https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
13rd Year, Vol. 13, No. 51, 2024 pp.35-50
Received: 25/05/2024 Accepted: 18/08/2024

(Research Paper)

Evaluation of Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC beta-lactamase activity in *Pseudomonas anrogenase* isolated from clinical specimens

Erfaneh Ghobakhloo
Department of Microbiology, Biological Sciences College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran.
e1836026@gmail.com
Fatemeh Noorbakhsh[\]
Department of Microbiology, Biological Sciences College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran.
Niloofar_noorbakhsh@yahoo.com.
Fahimeh Baghbani Arani
Department of Genetic, Biological Sciences College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran.
baghbani.f@gmail.com

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common opportunistic microorganisms causing infections in a wide variety of patients. Increasing intrinsic and acquired resistance to antibiotics is a global challenge for the treatment of infections. The aim of this study is to evaluate the extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC beta-lactamase activity of *Pseudomonas anrogenase* isolated from clinical specimens. In this research 55 strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from clinical patients were identified by biochemical methods and then their antibiotic resistance pattern was determined by diffusion method. The strains producing ESBLs were evaluated by combined test and AmpC by the double synergism phenotypic method. Molecular methods were also used to detect strains carrying ACC, FOX, MOX, DHA, MIR, CMY, TEM, SHV and CTX genes. In this study, the highest resistance was to the antibiotic meropenem (52.7%) and the lowest resistance was to the antibiotic colistin (1.8%). When the synergism of the double discs was examined, 61.8% of the strains were found to produce AmpC. None of the strains in this study were ESBLs. The frequencies of DHA, MOX, FOX, ACC, SHV and CTX genes were 30.9%, 12.7%, 81.8%, 27.3%, 5.5% and 5.5%, respectively. MIR, CMY and TEM genes were not observed in any of the strains in this study. The results showed the frequency of the FOX gene among the strains and the greater resistance of these strains to the antibiotic meropenem, and AmpC β-lactamase activity was evaluated as an important factor in the occurrence of antibiotic resistance.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, combined disc test, double disc synergism test,AmpC, ESBL

[\] Corresponding Author

3060-7647/ © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Ghobakhloo E., Noorbakhsh F., Baghbani Arani F. Evaluation of Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC beta-lactamase activity in Pseudomonas anrogenase isolated from clinical specimens. *Journal of Microbial Biology*, 2024; 13 (51): 35-50. 10.22108/bjm.2024.141472.1593

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common opportunistic microorganisms causing infections in various patients including respiratory infections, hereditary cystic fibrosis, bacteraemia, burns, septicemia and other infections. *P. aeruginosa* is resistant to a wide range of antibiotics, including penicillins, broad-spectrum cephalosporins and carbapenems. Increasing intrinsic and acquired resistance to antibiotics is a global challenge in the treatment of infectionsProduction of beta-lactamase enzymes and increased expression of efflux pumps play a major role in the resistance of Pseudomonas aeruginosa strains to beta-lactam antibiotics. Beta-lactams, such as cephalosporins, are antibiotics that are widely engineered to be resistant to the hydrolytic activities of beta-lactamase enzymes. The production of beta-lactamase enzymes is one of the main mechanisms by which Gram-negative bacteria develop resistance to beta-lactam antibiotics. With the indiscriminate use of this class of antibiotics and the selective pressure on bacteria, newer beta-lactamases have emerged that are resistant to these antibiotics a new class of these enzymes called broad-spectrum beta-lactamases. Nowadays, beta-lactamases are being released in a wide range and have spread to many bacteria, such as *P. aeruginosa*. These agents are placed on plasmids , which facilitates their spread in bacteria. In addition, bacteria that produce ESBLs are often resistant many non-beta-lactam drugs such as trimethoprim, quinolones, sulfamethoxazole and aminoglycosides, causing many problems in the treatment of infections caused by them. AmpC enzymes, often inducible by beta-lactams, are encoded by chromosomal genes and are present in many Gram-negative bacilli. Most of the enzymes are AmpC cephalosporinases, but to some extent they have the ability to hydrolyse other beta-lactams such as penicillins. This enzyme is resistant to inhibition by clavulanic acid and biologically confers resistance to cephamycins and oxyaminobutalactams. The aim of this study is to evaluate the extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC beta-lactamase activity in *P. aeruginosa* isolated from clinical specimens.

