● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌وسوم، شمارهٔ ۱، ص ۱۱-۱، ۱۳۹۴

مقالهٔ پژوهشی

ارزیابی روش فنوتیپی بتالاکتاماز دیسک تست جهت شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در جدایه‌های بالینی پسودوموناس آئروژینوزا دارای مقاومت چندگانه

داود کلانتر نیستانکی[۱]، فرشته جبل‌عاملی[۲]، اکبر میرصالحیان[۳]، محمد ایمان عینی[۴*]

خلاصه

مقدمه: تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌باشد. شیوع جدایه‌هایی که به طور هم‌زمان دارای چندین مکانیسم مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام هستند، باعث کاهش حساسیت در تست‌های تأییدی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌شود. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی روش بتالاکتاماز دیسک تست برای شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در جدایه‌های بالینی پسودوموناس آئروژینوزاهای دارای مقاومت چندگانه بود.

روش: در مجموع ۱۰۰ جدایه پسودوموناس آئروژینوزا دارای مقاومت چندگانه از بیماران سوختگی جمع‌آوری شد و حساسیت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها به روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید. سه روش دیسک ترکیبی با کلاولانیک اسید، دیسک سینرژی و بتالاکتاماز دیسک تست جهت شناسایی جدایه‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مورد استفاده قرار گرفت. جدایه‌های تولید کننده کارباپنمازها نیز با استفاده از روش MHT (Modified Hodge Test) شناسایی شدند. جهت شناسایی ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{PER}، bla_{CTX-M}، bla_{OXA} و bla_{PSE} از روش PCR (Polymerase chain reaction) استفاده گردید.

یافته‌ها: تمام جدایه‌ها دارای مقاومت چندگانه بودند. تنها سه جدایه با روش دیسک ترکیبی به عنوان تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف شناسایی شد. هیچ کدام از جدایه‌ها با روش دیسک سینرژی به عنوان تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف شناسایی نشدند. از ۱۰۰ جدایه مورد بررسی، ۸۷ درصد به روش بتالاکتاماز دیسک تست به عنوان تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در نظر گرفته شدند و ۶۸ درصد جدایه‌ها تولید کننده کارباپنماز بودند. میزان شیوع بتالاکتامازهای bla_{OXA}، bla_{TEM} و bla_{PER} به ترتیب ۹۷، ۶۱ و ۱۳ درصد بود و تمامی جدایه‌ها فاقد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف bla_{SHV}، bla_{CTX-M} و bla_{PSE} بودند.

نتیجه‌گیری: بر طبق نتایج به دست آمده، روش بتالاکتاماز دیسک تست جهت شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در جدایه‌های دارای مقاومت چندگانه مناسب می‌باشد، اما جهت تأیید آن به بررسی‌های بیشتری نیاز است.

واژه‌های کلیدی: مقاومت به بتالاکتام، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، تست‌های تأییدی، پسودوموناس آئروژینوزا، سوختگی

۱- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۲- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران ۳- استاد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران ۴- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** emaneini@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۸ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۳/۱۲/۲۶ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۴/۲/۱۵

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام یکی از پرکاربردترین عوامل ضد میکروبی جهت درمان عفونت‌های حاصل از باسیل‌های گرم منفی مانند پسودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونیه و اشرشیاکلی می‌باشد (۱). این باکتری‌ها از طریق تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز، افزایش فعالیت پمپ‌های افلاکس، جهش در پورین‌ها و تغییر در گیرنده دارو قادر به ایجاد مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام هستند (۲). در هر حال، تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از مهم‌ترین و شایع‌ترین عوامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در باسیل‌های گرم منفی می‌باشد (۲، ۱).

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بر اساس ساختار مولکولی، نوع سوبسترا و مهار کننده به سه فنوتیپ اصلی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع ESBLs (Extended spectrum beta-lactamases)، متالوبتالاکتامازها (Metallo-beta-lactamase یا MBLs) و بتالاکتامازهای نوع AmpC تقسیم می‌شوند (۳). در حال حاضر چندین روش فنوتیپی مانند دیسک ترکیبی با کلاولانیک اسید و روش دیسک سینرژی به‌عنوان تست تأییدی جهت شناسایی ایزوله‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع ESBLs استفاده می‌گردد (۵، ۴). حساسیت تست‌های تأییدی ESBLs در صورت حضور هم‌زمان دیگر بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مانند MBLs و بتالاکتامازهای نوع AmpC و دیگر مکانیسم‌های مقاومت مانند فعالیت پمپ‌های افلاکس و جهش در پورین‌ها کاهش می‌یابد (۶-۴). این کاهش حساسیت منجر به ایجاد خطا در شناسایی، تفسیر و نتایج منفی کاذب در این تست‌ها می‌گردد (۸، ۷). علت این اختلال، همپوشانی دیگر مکانیسم‌ها با آنزیم‌های ESBLs می‌باشد (۶-۴). هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی روش فنوتیپی بتالاکتاماز دیسک تست جهت شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در جدایه‌های پسودوموناس آئروژینوزا دارای مقاومت چندگانه بود.

