومت ارگانسیم های بیماری زا در برابر درمان داشته اند(۱). در بسیاری از بیماری های باکتریایی، میزان داروی تجویزی با توجه به بافت هدف تعیین می گردد و این امر سبب می شود در محل‌های باز که دسترسی سریع تری به منشاء عفونت می باشد، درمان با کمترین مقدار دز دارویی انجام شود(۲). باکتری هایی که از نظر حضور در فضاهای عمومی و بیمارستانی شیوع بیشتری دارند و به نوعی در گروه باکتری‌های بیمارستانی جای می‌گیرند، حصول این امر را راحت می کنند. *سودوموناس آئروژینوزا* یکی از این باکتری ها می باشد که توانایی مقیم شدن در مکان های مختلفی از بدن انسان را دارد (۴). سودوموناس آئروژینوزا مهم‌ترین پاتوژن انسانی و دومین عامل عفونت‌های سوختگی است، همچنین این باکتری در محیطهای بیمارستانی و در مناطق مرطوب یافت می‌شود(۶و۵). وجود سویه‌های با مقاومت چندگانه دارویی در این باکتری مشکل اصلی در درمان باکتری در بخش‌های مهم بیمارستانی مانند سوختگی و مراقبت‌های ویژه است(۷). بتالاکتاماز ها یک گروه نامتجانس از آنزیم های باکتریایی می باشند(۲) که براساس معیارهای مختلفی همچون طیف هیدرولیزی آنزیم، میزان حساسیت در برابر مهار کننده های بتالاکتاماز، مکان ژنتیکی آنزیم (پلاسمیدی، کروموزومی، اینتگرونی) و توالی آمینواسیدی پروتئین طبقه بندی می شوند(۸). برای طبقه بندی بتالاکتامازها روش های متعددی وجود دارد که در بین آنها طبقه بندی آمبلر و طبقه بندی بوش کاربرد بیشتری پیدا کرده اند. بر اساس دسته بندی آمبر، بتالاکتامازهای گروه C که به *AmpC* نیز شهرت دارند، یکی از مهمترین عوامل مقاومتی علیه آنتی بیوتیک های بتالاکتامی می باشد(۸). بتالاکتامازهای نوع *AmpC* در اواخر دهۀ ۱۹۷۰ ظاهر و مورد مطالعه قرار گرفتند. این آنزیم ها سفالوسپورین های وسیع الطیف مانند سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم و مونوباکتام هایی مانند آزترونام و سفامایسین ها را هیدرولیز می نمایند. اما توسط مهار کننده های معمولی مانند کلاوولانات

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۹۵۱۰۰۷۵۷۵۵ دانشگاه علوم پزشکی همدان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر محمدرضا عربستانی
آدرس: همدان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۰۸۱-۲۳۸۳۸۰۷۷
E-mail: mohammad.arabestani@gmail.com

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.3.5.3 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.3.36 ]

مهـار نمی‌شوند (۹). آنزیم *AmpC* که اغلب توسط بتالاکتامها قابل القاء می باشند به وسیله ژن‌های کروموزومی کد می شوند. آنزیم *AmpC* با واسطه پلاسمید میتواند بـه ارگانیسم های فاقد این آنزیم منتقل شده و مقـاومتی شـبیه بـه مقاومـت بتالاکتـامی را سبب شود (۹).

در یک بررسی انجام شده توسط Chiquet و همکاران مشخص شد که بین حضور برخی باکتری های عامل کراتیت چشمی و مقاومت به برخی آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، ارتباط مستقیمی وجود دارد (۱۰). همچنین Jansen و همکاران با مطالعه بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* نشان دادند که بین ایزوله های جدا شده از نمونه های سیستیک فیبروزیس و سایر نمونه های بالینی، از نظر الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی تفاوت قابل ملاحظه ای وجود دارد (۱۱). با این حال، این احتمال وجود دارد که بین نمونه های مختلف بالینی که سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* از آن جدا شده است و میزان و نوع مقاومت آنتی بیوتیکی ارتباطی وجود داشته باشد (۱۲).

ممکن است این امر تا حدی پیش روی کند که سبب ظهور سویه های متفاوت در یک شخص که توسط یک گونه مشترک از باکتری آلوده شده است، را سبب شود. لذا هدف از این مطالعه بررسی ارتباط میان حضور ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی کدکننده آنزیم *AmpC* و نوع نمونه بالینی در سودوموناس آئروژینوزا می باشد.

