

Investigation of the Emergence of Multi-Drug Resistance Mediated by blaDHA β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients¹

Azher Talib Alvan

Department of Biology, Faculty of Convergent Sciences and Technologies, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

azhertalib08@gmail.com

Bita Behboodian

Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Ma.C., Islamic Azad University of Mashhad, Iran (**Corresponding author**).

b.behboodian@mshdiau.ac.ir

Samaneh Dolatabadi

Department of Biology, Ne.C., Islamic Azad University, Neyshabur, Iran. s_dolatabadi1436@yahoo.com

Matin Setayesh

Biotechnology Research Center, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran. matins.setayesh@gmail.com

Abstract

Objective: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that causes chronic pulmonary infections in cystic fibrosis patients. In addition, *Pseudomonas aeruginosa* is one of the pathogens responsible for nosocomial infections. *Pseudomonas aeruginosa* is highly resistant to antibiotics and has been classified by the World Health Organization as a "critical" pathogen that urgently needs new antibiotics. The presence of the blaDHA gene in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients hospitalized in a selected military hospital between 1402 and 1403 was investigated.

Materials and Methods: In this study, 141 clinical samples including blood, urine, wound and trachea from nosocomial infections in one of the selected hospitals in Khorasan Razavi were examined. *Pseudomonas aeruginosa* samples were identified by biochemical tests. Their antibiotic susceptibility was assessed by disk diffusion method. After primer design and bacterial DNA extraction, the frequency of blaDHA gene presence in isolates was assessed by PCR technique.

Findings: The isolation rate of *Pseudomonas aeruginosa* was 5.8% of all hospital infections, which was higher than the samples from intensive care units (4%) and trachea (4.5%). The results of the antibiogram test showed 100% resistance to cefazolin and ampicillin. After that, the highest resistance rate was observed to the antibiotic cefisoxime (87.5%), and the lowest resistance rate was observed to imipenem (0.7%). All isolates were reported to be sensitive to doxycycline. After examining the PCR results, 2.3% of the isolates carried the blaDHA gene.

¹ Received: 2024/06/01 ; Revised: 2024/06/28 ; Accepted: 2024/08/11; Published online: 2024/10/03



Conclusion: The findings showed that the distribution of blaDHA gene in Iranian *Pseudomonas aeruginosa* isolates is limited, although this issue requires further studies.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Beta-Lactamases, blaDHA, Multi Drug Resistance, Biofilm.



بررسی بروز مقاومت دارویی با واسطه بتالاکتاماز *blaDHA* در سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران^۲

ازهر طالب الوان

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

azhertalib08@gmail.com

بی‌تا بهبودیان

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، ایران (نویسنده مسئول).

b.behboodian@mshdiau.ac.ir

سمانه دولت‌آبادی

گروه زیست‌شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران. s_dolatabadi1436@yahoo.com

متین ستایش

مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران. matins.setayesh@gmail.com

چکیده

هدف: سودوموناس آئروژینوزا یک بیماری‌زا فرصت‌طلب است که باعث عفونت‌های مزمن ریوی در بیماران فیروز کیستیک می‌شود. علاوه بر این، سودوموناس آئروژینوزا یکی از پاتوژن‌های مسئول عفونت‌های بیمارستانی است. سودوموناس آئروژینوزا در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار مقاوم است و توسط سازمان بهداشت جهانی در گروه "بحرانی" بیماری‌زها قرار گرفته است که نیاز فوری به آنتی‌بیوتیک‌های جدید دارند. حضور ژن *blaDHA* در سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده از بیماران بستری در بیمارستان منتخب نظامی در فاصله سال‌های ۱۴۰۳-۱۴۰۲ بوده است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، تعداد ۱۴۱ نمونه بالینی شامل خون، ادرار، زخم و نای از عفونت‌های بیمارستانی یکی از بیمارستان‌های منتخب در خراسان رضوی بررسی شد. نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا با آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها با روش انتشار دیسک ارزیابی شد. پس از طراحی پرایمر و استخراج DNA باکتریایی، فراوانی حضور ژن *blaDHA* در جدایه‌ها با تکنیک PCR ارزیابی شد.

یافته‌ها: میزان جداسازی سودوموناس آئروژینوزا ۵۸٪ از کل عفونت‌های بیمارستانی بود که بیشتر از نمونه‌های بخش مراقبت‌های ویژه (۴٪) و نای (۴۵٪) بود. نتایج آزمایش آنتی‌بیوگرام، مقاومت ۱۰۰٪ به سفازولین و آمپی‌سیلین را نشان داد. پس از آن،

^۲ تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۱ ؛ تاریخ اصلاح: ۱۴۰۳/۰۴/۰۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۱ ؛ تاریخ انتشار آنلاین: ۱۴۰۳/۰۷/۱۲



بیشترین میزان مقاومت به آنتی بیوتیک سفیزوکسیم (۸۷.۵٪)، و کمترین میزان مقاومت به ایمپنم (۰.۷٪) مشاهده شد. همه جدایه‌ها به داکسی سایکلین حساس گزارش شدند. پس از بررسی نتایج PCR، ۲.۳٪ از جدایه‌ها حامل ژن *blaDHA* بودند. نتیجه گیری: یافته‌ها نشان داد که توزیع ژن *blaDHA* در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا ایرانی محدود است، اگرچه این موضوع نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

کلیدواژه‌ها: سودوموناس آئروژینوزا، بتالاکتاماز، *blaDHA*، مقاومت چند دارویی، بیوفیلم.