روش بررسی

از سال ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۱ در مجموع ۱۰۰ جدایه بالینی پسودوموناس آئروژینوزا دارای مقاومت چندگانه و مقاوم به کاربا‌پنم‌ها(ایمیپنم و مروپنم) از بیماران دچار سوختگی بستری در بیمارستان شهید مطهری تهران جمع‌آوری شد. جهت تعیین هویت جدایه‌ها، از رنگ‌آمیزی گرم، تولید رنگدانه و تست‌های بیوشیمیایی شامل عدم تخمیر لاکتوز در محیط مکانکی، تولید اکسیداز، تست TSI (Triple sugar iron)، تست اکسیداسیون- فرمانتاسیون (تخمیر) (Oxidation-Fermentation یا OF)، رشد در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و تست تحرک استفاده شد (۹). جهت انجام تست‌های بیوشیمیایی، پسودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به عنوان سویه شاهد مورد استفاده قرار گرفت.

جهت تعیین حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های آگمنتین (آموکسی‌سیلین ۳۰ میکروگرم و کلاولانیک ۱۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفپودوکسیم (۳۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم) و پلی‌میکسین (۳۰۰ واحد) از روش انتشار در دیسک مطابق استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) استفاده شد. (۱۰). اشرشیاکلی ATCC 25922 و پسودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به عنوان سویه شاهد جهت انجام آنتی‌بیوگرام مورد استفاده قرار گرفت (۱۰).

شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع ESBLs به روش دیسک ترکیبی با کلاولانیک اسید: برای این کار، مطابق دستورالعمل CLSI عمل شد (۱۱). ابتدا از جدایه بالینی

استاندارد McFarland ۰/۵ تهیه گردید و به صورت چمنی بر روی سطح محیط Mueller-Hinton agar کشت داده شد. سپس دیسک سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) به فاصله ۳۰ میلی‌متر از دیسک سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)/ کلاولانیک اسید (۱۰ میکروگرم)، دیسک سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) به فاصله ۳۰ میلی‌متر از دیسک سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)/ کلاولانیک اسید (۱۰ میکروگرم) و دیسک سفپودوکسیم (۳۰ میکروگرم) به فاصله ۳۰ میلی‌متر از دیسک سفپودوکسیم/ کلاولانیک اسید (۱۰ میکروگرم) بر روی محیط قرار گرفت. مطابق استاندارد CLSI، افزایش قطر هاله عدم رشد در اطراف هر یک از دیسک‌های حاوی کلاولانیک اسید به اندازه بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر در مقابل دیسک‌ها فاقد کلاولانیک اسید نشان دهنده حضور ESBLs در جدایه‌ها بود. از کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 به عنوان شاهد مثبت و اشرشیاکلی ATCC 25922 و پسودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع ESBLs به روش دیسک سینرژی: در این روش پس از کشت باکتری بر روی محیط (مشابه با روش دیسک ترکیبی با کلاولانیک اسید) ابتدا یک دیسک آگمنتین [آموکسی‌سیلین (۲۰ میکروگرم)/ کلاولانیک اسید (۱۰ میکروگرم)] در مرکز پلیت قرار داده شد. سپس دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم) و سفپیم (۳۰ میکروگرم) در اطراف آن و به فاصله ۳ سانتی‌متری از دیسک آگمنتین قرار گرفت. افزایش هاله عدم رشد در اطراف هر یک از دیسک‌های سفتازیدیم، سفوتاکسیم، آزترونام و سفپیم به سمت دیسک آگمنتین نشان دهنده حضور ESBLs می‌باشد. در این روش از سویه‌های استاندارد مورد استفاده در روش دیسک ترکیبی به عنوان شاهدهای مثبت و منفی استفاده شد (۶).

شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف با روش بتالاکتاماز دیسک تست: اساس این روش بر مبنای حضور و ترشح بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در فضای پری‌پلاسمیک باسیل‌های گرم منفی می‌باشد (۸، ۷). در این روش، ابتدا مقداری بافر TE 100X (Tris-EDTA-100X) به نسبت برابر (۱/۱)، با سرم فیزیولوژی رقیق شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول حاصل به دیسک‌های بلانک (فاقد آنتی‌بیوتیک) اضافه گردید و پس از خشک شدن دیسک‌ها در دمای اتاق، از آن‌ها استفاده شد. در ادامه یک سویه حساس به سفوتاکسیم (پسودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853) در محیط Mueller-Hinton agar به روش چمنی کشت داده شد و یک دیسک سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) بر روی محیط قرار گرفت. در بالا و پایین دیسک سفوتاکسیم، دیسک‌های بدون آنتی‌بیوتیک حاوی بافر TE قرار داده شد و به هر یک از دیسک‌ها، کلونی نمونه‌های پسودوموناس آئروژینوزا اضافه شد. بافر TE موجود در این دیسک‌ها موجب تخریب غشای خارجی و آزاد شدن آنزیم‌های بتالاکتاماز به محیط کشت می‌شود. در صورت وجود بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در جدایه بالینی، سویه حساس کشت داده شده می‌تواند به سمت دیسک سفوتاکسیم رشد کند. از سویه‌های استاندارد اشرشیاکلی ATCC 25922 و پسودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

شناسایی کاربانپنمازها به روش MHT (Modified Hodge Test): مطابق دستورالعمل CLSI، برای غربالگری جدایه‌های تولید کننده کاربانپنماز از روش MHT استفاده شد (۱۰). ابتدا از یک سویه حساس به ارتانپنم (اشرشیاکلی ATCC 25922) استاندارد McFarland ۰/۵ تهیه و به نسبت ۱/۱۰ رقیق و در سطح محیط Mueller-Hinton agar به‌روش چمنی کشت داده شد. سپس یک دیسک ارتانپنم (۱۰ میکروگرم) در مرکز محیط قرار داده شد و جدایه‌های بالینی به صورت یک خط

از کناره پلیت تا کناره دیسک ارتاپنم کشت داده شدند. در صورتی که جدایه تولید کننده کارباپنماز باشد، آنزیم کارباپنماز در محیط ترشح شده، باعث تجزیه ارتاپنم می‌شود و در این صورت سویه حساس ATCC 25922 توانایی رشد به سمت دیسک ارتاپنم را در کنار جدایه بالینی پیدا می کند.

شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز به روش PCR (Polymerase chain reaction): ابتدا DNA توتال جدایه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت Bioneer) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{OXA}، bla_{PER-1}، bla_{PSE} و bla_{CTX-M} با استفاده از پرایمرهای اختصاصی لیست شده در جدول ۱ و با استفاده از دستگاه Thermal Cycler T100 Bio-Rad شناسایی شدند (۱۲). شرایط واکنش PCR شامل دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (یک بار) و ۳۰ سیکل شامل دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال یک دقیقه، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و یک سیکل شامل دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

واکنش PCR با وجود سویه‌های شاهد کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 (دارای ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{CTX-M}) و پسودوموناس آئروژینوزا KOAS (دارای bla_{PER}) در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Taq DNA Polymerase Master Mix Red(Ampliqon,Co)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse با غلظت ۱۰ پیکومول، ۲ میکرولیتر DNA و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر بود. سپس محصولات PCR در ژل آگارز یک درصد حاوی رنگ Green viewer الکتروفورز شدند و در نهایت، ژل از نظر وجود ژن‌های مورد نظر در دستگاه Gel Doc مورد بررسی قرار گرفت.

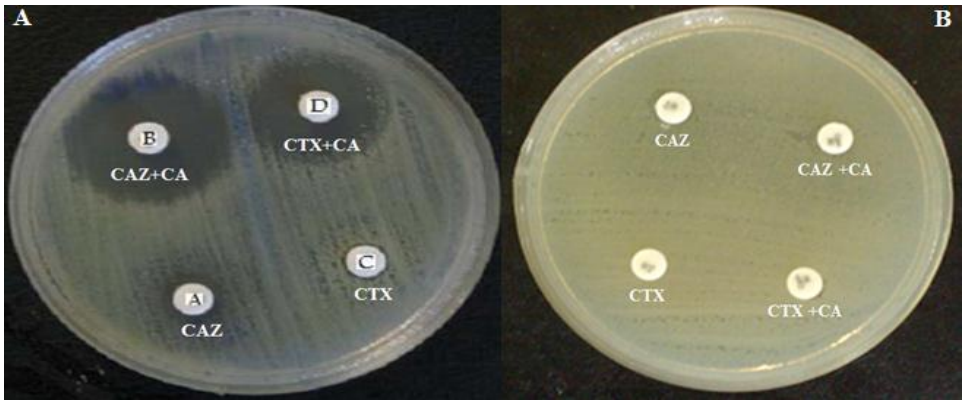
جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده و دمای اتصال آن‌ها جهت شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف

ژن هدف	توالی پرایمر ('3 -'5)	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	اندازه محصول (جفت باز)
bla_{SHV}	F-TCAGCGAAAAACACCTTG R-TCCCGCAGATAAATCACC	۵۱	۴۷۲
bla_{TEM}	F-GAGTATTCAACATTTCCGTGTC R-TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	۵۴	۸۰۰
bla_{OXA}	F-TCAACAAATCGCCAGAGAAG R-TCCCACACCAGAAAAACCAG	۵۶	۲۷۶
bla_{PER}	F-GGGACARTCSKATGAATGTCA R-GGYSGCTTAGATAGTGCTGAT	۴۷	۹۲۶
bla_{PSE}	F-AATGGCAATCAGCGCTTC R-GCGCGACTGTGATGTATA	۴۸	۶۹۸
bla_{CTX-M}	F-GCGATGGGCAGTACCAGTAA R-TTACCCAGCGTCAGATTCCG	۶۰	۳۹۲

نتایج

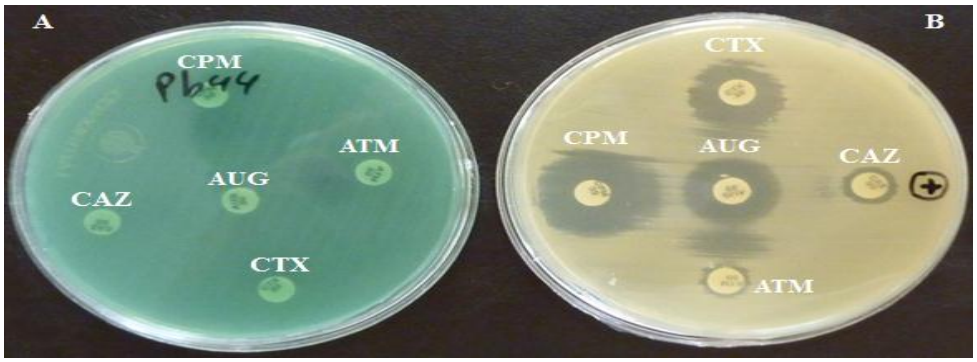
تمامی جدایه‌های بالینی به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین/ کلاولانیک اسید، سفوتاکسیم، سفپودوکسیم، ارتاپنم، ایمی‌پنم، مروپنم، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. میزان مقاومت به سفپیم و سفتازیدیم به ترتیب ۹۸ و ۸۲ درصد بود و همه جدایه‌ها نسبت به پلی‌میکسین حساسیت داشتند. تنها سه جدایه به روش دیسک ترکیبی با کلاولانیک اسید، به عنوان تولید

ESBLs شناسایی شد. در ۹۷ درصد جدایه‌ها قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های مورد استفاده در روش دیسک ترکیبی به تنهایی و همراه با کلاولانیک اسید صفر بود و کلاولانیک اسید باعث تشکیل هاله عدم رشد در اطراف هیچ کدام از دیسک‌های سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفپودوکسیم نشده بود (شکل ۱). همچنین، هیچ یک از جدایه‌ها به روش دیسک سینرژی، تولید کننده ESBLs نبودند. قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده این روش شامل آزترونام، سفتازیدیم، سفپیم، سفوتاکسیم و آموکسی‌سیلین/ کلاولانیک اسید صفر بود (شکل ۲).



شکل ۱. شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به روش دیسک ترکیبی با کلاولانیک اسید.

قسمت A: کلاولانیک اسید (CA)در سویه شاهد مثبت (کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603) باعث افزایش قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های سفتازیدیم(CAZ) و سفوتاکسیم (CTX)شد. قسمت B: کلاولانیک اسید باعث ایجاد هاله عدم رشد در اطراف هیچ کدام از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی در جدایه بالینی پسودوموناس آئروژینوزا نشد.