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری، شناسایی و ایزوله کردن *سودوموناس آئروژینوزا*:** در این مطالعه توصیفی- تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد اخلاقی IR.UMSHA.REC. ۱۳۹۵.۴۰۲ به روش نمونه‌گیری آسان، تصادفی و در دسترس، ۱۱۴ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا طی یک دوره ۹ ماهه از تیر ۹۵ تا فروردین ۹۶ از مجموع ۲۸۸ نمونه بالینی مختلف جداسازی شد. نمونه‌ها با منشا باکتریایی وارد مطالعه شدند. جهت غربالگری اولیه، نمونه های جمع‌آوری شده بر روی محیط Cetremide Agar(Merck آلمان) کشت داده شد و در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. در نهایت با استفاده از تست های مختلف بیوشیمیایی(اکسیداز، کاتالاز، ایندول، متیل رد و کشت بر روی محیط های شناساگر) ایزوله های بدست آمده تعیین جنس و گونه شدند (۱۳).

**تعیین فنوتیپی سویه های مولد *AmpC* به روش دیسک دیفیوژن:** برای بررسی وجود *AmpC* از دیسک های سفوکسیتین (۳۰میکروگرم) و سفپودوکسیم (۱۰میکروگرم) (Mastانگلستان) به همراه ترکیبات مهار کننده آنزیم *AmpC* استفاده شد. در کلیه موارد از کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 به عنوان نمونه کنترل مثبت و از *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC27853 به عنوان کنترل منفی استفاده گردید(۱۴).

**استخراج DNA و پلاسمید باکتریایی:** استخراج پلاسمید و DNA با استفاده از کیت استخراج صورت گرفت. بعد از کشت ایزوله ها بر روی محیط Mueller-Hinton agar (Merck آلمان) کشت داده شد. سپس چند کلنی از هر ایزوله کشت داده شده به ۵میلی لیتر محیط کشت LB Broth(sigma aldrich آمریکا) تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵±۲ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سایرمراحل استخراج DNA و پلاسمید با استفاده از کیت استخراج سینا ژن ایران انجام شد.

**آماده سازی پرایمرها و انجام آزمونPCR :** برای انجام واکنش PCR برای هر نمونه ۲۵ میکرولیتر از مستر میکس قرمز(شرکت Ampliqonآلمان) با ۱ لاندا از DNA استخراج شده و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر میکس اولیه آماده شد (جدول ۱) و برای رساندن حجم نهایی به ۵۰ میکرولیتر به آن آب مقطر اضافه گردید. برای تکثیر ژن‌های مورد نظر از دستگاه ترموسایکلر (BioRad آمریکا) با تنظیمات سیکل دمایی بصورت شوک حرارتی ۹۴ درجه سانتیگراد۳۰ ثانیه و تعداد ۳۵ سیکل بصورت ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، دمای انلینگ ۶۱ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۳۰ ثانیه اعمال شد. طویل شدن نهایی هم در ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. در نهایت محصولات بدست آمده جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

**جدول ۱. لیست پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی سویه های سودوموناس آئروژینوازی مولد *AmpC***

| ژن | نام پرایمر | توالی نوکلئوتید ها | طول آمپلیکون (جفت باز) | منبع |
|---|---|---|---|---|
| MOX | MOXMF<br>MOXMR | GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT<br>CACATTGACATAGGTGTGGTGC | ۵۲۰ | (۱۵) |
| CIT | CITMF<br>CITMR | TGGCCAGAACTGACAGGCAAA<br>TTTCTCCTG AACGTGGCTGGC | ۴۶۲ | (۱۵) |
| DHA | DHAMF<br>DHAMR | AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT<br>CCGTACGCATACTGGCTTTGC | ۴۰۵ | (۱۵) |
| EBC | EBCMF<br>EBCMR | TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG<br>CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT | ۳۰۲ | (۱۵) |
| FOX | FOXMF<br>FOXMR | AACATGGGGTATCAGGGAGATG<br>CAAAGCGCGTAACCGGATTGG | ۱۹۰ | (۱۵) |
| ACC | ACCMF<br>ACCMR | AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA<br>TTCGCCGCAATCATCCCTAGC | ۳۴۶ | (۱۵) |
| AmpC1 | Pre*AmpC*-PA1<br>Post*AmpC*-PA2 | ATGCAGCCAACGACAAAGG<br>CGCCCTCGCGAGCGCGCTTC | ۱۲۴۳ | (۱۵) |
| AmpC2 | *AmpC*-PA-A<br>*AmpC*-PA-B | CTTCCACACTGCTGTTCGCC<br>TTGGCCAGGATCACCAGTCC | ۱۰۶۳ | (۱۵) |

