بررسی ژنهای بتالاکتامازطیف گسترده تیپ KPC-2 و OXA-10 در ایزوله های بالینی پسودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتربومانی

عهدیه سقا باشی[1] ، هایده مبین[2] * ، بهبود جعفری [3]

1- کارشناسی ارشد ، گروه علوم پایه ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر ، اهر ، ایران
2- دانشیار ، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
3- استاد یار ، گروه علوم پایه ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر ، اهر ، ایران

***نشانی برای مکاتبه:** تبریز، خیابان منظریه ، میدان سلیمان خاطر، دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز. drhmobaiyen@iaut.ac,ir و drhmobaiyen@gmail.com، تلفن: 09143005489 ، نمابر 04134781496

دریافت مقاله: شهریور نود و هفت پذیرش برای چاپ: مهر نود و هفت

چکیده

سابقه و هدف: *این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و اثرات آنتاگونیستی آنها با تمرکز بر بررسی ژن های KPC-2 و OXA-10 در ایزوله های پسودموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتر بومانی انجام گردید.*

روش کار: *الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ، اثرات آنتاگونیستی آنها با ایمی پنم با روش دیسک دیفیوژن آگار و تولید آنزیم های بتا لاکتاماز طیف گسترده ازروش دیسک ترکیبی و MIC ایزوله ها با روش E-test انجام شد.پس از استخراج DNAباکتریهای مورد آزمایش وجود ژن های KPC-2 و OXA-10 همراه با پرایمر اختصاصی 16SrRNA باسیل های گرم منفی با روش PCR دوگانه مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته ها: *بیشترین میزان مقاومت در ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک کاربنی سیلین (7/72٪) و در ایزوله های اسینتوباکتربومانی نسبت به آنتی بیوتیک های کاربنی سیلین، سفتازیدیم، سفتریاکسون و آزترونام (9/92٪) مشاهده گردید. بیشترین اثر آنتاگونیستی در ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا بین ایمی پنم با سفتازیدیم (7/25٪) و (66/25 ٪) به عنوان MDR تعیین شدند در روش دیسک ترکیبی 29 ایزوله (2/36٪) مولد آنزیم های ESBLs بودند در حالیکه با روش PCR به ترتیب 53 ایزوله (2/66٪) و 57 ایزوله (2/71٪) دارای ژن مقاومت بتالاکتاماز KPC-2 و OXA-10 بودند که بسته به نوع باکتری، ژن KPC-2 در پسودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتربومانی بترتیب (7/69٪ و 50٪) و ژن OXA-10 (7/72٪ و 64/3٪) مشاهده گردید.*

نتیجه گیری: *با توجه به گستردگی کسب ژن های مقاومت دارویی در ایزوله های بالینی ، استناد به نتایج آنتی بیوگرام جهت درمان در مراکز بیمارستانی کافی به نظر نمیرسد و نیاز به پایش مداوم سویه های مولد آنزیم های بتا لاکتاماز طیف گسترده و کاربا‌پنماز ی در ابعاد گسترده و تغییر پروتکل درمانی عفونتها بصورت دوره ای ضرورت دارد.*

واژگان کلیدی: بتالاکتاماز وسیع الطیف، پسودوموناس آئروژینوزا، اسینتوباکتربومانی، ژن KPC ، ژن OXA، MIC

مقدمه

عفونت بیمارستانی در تمام کشورهای دنیا اعم از فقیر و غنی تاثیر گذار و از عوامل عمده مرگ و میر بیماران در مراکز درمانی بوده و هزینه های قابل توجهی بر بیمار و سیستم بهداشت و درمان تحمیل می نماید (1).

پسودوموناس آئروژینوزا و اسینتو باکتر بومانی بدلیل ویژگی های خاص این باکتریها، بیشترین عوامل ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی بوده و نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها از جمله بتالاکتام ها مقاومت نشان میدهد که شایعترین مکانیسم مقاومت تجزیه آنزیماتیک آنها به وسیله آنزیم های بتالاکتامازها است(2-4). بر اساس طبقه بندی مولکولار بر مبنای توالی نوکلئوتیدها و اسید آمینه این آنزیم ها چهار کلاس (A-D) از این آنزیم ها شناخته شده است(5). ESBL ها (extended spectrum β- lactamases) گروه A و دسته ای از بتالاکتامازهای D موجب هیدرولیز سفالوسپوزین های نسل اول، دوم ، سوم و منوباکتام شده اما توسط مهار کننده های بتا لاکتامازها از

جمله کلاولانیک اسید مهار و از پلاسمیدهای کد کننده خانواده SHV، TEM، و OXA منشاء می گیرند(7،6). بتالاکتاماز های تیپ KPC تجزیه کننده کارباپنم از کارباپنماز ها متعلق به کلاس مولکولی A می باشند. این آنزیم ها قادر به هیدرولیز پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و آزترونام هستند و به طور ضعیفی با کلاولانیک اسید و تازو باکتام مهار می شوند. آنزیم های KPC همچنین می توانند به تمام کارباپنم ها مانند مروپنم، ایمی پنم، ارتاپنم و دوریپنم نیز مقاومت ایجاد نموده و تا کنون از KPC- 1 تا KPC- 10 ، گزارش شده است.