Materials & Methods:

This study was conducted on *P. aeruginosa* isolated from 55 clinical samples of patients referred to Milad Hospital in Tehran as outpatients and inpatients. Bacterial strains were identified by biochemical methods such as Gram stain, TSI, SIM, MRVP, indole, simon citrate, OF test and oxidase and then their antibiotic resistance pattern was determined by disc diffusion method. The strains producing ESBL were evaluated by combined disc test (to perform this step, combined disc method of clavonic acid, ceftazidime and cefotaxime purchased from Padton Teb Company was used. According to the company, after preparing a suspension of half of McFarland from the strains studied, disc of ceftazidime, ceftazidime clavonic, cefotaxime and cefotaxime clavonic acid were placed at a distance of 20 mm from each other on an agar plate after 24 hours of incubation at a temperature 37°C of the strains, if the increase in halo diameter associated with Clavoni compared to each of the antibiotics was 5 mm compared to their halo diameter alone, it confirms the presence of ESBLs) and AmpC by double disk synergism(culture was given on Mueller Hinton agar medium using swap sterile suspension equivalent to half of McFarland bacteria. A ceftazidime disc and a cefoxitin disc were then placed on the medium using sterile forceps. The plates were heated to 37°C for 24 hours. In this test, if after 24 hours a large halo around the ceftazidime disc and a small halo forms around the cefoxitin disc, and the ceftazidime halo has a flat end on the side of the cefoxitin halo, the DDT test is reported as positive (phenotypic method). Molecular methods have also been used to detect strains carrying the *ACC, FOX, MOX, DHA, MIR, CMY, TEM, SHV* and *CTX* genes by polymerase chain reaction. In this study, SPSS ver-22 software was used for statistical analysis of the collected data. The relationship of the information was considered significant using Chi-square test and P-value less than 0.05.

10.22108/bjm.2024.141472.1593

Results:

In the present study, the highest resistance to the antibiotic meropenem (52.7%) and the lowest resistance to the antibiotic colistin (1.8%) were observed. In addition, by examining the synergism of double discs, 61.8% of the strains were found to produce AmpC. None of the strains in this study were ESBLs. The frequencies of the *DHA, MOX, FOX, ACC, SHV* and *CTX* genes were 30.9%, 12.7%, 81.8%, 27.3%, 5.5% and 5.5%, respectively. *MIR, CMY* and *TEM* genes were not observed in any of the strains in this study. Among the strains studied, the highest gene coexistence is related to DHA and FOX genes (30.9%) and the lowest gene coexistence is related to ACC and MOX genes (1.8%). In addition, the CTX-ACC, CTX-MOX, SHV-ACC and SHV-MOX genes were not observed simultaneously in this study. In all the resistant strains studied, the highest frequency associated with the FOX gene and the lowest frequency with the MOX gene. Meanwhile, strains resistant to meropenem antibiotics had the highest frequency of genes studiedThe lowest frequency of genes was also observed in the strain resistant to colistin antibiotics. The frequency of SHV and CTX genes among all antibiotic resistant strains was observed at the same level (5.5%). Also with statistical analyses of resistance to ciprofloxacin, ceftazidime, lofloxacin, piperacillin, amikacin and gentamicin and SHV and CTX genes, also between resistance to amikacin and gentamicin antibiotics and ACC gene and finally between resistance to antibiotics gentamicin biotic and FOX gene were significantly related P value<0.05).

Conclusion:

The results showed the frequency of *FOX* gene among the strains and the greater resistance of these strains to the antibiotic meropenem, and AmpC β-lactamase activity was evaluated as an important factor in the occurrence of resistance to antibiotics.

Today, antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria is rapidly becoming a global public health crisis. In particular the emergence of ESBL and AmpC strains and the acquisition of other resistance genes with the ability to cope with new antibiotics is very worrying. This highlights the importance of continued and comprehensive studies of these strains. On the other hand, the number of organisms capable of producing ESBL and AmpC enzymes in Pseudomonas aeruginosa strains is increasing, which is one of the most important issues in the treatment of infections caused by this bacterium. In the present study, the strains carrying the genes studied were highly resistant to antibiotics. The study also founda significant association between AmpC-positive strains and antibiotic resistance . The study found that extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) resistance was not present in the strains tested, and a small number of strains carried the genes for this type of resistance. Since most resistance is induced, it seems that in recent years the antibiotics that induce this type of resistance have been used less in treatment and this resistance has decreased, but because of the increased use of third-generation cephalosporins, this resistance is still there. It is present at high levels in pathogen strains.