مقدمه

مقاومت چند دارویی MDR، Multi-Drug Resistance زمانی رخ می‌دهد که در باکتری‌ها مکانیسم‌هایی تکامل پیدا کنند که به آن‌ها اجازه می‌دهد در برابر چندین آنتی‌بیوتیک که معمولاً علیه آن‌ها موثر هستند، زنده بمانند. این مقاومت گزینه‌های درمانی را کاهش داده و مدیریت عفونت‌ها را پیچیده‌تر می‌کند (۱، ۲). شیوع باکتری‌های مقاوم به درمان در سراسر جهان رو به افزایش است و برآوردها نشان می‌دهند که عفونت‌های مقاوم به عوامل ضد میکروبی، در صورت عدم کنترل، می‌توانند تا سال ۲۰۵۰ سالانه به ۱۰ میلیون مرگ منجر شوند (۱). از این رو MDR پروتکل‌های درمانی را پیچیده‌تر کرده و منجر به طولانی‌تر شدن بیماری، افزایش احتمال شکست درمان و افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی می‌شود (۱، ۳). مدیریت عفونت‌های ناشی از باکتری‌های MDR چالش برانگیز است، زیرا مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های موثر را به‌ویژه در عفونت‌های باکتری‌های گرم منفی که اغلب مقاومت بالایی دارند کاهش داده است (۴). درک بین تفاوت بین MDR فنوتیپ‌های کاملاً مقاوم Pan-drug resistance، PDR در سودوموناس آئروجینوزا بسیار مهم است (۵). همان‌طور که گفته شد در فنوتیپ MDR باکتری حداقل به سه دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون‌ها از طریق تولید آنزیم‌های مقاومت‌زا، از خود مقاومت نشان می‌دهد در حالی که در فنوتیپ PDR گونه باکتریایی به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است (۵). با توجه گزینه‌های درمانی محدود شناخت این فنوتیپ الزامی است.

سودوموناس آئروجینوزا یک باکتری گرم منفی محیطی است که به‌طور گسترده در طبیعت یافت می‌شود و به عنوان یک عامل بیماری‌زای فرصت‌طلب، به‌ویژه در محیط‌های بیمارستانی، شناخته شده است (۶). سودوموناس آئروجینوزا یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی است که به‌ویژه در بیماران مبتلا به نقص ایمنی، مانند افراد مبتلا به سرطان یا بیماری‌های مزمن، باعث ایجاد عفونت‌های شدید با میزان بالای مرگ‌ومیر و بیماری می‌شود (۷). این باکتری به‌طور ذاتی نسبت به بسیاری از ترکیبات ضد میکروبی مقاوم است که این ویژگی ناشی از سیستم‌های مؤثر پمپ افلاکس، نفوذپذیری پایین غشای خارجی و تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (۷). سویه‌های MDR این باکتری به‌طور فزاینده‌ای رایج هستند و چالش‌های درمانی قابل توجهی را ایجاد می‌کنند (۷).

تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروجینوزا یک فرآیند پیچیده و چندمرحله‌ای شامل اتصال اولیه، اتصال غیر قابل برگشت و میکروکلنی، بلوغ بیوفیلم و در نهایت انتشار است که موجب افزایش بقای باکتری، تحمل نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش بیماری‌زایی می‌شود و باعث دشوار شدن درمان عفونت‌ها می‌گردد (۸). بیوفیلم‌ها نقش اساسی در توانایی سودوموناس آئروجینوزا برای ایجاد عفونت‌های مزمن دارند، به‌ویژه در ریه‌های بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک، زخم‌های مزمن، و بر روی تجهیزات پزشکی مانند کاتترها و ایمپلنت‌ها (۹). سلول‌های وابسته به بیوفیلم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و پاسخ‌های ایمنی میزبان تحمل بیشتری دارند، که درمان این عفونت‌ها را به‌شدت دشوار می‌کند (۹).

ژن *blaDHA* در سودوموناس آئروجینوزا یک آنزیم بتا-لاکتاماز نوع AmpC را رمزگذاری می‌کند که به مقاومت این باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام کمک می‌کند (۱۰). ژن *blaDHA* یک بتا-لاکتاماز کلاس C تولید می‌کند که قادر به هیدرولیز طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام، از جمله سفالوسپورین‌ها است. این فعالیت آنزیمی موجب کاهش اثربخشی این



آنتی بیوتیک‌ها و ایجاد مقاومت می‌شود (۱۱). ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروجینوزا حامل ژن *blaDHA* معمولاً الگوهای MDR را نشان می‌دهند که گزینه‌های درمانی را پیچیده می‌کند (۱۱، ۱۲). نقش این ژن در مقاومت حائز اهمیت است زیرا دامنه آنتی بیوتیک‌های بتا-لاکتام غیرقابل اثرسازی را گسترش می‌دهد (۱۱، ۱۲).