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.3.5.3 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.3.36 ]

**آنالیز داده ها:** نتایج بدست آمده از تعیین مقاومت های آنتی‌بیوتیکی به روش فنوتیپی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آماری x2 تجزیه و تحلیل شدند و $p \leq ۰/۰۵$ معنی دار در نظرگرفته شد.

## یافته ها

**پراکنش ایزوله‌های حامل آنزیم AmpC:** در این مطالعه بعد از انجام تست های فنوتیپی و غربالگری اولیه، از ۱۱۴ ایزوله *سودوموناس آئروژینوا* مورد بررسی، ۹۷ ایزوله(۸۵/۰۸ ٪) به روش فنوتیپی دارای آنزیم *AmpC* در نظر گرفته شدند. از مجموع ۹۷ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* حامل آنزیم AmpC، ۸۰ ایزوله (۸۲/۴۲ ٪) حامل ژن‌های کروموزومی و ۷۷ ایزوله (۷۹/۳۸ ٪) حامل ژن‌های پلاسمیدی بودند.

**پراکنش نمونه های بالینی در ایزوله های حاوی ژن‌های *AmpC*:** در این مطالعه، از مجموع ۸۰ ایزوله حامل آنزیم *AmpC* کروموزمی، ۲۲ ایزوله(۲۷/۵٪) از خون، ۱۰ ایزوله (۱۲/۵٪) از ادرار، ۱۶ ایزوله (۲۰٪) از ترشحات زخم، ۱۹ ایزوله (۲۳/۷۵٪) از زخم بیماران سوختگی، ۹ ایزوله (۱۱/۲۵ ٪) از کاتتر و ۴ ایزوله (۵٪) از مایع مغزی نخاعی بدست آمد. همچنین از ۷۷ سویه حامل آنزیم‌های *AmpC* پلاسمیدی، ۱۲ ایزوله (۱۰/۵۲٪) از خون، ۲۳ ایزوله (۲۸/۷۵٪) از ادرار، ۸ ایزوله (۱۰ ٪) از ترشحات زخم، ۲۷ ایزوله(۳۳/۷۵ ٪) از زخم بیماران سوختگی، ۲ ایزوله (۲/۲۵ ٪) از کاتتر و ۵ ایزوله(۶/۲۵ ٪) از مایع مغزی نخاعی بدست آمد. بیشترین سویه های *AmpC* کروموزومی و پلاسمیدی نیز از بیماران بخش های ICU و اطفال جداسازی شده بودند.

از نظر نوع نمونه بالینی، بیشترین سویه های *AmpC* مثبت، از نمونه های ادرار و کشت بدست آمدند و کمترین آن مربوط به نمونه های گرفته شده از ترشحات زخم بود. این مقادیر شامل هر دو گروه پلاسمیدی و کروموزومی بود. علاوه بر این، با توجه به نمونه های بدست آمده بیشترین سویه های سودوموناس آنروژینوزا مولد آنزیم *AmpC* کروموزمی و پلاسمیدی از بیماران زن جداسازی شد. از ۸۰ ایزوله حاوی ژن های *AmpC* کروموزومی، ۵۹ ایزوله(۷۳/۷۵ ٪) از بیماران زن و ۲۱ ایزوله(۲۵/۲۶ ٪) از بیماران مرد جداسازی شد ارتباط معنی داری بین حضور ژن‌های *AmpC* کروموزومی و نمونه های بالینی مختلف مشاهده شد (جدول۲). همچنین از ۷۷ ایزوله بالینی دارای ژن *ApmC* پلاسمیدی، ۴۱ ایزوله(۵۳/۲۴ ٪) از مردان و ۳۶ ایزوله(۴۶/۵۳ ٪) از زنان بدست آمد و ارتباط معنی داری بین حضور ژن‌های *AmpC* پلاسمیدی و نمونه های بالینی مختلف مشاهده شد (جدول۳).

