# ردیابی مولکولی ژن بتالاکتامازی DHA در سودوموناس آئروژینوزاهای جدا شده از نمونه‌های پوستی در شهر قم

حوری سادات حجازی[۱]، محسن زرگر[۲]، مهرداد معماریان*[۳]

## چکیده

«پسودوموناس آئروژینوزا» می‌تواند تقریباً در تمام بافت‌های بدن عفونت ایجاد کند. باکتری می‌تواند در سوختگی‌ها، زخم، بافت قرنیه، دستگاه ادراری و ریه‌ها کلونیزه و پس از ورود به خون، سبب سپتی سمی و یا ضایعات موضعی در مکان‌های دیگر بدن شود. امروزه به دلیل استفاده بی‌رویه از داروهای مؤثر بر پسودوموناس آئروژینوزا، این باکتری به شدت در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده است. هدف از این پژوهش، جست‌وجوی ژن مقاومت به بتالاکتام‌ها در ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های پوستی است. در این تحقیق از تعداد ۱۰۰ ایزوله سودوموناس که در بانک میکروبی آزمایشگاه تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم نگهداری می‌شد؛ پس از کشت و تأیید بیوشیمیایی ایزوله‌ها به منظور ردیابی ژن‌های مذکور، ابتدا ژنوم استخراج و سپس با PCR ژن DHA ردیابی شد. نتیجه این‌که از تعداد ۱۰۰ ایزوله، ٤٥ ایزوله مقاوم به ایمی پنم به دست آمد که ۲۲ مورد در روش سینرژیستی دبل دیسک مثبت و از این تعداد، ٦ مورد دارای ژن DHA بودند. همچنین بروز مقاومت روز افزون در باکتری سودوموناس آئروژینوزا منجر به مشکلات در درمان بیماران شده و گزارش دوره‌ای حساسیت دارویی جهت درمان اجتناب ناپذیر می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، نمونه پوستی، ژن DHA ، شهر قم.

۱. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی قم، قم، ایران.

۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی قم، قم، ایران.

۳. * استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی قم، قم، ایران.

Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

## مقدمه

«عفونت بیمارستانی» (Nosocomialinfection) یکی از مشکلات مهم در بیمارستان‌ها به شمار می‌رود. «عفونت بیمارستانی» به عفونتی اطلاق می‌شود که بیمار در زمان بستری شدن به آن مبتلا نبود؛ امّا ٤٨ تا ٧٢ ساعت بعد از پذیرش در بیمارستان، سه روز بعد از ترخیص و یا سی روز بعد از عمل جراحی در بیمار ایجاد می‌شود. باوجود مراقبت‌های بسیار، عفونت‌های بیمارستانی به‌طور چشمگیری با عوارض و بروز مرگ‌ومیر همراه بوده و مخارج زیادی را به بیمار بستری‌شده تحمیل می‌کنند(١). در طول چند دهه اخیر، باکتری‌های گرم منفی، به دلیل داشتن فاکتورهای ویرولانس متعدد و مقاومت‌های دارویی وسیع، به عنوان شایع‌ترین عامل اتیولوژیک عفونت‌های مهاجم شناخته شده‌اند(٢). بیش‌ترین اطلاعات مربوط به اپیدمیولوژی عفونت‌های زخم سوختگی از مطالعات انجام شده در سال‌های ١٩٥٠ تا ١٩٩٠ به دست آمده است(٣). میزان مرگ ومیر گزارش شده٤٠% و بیش‌تر بر اساس وسعت ناحیه سوختگی گزارش شده است. تخمین زده شده که سالانه ١-٢ میلیون نفر در ایالت متحده دچار سوختگی می‌شوند که ٥%تا ٦% از این موارد به مرگ منتهی می‌شود(٤). سطوح زخم‌های سوختگی در زخم‌های نیمه عمقی و در تمامی سوختگی‌های کاملاً عمیق، محیط سرشار از پروتئین می‌باشد که شامل یک بافت نکروزه شده فاقد عروق (اسکار) است و محیط بسیار مناسبی برای کلونیزاسیون و تکثیر باکتری‌ها فراهم می‌کند(٥). نبود عروق خونی درون اسکار به مهاجرت ناقص سلول‌های ایمنی میزبان و محدودیت انتقال عوامل آنتی میکروبیال به ناحیه منجر می‌شود؛ در حالی‌که مواد سمی تولید شده از بافت اسکار، تخریب پاسخ‌های ایمنی موضعی را به دنبال دارد. ماهیت و وسعت ناحیه سوختگی به همراه نوع و میزان میکرو ارگانیسم کلونیزه شده بر روی زخم، بر ایجاد عفونت تهاجمی در زخم سوختگی مؤثر است (٦). سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های فرصت طلب در بیماران دارای ضعف سیستم ایمنی، مانند بیماران دارای زخم سوختگی می‌باشد. این باکتری مهم‌ترین عامل عفونت در زخم‌های سوختگی است و به عنوان خطری جدی در سراسر جهان محسوب می‌شود. عفونت سیستمیک ثانویه ایجاد شده به وسیله سودوموناس آئروژینوزا، می‌تواند مرگ‌ومیر بالای این بیماران را باعث شود (٧). مسئله دیگری که گویای اهمیت نقش سودوموناس آئروژینوزا در عفونت‌های زخم سوختگی است؛ توانایی این باکتری در تولید بیوفیلم می‌باشد. این ویژگی منحصر به فرد، در پایدار ماندن عفونت ایجاد شده در زخم سوختگی و بی‌اثر شدن آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی و افزایش مقاومت‌های دارویی سودوموناس آئروژینوزا، دارای نقش مهمی است. این باکتری به عنوان یک میکرو ارگانیسم بسیار سازگار محسوب شده و به سرعت می‌تواند به انواع متنوعی از آنتی‌بیوتیک‌های متعددی مقاوم شود. عفونت‌های بیمارستانی ایجاد شده به وسیله این باکتری، اغلب به سختی درمان می‌شوند(٨).

