CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Simorgh Research Repository

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکتری تخصصی رشته باکتری شناسی پزشکی

عنوان:

بررسی مکانیسم های مولکولی مقاومت به کارباپنم‌ها در ایزوله‌های بالینی پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیمارستانهای دانشگاه علوم پزشکی کرمان

نگارش: فرحناز پهلوان زاده

استاد راهنما: دکتر شهلا منصوری، دکتر داود کلانتر نیستانکی و
دکتر محمد معتمدی فر

سال تحصیلی: ۱۳۹۸ ـ ۱۳۹۷

بسمه تعالی

تاریخ ۹۷/۱۲/۲۱

شماره ۹۸/۳/۵۱۶

پیوست .....

صورتجلسه دفاع از پایان نامه

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی **خانم فرحناز پهلوان زاده** دانشجوی دکتری تخصصی (Ph.D) رشته **باکتری شناسی پزشکی** دانشکده **پزشکی** دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان" بررسی مکانیسم های مولکولی مقاومت به کاربانیم ها در ایزوله های بالینی پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیمارستان های دانشگاه علوم پزشکی کرمان " در ساعت ۱۰:۳۰ صبح روز سه شنبه مورخ **۹۷/۱۲/۲۱** با حضور اعضای محترم هیات داوران به شرح ذیل:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف: استادان راهنما	سرکار خانم دکتر شهلا منصوری جناب آقای دکتر داود کلانتر جناب آقای دکتر محمد معتمدی فر	
ب: استادان مشاور	.....	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	سرکار خانم دکتر رویا احمد رجبی	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر سید امین آیت اللهی موسوی	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکتر رضا قنبرپور	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکتر غلامحسین شهیدی	
ه: نماینده تحصیلات تکمیلی	جناب آقای دکتر محمدرضا شکیبایی	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه ..... خوب ..... و نمره ..... ۱۷/۹۷ ..... مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
دانشکده پزشکی افضلی پور

چکیده :

زمینه و هدف : پسودوموناس‌آئروژینوزا یکی از باسیل های گرم منفی غیر تخمیری و از عوامل مهم عفونت بیمارستانی بخصوص در افراد با سیستم ایمنی مشکل دار می باشد. کارباپنم بعنوان مهم ترین داروی انتخابی در درمان عفونتهای ناشی از این باکتری در بیماران مورد استفاده قرار می‌گیرد. ولی این باکتری با وجود مقاومتهای ذاتی و کسب شاخصهای مقاومت از سایر ارگانیزمها در برابر داروهای مصرفی با درمان مبارزه میکند. این مطالعه جهت بررسی مکانیزمهای مقاومت ذاتی و اکتسابی بکار رفته بوسیله باکتری برای مقاومت در برابر کارباپنم ها انجام گرفت .

روش بررسی : این بررسی روی ۱۷۰ ایزوله بالینی پسودوموناس آئروژینوزا در شهر کرمان انجام شد. حساسیت آنتی بیوتیکی برای ۱۱ آنتی بیوتیک مختلف با روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. MIC ایزوله های مقاوم در حضور چهار آنتی بیوتیک ایمی پنم ، مروپنم ، سفتازیدیم و سفپیم به تنهایی تعیین و سپس MIC آنها نیز در حضور کلوگزاسیلین بدست آمد. تولید متالوبتالاکتامازها هم بصورت فنوتیپی با روش Double Disk Synergy Test در حضور EDTA و ۲-مرکاپتوپروپیونیک اسید و هم بصورت ژنوتیپی با روش PCR بررسی شد. شناسایی فنوتیپی پمپهای افلاکس بصورت فنوتیپی در حضور چهار آنتی بیوتیک ایمی پنم ، مروپنم ، سفتازیدیم و کاربنی سیلین به تنهایی و در حضور مهار کننده پمپ افلاکس فنیل آرژی‌نین بتانفتیل‌آمید دی‌هیدروکلراید تعیین شد. همچنین نقش روی در مقاومت به کارباپنم ها با تعیین MIC بدست آمد. سکانس ژنی پروتئین پورین *oprD* جهت شناسایی جهش های مخدوش کننده بررسی شد و در نهایت میزان بیان ژن mexA به روش Real Time PCR بدست آمد. از روش ERIC-PCR برای تایپینگ و بررسی ارتباط ژنتیکی ایزوله ها استفاده شد.