مشخص شده که ژن های کد گذاری کننده KPC-1 و KPC-2 یکسان بودند. اولین گزارش از یکی از این بتالاکتامازهای KPC-1 و KPC-2 ، از کلبسیلاپنومونیه مقاوم به کارباپنم جدا شده از شمال کالیفرنیا در سال 2001 و دومین گزارش از یک کلبسیلا اکسی توکا بوده است. در حال حاضر، کارباپنماز های KPC-1 و KPC-2 در میان بسیاری از گونه های گرم منفی جدا شده در کشور های مختلف جهان گزارش شده است (8). باکتری های تولید کننده KPC عمدتاً از خانواده انتروباکتریاسه ها هستند ولی پسودوموناس آئروژینوزا و گونه های اسینتوباکتر نیز به ندرت KPC تولید می کنند(9). بتالاکتامازهای تیپ OXA در کلاس D آمبلر طبقه بندی شده و ژن های رمز کننده این آنزیم ها ممکن است روی کروموزوم، پلاسمید، ترانسپوزون باکتریایی و همچنین بر روی اینتگرو ن ها یافت شوند(11،10). برای اولین بار ESBL های نوع OXA در یک نمونه پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از یک بیمارستان واقع در آنکارا در کشور ترکیه شناسایی شدند(12). بتالاکتاماز های تیپ OXA که به اگزا سیلینازها نیز مشهور هستند گروهی از ESBL ها هستند که باکتری را به آمپی سیلین و سفالوتین مقاوم می کنند و با فعالیت هیدرولیتیکی بالا در مقابل اگزاسیلین و کلوگساسیلین تمایز می یابند(14،13).

بتالاکتامازهای OXA در انواع زیادی از گونه های گرم منفی توزیع شده است آنها اغلب در انتروباکتریاسه، پسودوموناس و اسینتوباکتر اکتسابی هستند، در حالی که ژن های کروموزومی آنها به طور طبیعی در اغلب باکتری های گرم منفی مانند آئروموناس، لژیونلا و گونه های کمپیلوباکتر شناسایی شده اند(15). در این مطالعه ، با توجه به شیوع مقاومت های آنتی بیوتیکی بسیار بالادر باکتریهای جدا شده از بیمارستان ها از یک طرف ، و نقش پسودوموناس آئروزینوزا و اسینتوباکتربومانی بعنوان مهم ترین عوامل ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی از طرف دیگر، بررسی تولید بتالاکتاماز طیف گسترده و کارباپنمازها در ایزوله های بیمارستانی با هدف ترسیم دیدگاه های نسبتاً مناسبی از وضعیت مقاومت در منطقه مورد هدف قرار داد.

روش کار

ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتربومانی در طول 7 ماه آخر سال 1393 از نمونه های بالینی مختلف شامل (خلط، زخم، برونش، بافت استخوانی، ریه، تراشه، ادرار و کشت خون) و از بخش های بالینی مختلف بیمارستان عالی نسب، شهداء تبریز و امام خمینی ارومیه جدا شدند.

تعیین هویت قطعی در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده ی پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز با استفاده از روش های معمول بیوشیمایی انجام شد. ایزوله های خالص شده در محیط کشت TSB حاوی 20 ٪ گلیسرول در $70C^{o}$ – جهت انجام آزمایش های بعدی نگهداری شدند.

بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها با روش دیسک دیفیوژن اگار و بر اساس استاندارد (Clinical and laboratory standards jnstitute, CLSI) مقاومت ضد میکربی ارزیابی شد(16). دیسک های آنتی بیوتیک مورد استفاده از شرکت (Himedia)تهیه شد و شامل سفتازیدیم (30µg)، سفتریاکسون (30µg)، ایمی پنم (10µg)، آزترونام (30µg)، کاربنی سیلین (100µg)، پیپراسلین (100µg)، کلیستین (10µg) بود. از سویه استاندارد Escherichia coli ATCC25922 برای ارزیابی کیفیت دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده و صحت روش انجام تست به عنوان سویه کنترل استفاده شد. جهت بررسی اثرات آنتاگونیستی و سینرژیستی بین آنتی بیوتیک های مورد استفاده ، دیسک ایمی پنم به عنوان آنتی بیوتیک شاخص از گروه بتالاکتام ها در مرکز پلیت و سایر دیسک های آنتی بیوتیکی به طور همزمان با رعایت فاصله استاندارد و در شرایط یکسان در مورد تمام ایزوله ها در روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار قرار داده شدند . ایزوله های های مقاوم به، حداقل سه کلاس آنتی بیوتیکی مورد استفاده(کارباپنم ها، سفالوسپورین ها، پنی سیلین ها، مونوباکتام ها و پلی میکسین ها) به عنوان ایزوله های مقاوم به چند دارو(MDR)در نظر گرفته شدند(17).

به دلیل اهمیت بیشتر آنتی بیوتیک های ایمی پنم و پیپراسیلین در درمان عفونت های حاصل از پسودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتربومانی، آزمون تعیین حداقل غلظت بازدارندگی دارو (MIC) با استفاده از نوار های E-test تهیه شده از شرکت Liofilcheme ایتالیا، انجام شد. غلظت E-test انتخابی برای ایمی پنم (IMI) با MIC 0/002 تا 32 میکروگرم در میلی لیتر و برای پیپراسیلین (PIP) با MIC 0/016 تا 256 میکروگرم در میلی لیتر بود. حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) ، هر یک از سویه ها به طور جداگانه برحسب میکروگرم در میلی لیتر یاداشت شدو سپس بر اساس دستورالعمل استانداردهای کلینیکی و آزمایشگاهی (CLSI) به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش گردید. در این روش از سویه استاندارد Escherichia coli ATCC25922 به عنوان سویه کنترل استفاده گردید(18).