بیماری‌های ایجاد شده توسط سودوموناس آئروژینوزا، در بیمارانی اتفاق می‌افتد که در سیستم دفاعی خود اختلالاتی دارند (مثل کاهش سیستم ایمنی بدن در بیماران HIV مثبت و همچنین افراد دارای نوتروپنی) و یا در افرادی که به زخم‌های ناشی از ضربه مبتلا شده، یا کسانی که در راه هوایی آن‌ها لوله گذاری (شانت) شده است(۹). مطالعات اپیدمیولوژیك نشان داده‌اند که این باکتری عامل۱۰% عفونت‌های بیمارستانی، ۱۱% عفونت‌های خونی و ٤% اپیدمی‌های بیمارستانی به شمار می‌رود (۱۰). سودوموناس آئروژینوزا موجب عفونت-هایی است، از قبیل پنومونی، عفونت‌های دستگاه ادراری و باکتریمی اندوکاردیت، عفونت‌های پوستی، عفونت‌های گوش، عفونت‌های چشم در افراد بستری در بیمارستان (۱۱). سودوموناس آئروژینوزا در بیماران دچار سوختگی، باعث التهاب، تحریک سیستم ایمنی و ایجاد زخم‌های چرکی پوستی می‌گردد (۱۲). آنزیم DHA جزء ساب تایپ‌های AmpC می‌باشد. آنزیم‌های AmpC سرین سفالوسپورینازهایی هستند که به وسیله کلوگزاسیلین و برونیک اسید مهار می‌شوند. مقادیر بالای AmpC، موجب مقاومت به پنی‌سیلین‌ها، مونوباکتام‌ها، اکسی ایمینو سفالوسپورین‌ها و سفامایسین می‌شود. در صورت نقص در پورین‌های غشایی، بتالاکتامازهای AmpC می‌توانند موجب مقاومت به کاربانم‌ها نیز گردند (۱۳). AmpC توسط ژن‌های کروموزومی کاملاً تنظیم شده‌ای «کد» می‌شود و در اعضای خانواده انترو باکتریاسه به فراوانی وجود دارد. پدیده جدیدی که موجب افزایش بیان AmpC، در گونه‌های فاقد ژن *blaAmpC* شده است؛ حرکت ژن‌های کدکننده از کروموزوم به پلاسمید و سپس گسترش مقاومت در گونه‌های بیمارستانی می‌باشد (۱۴). اولین نوع آنزیم DHA در سال ۱۹۹۲ در Dhahran عربستان، در سالمونلا انتریکا سروار اینتریتیدیس شناسایی شد. برخلاف بیش‌تر ژن‌های AmpCی پلاسمیدی، بیان *bla DHA* به وسیله ampR تنظیم می‌شود. پروتئین AmpR، پس از اتصال به پنتاپپتید UDP-Mur-NAc باعث سرکوب بیان ژن ampC شده است. این غیرفعال شدن، با حضور بتالاکتام‌هایی، مانند سفوکسیتین، کلاولانیک اسید و ایمی پنم و یا به وسیله موتاسیون در ژن ampD برطرف می‌شود. جالب توجه این‌که در سودوموناس آئروژینوزا AmpR، علاوه بر این نقش، در بیان چندین فاکتور ویرولانس، از جمله پیوسیانین، پروتئازLasA و الاستاز LasB مؤثر است (۱۵). هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن مقاومت DHA، در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از عفونت‌های پوستی می‌باشد.