ماتریکس‌های بیوفیلم در سودوموناس آئروجینوزا اغلب شامل آلزینات‌ها هستند که نقش مهمی در ساختار بیوفیلم ایفا می‌کنند. با این حال همانطور که گفته شد *blaDHA* ارتباط بیشتری با مکانیسم‌های مقاومت آنتی بیوتیکی دارد (۱۳). وجود *blaDHA* در ایزوله‌هایی که تشکیل بیوفیلم قوی دارند، ممکن است به افزایش تحمل آنتی بیوتیکی کمک کند؛ زیرا ترکیبی از حفاظت فیزیکی توسط بیوفیلم و تخریب آنزیمی آنتی بیوتیک‌ها را ارائه می‌دهد (۹). با این حال، فرآیندهای تنظیمی حاکم بر تشکیل بیوفیلم شامل مسیرهای تنظیمی و ساختاری مستقل از بیان *blaDHA* هستند (۹).

هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن *blaDHA* در سویه‌های بالینی سودوموناس آئروجینوزا جداسازی شده از بیماران بستری در بیمارستان منتخب نظامی در فاصله سال‌های ۱۴۰۳-۱۴۰۲ بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی جدایه‌ها

تعداد ۱۴۱ نمونه بالینی مرتبط با عفونت بیمارستانی مورد نیاز در این تحقیق از ادرار، زخم، ترشحات ریه یا خلط و خون طی نمونه‌گیری از بخش‌های ICU، CCU، قلب، زنان، جراحی، ارتوپدی، داخلی، اطفال و NICU یک بیمارستان منتخب نظامی خراسان رضوی جمع‌آوری شدند. ملاک تشخیص بر اساس تعاریف CDC2 بود. نمونه‌های جداسازی شده بر روی محیط‌های ستریماید آگار، بلاد آگار و مک‌کانکی آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. جهت تایید سویه‌های بالینی از روش‌های فنوتیپی رنگ‌آمیزی گرم و بررسی شکل و رنگ کلنی‌ها استفاده شد. از تست‌های بیوشیمیایی اکسیداز، TSI، تست حرکت و رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، کاتالاز، اوره‌آز، سیمون سترات و تولید H_2S جهت تشخیص استفاده گردید.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از آنتی بیوگرام

جهت تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروجینوزا از روش دیسک دیفیوژن طبق استانداردهای CLSI استفاده شد (۱۴). ابتدا از کشت ۲۴ ساعته و خالص باکتریایی، سوسپانسیونی در نرمال سالین با OD معادل با ۰/۵ مک‌فارلند آماده‌سازی شد. سپس با استفاده از سوآپ استریل مقداری از سوسپانسیون باکتریایی در محیط مولر هینتون آگار به صورت چمنی و یکدست کشت داده شد. جهت جذب رطوبت اضافی محیط‌های کشت، پلیت‌های به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند. دیسک‌های آنتی بیوتیکی (جدول ۱) در فاصله‌ی مناسب و استاندارد از یکدیگر و از لبه‌ی پلیت قرار داده شدند. قطر هاله عدم رشد بعد از ۱۸-۲۴ ساعت از قرار دادن پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با استفاده از کولیس برای هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج مطابق با دستورالعمل CLSI در سه گروه حساس، نیمه‌حساس و مقاوم گزارش شد.

جدول ۱. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده و دوز مصرفی

دوز (μg)	آنتی‌بیوتیک	دوز (μg)	آنتی‌بیوتیک
۳۰	Ceftazidime	۳۰	Ceftizoxime
۳۰	Cefepim	۳۰	Cefotaxime
۱۰	Imipenem	۳۰	Ceftriaxone
۱۰	Colistin	۵	Cefixime
۳۰	Aztreonam	۵	Ciprofloxacin
۱۰	Meropenem		Co-trimoxazol
	Pipractam	۳۰	Amikacin
۳۰	Cefepime	۲۰	Co -amoxic
۵	Levofloxacin	۱۰	Amoxicillin
۵	Rifampin	۱۰	Gentamycin
۱۰	Norfloxacin	۵	Ofloxacin
۳۰۰	Nitrofurantoin	۱۰	Nalidixic acid

استخراج DNA باکتری، تایید استخراج، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR^۳) و بررسی محصولات

استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت سیناکلون (SinaPure DNA (EX6001) انجام شد. در این روش تعدادی کلنی در بافر پروتئاز به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس رسوب سانتریفوژ و به عنوان الگو استفاده گردید. برای تایید استخراج DNA، از ژل آگارز ۲ درصد استفاده گردید. جهت انجام فرایند PCR با دستگاه Veriti™ Thermal Cyclor ژن *blaDHA* از پرایمرهای جدول ۲، مطابق با برنامه جدول ۳ استفاده شد. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شدند و حضور ژن *blaDHA* با استفاده از دستگاه ژل داکيومنتاری و توسط امواج UV بررسی گردید. برای تحلیل نتایج حاصل‌شده از آزمون تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و PCR ژن *blaDHA*، از نرم افزار SPSS استفاده شد.