برای تأیید تولید ESBL در ایزوله ها از آزمون Combined Disk Test با استفاده از سفتازیدیم (gμ۳۰) و دیسک سفتازیدیم/ کلاولانیک اسید (gμ۳۰/gμ۱۰) تهیه شده از شرکت Himedia استفاده شد. در صورتی که هاله ی عدم رشد اطراف دیسک حاوی کلاولانیک اسید نسبت به بدون کلاولانیک اسید مساوی یا بزرگتر از mm۵ ≥ باشد. ایزوله های مورد نظر را می توان بر طبق استاندارد CLSI ، بعنوان مولد بتالاکتاماز های وسیع الطیف (ESBLs) در نظر گرفته شد(19). در این روش از سویه استاندارد Escherichia coli ATCC25922 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

در این مطالعه استخراج DNA ایزوله ها با استفاده از کیت استخراج DNA GeneALL تهیه شده از شرکت GeneAll Biotechnology کشور کره انجام شد.

برای تکیر ژن های bla_{KPC-2} و bla_{OXA-10} به روش PCR دوگانه دو جفت پرایمر اختصاصی برای ژن KPC-2 ، 16SrRNAونیز ژن OXA-10 ، 16S rRNA بطور همزمان در یک واکنش PCR استفاده شد. مخلوط اصلی واکنش PCR با حجم نهایی 25 میکرولیتر، محتوی (17/35 میکرولیتر آب مقطر، 2/5 میکرولیتر بافر PCR ، 1/75 میکرولیتر $MgCl_2$ ، 1 میکرولیتر $dNTP_S$ ، 0/1 میکرولیتر از هر پرایمر Forward و Reverse ژن های هدف (KPC-2 و OXA-10) ، 0/1 میکرولیتر از هر پرایمر Forward و Reverse ژن 16S rRNA ، 1 میکرولیتر Taq DNA Polymerase) تهیه شد و نهایتاً به هر میکروتیوپ 1 میکرولیتر DNA الگو اضافه گردید توالی پرایمر و دماهای مورد استفاده البته با کمی تغییرات در دما هایی مورد استفاده طبق جدول 1 انتخاب گردید(20،21،22). محصولات PCR در ژل آگاروز 1٪ با ولتاژ 90 به مدت 1 ساعت الکتروفورز شده و سپس در دستگاه Gel Document باندهای مربوطه مشاهده و عکس برداری شدند. جهت تعیین اندازه محصول PCR از سایز مارکر 50bp (شرکت Fermentase) استفاده شد.

جدول 1 : توالی پرایمرها و برنامه زمان بندی واکنش PCR برای ژن های KPC-2 ، OXA-10 و 16S rRNA (21،22،23).

تعداد چرخه	مراحل PCR	درجه حرارت (˚C)	مدت زمان (دقیقه و ثانیه)	پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	اندازه محصول
1	First Denaturation	95	5 دقیقه	KPC-2-F KPC-2-R	5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3' 5'-CTTGTCATCCTTGTTAGGCG-3'	798 bp
10	First Cyclic Denaturation	95	30 ثانیه	OXA-10-F OXA-10-R	5'-GTCTTTCGAGTACGGCATTA-3' 5'-ATTTTCTTAGCGGCAACTTAC-3'	720 bp
	First Annealing and Extension	64	50 ثانیه	16S rRNA-F 16S rRNA-R	5'-GGATTAGATACCCTGGTAGTCC3´ 5´-TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC-3´	320 bp
25	Final Cyclic Denaturation	95	30 ثانیه			
	Final Annealing	62	30 ثانیه			
	Final Extension	72	30 ثانیه			