## مواد و روش ها

برای کشت اولیه نمونه‌های تهیه شده از زخم بیماران دچار سوختگی، از محیط مک کانکی اگار استفاده شد. به منظور اجرای تست‌های تشخیصی و افتراقی مجدد، از نظر وجود باکتری سودوموناس آئروژینوزا کلنی‌های رشد یافته مورد آزمایش و ارزیابی قرار گرفتند (۱).

بدین منظور سواب‌های حاوی ترشحات زخم بر روی آن کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای اجرای دیسک دیفیوژن و تعیین حساسیت ایزوله‌های میکروبی، از محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. سوش استاندارد ATCC۲۷۸۵۳ سودوموناس آئروژینوزا و ATCC۷۰۰۶۰۳ کلبسیلا پنومونیه، از بیمارستان شریعتی تهران (دانشکده پزشکی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران) تهیه گردید (۲).

باکتری سودوموناس آئروژینوزا بر روی محیط TSB کشت داده می‌شود و سپس محیط‌ها در انکوباتور شیکردار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شود و سپس حدود ۱/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری داخل میکروتیوپ ۲ میلی لیتری سانتریفوژ می‌گردد (۷۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه). رسوب حاصل داخل مخلوط زیر حل می‌شود:

الف) ۶۰۰ میکرولیتر تامپون لیز؛ ب) ۲۰ میکرولیتر از SDS۲۵%, ۳ میکرولیتر از پروتیناز k رسوب باکتری را با استفاده از سمپلر به خوبی در محلول‌های مذکور، مخلوط می‌گردد. میکروتیوپ‌ها را در بن‌ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت یک ساعت انکوبه می‌گردند. میکروتیوپ‌ها را از بن ماری خارج و سرد کرده و بر روی سوسپانسیون لیز شده باکتریایی ۶۲۰ میکرولیتر مخلوط فنل ـ کلروفرم ـ ایزوآمیل الکل اضافه می‌شود. درب لوله‌ها را بسته و آن را به خوبی تکان می‌دهند تا سوسپانسیون شیری رنگ حاصل شود. سوسپانسیون مرحله قبل در(rpm)۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ می‌گردد. با استفاده از سمپلر متغیر ۲۰۰ میکرولیتری که بر روی ۱۵۰ میکرولیتر تنظیم شده است؛ فاز رویی به یک میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتری نو منتقل می‌شود. ۶۲۰ میکرولیتر مخلوط فنل ـ کلروفرم ـ ایزوآمیل الکل به محلول حاصل از مرحله ۴ اضافه و مراحل ۳ و ۴ تکرار می‌گردد. ۶۲۰ میکرولیتر کلروفرم به روی میکروتیوپ می‌شود؛ سپس به خوبی مخلوط شده تا سوسپانسیون شیری رنگ حاصل شود و به مدت۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰rpm و در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ می‌شود. با استفاده از سمپلر متغیر ۲۰۰ میکرولیتر که بر روی ۱۵۰ میکرولیتر تنظیم شده است، فاز رویی به یک میکروتیوپ ۲ میلی لیتری نو منتقل می‌گردد و در حدود ۱/۵ میلی لیتر اتانول خالص سرد به آن اضافه می‌شود و با واژگون کردن مکرر لوله، به آرامی مخلوط را به هم زده تا این‌که رشته DNA ظاهر شود. DNAی رسوب یافته با سانتریفوژ کردن در ۹۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه به دست آمده و مایع رویی را خارج کرده و میکروتیوپ را در