جدول ۲. توالی الیگونوکلوئیدی پرایمرهای *blaDHA*

اندازه محصول (bp)	توالی نوکلئوتیدی پرایمر
	پرایمر
	<i>F-blaDHA</i> AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT

^۳ Polymerase Chain Reaction

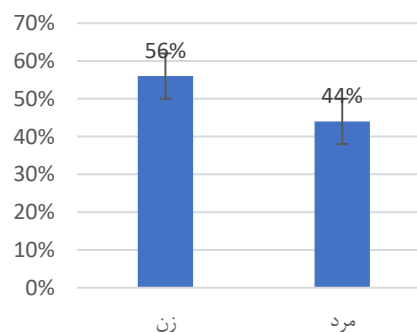
جدول ۳. برنامه دمایی برای تکثیر ژن *blaDHA*

طویل سازی	تکثیر			
	اولیه	واسرشت شدن	اتصال پرایمر	طول سازی نهایی
	۹۴ °C	۹۴ °C	۶۰ °C	۷۲ °C
	۲ دقیقه	۱ دقیقه	۱/۵ دقیقه	۱ دقیقه
	۱ چرخه	۳۰ چرخه		۱ چرخه

نتایج

جمع آوری نمونه و فراوانی ها

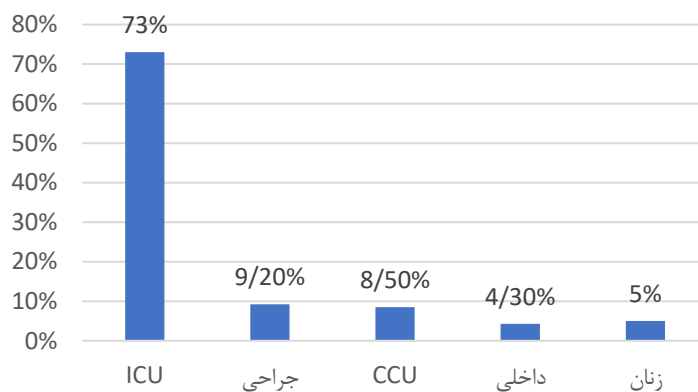
در این پژوهش ۱۴۱ بیمار مبتلا به عفونت بیمارستانی که بیش از ۴۸ ساعت در بیمارستان منتخب نظامی بستری بودند، شناسایی شدند. از ۱۴۱ نفر مبتلا به عفونت بیمارستانی ۴۴ درصد مرد و ۵۶ درصد زن بودند که نشان دهنده بیشتر بودن میزان بروز عفونت بیمارستانی در بیماران زن بوده است (شکل ۱).



شکل ۱. نمودار درصد بیماران بستری در بیمارستان نظامی منتخب

میزان شیوع عفونت های بیمارستانی در بخش های مختلف

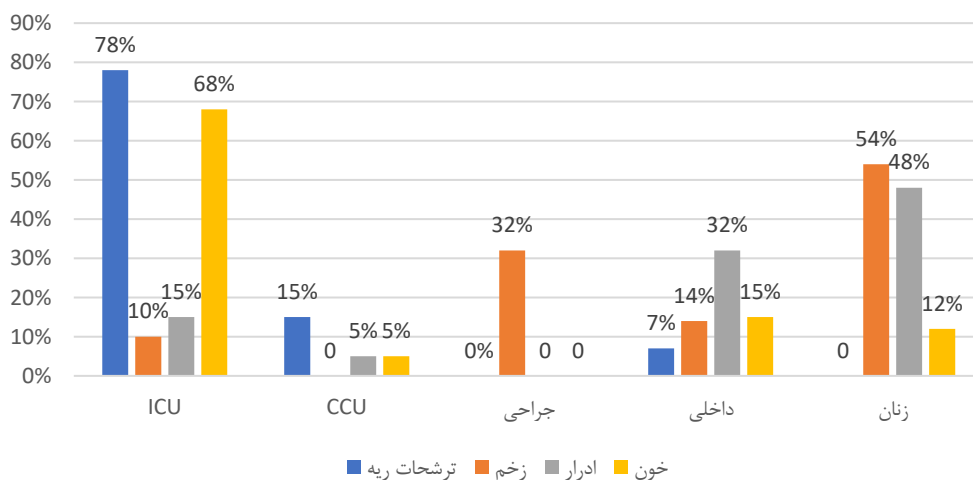
از ۱۴۱ مورد عفونت بیمارستانی، بیشترین میزان عفونت مربوط به بخش مراقبت های ویژه (ICU) با ۷۳ درصد فراوانی و کمترین میزان مربوط به بخش داخلی با ۴/۳ درصد فراوانی بوده است (شکل ۲).