یافته‌ها

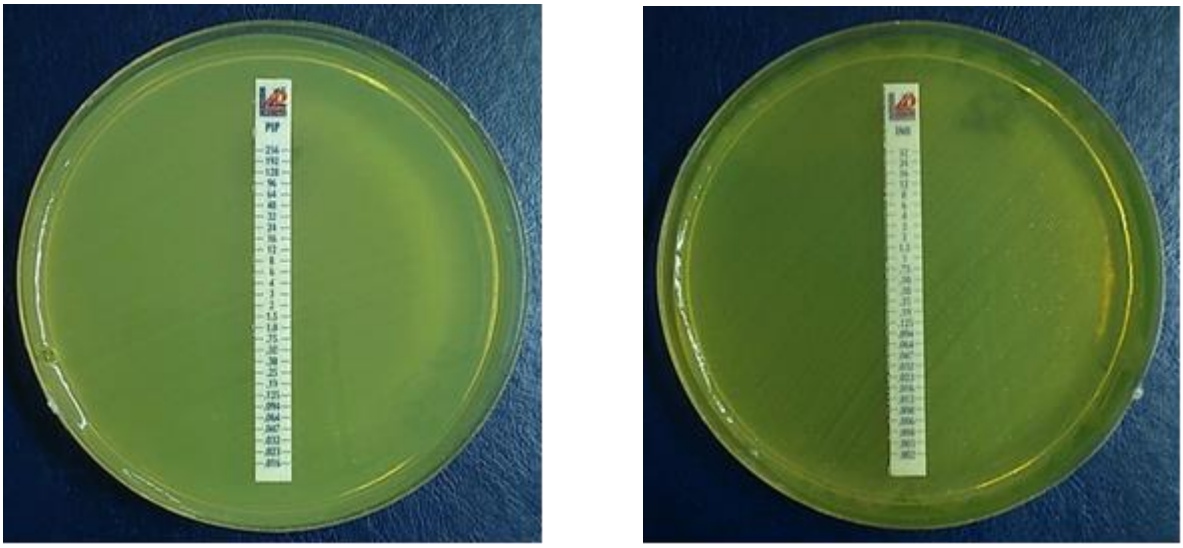
بعد از انجام آزمون های بیوشیمیایی معمول از کل ایزوله های مورد آزمایش 66 ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا و 14 ایزوله اسینتوباکتربومانی از نمونه های مختلف بالینی تعیین هویت شد که بیشترین نمونه بالینی مورد مطالعه خلط با 27 مورد (33/8 ٪) و کمترین آن خون با 2مورد (2/5 ٪) را شامل می شد. یک ایزوله از باکتریها ی مورد مطالعه نسبت به تمام آنتی بیوتیک ها مقاوم بود. در ایزوله های پسودوموناس آئروژینوز ا، اثرات آنتاگونیستی بین ایمی پنم با سفتازیدیم در 17 ایزوله (25٪/7)، سفتریاکسون در15 ایزوله (22/7 ٪)، آزترونام در 13 ایزوله (19/6٪) و پیپراسیلین در 4 ایزوله (6/6 ٪) مشاهده شد . در حالیکه با کاربنی سیلین وکلیستین این اثر قابل مشاهده نبود . در میان ایزوله های اسینتوباکتربومانی هیچگونه اثر آنتاگونیستی یا سنیرژیستی بین ایمی پنم با سایر آنتی بیوتیک های مذکور مشاهده نگردید(جدول 2).

جدول 2 : فراوانی مقاومت دارویی در ایزوله های پسودوموناس آئروجینوزا و آسینتوباکتر بومانی مورد مطالعه

آنتی بیوتیک	تعداد ایزوله ها (درصد)		
	پسودوموناس آئروژینوزا	**اسینتوباکتربومانی**	**جمع کل**
سفتازیدیم	(51/5)34	(92/9)13	(58/8)47
ایمی پنم	(30/3)20	(71/4)10	(37/5)30
سفتریاکسون	(56/0)37	(92/9)13	(62/5)50
کار بنی سیلین	(72/7)48	(92/9)13	(76/2)61
آزترونام	(51/5)34	(92/9)13	(58/8)47
پیپراسیلین	(57/6)38	(78/6)11	(61/2)49
کلیستین	(7/6)5	(0)0	(6/2)5
مقاوم به چند دارو	(60/6) 40	(92/8) 13	(66/25) 53

جهت شناسایی ایزوله های مولد آنزیم های بتا لاکتاماز طیف گسترده از بررسی قطر هاله های مهار رشد و نیز روش ترکیب دو دیسک (combined discses tset,CT) با استفاده از دیسک های سفتازیدم 30 µg و سفتازیدیم/کلاولانیک اسید 10µg /30µg استفاده شد.

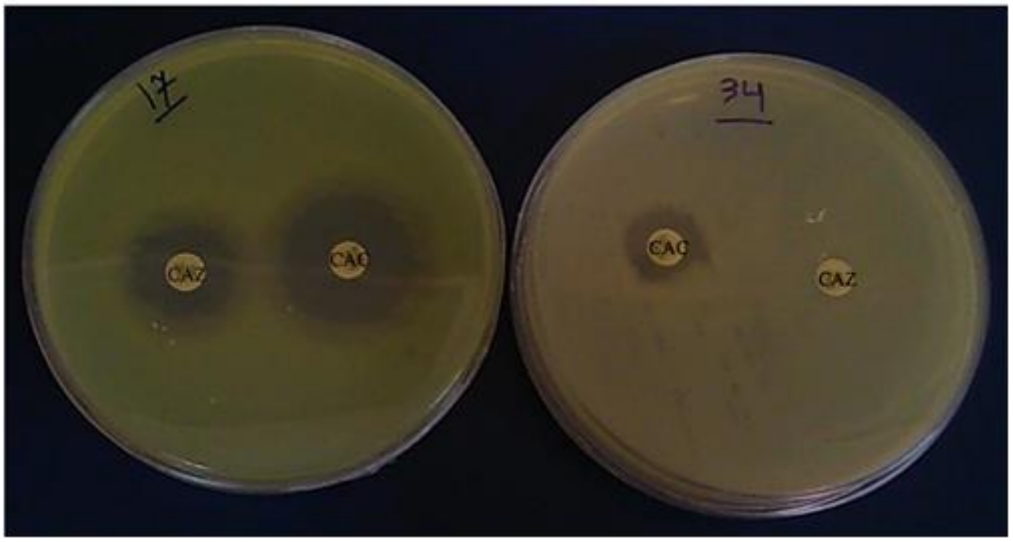
در تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) به روش E-test ایزوله ها با دو نوع نوار E-test ایمی پنم و پیپراسیلین (LIOFLCHEM) آزمایش شدند، شکل1، تصویری نتیجه این آزمون برای یک ایزوله را نشان میدهد. در این مطالعه نتایج MIC ایم پنم در ایزوله های *پسودوموناس آئروجینوزا* و *آسینتوباکتربومانی* به ترتیب 96/6 ٪، 90 ٪ (MIC =(Lm/gµ۳۲≥ و نسبت به پیپراسیلین 93/8 ٪ و 90/9 ٪ (MIC = (>Lm/gµ۲۵۶ را نشان داد.