یافته ها : روش دیسک دیفیوژن نشان داد که ۱۰۰درصد ایزوله ها به کلیستین حساس بودند و بر طبق نتایج حاصله میزان حساسیت به ایمی پنم (۶۴/۱ ٪)، مروپنم (۶۳/۵ ٪)، دوری پنم (۶۵/۹ ٪)، سفتازیدیم (۷۳/۵ ٪)، سفپیم (۷۱/۸ ٪)، آزترونام (۶۲/۹ ٪)، جنتامایسین (۶۴/۷ ٪)، سیپروفلوکساسین (۷۰/۶ ٪)، پیپراسیلین/تازوباکتام (۷۷/۱ ٪) و کاربنی سیلین (۶۲/۹ ٪) بود. از کل ۶۱ ایزوله مقاوم به کارباپنم ، (۹۱/۸)۵۶ نمونه آنزیم دارای آنزیم AmpC بودند و کاهش دوبرابری یا بیشتر را در MIC در حضور کلوگزاسیلین نشان می‌دادند. در بین ۶۱ ایزوله مقاوم به کارباپنم در زمان استفاده از EDTA هیچ واکنش مثبتی دیده نشد و همه نمونه ها منفی بودند در حالی که استفاده از ۲-مرکاپتوپروپیونیک اسید وجود ۴ (۶/۵ ٪) ایزوله‌های حاوی آنزیم متالوبتالاکتاماز را نشان میداد. حضور فنیل آرژینین بتا نفتیل آمید بعنوان مهارکننده پمپ های

افلاکس کاهش MIC را در ۶۱ ایزوله مقاوم به کاربا‌پنم نشان داد. . در تمام این ایزوله ها پمپهای افلاکس فعال بوده و دارو را به خارج سلول پمپ می نمودند. حضور روی ($ZnCl_2$) در محیط در غلظت ۰/۲ میلی مولار سبب تغییر MIC در ایزوله های حساس و سویه استاندارد گردید ولی روی ایزوله های مقاوم تاثیری نداشت. با این حال در غلظتهای بالاتر از ۰/۲ میلی مولار سویه های مقاوم نیز تغییرات افزایشی را در MIC نشان می دادند. واکنش PCR حضور آنزیمهای متالوبتالاکتامازی bla_{IMP} ، bla_{VIM} ، bla_{SIM} و bla_{NDM} را در ۴ ایزوله نشان داد.

در روش ERIC-PCR با در نظرگرفتن درصد شباهت(۷۰ ٪) ۹ کلاستر و ۳ singleton بدست آمد که در ۶۱ ایزوله مقاوم به کاربا‌پنم شایعترین تیپهای رایج کلاستر ۸ با ۲۰ ایزوله و کلاستر ۶ با ۱۱ ایزوله بودند. نتایج تعیین توالی تغییراتی را بصورت پلی مورفیسم (جایگزینی آمینو اسیدها) ، حذف ، الحاق نوکلئوتیدها بصورت تکی و یا الحاق Insertion Sequence را در سکانس ژنی نمونه های بالینی در مقایسه با سویه استاندارد PAO1 نشان داد و میزان بیان ژن *mexA* در ۲۶(۴۲/۶ ٪) نمونه از ایزوله های مقاوم به کاربا‌پنم بیش از ۲ برابر (۷-۲) در مقایسه با سویه استاندارد PAO1 بود که نشان از فعالیت این پمپ در ایجاد مقاومت به دارو را داشت.

نتیجه گیری:

در این بررسی مقاومت چندگانه در ایزوله های پسودوموناس‌آئروژینوزا در ایزوله های بالینی زیاد بود و درگیری فاکتورهای متعددی را در ایجاد مقاومت به کاربا‌پنم ها نشان داد. در مطالعه حاضر یافتیم که در میان تمام مکانیزمهایی که سبب مقاومت به کاربا‌پنم ها می‌گردد، در درجه اول تغییرات تخریب کننده ژن پروتئین oprD و در درجات بعدی افزایش تولید AmpC و افزایش بیان پمپهای افلاکس MexAB-OprM و در نهایت تولید آنزیمهای متالوبتالاکتاماز و ESBL ها را در مقاومت به کاربا‌پنم ها نقش دارند. نتایج تایپینگ ERIC-PCR نشان از گوناگونی سویه های درگیر در بیماریزای و یکسان نبودن استرینها داشت. با توجه به مصرف دارویی کلوگزاسیلین در درمان عفونتهای استافیلوکوکی بعنوان یک پیشنهاد میتوان کلوگزاسیلین را با داروهای ضد پسودوموناسی جهت مهار آنزیم AmpC همراه نمود.