شکل ۲. نمودار درصد ایجاد عفونت‌های بیمارستانی در بخش‌های مختلف بیمارستان

میزان شیوع سودوموناس آئروجینوزا در نمونه‌های ارسالی از بخش‌های مختلف بیمارستان

بیشترین میزان عفونت‌های بیمارستانی در نمونه‌های کشت ترشحات ریه با ۵۹/۸٪ فراوانی و کمترین میزان در نمونه‌های خون با ۳/۹٪ مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳. نمودار میزان شیوع نوع نمونه در عفونت‌های بیمارستانی در بخش‌های مختلف

شناسایی مورفولوژی، کشت و تست‌های بیوشیمیایی

هر نمونه بیمار روی محیط کشت‌های بلاد آگار، مک‌کانکی آگار و ستریماید آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. کلنی‌های سودوموناس آئروجینوزا بر روی محیط بلاد آگار، برجسته، بعضاً دارای همولیز و حالت موکوئیدی داشتند. کلنی‌های ایزوله‌ها بر روی محیط ستریماید آگار، سبز رنگ، برجسته، موکوئیدی با حاشیه مشخص و اندازه ۲ میلی‌متر بود. کلنی‌های باکتری سودوموناس آئروجینوزا روی محیط کشت مک‌کانکی آگار، گرد، صورتی برجسته، موکوئیدی با حاشیه مشخص و کلنی‌های کوچک‌تر نسبت به محیط بلاد آگار و ستریماید آگار را تشکیل دادند (شکل ۴).



شکل ۴. کلنی‌های رشد کرده باکتری سودوموناس آئروجینوزا بر روی محیط‌های بلاد آگار (سمت راست)، ستریماید آگار (وسط)، و مک‌کانکی آگار (سمت چپ)

نتایج بررسی‌های بیوشیمیایی (جدول ۴) و میکروسکوپی (شکل ۵) نیز بیانگر حضور باکتری سودوموناس آئروجینوزا بودند.

جدول ۴. نتایج تست‌های بیوشیمیایی مختلف جهت شناسایی سودوموناس آئروجینوزا

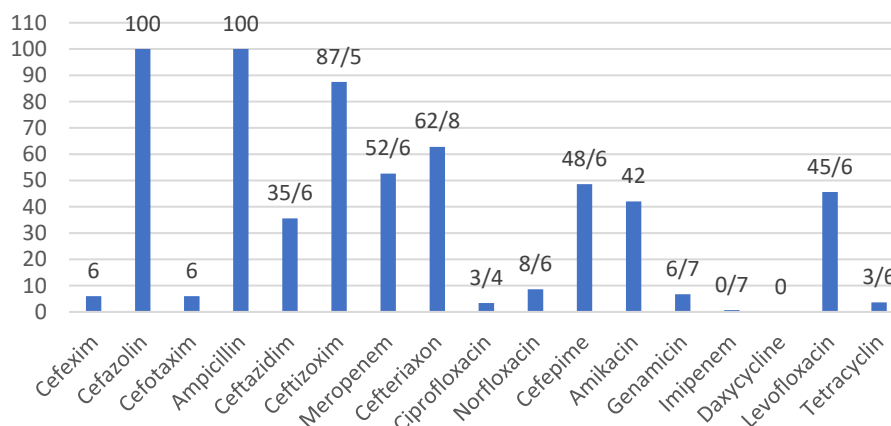
تست	اکسیداز	H ₂ S	TSI	کاتالاز	سیترات	تحریک	اوره
سودوموناس آئروجینوزا	+	-	K/K	+	+	+	-



شکل ۵. بررسی میکروسکوپی رنگ آمیزی گرم بیانگر حضور باسیل تا کوکوباسیل های گرم منفی می باشد

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

نتایج بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی، مقاومت ۱۰۰ درصدی در آنتی بیوتیک های سفازولین و آمپی سیلین را نشان داد. کمترین میزان مقاومت نیز مربوط به ایمی پنم بود. همچنین همه سویه ها به آنتی بیوتیک داکسی سیکلین حساسیت نشان دادند (شکل ۶).



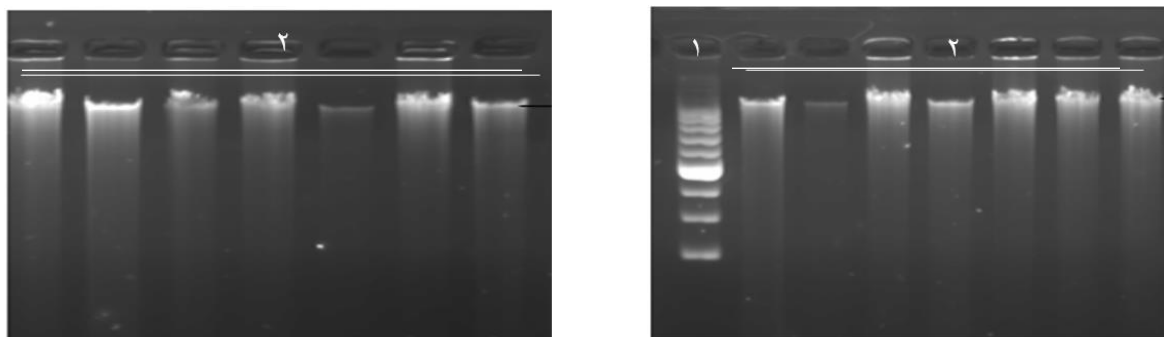
شکل ۶. درصد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف در ایزوله های سودوموناس آئروجینوزا

بر این اساس و پس از بررسی مقاومت های دارویی در ایزوله های سودوموناس آئروجینوزا، مشاهده گردید که ۸۱/۸٪ ایزوله ها فنوتیپ MDR، ۱۸/۲٪ ایزوله ها فنوتیپ XDR را نشان دادند و هیچ یک از ایزوله ها دارای فنوتیپ PDR نبودند.