شکل 1 : نتیجه کشت یک ایزوله پسودوموناس آئروجینوزا با نوار E-Test ایمی پنم (سمت راست) و پیپراسیلین (سمت چپ)

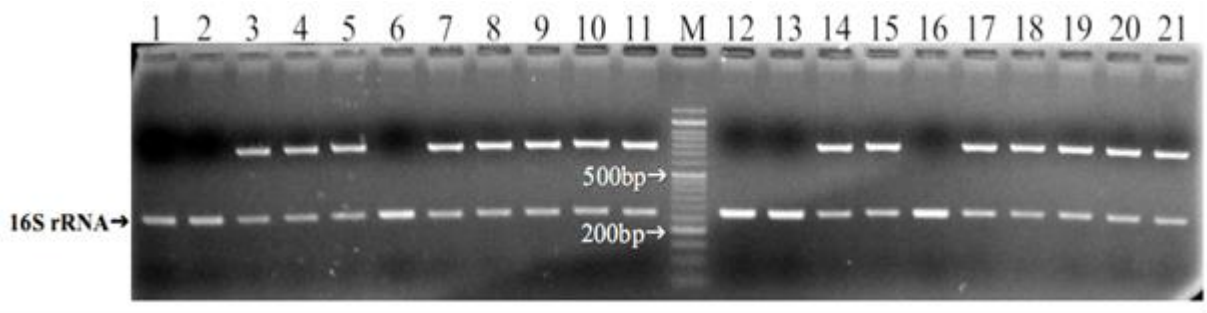
جهت غربالگری اولیه قطر هاله مهار رشد سه آنتی بیوتیک سفتازیدیم (mm 22 ≤) ، سفتریاکسون(mm 25 ≤) و آزترونام(mm 27 ≤) با معیارهای فوق مقایسه با توجه به نتایج ثبت شده در کل ایزوله های مورد آزمایش تمام ایزوله ها با نشان دادن مقاومت حداقل نسبت به یکی از این آنتی بیوتیکها بعنوان ایزوله های تولید کننده ESBLs در نظر گرفته شدند

در آزمون تائیدی CT با سفتازیدیم/ سفتازیدیم + کلاولانیک اسید به ترتیب در ایزوله های پسودوموناس ائروجینوزا و اسینتوباکتر بومانی 27 مورد (40/9 ٪) و 2 مورد (14/3 ٪) بعنوان ایزوله های تولید کننده ESBLs شناسایی شدند. (شکل2) نتیجه CT را در یک ایزوله *پسودوموناس آئروجینوزا* و *آسینتوباکتر بومانی* را نشان میدهد



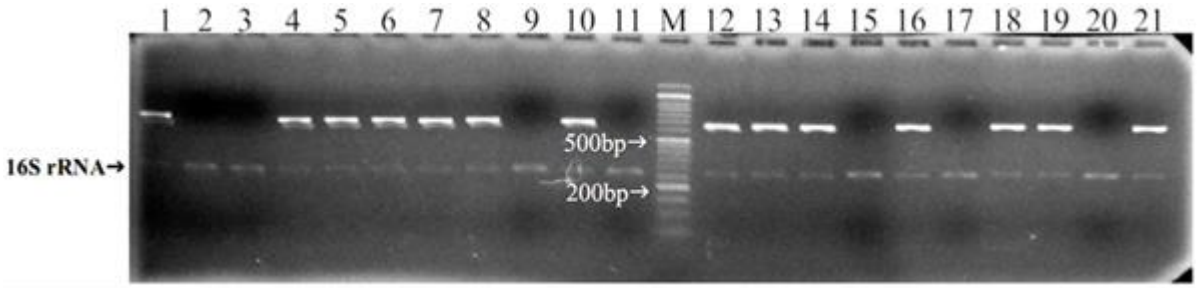
شکل 2 : شکل تست فنوتیپی به روش Combined disc method برای پسودوموناس آئروژینوزا (سمت چپ) و اسینتوباکتربومانی (سمت راست).

در ارزیابی نتایج PCR ژن آنزیم bla KPC-2 باند واضحی در ناحیه **798** bp مشاهده شد(شکل 3). ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا 46 مورد (69/7 ٪) و اسینتوباکتربومانی 7 مورد (50 ٪) واجد ژن KPC-2 بودند. در حالیکه ، در مقایسه با نتایج مقاومت ایزوله ها نسبت به آنتی بیوتیک ایمی پنم ، 20 ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا (33/3 ٪) و 10 ایزوله اسینتوباکتربومانی (71٪/4) به نظر میرسید که دارای فعالیت ناشی از تولید آنزیم کارباپنمازی را داشته باشند. شکل 3 محصول الکتروفورز حاصل از تکثیرژن آنزیم bla KPC-2 را نشان میدهد.