**جدول ۲. فراوانی ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزای* مولد *AmpC* کروموزمی بر اساس تست های ژنوتیپی در نمونه های بالینی**

| بخش جداشده | *سودوموناس آئروژینوزا* (n=۸۰) | | | | | | جمع کل | P-value |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | کشت ادرار | ترشحات زخم | کشت خون | زخم بیماران سوختگی | کشت از آلودگی کاتتر | کشت مایع مغزی-نخاعی | | |
| CIT | ۰ | ۰ | ۵ | ۳ | ۰ | ۰ | ۸ | ≤۰/۰۰۴ |
| DHA | ۳ | ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۴ | ≤ ۰/۰۰۱ |
| EBC | ۰ | ۲ | ۳ | ۸ | ۱ | ۲ | ۱۶ | ≤۰/۰۰۹ |
| FOX | ۶ | ۱۰ | ۱۳ | ۸ | ۲ | ۰ | ۳۹ | ≤۰/۰۰۱ |
| ACC | ۱ | ۳ | ۰ | ۰ | ۳ | ۲ | ۹ | ≤۰/۰۱۸ |
| MOX | ۰ | ۰ | ۱ | ۰ | ۲ | ۰ | ۲ | ≤۰/۰۱۵ |

**جدول ۳. فراوانی ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزای* مولد *AmpC* پلاسمیدی بر اساس تست های ژنوتیپی در نمونه های بالینی**

| بخش جداشده | *سودوموناس آئروژینوزا* (n=۷۷) | | | | | | جمع کل | P-value |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | کشت ادرار | ترشحات زخم | کشت خون | زخم بیماران سوختگی | کشت از آلودگی کاتتر | کشت مایع مغزی-نخاعی | | |
| CIT | ۲ | ۱ | ۱ | ۴ | ۰ | ۰ | ۸ | ≤۰/۰۰۵ |
| DHA | ۳ | ۱ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۵ | ≤۰/۰۱۵ |
| EBC | ۰ | ۲ | ۴ | ۴ | ۰ | ۰ | ۱۰ | ≤۰/۰۰۷ |
| FOX | ۱۴ | ۱ | ۶ | ۸ | ۰ | ۰ | ۲۹ | ≤۰/۰۳۷ |
| ACC | ۱ | ۳ | ۰ | ۶ | ۰ | ۱ | ۱۱ | ≤۰/۰۰۲۳ |
| MOX | ۳ | ۰ | ۱ | ۵ | ۲ | ۰ | ۱۴ | ≤۰/۰۴۱ |

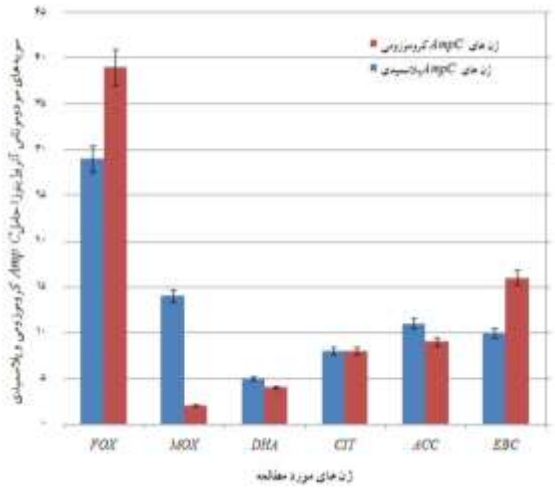
**فراوانی خانواده‌های ژنی *AmpC* پلاسمیدی و کروزمومی:** ژن‌های *AmpC* *پلاسمیدی* نسبت به ژن‌های کروموزومی در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* بیشتر مشاهده شد. از مجموع ۷۷ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا حامل *AmpC* پلاسمیدی ۲۹ ایزوله (۳۷/۶۶ ٪) دارای ژن پلاسمیدی *Fox*، ۱۰ ایزوله (۱۲/۹۵٪) دارای ژن پلاسمیدی *EBC*، ۱۱ ایزوله (۱۴/۸۲٪) دارای ژن پلاسمیدی *ACC*، ۵ ایزوله (۶/۴ ٪) دارای ژن پلاسمیدی *DHA*، ۸ ایزوله (۱۰/۳۸ ٪) دارای ژن پلاسمیدی *CIT* و ۱۴ ایزوله(۱۸/۱۸ ٪) از ایزوله ها دارای ژن پلاسمیدی *Mox* بودند. همچنین از مجموع ۸۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا حامل *AmpC* کروموزمی ۳۹ ایزوله(۴۸/۷۵ ٪) دارای ژن کروموزومی *Fox*، ۱۶ ایزوله(۲۰ ٪) دارای ژن کروموزومی *EBC*، ۹ ایزوله(۲۳/۵۷ ٪) دارای ژن