هوای اتاق خشک کرده و یا از دستگاه وکیوم استفاده می‌شود. DNA را در ۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE حاوی RNAase حل شده، نگهداری می‌کنند. بعد از آماده سازیMasterMix، DNAی نمونه‌های مورد نظر را در میکس PCR وارد کرده و با استفاده از سمپلر، آن را خوب سمپلینگ می‌کنیم. قابل ذکر است که در هر سری از تست PCR، باید DNAی مربوط به کنترل مثبت و کنترل منفی (جهت اطمینان از نبود آلودگی درتست) به همراه نمونه‌های مجهول، PCR شود. سپس مخلوط‌های PCR که حاوی DNAهای مجهول و DNA کنترل هستند، داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. از باکتری واجد ژن‌های مورد نظر که از انسیتو پاستور تهیه گردیده بود، به منظور کنترل مثبت استفاده شد. مشخصات پرایمرهایی که در PCR مورد استفاده قرار گرفته‌اند، در جدول ۱ و برنامه PCR در جدول ۲ درج شده است. در نهایت محصول PCR الکتروفورز و باند مورد نظر ردیابی شدند.

| Factor | Temperature(°C) | Time |
|---|---|---|
| Gene | DHA | DHA |
| Step | | |
| Initial denaturation | ۹٤ | min۳ |
| Denaturation | ۹٤ | s۳۰ |
| Anealing | ٥٤ | s٤٥ |
| Extension | ۷۲ | s٤۰ |
| Final extension | ۷۲ | min۱۰ |
| Cycle | | ۳٥ |

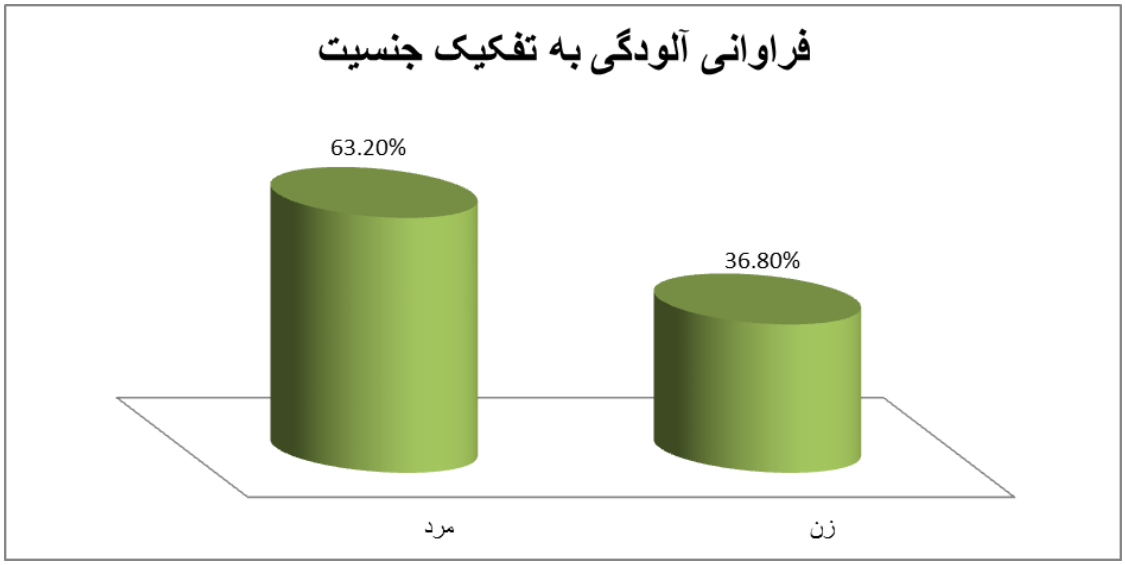
| Prime | Primer sequence | Product size(bp) |
|---|---|---|
| DHA Forward<br>DHA Reverse | ٥'- GCCGCAGTGGAAGGGGATC -۳'<br>٥'- GCCAGAATCACAATCGCCACC -۳' | ۷۲۳ |

## نتایج تست‌های فنوتیپی

تعداد ۱۰۰ باکتری از بانک میکروبی دانشگاه آزاد قم احیا شدند و پس از تست‌های بیوشیمیایی و تأیید مورد بررسی قرار گرفتند(جدول ۱-٤). اطلاعات مرتبط با جنسیت در تحقیقات قبلی موجود بود که عفونت در مردان را بیش‌تر از زنان نشان می‌داد (نمودار۱).