شکل 3: الکتروفورز محصول Duplex- PCR حاصل از تکثیر قطعه مورد نظر از ژن KPC-2 با طول تقریبی 798 bp و 16S rRNA با طول تقریبی 320 bp. M: سایز مارکر با اندازه 50 bp ؛ ستون 12: کنترل منفی
ستون های 3-5، 7 - 11 ، 14 ، 15 ، 17-21 : ایزوله های دارای ژن KPC-2
ستون های 1، 2 ، 6 ، 13 و 16 : ایزوله های فاقد ژن KPC-2

در بررسی نتایج حاصل از تکثیر ژن آنزیم bla OXA-10 باند واضحی در ناحیه 720 bp در الکتروفورز مشاهده شد(شکل4). در کل از 66 ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا 48 مورد (72/7 ٪) و از 14 ایزوله اسینتوباکتربومانی 9 مورد (64/3 ٪) واجد ژن bla OXA-10 بودند. در مقایسه نتایج PCR با نتایج آزمایش تاییدی CT در بین ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا 20 ایزوله از بین27 مورد مولد آنزیم ESBLs و هر 2 ایزوله اسینتوباکتربومانی مولد آنزیم ESBLs دارای ژن bla OXA-10 بودند. لازم به ذکر است که بر اساس نتایج PCR در ایزوله های مورد آزمایش، مشخص شد 34 ایزوله (42٪/5) به طور همزمان دارای هر دو ژن bla KPC-2 و bla OXA-10 بودند که از این میان 31 ایزوله (46/9 ٪) متعلق به ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا و 3 ایزوله (21٪/4) مربوط به ایزوله های اسینتوباکتربومانی بود.



شکل 4 : الکتروفورز محصول Duplex- PCR حاصل از تکثیر قطعه مورد نظر از ژن OXA-10 با طول تقریبی 720 bp و 16S rRNA با طول تقریبی 320 bp ، M: سایزمارکربا اندازه 50 bp : ستون11 : کنترل منفی
ستون های 1،4،5،6،7،8،10،12،13،14،16،18،19،21 : ایزوله های دارای ژن OXA-10
ستون های2،3،9،11،15،17،20 : ایزوله های فاقد ژن OXA-10

بحث

بروز کارباپنماز ها آنزیم های بتا لاکتاماز طیف گسترده و انتشار جهانی و مقدار مقاومت ضد میکروبی آنها سبب افزایش مرگ و میر در کلیه جوامع جهانی شده است(24) که این امر لزوم بررسی های منطقه ای و حتی هر واحد کلینیکی را به طور مجزا نشان می دهد. در بیمارستانهای مورد بررسی در این مطالعه ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتر به ترتیب مقاومت بالای 50 ٪ و 70 ٪ را نسبت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه نشان دادند و این در حالی است که مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک کلیستین به ترتیب در پسودوموناس آئروژینوزا و اسینتوبا بومانی نیز 7/6 ٪ و 0 ٪ و نسبت به ایمی پنم 30/3 ٪ و 71/4 ٪ را نشان می دهد. که این هم می تواند سبب نگرانی در امر از دست دادن دارو های انتخابی در درمان این دو گونه باکتریائی باشد. در مطالعه صادقی فرد(25) و دشتی زاده و همکاران در سال 1393، ٪100 ایزوله ها حساس به کلیستین در حالیکه در مطالعه شاهچراغی 4/2 ٪ مقاوم(26) و در مطالعه طبا طبایی و همکاران در سال 1392، 13/3 ٪ (27) و رابرت و همکاران در پیتسبورگ روسیه 2/6 ٪ (28) گزارش شده و این نتا یج حاکی از دست دادن تدریجی کلیستین در کلینیک در آینده نزدیک خواهد بود. مقاومت نسبت به کاربنی سیلین در این مطالعه در ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتر به ترتیب برابر با 72/7 ٪ و 92/9 ٪ نشان داده شد که در مطالعات دیگر مثل مطالعه صادقی فرد و همکاران(25) مقاومت نسبت به کار بنی سیلین برابر 100 ٪ ، مطالعه پیمانی و همکاران(29) برابر با 35 ٪ و مطالعات از نقاط دیگر جهان مثل برزیل با 57/1٪، زیمباوه 61/9٪ و روسیه 98/3٪ (30) گزارش شده است. مقاومت نسبت به ایمی پنم در جهان و در ایران رو به رشد می باشد بطوریکه در مطالعه نهایی و همکاران در سال 1386 (2 ٪) (28) و مطالعه مهاجری در سال 1380 (10 ٪) و در همان سال در ژاپن 3/ 8 ٪، روسیه 4/ ٪13، فرانسه 5/ 18٪، کانادا 12٪ و اسپانیا 14٪ (30) گزارش شده بود. در حالیکه این میزان مقاومت در ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا در لتونی 23/9٪، در کره 20/5٪ و در اسپانیا 14٪ (31) گزارش شده است. مقاومت نسبت به ایمی پنم در مطالعه حاضر 30/3 ٪ برای ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا و 71/4 ٪ برای ایزوله های اسینتوباکتربومانی گزارش شد. ضمن اینکه این دارو در ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا با سفتازیدیم 25/7 ٪ ، با سفتریاکسون در 22/7 ٪ و آزترونام 19/6 ٪ و با پیپراسیلین 6/6 ٪ موارد اثرات آنتا گونیستی را نشان داد که این امر مصرف همزمان این داروها در عفونت های مهم را زیر سوال می برد. ضمن اینکه 36/2 ٪ از ایزوله های مورد مطالعه مولد $ESBL_s$ بودند که نشان دهنده این است که حتی با وجود حساسیت در شرایط آزمایشگاهی مصرف آنتی بیو تیک های گروه بتالاکتام از کارآیی کافی در درمان بر خوردار نخواهد بود از تولید آنزیم های بتالاکتاماز و کارباپنماز در پسودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتر به ترتیب ژن OXA-10 (7 /72 ٪ ، 64/3 ٪) و ژن KPC-2 (69/7 ٪ ، 50 ٪) را بیان کرده بودند. در مطالعه Johanna و همکاران در سال 2014 در کلمبیا 11/5٪ (32) در مطالعه Robledoو همکاران به ترتیب در سال 2010 و 2011 در پورتوریکو (3/4٪) و (14 ٪) از اسینتوباکتربومانی جدا شده (34،33) و در مطالعه ای Anis Karuniawati و همکاران در سال 2011 در اندونزی در 0 ٪ از ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا (21) ژن KPC گزارش شد. در مورد پسودوموناس آئروژینوزا در مطالعه گلشنی و همکاران، در سال 2013 در شهر اصفهان (60 ٪) ایزوله ها، در مطالعه Vatcheva-Dobrevska و همکاران در سال 2013 در بلغارستان (48٪) ایزوله ها و در مورد اسینتوباکتربومانی در مطالعه Haluk Vahaboglu و همکاران در سال 1998 در ترکیه هیچ یک از ایزوله ها (صفر٪) ، در مطالعه رحیم زاده و همکاران در سال 1391 در تبریز (8٪/3) ایزوله ها از نظر ژن OXA-10 مثبت بودند(35-38).