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.3.5.3 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.3.36 ]

کروموزومی *ACC*، ۴ ایزوله (۲۷/۵ ٪) دارای ژن کروموزمی *DHA*، ۸ ایزوله(۴/۲۱ ٪) دارای ژن کروموزومی *CIT* و ۲ ایزوله(۷/۳۶ ٪) از ایزوله ها دارای ژن کروموزومی *Mox* بودند. بیشترین نمونه هایی که دارای ژن Fox بودند از بیماران بستری در بخش ICU و اطفال بدست آمد (نمودار ۱ و شکل۱). ارتباط معنی داری بین نوع نمونه بالینی و پراکنش ژن های عامل مقاومت به بتالاکتاماز های گروه C آمبر وجود نداشت.




**شکل ۱. نتایج حاصل از تکثیر ژن های گروه AmpC.**
**ژن *MOX* با طول۵۲۰ جفت باز، ژن *CIT* با طول ۴۶۲ جفت باز ،ژن DHA با طول ۴۰۵ جفت باز، ژن *EBC* با طول جفت۳۰۲ باز، ژن *FOX* با طول ۱۹۰ جفت باز و ژن *ACC* با طول ۳۴۶ جفت باز .چاهک۱: کنترل منفی، چاهک 2تا8: نمونه های مثبت از نظر حضور ژن ها. چاهکM: مارکر ۱۰۰ جفت بازی**




**نمودار ۱. فراوانی خانواده ژنی *AmpC* کروموزومی و پلاسمیدی**

## بحث و نتیجه گیری

در این بررسی از ۱۱۴ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی شده، ۹۷ ایزوله با استفاده از روش های فنوتیپی مولد آنزیم *AmpC* تشخیص داده شدند. این در حالی بود که، نتیجه حاصل با نتایج بدست آمده از روش های مولکولی تفاوت داشت. در مطالعاتی که Lin و همکاران داشتند مشخص شد که روش‌های فنوتیپی جهت شناسایی سویه های حامل *AmpC* دارای حساسیت قابل قبولی نیستند(۱۶). باکتری سودوموناس آئروژینوزا با توجه به ویژگی‌های خاص خود می‌تواند اعضای مختلفی را دچار عفونت کند. در برخی موارد ممکن است حضور و فعالیت باکتری در بخش‌های مختلف، نوع و دامنه مقاومت آن را نیز تحت تاثیر قرار دهد (۱۷و۱۸). همچنین مطالعه Garrec و همکاران نیز نشان داد که روشهای فنوتیپی در بیشتر مواقع با خطا در تشخیص و گزارشات همراه می باشند (۱۹)، که علت این امر می تواند به دلیل تجربه شخص آزمایشگر، کیفیت مواد مورد استفاده جهت انجام آزمون، شرایط محیطی انجام آزمون از قبیل شرایط دمایی و pH، شرایط انکوباسیون نمونه ها و همچنین تجهیزات مورد استفاده جهت آزمایش باشد که تمام موارد ذکر شده بر روی نتایج حاصل از روش های فنوتیپی تاثیرگذار می‌باشند. سودوموناس آئروژینوزا مقاومت زیادی نسبت به بسیاری از مواد ضد میکروبی و ضد عفونی کننده نظیر ترکیبات آمونیوم، هگزا کلروفن، صابون‌ها و محلول‌های ید دارد (۱۸).