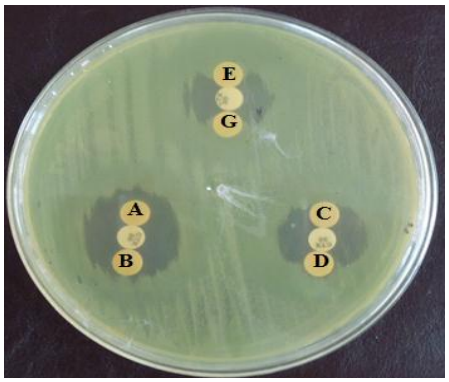
شکل ۲. شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به روش دیسک سینرژی

قسمت A: قطر هاله عدم رشد در اطراف تمام آنتی‌بیوتیک‌ها آموکسی سیلین/ کلاولانیک اسید (آگمنتین (AUG))، سفپیم (CPM)، آزترونام (ATM)، سفتازیدیم (CAZ) و سفوتاکسیم (CTX)در جدایه بالینی پسودوموناس آئروژینوزا صفر است. قسمت B: ا(کنترل مثبت) یجاد هاله در اطراف هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها به سمت دیسک آگمنتین، نشان دهنده تولید ESBLs (Extended spectrum beta-lactamases) می‌باشد.

با استفاده از روش بتالاکتاماز دیسک تست ۸۷ درصد جدایه‌ها به‌عنوان تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف شناسایی شدند (شکل ۳) و ۶۸ درصد جدایه‌ها به روش MHT به عنوان تولید کننده کارباپنماز شناسایی شدند (شکل ۴).

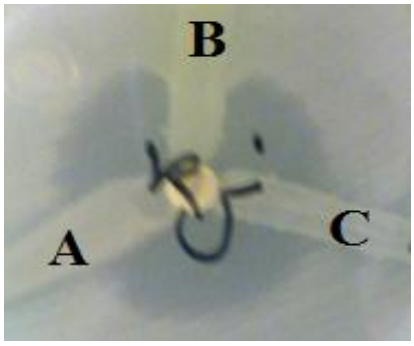
تمامی جدایه‌ها فاقد ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف bla_{CTX-M}، bla_{PSE}، bla_{SHV} و bla_{PSE} بودند. میزان شیوع ژن‌های bla_{OXA}، bla_{TEM} و bla_{PER} به‌ترتیب ۹۷، ۶۱ و ۱۳ درصد بود (شکل ۵). تمام جدایه‌ها حداقل یکی از ژن‌های کد کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف bla_{OXA}، bla_{TEM} و bla_{PER} را داشتند.

در بین جدایه‌های مورد بررسی، ۴۸ درصد آن‌ها هم‌زمان دارای bla_{TEM} و bla_{OXA} بودند و شیوع هم‌زمان bla_{PER}، bla_{TEM} و bla_{OXA} در ۹ درصد و bla_{OXA-10} و bla_{PER} در ۴ درصد جدایه‌ها مشاهده شد.



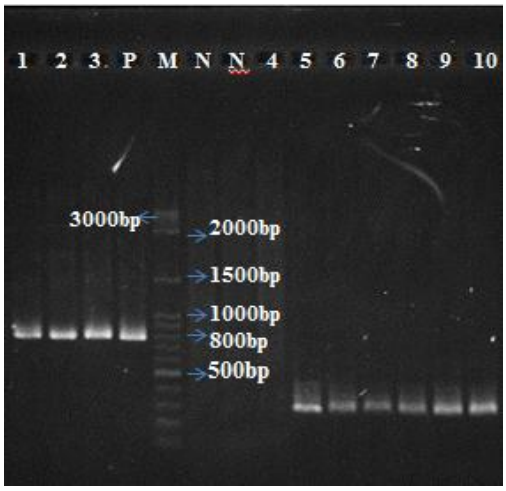
شکل ۳. شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به روش بتالاکتاماز دیسک تست با استفاده از دیسک سفوتاکسیم

قسمت‌های A و B: شاهد منفی (اشریشیاکلی ATCC 25922 و پسودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853)، قسمت‌های C, D, E و G: جدایه‌های پسودوموناس آئروژینوزا تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف. آزاد شدن بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از دیسک های بلانک آغشته با جدایه‌های مورد بررسی (دیسک‌های بلانک D, C, G و F) باعث رشد سویه حساس به‌سمت دیسک سفوتاکسیم شده است.