جدول ۱-۴: تست‌های بیوشیمیایی ایزوله‌ها

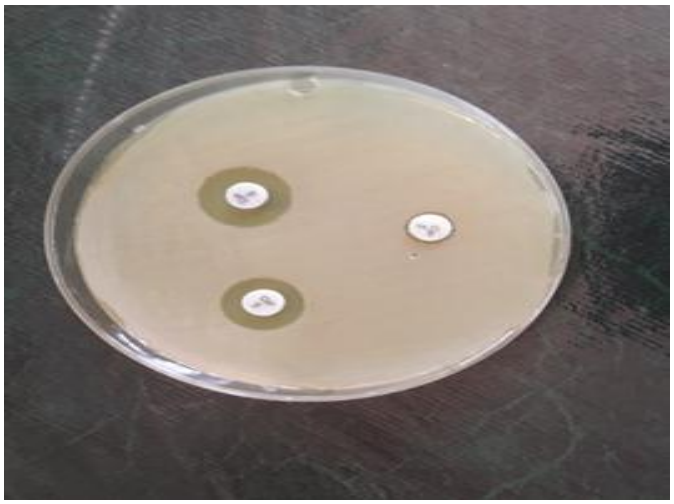
| تست‌های تشخیصی برای شناسایی سودوموناس آئروژینوزا |
| --- |
| اجرای رنگ‌آمیزی گرم |
| اجرای تست اکسیداز |
| رشد در دمای ٤٢ درجه |
| تولید سولفید هیدروژن در محیط TSI |
| رشد در محیط سیمون سیترات آگار |
| انتشار بوی میوه |
| توانایی حرکت |
| رشد در محیط ستریماید آگار |
| رشد در محیط مک کانکی آگار |




**نمودار ۱-٤. فراوانی ایزوله بر اساس جنسیت**

## نتایج دیسک ترکیبی

نتایج انجام شده روی ٤٥ سویه مقاوم به ایمیپنم ۲۲ مورد افزایش قطر هاله (بیش از ٥ میلیمتر) نشان دادند



**شکل۱. تصویر آنتی بیوگرام تست دیسک سینرژی همراه دیسک ایمی پنم به تنهایی و در حالت ترکیب با برونیک اسید (افزایش قطر هاله در حالت ترکیبی، گویای مثبت بودن تست است)**

## ۴-۴ نتایج PCR

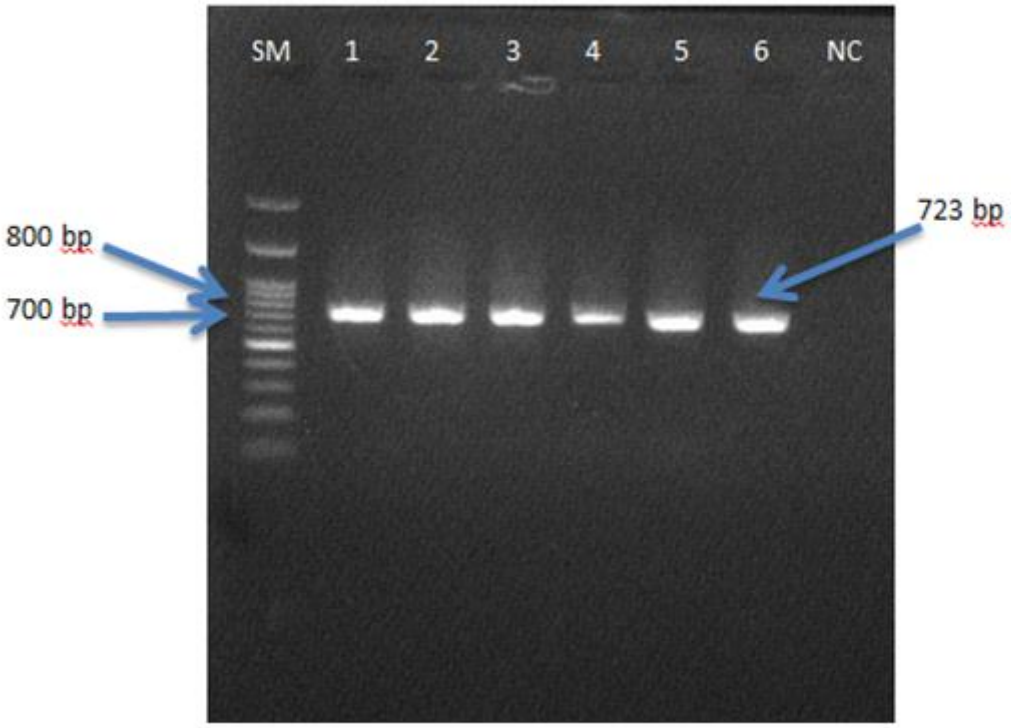
به منظور بررسی DNAی ژنومیک و بررسی کیفی DNAی استخراج شده، نمونه پس از استخراج بر روی ژل آگارز، الکتروفورز گردید. باندهای ایجاد شده در شکل ۲ گویای حضور DNAی ژنومیک است. به منظور بررسی کمی DNAی استخراج شده به وسیله دستگاه نانودرآپ، غلظت DNAی استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت. جذب نوری در طول موج ۲۸۰/۲۶۰ معادل ۷/۱ الی ۹/۱ به منظور انجام واکنش PCR مطلوب می‌باشد (شکل۳).