از این رو باید این انتظار را داشت که ایزوله های جمع آوری شده از قسمت‌هایی از بدن که بیشتر در برابر عوامل ضد عفونی کننده مانند بتادین، الکل و مواد دیگر می باشند، در برابر درمان از خود مقاومت بیشتری نشان دهند(۲۰). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که نمونه های بدست آمده از زخم های سوختگی و ترشحات دارای بیشترین میزان پراکنش ژنی بودند. همچنین عفونت های ناشی از کاتتر و عفونت های ادراری نیز دارای پراکنش قابل ملاحظه ای از نظر ژن های *AmpC* بودند. در مطالعه ای که Cornut و همکاران داشتند مشخص شد که نمونه هایی که از عفونت های ایجاد شده از سطوح باز گرفته شده است، نسبت به سایر نمونه های حامل عفونت باکتریایی، دارای مقاومت بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک و درمان می باشد (۲۱). سودوموناس آئروژینوزا مسئول ۱۱ تا ۱۳ درصد از عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در بیماران فیبروز سیستیک، اشخاص دچار سوختگی یا دارای نقص ایمنی و افرادی که از دستگاه های ونتیلاتور استفاده می کنند، می باشد. سپسیس ناشی از این باکتری یک عارضه جدی متعاقب عفونت سوختگی است(۲۲و۲۳).

این امر با نتایجی که از نمونه های حاصل از سوختگی و ترشحات زخمی بدست آمد، همخوانی داشت، بطوریکه بیشتر نمونه های دارای خانواده های ژنی *AmpC* پلاسمیدی و کروموزومی در گروه عفونت های ساکن در زخم ها بدست آمد. البته در بروز مقاومت های وابسته به آنتی بیوتیک های بتالاکتامی که به واسطه پلاسمید منتقل می شوند کاهش نفوذپذیری ارگانیسم به دارو که تغییر در گیرنده اختصاصی و تمایل دارو و تغییر جزئی در یک یا چند جز از پوشش سلولی و از دست دادن ظرفیت انتقال فعال برای دارو از غشا سلولی را در پی دارد را نباید نادیده گرفت (۲۳و۲۴).

این درحالی است که، هر چه عوامل مداخله ای در محیط زندگی باکتری کمتر باشد، ارگانیسم راحت تر می تواند الگوی مقاومتی خود را تنظیم کند(۲۵). در مطالعه حاضر، ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزای AmpC* پلاسمیدی جدا شده از نمونه خون دارای فراوانی کمتری نسبت به ایزوله های دارای ژن‌های کروموزمی بود. از جمله اختلافاتی که در بررسی های نمونه های بالینی صورت گرفت، می توان به عدم همخوانی حضور ژن‌های پلاسمیدی و کروموزومی در باکتری های بدست آمده اشاره کرد. در مطالعه Rafiee و همکاران بر روی طیف گسترده باکتری های جدا شده از نمونه های بالینی داشتند، مشخص شد که بین نوع نمونه بالینی و پراکنش ژن های پلاسمیدی و کروموزومی نیز می تواند ارتباطی وجود داشته باشد. در این پژوهش ۲۵ ساله، حضور فعال باکتری های

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.3.5.3 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.3.36 ]

بیمارستانی و انتقال ژن ها در نمونه های بالینی مختلف مورد بررسی قرار گرفت(۲۲). نتایج بدست آمده از این مطالعه مشخص کرد که حضور ژن‌های کروموزومی-پلاسمیدی کدکننده آنزیم *AmpC* می‌تواند با توجه به نوع نمونه بالینی دارای فراوانی متفاوت باشد. پراکنش سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای حامل ژن‌های پلاسمیدی و کروموزمی در نمونه‌های بالینی مختلف نشان داد که حتی منبع عفونت و بافت درگیر شده توسط باکتری نیز می‌تواند الگوی ژنی اورگانیسم را تحت تاثیر قرار دهد. از این رو، برخی ایزوله‌ها نسبت به درمان و خطوط آنتی بیوتیکی مصرفی از خود مقاومت نشان داده و مسیر درمان را تغییر می‌دهند. از این رو، با شناسایی این ارتباطات می‌توان مسیر درمان عفونت‌های وابسته به سودوموناس آئروژینوزا را کنترل کرد. از طرفی، با توجه به مقطعی بودن مطالعه و محدودیت های حاکم بر آن، در سطوح گسترده و با کاهش دامنه احتمالات، قابل استفاده نمی باشد، از این رو انجام مطالعات بیشتر پیشنهاد می شود.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان و پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه تشکر و قدردانی می گردد.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.3.5.3 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.3.36 ]

# Investigation of the Relationship between the Presence of Chromosomal and Plasmid-Encoded AmpC Genes and Type of Clinical Specimen in *Pseudomonas Aeruginosa*

**H. Tahmasebi (MSc )[1], M. Yousef Alikhani (PhD)[2], S. Dehbashi(MSc)[2], M.R. Arabestani (PhD) [*3]**

1.Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, I.R.Iran.
2.Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran.
3.Brucellosis Research Center, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran.