شکل ٤. شناسایی کارباپنمازها به روش MHT (Modified Hodge Test)

قسمت A: شاهد منفی، قسمت B: جدایه تولید کننده کارباپنماز [تولید کارباپنماز باعث رشد سویه حساس به ارتاپنم (اشریشیاکلی ATCC 25922) به سمت دیسک ارتاپنم شده است] و قسمت C: جدایه فاقد کارباپنماز



شکل ۵. نمای الکتروفورزی محصولات PCR (Polymerase chain reaction) ژن‌های bla_{TEM} و bla_{OXA}

M: اندازه نشانگر، P: شاهد مثبت، N: شاهد منفی، شماره ۱ تا ۳ (۸۰۰ جفت باز) bla_{TEM} و شماره ۴ تا ۱۰ (۲۷۶ جفت باز) bla_{OXA}

بحث

در مطالعه حاضر، تمامی جدایه‌های مورد بررسی، حداقل یکی از ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف bla_{PER}، bla_{TEM} و bla_{OXA} را داشتند. از سه روش دیسک ترکیبی با کلاولانیک اسید، دیسک سینرژی و بتالاکتاماز دیسک تست جهت شناسایی فنوتیپی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف استفاده شد. به جز سه جدایه، همه جدایه‌ها در روش دیسک ترکیبی فاقد قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفپودوکسیم به‌تنهایی و همراه با کلاولانیک اسید بودند. در روش دیسک سینرژی نیز تمامی جدایه‌ها فاقد هر گونه هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های آموکسی سیلین/کلاولانیک اسید، آزترونام، سفپیم، سفوتاکسیم و سفتازیدیم مورد استفاده در این روش بودند. به نظر می‌رسد که وجود سایر بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مانند MBLs، AmpC، کارباپنمازها و همچنین دیگر مکانیسم‌های مقاومت مانند جهش در پورین‌ها و فعالیت بالای پمپ‌های افلاکس، باعث کاهش حساسیت روش‌های دیسک ترکیبی با کلاولانیک اسید و دیسک سینرژی شده است (۱۳، ۷، ۴) که نتایج حاصل از این تست‌ها با نتایج PCR ژن‌های ESBLs در تحقیق حاضر همخوانی نداشت.

در بررسی حاضر، ۶۱ درصد جدایه‌ها دارای bla_{TEM} بودند. امروزه شیوع برخی از bla_{TEM} مقاوم به کلاولانیک اسید که به نام IRT شناخته می‌شوند، در حال افزایش می‌باشد که حضور آن‌ها در جدایه‌های مورد بررسی دور از انتظار نیست و جهت تأیید، به انجام توالی‌یابی ژن‌های bla_{TEM} در جدایه‌های مورد بررسی نیاز می‌باشد (۱۴، ۳). همچنین، تحقیقات نشان داده‌اند که بسیاری از بتالاکتامازهای گروه D در طبقه‌بندی Ambler (مانند bla_{OXA})، به مهار توسط کلاولانیک اسید مقاوم هستند یا حساسیت کمتری به آن دارند (۱۴، ۳، ۲).

از آن‌جایی که به ترتیب ۹۷ و ۶۱ درصد از جدایه‌ها در بررسی حاضر دارای bla_{OXA} و bla_{TEM} بودند، شاید یکی از دلایل کاهش حساسیت روش دیسک ترکیبی با کلاولانیک اسید و دیسک سینرژی، عدم مهار این آنزیم‌ها توسط کلاولانیک اسید باشد (۱۵، ۱۴، ۳). البته لازم به ذکر است که جهت تأیید این گفته، به تعیین توالی ژن‌های bla_{OXA} و bla_{TEM} در جدایه‌های مورد بررسی نیاز می‌باشد. بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، ۶۸ درصد جدایه‌های مورد

بررسی به روش MHT به عنوان تولید کننده کارباپنماز شناخته شدند. یکی از شایع‌ترین کارپاپنمازها در پسودوموناس آئروژینوزا، MBLs می‌باشد. این آنزیم‌ها علاوه بر هیدرولیز کارباپنم‌ها، قادر به هیدرولیز سفالوسپورین‌ها مانند سفتازیدیم و سفوتاکسیم هستند (۱۶، ۴). حضور هم‌زمان MBLs با دیگر بتالاکتامازها مانند ESBLs، باعث همپوشانی آن‌ها با یکدیگر و باعث کاهش حساسیت تست‌های فنوتیپی شناسایی ESBLs و در نهایت، ایجاد نتایج منفی کاذب در آن‌ها می‌گردد (۱۶، ۴).

آنزیم‌های MBLs توسط عوامل Chelator (جذب کننده) مانند EDTA مهار می‌شوند (۱۴، ۳). از آن‌جایی که در روش بتالاکتاماز دیسک تست از بافر TE حاوی Tris و EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) استفاده می‌شود، MBLs نقشی در مثبت شدن روش بتالاکتاماز دیسک تست نخواهند داشت؛ چرا که EDTA باعث مهار آنزیم‌های MBLs می‌شود (۱۶، ۴). در روش بتالاکتاماز دیسک تست، ۸۷ درصد جدایه‌ها به عنوان تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف شناخته شدند که این یافته با نتایج حاصل از شناسایی ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به روش PCR همخوانی بیشتری داشت. به دلیل این‌که غشای خارجی باکتری در روش تست بتالاکتاماز دیسک تخریب می‌شود، مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در باکتری مانند پمپ‌های افلاکس و عدم نفوذ(به‌علت جهش در پورین‌ها) کارایی خود را از دست می‌دهند (۸-۶)، بنابراین نتایج مثبت در این روش می‌تواند نشان دهنده فعال بودن این مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در جدایه‌های مورد بررسی نیز باشد.