شکل ۲. تصویر ژل اگارز از ژنوم استخراج شده

**شکل۳. سنجش کمی مقدار ژنوم استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ**

## بررسی فراوانی ژن DHA

در این مطالعه، از ۲۲ ایزوله مقاوم در روش دیسک سینرژی، ٦ مورد دارای ژن DHA بودند و در مجموع ٦% از کل ایزوله‌ها دارای این ژن بودند. طبق شکل٤ محصول PCR این ژن باند ۷۲۳ بیس پر را ایجاد می‌کند.




**شکل٤. الکتروفورز محصول PCR ژن DHA (ردیف SM مارکر . ۱ کنترل مثبت و ۲-٦ ایزوله‌های واجد ژن هستند و NC کنترل منفی)**

تصویر الکتروفورز ژنDHA: چاهک اول لدر شماره ۱ کنترل مثبت، شماره ۲ تا ٦ نمونه واجد ژن و چاهک NC کنترل منفی ، باند مورد نظر ۷۲۳ بیس پر می‌باشد.

## بحث

پسودوموناس آئروژینوزا، عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی(Nosocomial Infection)، مرگ و میر در مبتلایان به ضعف سیستم ایمنی، مانند ایدز، بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه(ICU)، مبتلایان به نقص ژنتیکی سیستیک فیبروزیس(Cystic Fibrosis) و سوختگی ها به شمار می‌رود. بنابراین، کنترل و درمان عفونت ناشی از این باکتری، به دلیل افزایش سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR=Multi-drug resistant) و به کارگیری وسایل مصنوعی و کار گذاشتنی در بدن، مانند سوندهای درون سیاهرگی، سوندهای ادراری، دریچه‌های مصنوعی قلب، لنزهای تماسی و داخل چشمی و همچنین سوختگی‌های شدید، از مشکلات اصلی در بیمارستان‌ها

می‌باشد (جارویس و همکاران، ۱۹۹۱). این باکتری به دلیل توانایی های وسیع متابولیکی و ژنتیکی، از قبیل نفوذناپذیری نسبی غشای خارجی، پمپ‌های تراوشی، آنزیم‌های کروموزومی و پلاسمیدی تجزیه‌کننده آنتی‌بیوتیک‌ها؛ یکی از مقاوم‌ترین میکروارگانیسم‌ها محسوب می‌شود (لامبرت،۲۰۰۲). بتالاکتامازهای با طیف گسترده یا ESBLs(Extended Spectrum Beta-Lactamases)، بیش‌تر به وسیله پلاسمید کد می‌شوند (کولودنر و همکاران، ۲۰۰۴)، و باکتری‌ها را به گسترهٔ وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های خانواده سفالوسپورین‌ها، از قبیل سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم و مونوباکتام (آزترونام) مقاوم می‌کنند. همچنین عامل مقاوت به آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون‌ها، سولفونامیدها و تری متو پریم ـ سولفومتوکسازول می‌باشند (جیانگ و همکاران، ۲۰۰۶). بر اساس مطالعه‌ای توسط ZhonghuaYi و همکاران در سال ۲۰۰۸. در چین؛ آنالیز ژن‌های مقاومت به بتالاکتام‌ها در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا برای ۱٤٦ کودک انجام گرفت. در این مطالعه ابتدا روش آگار دایلوشن مطابق CLSI برای محاسبه MIC (MinimumInhibitionConcentration) ۱۲ آنتی‌بیوتیک (شامل خانواده پنی‌سیلین، سفالوسپورین‌های نسل ۳و٤، کاربا‌پنم، آزترونام، مهارکننده‌های بتالاکتام‌ها، کینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدها) انجام گرفت. میزان مقاومت به مروپنم ۳٥/٦% و ایمی پنم ٤۱/۱% گزارش گردید. همچنین روش PCR برای بررسی وجود ژن‌های GES, VEB, DHA, FOX, MIR, VIM, IMP, OXA, PER انجام شد که ژن‌های GES,VEB,DHA, IMP,VIM در هیچ یک از سویه‌ها یافت نشد (موهان، ۱۹۹٥). بر اساس مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۷، توسط Zhonghua shao و همکاران در چین صورت گرفت، ۲۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از زخم بیماران سوختگی مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه، بررسی مقاومت به روش دیسک دیفیوژن برای ۱٤ آنتی‌بیوتیک انجام شد. همچنین ژن‌های بتالاکتاماز VIM, IMP, DHA, VEB, GES با روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند که شیوع ژن GES ۱۰۰% و ژن‌های VEB,DHA صفر گزارش شد. این محققان شیوع بسیار بالای ژن GES را به میزان مقاومت زیاد سودوموناس آئروژینوزای موجود در این مرکز مرتبط می‌دانند (موریتا و همکارانش، ۲۰۰۱). در مطالعه‌ای که توسط جبل‌عاملی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در تهران انجام شد، از بین ۱۱۲ نمونه سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از زخم سوختگی، ٤۲/۸% از نمونه‌ها ESBL مثبت بودند. در این مطالعه روش دیسک دیفیوژن برای بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی اجرا شد. تمامی نمونه‌های ESBL مثبت، به آزترونام، سفپیم، سفوتاکسیم، سفپودوکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، اوفلوکساسین مقاوم بودند. همچنین کم‌تر از ٦۰% از نمونه‌های ESBL به ایمی پنم، مروپنم، پیپراسیلین ـ تازوباکتام مقاوم بودند. در این مطالعه میزان شیوع آنزیم VEB۱ ۳۱/۳% گزارش شد؛ اما میزان شیوع ژن GES صفر بود (موراتا و همکارانش، ۲۰۰۶). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط شاهچراغی و همکاران صورت گرفت، به منظور بررسی الگوی حساسیت