**J Babol Univ Med Sci; 20(3); Mar 2018; PP: 36-43**
**Received: Sep 16th 2017, Revised: Dec 17th 2017, Accepted: Dec 24th 2017.**

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Different clinical specimens play a decisive role in the type and nature of drug resistance in pathogenic organisms. Occasionally, the presence of certain antibiotic resistance genes is associated with the type of clinical specimen. The aim of this study was to determine the relationship between the presence of chromosomal and plasmid-encoded AmpC genes and type of clinical specimen in *Pseudomonas aeruginosa*.

**METHODS:** In this descriptive and experimental study, 114 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, and clinical specimens including blood, urine, wound secretion, burn injuries were collected from teaching hospitals in Hamadan. The presence of chromosomal and plasmid-encoded AmpC genes was evaluated using multiplex PCR technique.

**FINDINGS:** The plasmid-encoded AmpC genes were observed more than chromosomal genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. The FOX gene with a value of 29 (37.66%) ($p\leq0.037$) and DHA gene with a value of 5(6.4%) ($p\leq0.015$) in plasmid-encoded AmpC genes, while FOX gene with a value of 39 (48.75%) ($p\leq0.001$) and MOX gene with a value of 2 (7.36%) in chromosomal AmpC genes had the highest and lowest frequency, respectively.

**CONCLUSION:** The results of the study showed that the presence of chromosomal and plasmid-encoded AmpC genes may have various frequencies according to the type of clinical specimen.

**KEYWORDS:** *Pseudomonas Aeruginosa, Drug Resistance, Ambler Classification of B-Lactamases, Plasmid, Chromosome.*

**Please cite this article as follows:**

Tahmasebi H, Yousef Alikhani M, Dehbashi S, Arabestani MR. Investigation of the Relationship between the Presence of Chromosomal and Plasmid-Encoded AmpC Genes and Type of Clinical Specimen in *Pseudomonas Aeruginosa*. J Babol Univ Med Sci. 2018; 20(3):36-43.

***Corresponding Author; M.R. Arabestani (PhD)**
**Address:** Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran.
**Tel:** +98 81 23838077
**E-mail:** mohammad.arabestani@gmail.com.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.3.5.3 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.3.36 ]

## References

1.Tuuminen T, Osterblad M, Hamalainen S, Sironen R. Relapsing sepsis episodes of Escherichia coli with CTX-M ESBL or derepressed AmpC genes in a patient with chronic autoimmune pancreatitis complicated by IgG4 hypergammaglobulinaemia. New Microbes New Infect. 2016;9:50-3.

2.Arabestani MR, Rajabpour M, Yousefi Mashouf R, Alikhani MY, Mousavi SM. Correlation Between the Expression of oprd gene and sensitivity to carbapenems of pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical samples using qrt-pcr. Arak Med Univ J. 2015;17(11):70-9. [In Persian].

3.Rezaei F, Saderi H, Boroumandi S, Faghihzadeh S. Relation between resistance to antipseudomonal beta-lactams and ampc and mexc genes of pseudomonas aeruginosa. Iran J Pathol. 2016;11(1):47-53.

4.Bokaeian M, Tahmasebi H. Molecular Identification of Genes Responsible for Resistance to Aminoglycosides and Methicillin in Clinical Samples of Staphylococcus Aureus. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(3):38-46. [In Persian].

5.Rajabpour M, Arabestani mR, Yousefi mashof R, Alikhani MY. MIC determination of Pseudomonas aeruginosa strains were isolated from clinical specimens of patients admitted to educational hospitals in Hamedan (90-91). Iran J Med Microbiol. 2013;7(3):18-25. [In Persian].

6.Salehi Z, Amini K, Kheirkhah B. Molecular identification of quorum sensing genes in clinical strains of pseudomonas aeruginosa and antibiotic resistance profile. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(4):46-53. [In Persian].

7.Ahmadi Roudbaraki Z, Ranji N, Soltani Tehrani B. Deregulation of mexb gene in ciprofloxacin resistant isolates of pseudomonas aeruginosa treated with silibinin-encapsulated in nanoparticles . J Babol Univ Med Sci. 2017;19(11):42-9. [In Persian]

8.Bogaerts P, Huang TD, Bouchahrouf W, Bauraing C, Berhin C, El Garch F, et al. Characterization of ESBL- and AmpC-Producing Enterobacteriaceae from Diseased Companion Animals in Europe. Microb Drug Resist. 2015;21(6):643-50.