نتایج استخراج DNA و آزمون PCR

مطابق با شکل، حضور DNA استخراجی از ایزوله های باکتریایی سودوموناس آئروجینوزا تایید شد. حضور ژن *blaDHA* نیز در ایزوله های سویه های سودوموناس آئروجینوزا با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت که درصد حضور ژن *blaDHA*

در این سویه‌ها ۲/۳ درصد مشاهده شد. همچنین حضور محصول ۴۰۰ جفت بازی مرتبط با ژن *blaDHA* با استفاده از الکتروفورز تایید شد (شکل ۷).



شکل ۷. الکتروفورز DNA استخراج شده از سویه‌های *S. aureus* آنتروجینوزا. چاهک ۱، DNA ladder، چاهک‌های ۲: نمونه‌های DNA استخراج شده از ایزوله‌ها



شکل ۸. نتایج PCR برای ژن *blaDHA* در *S. aureus* آنتروجینوزا. چاهک ۱ و ۲: لدر ۵۰ جفت بازی، چاهک ۳: کنترل منفی، چاهک‌های ۴: محصول PCR نمونه‌های باکتریایی

بحث

باکتری‌های حاوی *blaDHA* معمولاً ژن‌های مقاومت دیگری مانند *qnrB* که باعث مقاومت در برابر فلوروکینولون‌ها می‌شود و سایر ژن‌های بتالاکتاماز مانند *blaTEM*، *blaSHV* و *blaCTX-M* را نیز حمل می‌کنند. بیان همزمان این ژن‌ها، مقاومت در برابر چندین کلاس از آنتی‌بیوتیک‌ها را افزایش می‌دهد و به فنوتیپ MDR کمک می‌کند (۱۷-۱۴). ژن *blaDHA* تاکنون در چندین پاتوژن بالینی مرتبط، از جمله *Morganella morganii*، *Klebsiella pneumoniae*، *Salmonella enterica*، *Providencia stuartii*، *Proteus mirabilis* و *Escherichia coli* شناسایی شده است (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸). وجود آن اغلب



با سویه‌هایی که باعث عفونت‌های شدید، از جمله عفونت‌های خونی و عفونت‌های پای دیابتی می‌شوند، مرتبط است (۱۵). گسترش مقاومت ناشی از *blaDHA*، اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را به خطر می‌اندازد و روش‌های درمانی را پیچیده می‌کند (۲۱، ۲۲). همراهی آن با سایر عوامل تعیین‌کننده مقاومت، منجر به مقاومت در برابر چندین کلاس ضد میکروبی می‌شود که اغلب منجر به گزینه‌های درمانی محدود و افزایش خطر شکست درمان می‌شود (۲۱، ۲۲). گرچه حضور ژن *blaDHA* تنها در ۲/۳ درصد از ایزوله‌ها مشاهده شد، اما این میزان کم نباید موجب بی‌توجهی شود. وجود حتی تعداد محدودی از ایزوله‌های حامل این ژن می‌تواند زمینه‌ساز انتقال ژن مقاومتی به سویه‌های دیگر شود، خصوصاً در محیط‌های بالینی که انتخاب طبیعی ناشی از مصرف نامناسب آنتی‌بیوتیک‌ها شدت می‌گیرد. از طرفی، تأیید حضور باند ۴۰۰ جفت بازی در آزمون الکتروفورز نشان‌دهنده صحت روش PCR به‌کاررفته بوده و اعتبار نتایج را تقویت می‌کند.

سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو، شیوع بالایی در بیمارستان‌ها و مراکز مراقبت‌های ویژه در سراسر جهان، به ویژه در میان بیماران بدحال، دارند (۲۲، ۲۳). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که سودوموناس آئروژینوزا همچنان یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی در بیماران بستری به‌ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه محسوب می‌شود. شیوع بالای این باکتری در نمونه‌های تنفسی و زخم‌ها، بیانگر توانایی بالای آن در استعمار نواحی آسیب‌پذیر بدن و ایجاد عفونت‌های شدید است. سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند بیوفیلم‌هایی تشکیل دهد که از جوامع باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و پاسخ‌های ایمنی میزبان محافظت می‌کند و به عفونت‌های پایدار و افزایش تحمل به داروهای متعدد کمک می‌کند (۲۴). سودوموناس آئروژینوزا در برابر چندین کلاس آنتی‌بیوتیکی از جمله بتا-لاکتام‌ها (پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، کارباپنم‌ها)، آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون‌ها و در برخی موارد پلی‌میکسین‌ها مقاومت نشان می‌دهد (۲۵، ۲۶). مقاومت چند دارویی ناشی از بتالاکتامازهای با مقاومت طیف گسترده ($ESBL^+$) را می‌توان با روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی تشخیص داد. درمان جایگزین $ESBL$ ‌های غیر از کارباپنم‌ها می‌تواند ترکیبی از مهارکننده‌های بتالاکتام/ β -لاکتاماز مانند پپراسیلین/تازوباکتام (PZT^5) باشد (۲۷). با این حال هنوز، کارباپنم‌ها هنوز به عنوان داروی انتخابی برای عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌های تولیدکننده $ESBL$ در نظر گرفته می‌شوند (۲۸). همچنین، فشار انتخابی ناشی از افزایش استفاده از کارباپنم‌ها ممکن است منجر به ایجاد میکروب‌های مقاوم به کارباپنم یا حتی شیوع سایر پاتوژن‌های مقاوم به چند دارو شود (۲۹). بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه در بررسی‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی، مقاومت ۱۰۰ درصدی در آنتی‌بیوتیک‌های سفازولین و آمپی‌سیلین نشان داده شد. در این بررسی، کمترین میزان مقاومت نیز مربوط به ایمی‌پنم بود. همچنین همه سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک داکسی‌سیکلین حساسیت نشان دادند.

بر اساس داده‌های به‌دست‌آمده، حضور ژن *blaDHA* در ایزوله‌های *P. aeruginosa* نسبتاً نادر بود، اما با توجه به مقاومت‌های بالا و شیوع MDR/XDR ، نقش این ژن در مقاومت دارویی قابل تأمل است. پایش مستمر ژن‌های مقاومتی و استفاده هوشمند از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند به کنترل بهتر عفونت‌های بیمارستانی کمک کند.

نتیجه‌گیری

⁴ Extended spectrum resistance beta-lactamase

⁵ Piperacillin/tazobactam



عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو با افزایش عوارض، مرگ و میر، طولانی شدن مدت بستری در بیمارستان و هزینه‌های بالاتر مراقبت‌های بهداشتی همراه است. این مقاومت، گزینه‌های درمانی را محدود می‌کند و منجر به شکست درمان، به ویژه در بیماران مراقبت‌های ویژه و بیماران دارای نقص ایمنی می‌شود. در مجموع، این مطالعه اهمیت پایش مولکولی مقاومت‌های دارویی و بررسی ژن‌های مقاومتی را نه تنها در تشخیص، بلکه در کنترل و پیشگیری از گسترش عفونت‌های بیمارستانی نشان می‌دهد. پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده با تمرکز بر سایر ژن‌های مقاومتی مرتبط با بتالاکتامازها و نیز توالی‌یابی دقیق ژن‌های مورد نظر انجام شود تا درک جامع‌تری از مکانیسم‌های مقاومت در این سویه‌ها حاصل گردد.



References

1. Serra-Burriel M, Keys M, Campillo-Artero C, Agodi A, Barchitta M, Gikas A, et al. Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes of healthcare-associated infections in adults: Systematic review and meta-analysis. PLoS One [Internet]. 2020;15(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227139>
2. Singh V, Chibale K. Strategies to Combat Multi-Drug Resistance in Tuberculosis. Acc Chem Res [Internet]. 2021 May 18;54(10):2361–76. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00878>
3. Fernández J, Bert F, Nicolas-Chanoine MH. The challenges of multi-drug-resistance in hepatology. J Hepatol [Internet]. 2016;65(5):1043–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827816304317>
4. Morris S, Cerceo E. Trends, Epidemiology, and Management of Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospitalized Setting. Vol. 9, Antibiotics. 2020.
5. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Mar;18(3):268–81.
6. Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. Chapter 41 - Pseudomonas aeruginosa. In: Tang YW, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman JBTMM (Second E, editors. Boston: Academic Press; 2015. p. 753–67. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012397169200041X>
7. Strateva T, Yordanov D. Pseudomonas aeruginosa - a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol. 2009 Sep;58(Pt 9):1133–48.
8. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, et al. Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa wild type, flagella and type IV pili mutants. Mol Microbiol [Internet]. 2003;48(6):1511–24. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03525.x>
9. Vetrivel A, Ramasamy M, Vetrivel P, Natchimuthu S, Arunachalam S, Kim GS, et al. Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation and Its Control. Biologics [Internet]. 2021;1(3):312–36. Available from: <https://www.mdpi.com/2673-8449/1/3/19>
10. Dehkordi SMH, Anvar SA, Rahimi E, Ahari H, Ataee M. Molecular investigation of prevalence, phenotypic and genotypic diversity, antibiotic resistance, frequency of virulence genes and genome sequencing in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from lobster. Int J Food Microbiol [Internet]. 2022;382:109901. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160522003737>
11. Abdelrahman DN, Taha AA, Dafaallah MM, Mohammed AA, El Hussein ARM, Hashim AI, et al. β -lactamases (bla (TEM), bla (SHV), bla (CTXM-1), bla (VEB), bla (OXA-1)) and class C β -lactamases gene frequency in Pseudomonas aeruginosa isolated from various clinical specimens in Khartoum State, Sudan: a cross sectional study. F1000Research. 2020;9:774.
12. kani MM, Alabdali YAJ. Mobile genetic elements profiling, gene flow, and antimicrobial susceptibility profiles, among Pseudomonas aeruginosa isolates, isolated from Al Muthanna