آنتی‌بیوتیکی و شیوع ژن‌های کد کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف، ۶۰۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا از دو بیمارستان در تهران جداسازی شد. ابتدا روش دیسک دیفیوژن برای ۱۲ آنتی‌بیوتیک و سپس روش میکرو براث دایلوشن، به منظور تعیین MIC برای سفتازیدیم و ایمی پنم انجام گرفت. نمونه‌هایی که دارای MICی بیش‌تر یا مساوی ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر بودند، برای اجرای PCR انتخاب شدند. در این مطالعه ۳۹% از نمونه‌ها برای سفتازیدیم و ۵/۴۵% از نمونه‌ها برای ایمی پنم MIC بزرگ‌تر و مساوی ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر داشت. همچنین وجود ژن *blaVEB* ۲۴% و ژن *blaGES* صفر گزارش شد. نمونه‌هایی که دارای ژن *bla*VEB بودند، به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها به جز ایمی پنم مقاوم بودند. این اولین گزارش از وجود ژن blaVEB در ایران بود. (ناس و همکارانش). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ در عربستان سعودی، ۱۵۶ نمونه سودوموناس آئروژینوزای غیرحساس به سفالوسپورین‌های وسیع الطیف (Extended Spectrum Cephalosporins) ESC توسط Tawfik و همکاران بررسی شد. در این مطالعه میزان مقاومت به سفتازیدیم ۲۲/۴% و ایمی پنم ۷۰% گزارش شد. هیچ گونه مقاومتی علیه پلی میکسین B مشاهده نشد. همچنین تست‌های فنوتیپی برای تشخیص ESBL در نمونه‌های مقاوم به سفتازیدیم با MICی بزرگ‌تر از ۸ میلی گرم بر لیتر انجام شد. میزان شیوع ESBL در این مطالعه ۶۹/۴۴% بود. همچنین بررسی ملکولی نمونه‌های مقاوم نشان داد که شیوع ژن VEB۱ ۶۸% و شیوع ژن GES ۲۰ % است. این مطالعه اولین گزارش ژن GES از ناحیه شمال آفریقا و نیمه شرقی بود (نایمی و همکاران، ۲۰۰۶). به نظر می‌رسد به دلیل این‌که تاکنون از وجود ژن DHA در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا در ایران گزارشی منتشر نشده و همچنین در مورد ژن‌های GES,VEB آمار متفاوتی در ایران و سایر کشورها ارائه شده است؛ ضروری است تا در این زمینه بررسی‌های بیشتری انجام پذیرد.