طی مطالعات مختلف، شیوعی از اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه دارای ژن‌های ESBLs در کرمان گزارش شد که روش‌های فنوتیپی تأییدی ESBLs و AmpC قادر به شناسایی آن‌ها نبود (۱۹-۱۷). مطالعه منصوری و همکاران در کرمان نشان داد که ۲۸ جدایه مورد بررسی شامل ۶ جدایه کلبسیلا پنومونیه و ۲۲ جدایه اشرشیاکلی مقاوم به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف دارای ژن بتالاکتاماز، با روش‌های معمول شناسایی ESBLs قابل شناسایی نبودند (۱۹). همچنین، در مطالعه کلانتر نیستانکی و همکاران که بر روی پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران دچار سوختگی انجام شد، تنها ۲ جدایه به روش دیسک ترکیبی با کلاولانیک اسید به عنوان تولید کننده ESBLs شناسایی شدند و ۵۱ درصد جدایه‌ها AmpC overproducer بودند (۱۶). این احتمال وجود دارد که حضور هم‌زمان ESBLs و AmpC، باعث کاهش حساسیت تست‌های تأییدی ESBLs در جدایه‌های مورد بررسی در مطالعه آنان شده است (۱۲).

در مطالعه Song و همکاران که جهت شناسایی جدایه‌های تولید کننده بر روی اعضای خانواده انتروباکتریاسه دارای ژن ESBLs انجام گرفته بود، ۹/۵ درصد جدایه‌ها با روش‌های تأییدیه ESBLs قابل شناسایی نبودند (۲۰). Rodriguez-Martinez و همکاران در مطالعه خود گزارش نمودند که از ۳۲ نمونه بالینی پسودوموناس آئروژینوزا تولید کننده بتالاکتاماز، هیچ کدام با استفاده از روش دیسک ترکیبی به عنوان تولید کننده بتالاکتاماز شناسایی نشدند (۲۱). مقایسه نتایج تحقیق Rodriguez-Martinez و همکاران با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، نشان دهنده شیوع جدایه‌های دارای چندین مکانیسم مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در بین باسیل‌های گرم منفی در ایران و دیگر نقاط جهان می‌باشد. شیوع چنین جدایه‌هایی نه تنها خطری جدی در درمان عفونت ایجاد شده توسط آن‌ها و کاهش گزینه‌های درمانی می‌باشد، بلکه باعث کاهش حساسیت تست‌های معمول آزمایشگاهی در شناسایی فنوتیپ بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مانند ESBLs می‌شود (۴). بنابراین، معرفی روش‌هایی به عنوان جایگزین روش‌های قبلی جهت شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف

در تحقیقات و آزمایشگاه‌های بالینی، ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به نتایج بررسی حاضر، روش بتالاکتاماز دیسک تست می‌تواند جهت شناسایی حضور بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در جدایه‌های بالینی دارای چندین مکانیسم مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام استفاده شود. لازم به ذکر است که جهت تأیید این روش، بررسی‌های بیشتر به ویژه در بین باسیل‌های گرم منفی خانواده انتروباکتریاسه مورد نیاز می‌باشد که از اهداف مورد نظر محققان در تحقیقات آینده است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت تأمین بودجه این طرح تحقیقاتی به شماره ۱۹۲۰٤ و همچنین، دانشگاه علوم پزشکی کرمان به دلیل انجام قسمتی از تحقیق در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی افضلی‌پور، کمال تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

References

1. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 2010; 300(6): 371-9.
2. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol* 2011; 2: 65.
3. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 969-76.
4. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect* 2009; 73(4): 345-54.
5. Sundin D. Hidden beta-lactamases in the enterobacteriaceae – dropping the extra disks for detection, part II. *Clinical Microbiology Newsletter* 2009; 31(7): 47-52.
6. Willems E, Verhaegen J, Magerman K, Nys S, Cartuyvels R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging beta-lactamases in Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 41(2): 99-109.
7. Doi Y, Paterson DL. Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases. *Int J Infect Dis* 2007; 11(3): 191-7.
8. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(1): 161-82, Table.
9. Mahon CR, Lehman D, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2007.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement [Online]. [cited 2012 Jan]; Available from: URL: http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E. p. 58, 60, 114-22.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for

antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement [Online]. [cited Jun 2014]; Available from: URL: http://ncipd.org/control/images/NCIPD_docs/CLSI_M100-S24.pdf