9.Bermudes H, Arpin C, Jude F, El-Harrif Z, Bébéar C, Quentin C. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteria in a French hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997;16(7):523-9.

10.Chiquet C, Maurin M, Altayrac J, Aptel F, Boisset S, Vandenesch F, et al. Correlation between clinical data and antibiotic resistance in coagulase-negative Staphylococcus species isolated from 68 patients with acute post-cataract endophthalmitis. Clin Microbiol Infect. 2015;21(6):592.

11.Jansen G, Mahrt N, Tueffers L, Barbosa C, Harjes M, Adolph G, et al. Association between clinical antibiotic resistance and susceptibility of Pseudomonas in the cystic fibrosis lung. Evol Med Public Health. 2016;2016(1): 182-94.

12.Marsik FJ, Nambiar S. Review of Carbapenemases and AmpC-beta Lactamases. Pediat Infect Dis J. 2011;30(12):1094-5.

13.Adabi J, Shahraki Zahedani S, Bokaeian M, Tahmasebi H. An Investigation of the Prevalence of AmpC-producing Pseudomonas aeruginosa in Clinical Samples in Zahedan City, Iran. Qom Univ Med Sci J. 2017;11(4):61-71. [In Persian].

14.CLSI. M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement; 2015.

15.Li Y, Li Q, Du Y, Jiang X, Tang J, Wang J, et al. Prevalence of plasmid-mediated ampc β-lactamases in a chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of cmy-2-type ampc β-lactamase resistance in china. J Clin Microbiol. 2008;46(4):1317-21.

16.Lin S-P, Liu M-F, Lin C-F, Shi Z-Y. Phenotypic detection and polymerase chain reaction screening of extended-spectrum β-lactamases produced by Pseudomonas aeruginosa isolates. J Microbiol, Immunol Infect. 2012;45(3):200-7.

17.Tahmasebi H, Adabi J, Shahraki Zahedani S, Zeyni B. Comparison of two methods of direct pcr and pcr with dna extracted by kit for detection of oprl, exoa, and algd genes in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa. Qom Univ Med Sci J. 2017;11(3):11-21. [In Persian].

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.3.5.3 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.3.36 ]

18.Helmy MM, Wasfi R. Phenotypic and molecular characterization of plasmid mediated ampc beta-lactamases among escherichia coli, klebsiella spp., and proteus mirabilis isolated from urinary tract infections in egyptian hospitals. Biomed Res Int. 2014;2014:171548

19.Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard J-L, Jarlier V, Robert J. Comparison of Nine Phenotypic Methods for Detection of Extended-Spectrum β-Lactamase Production by Enterobacteriaceae. J Clin Microb. 2011;49(3):1048-57.

20.Marra AR, Pereira CAP, Gales AC, Menezes LC ,Cal RGR, de Souza JMA, et al. Bloodstream infections with metallo-β-lactamase-producing pseudomonas aeruginosa: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. Antimicrob Agent Chemother. 2006;50(1):388-90.

21.Cornut PL, Thuret G, Creuzot-Garcher C, Maurin M, Pechinot A, Bron A, et al. Relationship between baseline clinical data and microbiologic spectrum in 100 patients with acute postcataract endophthalmitis. Retina. 2012;32(3):549-57.

22.Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist1. Microbes Infect. 2000;2(9):1051-60.

23.Fisher JF, Mobashery S. 8.13 - Enzymology of Bacterial Resistance. In: Liu H-W, Mander L, editors. Comprehensive Natural Products II. Oxford: Elsevier; 2010. p. 443-87.

24.Gentile RC, Shukla S, Shah M, Ritterband DC, Engelbert M, Davis A, et al. Microbiological spectrum and antibiotic sensitivity in endophthalmitis. Ophthalmol. 2014;121(8):1634-42.

25.Rafiee R, Eftekhar F, Tabatabaei SA, Minaee Tehrani D. Prevalence of extended-spectrum and metallo β-lactamase production in ampc β-lactamase producing pseudomonas aeruginosa isolates from burns. Jundishapur J Microbiol. 2014;7(9):16436.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.3.5.3 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.3.36 ]