# Molecular detection of DHA and GES genes in Pseudomonas aeruginosa isolated from skin samples in Qom


## Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* can infect virtually all tissues in the body. this bacteria can be colonized in burns, wounds, corneal tissue, urinary tract and lungs, and after entering blood, cause septicemia or localized lesions in other parts of the body. Today, due to the untapped use of effective drugs On the *pseudomonas aeruginosa*, this bacterium is strongly resistant to antibiotics. The purpose of this study was to find the gene for resistance to beta-lactams in *.pseudomonas aeruginosa* isolated from skin samples

## :materials and methods

A total of ۱۰۰ isolates of *Pseudomonas* were used in Microbiology Bank of Microbiology Research Laboratory of Islamic Azad University of Qom. After cultivation and *biochemical* confirmation of isolates, genomic extraction was performed first to detect these genes and then .detected by PCR with DHA genes

## :Results

۴۵ isolates resistant to imipenem; ۲۲ cases were positive in the double-synergistic disks. Six isolates were positive for DHA gene.

## :Conclusion

Increasing resistance to *Pseudomonas aeruginosa* causes problems in treating patients .and a periodic review of drug allergy for inappropriate treatment


**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, skin samples, DHA ,Qom city

## Refrences


١.Adonizio A, Kong KF & Mathee K. (٢٠٠٨). Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in Pseudomonas aeruginosa by South Florida plant extracts. *Antimicrobial agents and chemotherapy* ٥٢, ١٩٨-٢٠٥.

٢.Araujo A, Oliveira ICM, Mattos MC & Benchetrit LC. (٢٠٠٨). Cell surface hydrophobicity and adherence of a strain of group B streptococci during the post-antibiotic effect of penicillin. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* ٥٠, ٢٠٣-٢٠٧.

٣.Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM & Nordmann P. (٢٠٠١). Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial agents and chemotherapy* ٤٥, ١٦١٥-١٦٢٥.

٤.Blomberg B, Jureen R, Manji KP, Tamim BS, Mwakagile DSM, Urassa WK, Fataki M, Msangi V, Tellevik MG & Maselle SY. (٢٠٠٥). High rate of fatal cases of pediatric septicemia caused by gram-negative bacteria with extended-spectrum beta-lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. *Journal of clinical microbiology* ٤٣, ٧٤٥-٧٤٩.

٥.Borriello SP, Murray PR & G F. (٢٠٠٥). *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections, Bacteriology* ASM Press, Washington D.C.

٦.Courtney HS, Ofek I, Penfound T, Nizet V & Pence MA. (٢٠٠٩). Relationship between Expression of the Family of M Proteins and Lipoteichoic Acid to Hydrophobicity and Biofilm Formation in Streptococcus pyogenes. *PLoS ONE: e*٤١٦٦ *doi:*١٠١٣٧١/*journalpone*٠٠٠٤١٦٦ ٤, ١-١١.

٧.Deptuła A & Gospodarek E. (٢٠١٠). Reduced expression of virulence factors in multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa strains. *Arch Microbiol* ١٩٢, ٧٩-٨٤.

۸.Doyle RJ. (۲۰۰۰). Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes and infection* ۲, ۳۹۱-٤۰۰.

۹.Forbes BA, Sahm DF & Weissfeld AS. (۲۰۰۷). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. Mosby.

۱۰.Franiczek R, Sobieszcza ska B, Grabowski M, Mowszet K & Pytrus T. (۲۰۰۳). Occurrence of extended-spectrum -lactamases among Escherichia coli isolates from hospitalized and healthy children. *Folia microbiologica* ٤۸, ۲٤۳-۲٤۷.

۱۱.Gallant CV, Daniels C, Leung JM, Ghosh AS, Young KD, Kotra LP & Burrows LL. (۲۰۰٥). Common -lactamases inhibit bacterial biofilm formation. *Molecular microbiology* ٥۸, ۱۰۱۲-۱۰۲٤.

۱۲.Goldberg JB, Hancock REW, Parales RE, Loper J & Cornelis P. (۲۰۰۸). Pseudomonas ۲۰۰۷. *Journal of Bacteriology* ۱۹۰, ۲٦٤۹-۲٦٥۸.

۱۳.Goranson J & Frank DW. (۲۰۰٦). Genetic analysis of exoenzyme S expression by Pseudomonas aeruginosa. *FEMS microbiology letters* ۱۳٥, ۱٤۹-۱٥٥.

۱٤.Hennequin C & Forestier C. (۲۰۰۷). Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon Klebsiella pneumoniae adhesion. *Research in microbiology* ۱٥۸, ۳۳۹-۳٤۷.

۱٥Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M & Parsek MR. (۲۰۰۱). Alginate overproduction affects Pseudomonas aeruginosa biofilm structure and function. *Journal of Bacteriology* ۱۸۳, ٥۳۹٥-٥۳۱۰۰.