نتیجه گیری

با توجه به اینکه ژن های مقاومت مثل OXA-10 بر روی عناصر ژنتیکی متحرک مثل اینتگرون ها قرار دارند، می توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند. لذا شناسایی این نوع ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی از اهمیت بالایی برخوردار بوده و جهت اجرای برنامه های کنترل عفونت و ممانعت از انتشار سویه های مقاوم ضروری می باشد.

REFERENCES

Refernces:

1. Jalal Pour SH, Kasra Kermanshahi R, Nouhi AS, Zarkesh Isfahani H. Comparing the Frequency of β -lactamase Enzyme in Isolated Nosocomial Infectious Bacteria. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 2010; 12(4):3-10.
2. Delissalde F, Amábile-Cuevas CF. Comparison of antibiotic susceptibility and plasmid content, between biofilm producing and non-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Antimicrobial Agents. 2004 Oct 1; 24(4):405-8.
3. Pooshaneh S, Farajnia S, Soleimani Dorjag M, Rahbarnia L, Ansarin Kh, Sohrabi N, Peymani A. Prevalence of Extended-Spectrum β-Lactamase class A among Acinetobacter baumannii isolates from patients of Imam Reza hospital, Tabriz. *Pharmaceutical Sciences*.2012; 17(4):225-232.
4. Valizadeh A, Sadeghifard N, Zolfaghary M, Maleki A, Ghafourian S. Study of Mutation Frequency in PA3721 Gene amongProducing and Non-producing ESBLs *Pseudomonas aeruginosa* Strainsby PCR method. *Scientific journal of ilam university of medical sciences*. 2012 Aug 15; 20(2):38-43.
5. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β-lactamases. *Research in Microbiology*. 2004 Jul 1; 155(6):409-21.
6. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β-lactamases. *New England Journal of Medicine*. 2005 Jan 27; 352(4):380-91.
7. Bradford PA. Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews*. 2001 Oct 1; 14(4):933-51.
8. Sacha P, Ostas A, Jaworowska J, Wieczorek P, Ojdana D, Ratajczak J, Tryniszewska E. The KPC type beta-lactamases: new enzymes that confer resistance to carbapenems in Gram-negative bacilli. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2009; 47(4):537-43.
9. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet infectious diseases*. 2009 Apr 1; 9(4):228-36.

10. Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006 Jan 30; 57(3):373-83.
11. Rasheed JK, Jay C, Metchock B, Berkowitz F, Weigel L, Crellin J, Steward C, Hill B, Medeiros AA, Tenover FC. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997 Mar 1; 41(3):647-53.
12. Hawkey PM. Prevalence and clonality of extended-spectrum β-lactamases in Asia. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008 Jan; 14:159-65.
13. Joshi SG, Litake GM, Ghole VS, Niphadkar KB. Plasmid-borne extended-spectrum β-lactamase in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of medical microbiology*. 2003 Dec 1; 52(12):1125-7.
14. Gazouli M, Sidorenko SV, Tzelepi E, Kozlova NS, Gladin DP, Tzouvelekis LS. A plasmid-mediated beta-lactamase conferring resistance to cefotaxime in a *Salmonella typhimurium* clone found in St Petersburg, Russia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1998 Jan 1; 41(1):119-21.

15. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010 Jan 1; 54(1):24-38.
16. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010 Aug 1; 300(6):371-9.
17. Ambler RP. The structure of β-lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 1980 May 16; 289(1036):321-31.
18. Angoti G, Godarzi H, Besharat M, Hajizadeh M, Zarringhalam Moghaddam M. Evaluation of antibiotic resistance of clinical Acinetobacter baumannii isolated of Tabriz hospital by disk diffiusion and MIC methods. Research in Medicine. 2014; 38 (2) :106-110
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria 2004; M100-S14.
20. Shojapour M, Shariati L, Karimi A, Zamanzad B. Prevalence of TEM-1 type beta-lactmase genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn infections using Duplex PCR in Shahrekord, 2008. *J Arak Univ Med Sci*. 2011; 14(1).
21. Anis Karuniawati YR, Lestari DC. Detection of carbapenemase encoding genes in *Enterobacteriace, Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumanii* isolated from patients at Intensive Care Unit Cipto Mangunkusumo Hospital in 2011. *Acta. Med. Indones*. 2013; 45:101-6.
22. Alipour, T., et al. Incidence of Extended Spectrum Beta-lactamase Producing *Pseudomonas Aeruginosa* and Frequency of OXA-2 and OXA-10 Genes. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2010; 4(8): 3202-3207.
23. Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant *enterococci*. *Journal of clinical microbiology*. 2000 Aug 1; 38(8):3092-5.
24. Gautier G, Guillard T, Podac B, Bercot B, Vernet-Garnier V, de Champs C. Detection of different classes of carbapenemases: Adaptation and assessment of a phenotypic method applied to *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, and proposal of a new algorithm. *Journal of microbiological methods*. 2018 Apr 1; 147:26-35.
25. Sadeghifard NK, Ranjbar R, Ghasemi A, et al. A study of antimicrobial resistance of *acinetobacter baumannii* and non-*acinetobacter baumannii* strains isolated from three hospitals in Tehran. *J Ilam Univ Med Sci* 2006; 14(3):29-34. [In Persian]
26. Shahcheraghi F, Akbari Shahmirzadi N, Abbas Alipour Bashash M, Jabbari H, Amir Mozafari N. Detection of blaCTX ,blaTEM beta-lactamase genes in clinical isolates of *acinetobacter* spp. from selected Tehran hospitals. *Iran J Med Microbiol* 2009; 3(1):1-9. [In Persian]
27. Tabatabaee SA, Nariman S, Taghipour R. Antibiogram and genotype of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *The Journal of Urmia University of Medical Sciences.* 2013; 24(3):184-92.
28. Nahaei M, Bohloli Khiavi R, Asgarzadeh M, Hasani A, Sadeghi J, Akbari Dibavar M. Antibiotic Resistance and Plasmid Profiles of Pseudomonas Aeruginosa Strains Isolated from In-Patients of Sina Hospital-Tabriz . J Ardabil Univ Med Sci. 2007; 7 (1) :90-98
29. Peymani A, Farivar TN, Rahimi H, Ranjbar M, Najafipour R. Frequency of class I integron among multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the selected hospitals in Qazvin and Tehran, Iran. Qom University of Medical Sciences Journal. 2014 Aug 23; 8(3).
30. Mohajeri P. Antibiotic Pattern of *Pseudomonas aeruginosa.* Journal of Kermansha University of Medical Sciences. 2004; 7(4):11-20
31. kanani M, khadiri T, khazaei S, madani S H, malekianzadeh E. Study of psuedomomas aeroginosa resistance to Ceftizidim and Imipenem in Kermanshah Imam reza hospital during 2006-2011. yafte. 2014; 15 (4) :52-60
32. Vanegas JM, Cienfuegos AV, Ocampo AM, López L, Del Corral H, Roncancio G, Sierra P, Echeverri L, Ospina S, Maldonado N, Robledo C. Similar Frequency of *Pseudomonas aeruginosa*

Producing KPC and VIM Carbapenemases in Diverse Genetic Clones at Tertiary–Care Hospitals in Medellín, Colombia. *Journal of clinical microbiology*. 2014 Sep 10: JCM-01879.

33. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010 Mar 1; 54(3):1354-7.
34. Robledo IE, Aquino EE, Vázquez GJ. Detection of KPC gene in Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011 Mar 28.
35. Golshani Z, Ahadi AM, SHarifzadeh A. Outbreak of ambler class A and D b-lactamase in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from non burn patients. *African Journal of Microbiology Research*. 2013 May 21; 7(21):2646-50.
36. Vatcheva-Dobrevska R, Mulet X, Ivanov I, Zamorano L, Dobreva E, Velinov T, Kantardjiev T, Oliver A. Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgarian hospitals. *Microbial Drug Resistance*. 2013 Oct 1; 19(5):355-61.
37. Vahaboglu H, Saribaş S, Akbal H, Ozturk R, Yucel A. Activities of cefepime and five other antibiotics against nosocomial PER-1-type and/or OXA-10-type beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1998 Aug 1; 42(2):269-70.
38. Rahimzadeh A, Farajnia S, Pourbabaee AA, Ansarin KH, Zolfaghari MR, Masoudi N. Detection of Prevalence of OXA-2 and OXA-10 Type ESBL and Class I integron among *acinetobacter bumanii* strains isolated from patients of Tabriz city (Iran) by PCR technique. *J Babol Univ Med Sci*; 2012; 14(5): 56-63.