کلمات کلیدی : مقاومت ضدمیکروبی ، AmpC ، MBLs ، P4157* ، MexA ، OprD و Real Time PCR

* : فنیل آرژینین بتا نفتیل آمید دی‌هیدروکلراید

Abstract:

Background and Objectives : *Pseudomonas aeruginosa* is one of the non-fermented gram negative bacteria and is one of the most important factors in hospital infection, especially in people with immunocompromised system. Carbapenem is used as the most important selective drug in the treatment of infections caused by this bacterium in patients. But this bacterium does not respond to the treatment by possessing inherent resistance and acquired resistance determinant from other organisms.This study was conducted to investigate the innate and acquired resistance mechanisms used by bacteria to carbapenems resistance.

Methods**:** This study was performed on 170 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Kerman. Antibiotic susceptibility for 11 different antibiotics was determined using disk diffusion test. MIC resistant isolates were determined in the presence of four antibiotics: imipenem, meropenem, ceftazidime and cefipime alone, and then their MIC was obtained in the presence of coloxacillin. Phenotypic detection of metallo-β-lactamase in the presence of EDTA and 2-mercaptopropionic acid was done by the double disk synergy test. PCR method carried out for genotyping detection of metallo-β-lactamase. Detection of efflux pumps was determined in presence of imipenem, meropenem, ceftazidime and carbenicillin with/ or without Phe-Arg-β-naphthylamide dihydrochloride as efflux pump inhibitor. The $ZnCl_2$ role was determined by MIC determination in resistance to carbapenems. OprD protein gene sequence was investigated to detect the destructive mutations and eventually the level of *mexA* gene expression was determined by Real time PCR method. The clonal relationship of the carbapenem-resistant isolates was evaluated by enterobacterial repetitive intragenic consensus-PCR (ERIC-PCR).

Results: According to the results, the disk diffusion test showed that 100% of isolates were sensitive to colistin and the antibiotics resistance rate was as follow: imipenem (64.1%), meropenem (63.5%), doripenem (65.9 %), ceftazidime (73.5%), cefepime (71.8%), aztreonam (62.9%), gentamicin (64.7%), ciprofloxacin (70.6%), piperacillin/tazobactam (77.1%) and carbenicillin (62.9%).Out of 61 resistant isolates to carbapeneme, 56(91/8 %) samples had the AmpC enzyme and showed two fold decrease or even more in MIC in the presence of cloxacillin. No carbapenem resistant was observed among the 61 isolates using EDTA, while 2-mercaptopropionic acid showed 4 (6.5%) isolates containing metallo-β-lactamase enzyme.The Presence of Phe-Arg-β-naphthylamide dihydrochloride showed a reduction in MIC in 61

carbapenem resistant isolates as the efflux pumps inhibitor. All of isolates showed active efflux pumps. The Presence of zinc ($ZnCl_2$) in the culture at 0.2 mM concentration changed MIC among sensitive isolates and also standard species but had no effect on the resistant isolates. However, at concentrations higher than 0.2 mM, resistant strains also showed an increasing in MIC. PCR reaction demonstrated the presence of metallo-β-lactamase genes including bla_{IMP}, bla_{VIM} , bla_{SIM} and bla_{NDM} in 4 isolates. 9 clusters and 3 singletons were extracted by using ERIC-PCR method and considering the cut off value (70%). The most common types were eight cluster with 20 isolates and six cluster with 11 isolates among the 61 isolates resistant to carbapenem. The result of sequencing showed that all isolates had mutation in oprD gene and changes as polymorphism (amino acids replacements), deletion, insertion of one nucleotid or insertion of insertionals sequences in gene sequence of clinical samples in comparison to standard species PAO1. The expression levels of *mexA* in 26 (42.6%) resistant isolates to carbapenem was twice as much comparing to PAO1 which means the activity of the efflux pumps played an important role in the appearance of the resistance.

Conclusion: In this study, multiple resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates was high in clinical isolates. Multiple factors were involved in occurrence of resistance. We found that among all resistance mechanisms to carbapenems , *oprD* genes had destructive changes as the most important factor and then increasing of AmpC production, overexpression of MexAB-OprM and production of metallo-β-lactamases and ESBL had a significant effect on carbapenem resistance. ERIC-PCR typing showed a variety of species involved in pathogenesis and heterogeneity. Considering cloxacillin as the treatment for staphylococcus aureus infections, cloxacillin could be accompanied with antipseudomonas drugs for inhibition of AmpC enzyme.

Keywords: Antimicrobial resistance; AmpC; MBLs; P4157; MexA; OprD; Real Time PCR.

Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

(PhD)

Title:

Evaluation of molecular mechanisms of carbapenem resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals of Kerman University of Medical Sciences

By:

Farahnaz pahlavanzadeh

Supervisors:

1-Porf.Shahla Mansouri

2-Dr.Davood Kalantar-Neyestanaki

3-Porf.*Mohammad Motamedifar*

Year:

2019