- hospitals' wound and burn units in Iraq. Gene [Internet]. 2023;884:147696. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111923005371>
13. Parsek MR, Tolker-Nielsen T. Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Curr Opin Microbiol [Internet]. 2008;11(6):560–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527408001331>
 14. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. CLSI standard M02. Wayne, PA Clin Lab Stand Institute. 2024;96.
 15. Mata C, Miró E, Toleman M, Rivera MA, Walsh TR, Navarro F. Association of blaDHA-1 and qnrB genes carried by broad-host-range plasmids among isolates of Enterobacteriaceae at a Spanish hospital. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2011;17(10):1514–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14618681>
 16. Hamid SF, Taha AB, Abdulwahid MJ. Distribution of blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, blaOXA, and blaDHA in *Proteus mirabilis* Isolated from Diabetic Foot Infections in Erbil, Iraq. Cell Mol Biol. 2020;66(1):88–94.
 17. Mahrouki S, Bourouis A, Chihi H, Ouertani R, Ferjani M, Moussa MB, et al. First characterisation of plasmid-mediated quinolone resistance-qnrS1 co-expressed blaCTX-M-15 and blaDHA-1 genes in clinical strain of *Morganella morganii* recovered from a Tunisian Intensive Care Unit. Indian J Med Microbiol [Internet]. 2012;30(4):437–41. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0255085721008537>
 18. Li L, Olsen RH, Wang C, Song A, Xiao J, Meng H, et al. First report of two foodborne *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Bovismorbificans* isolates carrying a novel megaplasmid harboring blaDHA-1 and qnrB4 genes. Int J Food Microbiol [Internet]. 2021;360:109439. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160521003986>
 19. Al Sium SM, Goswami B, Chowdhury SF, Naser SR, Sarkar MK, Faruq MJ, et al. An insight into the genome-wide analysis of bacterial defense mechanisms in a uropathogenic *Morganella morganii* isolate from Bangladesh. PLoS One [Internet]. 2025 Jan 23;20(1):e0313141. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0313141>
 20. Yamochi T, Yoshida K, Ohira Y, Ota H, Yamochi T, Takimoto M, et al. Genotypic characterization *Escherichia coli* strains from Japan producing AmpC beta-lactamase. Showa Univ J Med Sci. 2022;34(4):183–90.
 21. Debergh H, Maex M, Garcia-Graells C, Boland C, Saulmont M, Van Hoorde K, et al. First Belgian Report of Ertapenem Resistance in an ST11 *Klebsiella pneumoniae* Strain Isolated from a Dog Carrying blaSCO-1 and blaDHA-1 Combined with Permeability Defects. Antibiotics [Internet]. 2022;11(9). Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/9/1253>
 22. Jin Y, Shao C, Li J, Fan H, Bai Y, Wang Y. Outbreak of Multidrug Resistant NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* from a Neonatal Unit in Shandong Province, China. PLoS One [Internet]. 2015 Mar 23;10(3):e0119571. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119571>
 23. Schwartz B, Klammer K, Zimmerman J, Kale-Pradhan PB, Bhargava A. Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Clinical Settings: A Review of Resistance Mechanisms and Treatment Strategies. Pathog (Basel, Switzerland). 2024 Nov;13(11).
 24. Gill JS, Arora S, Khanna SP, Kumar KVSH. Prevalence of Multidrug-resistant, Extensively Drug-resistant, and Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from a Tertiary Level



Intensive Care Unit. J Glob Infect Dis [Internet]. 2016;8(4). Available from: https://journals.lww.com/jgid/fulltext/2016/08040/prevalence_of_multidrug_resistant,_extensively.5.aspx

25. Kunz Coyne AJ, El Ghali A, Holger D, Rebold N, Rybak MJ. Therapeutic Strategies for Emerging Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Dis Ther [Internet]. 2022;11(2):661–82. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00591-2>

26. Sindeldecker D, Stoodley P. The many antibiotic resistance and tolerance strategies of *Pseudomonas aeruginosa*. Biofilm [Internet]. 2021;3:100056. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590207521000149>

27. Gasink LB, Fishman NO, Weiner MG, Nachamkin I, Bilker WB, Lautenbach E. Fluoroquinolone-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of Risk Factors and Clinical Impact. Am J Med [Internet]. 2006;119(6):526.e19-526.e25. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002934305011502>

28. Shabrina LS, Ahmad A, Fadrian F. Bioscientia Medicina : Journal of Biomedicine & Translational Research Diagnosis and Management of Paraquat Intoxication. 1962;3478–99.

29. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005 Oct;18(4):657–86.

30. Chia JH, Su LH, Lee MH, Kuo AJ, Shih NY, Siu LK, et al. Development of high-level carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* among patients with prolonged hospitalization and carbapenem exposure. Microb Drug Resist. 2010 Dec;16(4):317–25.