12. Neyestanaki DK, Mirsalehian A, Rezagholizadeh F, Jabalameli F, Taherikalani M, Emaneini M. Determination of extended spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases and AmpC-beta-lactamases among carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns* 2014; 40(8): 1556-61.
13. Martine E, Escobar Pérez J, Márquez C, Vilacoba E, Centró D, Leal AL, et al. Emerging and existing mechanisms co-operate in generating diverse ß-lactam resistance phenotypes in geographically dispersed and genetically disparate *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2013; 1(3): 135-42.
14. Poole K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(17): 2200-23.
15. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new ß-Lactamases. *N Engl J Med* 2005; 352(4): 380-91.
16. Kalantar D, Jabalameli F, Emaneini M. The modified Hodge test for identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing isolates. *Burns* 2013; 39(2): 370-1.
17. Kalantar D, Mansouri S. Emergence of multiple β-lactamases produced by *Escherichia coli* clinicalisolates from hospitalized patient in Kerman, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2010; 3(4): 137-45.
18. Mansouri S, Kalantar D, Asadollahi P, Taherikalani M, Emaneini M. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended spectrum beta-lactamases and AMPC type beta-lactamases isolated from hospitalized patients in Kerman, Iran. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2012; 71(2): 81-6.
19. Mansouri S, Neyestanaki DK, Shokoohi M, Halimi S, Beigverdi R, Rezagholezadeh F, et al. Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs types of ß-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* producing Extended Spectrum ß-lactamases in Kerman, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2014; 7(2): e8756.
20. Song W, Jeong SH, Kim JS, Kim HS, Shin DH, Roh KH, et al. Use of boronic acid disk methods to detect the combined expression of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases and extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., and *Proteus mirabilis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57(3): 315-8.
21. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(11): 4783-8.

Evaluation of the β-Lactamase Disk Test Method in the Detection of Extended-Spectrum-β-Lactamases in Clinical Isolates of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Davood Kalantar-Neyestanaki, Ph.D.[1], Fereshteh Jabalameli, Ph.D.[2], Akbar Mirsalehian, Ph.D.[3], Mohammad Emaneini, Ph.D.[4*]

1. Assistant Professor, Department of Microbiology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2. Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: emaneini@gmail.com

(Received: 29 Dec 2014 Accepted: 5 May 2015)

Abstract

Background & Aims: The production of extended-spectrum-β-lactamases (ESBLs) is the main mechanism of resistance to β-lactam antibiotics. The outbreak of isolates simultaneously possessing several resistance mechanisms to β-lactam antibiotics caused a decrease in sensitivity of the confirmatory tests for ESBL. The aim of this study was the evaluation of the β-lactamase disk test method in the detection of ESBLs in clinical isolates of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods: A total of 100 multidrug-resistant P. aeruginosa isolates were recovered from burn patients. The sensitivity of the isolates to different antibiotics was determined using the standard disk diffusion method. ESBL-producing isolates were detected through the combination disk test with clavulanic acid, double disk synergy test, and β-lactamase disk test. Carbapenemase-producing isolates were detected using the Modified Hodge Test (MHT). The ESBLs genes (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{OXA}$, *bla*$_{PER}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX-M}$ and *bla*$_{PSE}$) were determined through polymerase chain reaction (PCR).

Results: All isolates were multidrug resistant. Only 3 isolates were detected as ESBL-producing isolates through combination disk test. No ESBL-producing isolates were detected through double disk synergy test. Among the 100 studied isolates, 87% were detected as ESBL-producing isolates and 68% as carbpenemase-producing isolates through β-lactamase disk test. . The prevalence of bla$_{TEM}$, bla$_{OXA}$, and bla$_{PER}$ among isolates were 97%, 61%, and 13%, respectively. All isolates were negative for bla$_{SHV}$, bla$_{PSE}$, and bla$_{CTX-M}$.

Conclusion: According to the results obtained in this study, the β-lactamase disk test is suitable for the detection of ESBLs in multidrug resistant isolates. However, further investigation is required.

Keywords: β-lactam resistance, Extended-spectrum-β-lactamases (ESBLs), Confirmatory tests, *Pseudomonas aeruginosa*, Burn

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23(1): 1-11