زیست‌شناسی میکروبی
سال سیزدهم، شماره ۵۱، ۱۴۰۳، صفحه ۳۵-۵۰
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۸

مقاله پژوهشی

بررسی فعالیت بتالاکتامازی طیف گسترده (ESBL) و AmpC بتالاکتامازی در سویه *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از نمونه‌های بالینی

عرفانه قباخلو
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران e1836026@gmail.com
فاطمه نوربخش*
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.niloofar_noorbakhsh@yahoo.com
فهیمه باغبانی آرانی
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایرانbaghbani.f@gmail.com

چکیده

سودوموناس آئروژینوزا یکی از میکروارگانیسم‌های فرصت‌طلب است که باعث عفونت در بیماران مختلف می‌شود. مقاومت ذاتی گسترده و افزایش مقاومت اکتسابی این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان عفونت‌های ناشی از این میکروارگانیسم را به یک چالش تبدیل می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت بتالاکتامازی ESBLs و AmpC و همچنین بررسی وجود ژن‌های دخیل در تولید این آنزیم‌ها در *سودوموناس آئروژینوزا* است. تعداد ۵۵ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران بالینی به روش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شده‌اند. سپس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها به روش انتشار از دیسک مشخص شد. سویه‌های مولد ESBLs به روش دیسک ترکیبی و AmpC به روش فنوتیپی سینرژیسم دو دیسک ارزیابی شدند. همچنین برای تشخیص سویه‌های حامل ژن‌های *ACC*، *FOX*، *MOX*، *DHA*، *MIR*، *CMY*، *TEM*، *SHV* و *CTX* از روش‌های مولکولی استفاده شد. در مطالعه حاضر با بررسی سینرژیسم دو دیسک، ۶۱/۸ درصد از سویه‌ها مولد AmpC مشاهده شدند. در این مطالعه هیچ‌یک از سویه‌های ESBLs نبودند. فراوانی هریک از ژن‌های *DHA*، *MOX*، *FOX*، *ACC*، *SHV* و *CTX* به‌ترتیب ۳۰/۹، ۱۲/۷، ۸۱/۸، ۲۷/۳، ۵/۵ و ۵/۵ درصد و ژن‌های *MIR*، *CMY* و *TEM* در این مطالعه در هیچ‌یک از سویه‌ها مشاهده نشدند. نتایج بیان‌کنندهٔ فراوانی ژن *FOX* در بین سویه‌ها و مقاومت بیشتر این سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک مروپنم بود؛ فعالیت AmpC بتالاکتامازی عاملی مهم در ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها ارزیابی شد.

واژه‌های کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، سینرژیسم دو دیسک، دیسک ترکیبی، AmpC، ESBL

نویسندهٔ مسئول مکاتبات: فاطمه نوربخش*

قباخلو ع.، نوربخش ف.، باغبانی آرانی ف. بررسی فعالیت بتالاکتامازی طیف گسترده (ESBL) وAmpC بتالاکتامازی در سویه سودوموناس آنروژینوزا جداشده از نمونه های بالینی. *زیست‌شناسی میکروبی*. ۱۴۰۳، ۱۳ (۵۱): ۳۵-۵۰. 10.22108/bjm.2024.141472.1593
3060-7647/ © 2024 The Authors
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-d/4.0/

مقدمه

سودوموناس‌ها جزء مهم‌ترین باکتری‌های گرم منفی و متعلق به شاخه پروتئوباکتریا، رده گاماپروتئوباکترها هستند. اعضای جنس سودوموناس، در همه جا وجود دارند؛ در خاک، مواد آلی درحال فساد، پوشش گیاهی، آب، محیط بیمارستان، مخازن مرطوب مانند وان دستشویی، توالت‌ها، زمین‌شورها، وسایل درمان تنفسی و دیالیز و حتی در محلول‌های ضدعفونی‌کننده یافت می‌شوند (۱, ۲). عفونت‌های ناشی از این باکتری به صورت‌های گوناگونی مانند عفونت‌های تنفسی در محیط‌های بیمارستانی و به‌خصوص به‌صورت ذات‌الریه انتقالی از سیستم تهویه، عفونت‌های سیستمیک، عفونت‌های دستگاه گوارش، عفونت در استخوان‌ها و مفاصل و درماتیت ظهور می‌کنند. این باکتری غالباً به‌صورت مزمن کلونیزه می‌شود و این خود منجر به تخریب بافت‌های ریه و کاهش فعالیت‌های ریوی می‌شود (۳, ۴).

سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهم‌ترین ارگانیسم‌های مقاوم در برابر عوامل آنتی‌بیوتیکی است. این باکتری از مهم‌ترین عوامل ایجاد عفونت در بیماران بستری‌شده در بیمارستان‌ها است که معمولاً به‌صورت باکتریمی و ذات‌الریه خود را نشان می‌دهد. *سودوموناس آئروژینوزا* علاوه بر اینکه ذاتاً در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است، این قابلیت را دارد تا در برابر آنتی‌بیوتیک‌های جدید، خاصیت مقاومتی خود را حفظ و به‌روزرسانی کند (۵).

بهترین گزینه برای درمان بسیاری از عفونت‌های باکتریایی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام است؛ با این حال، باکتری‌های گرم منفی قادرند با تولید آنزیم بتا-لاکتاماز نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت کسب کنند. آنزیم‌های بتالاکتاماز قادرند حلقه بتالاکتام را هیدرولیز کنند و به این ترتیب آن را غیرفعال کنند (۶). دو سیستم طبقه‌بندی اصلی برای آنزیم‌های بتالاکتاماز شامل سیستم Ambler و سیستم Bush-Jacoby وجود دارند. در سیستم Ambler، آنزیم‌های بتالاکتاماز براساس همولوژی توالی اسید آمینه از A تا D طبقه‌بندی می‌شوند. در سیستم Bush-Jacoby براساس پروفایل هیدرولیز سوبسترا (پنی‌سیلین، سفالوسپورین، سفالوسپورین با طیف گسترده، کارباپنم) و همچنین مهارکننده (مهارکننده‌های بتالاکتاماز کلاولانات و تازوباکتام) به گروه‌های ۱ تا ۴ طبقه‌بندی می‌شوند (۷).

بتالاکتامازهای کلاس A، C و D ازطریق مکانیسم سرین عمل می‌کنند و شباهت ساختاری بالایی دارند. بتالاکتامازهای کلاس B ازطریق یون Zn^{2+} عمل می‌کنند و به‌عنوان متالو بتالاکتامازها (MBLs) شناخته می‌شوند (۸).

در باکتری‌های گرم منفی، آنزیم‌های وسیع‌الطیفی مانند TEM-1 و SHV-1 به‌دنبال معرفی سفالوسپورین‌های نسل اول و دوم به وجود آمدند (۹). متعاقباً، آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام وسیع‌الطیف مانند سفتازیدیم و سفوتاکسیم معرفی شدند که در برابر هیدرولیز توسط این آنزیم‌ها مقاوم بودند. استفاده گسترده از این آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به تکامل بتالاکتامازهای جدیدی شد که این داروها را هیدرولیز می‌کند که ESBL نامیده شدند (۱۰). این گروه ازنظر اپیدمیولوژیک در سراسر جهان پراکنده‌اند و از کلاس A بتالاکتامازها محسوب می‌شوند (۱۱). آنزیم‌های ESBL عموماً شامل موتانت‌های ایجادشده از TEM و SHV هستند و قدرت هیدرولیتیک محدودتری دارند (۱۲). بتالاکتامازهای نوع AmpC شامل ACC، DHA، FOX، MOX، ACT، BIL، LAT و CMY هستند که در گروه C قرار می‌گیرند (۱۳). تمامی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* دارای ژن AmpC هستند که توسط بتالاکتام‌ها القاء می‌شوند. از معروف‌ترین بتالاکتامازهای *سودوموناس آئروژینوزا* می‌توان PSE-1

10.22108/bjm.2024.141472.1593

و PSE-4 را نام برد. گروه دیگری از بتالاکتامازها شامل SHV، ESBLs و OXA بازه گسترده‌ای از مقاومت را در *سودوموناس آئروژینوزا* ایجاد می‌کنند. از میان این گروه‌ها، ESBLها بیشتر فعال‌اند و بعضی گونه‌های آنها مانند OXA، تقریباً در تمامی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* یافت می‌شوند (۱۴).

بیان ژن‌های AmpC در جنس‌های گرم منفی مختلف متفاوت بوده و ممکن است به‌صورت القایی یا غیرالقایی روی دهد. آنزیم‌های *DHA*-1، *DHA*-2، ACD-1، *CMY*-3، CFE-1 از آمپی‌سیلینازهای القایی هستند. گونه‌های انتروباکتر، *سیتروباکتر فرئوندی ای*، *سراشیا مارسیسنس*، *مورگانلا مورگانی‌ای* و *سودوموناس آئروژینوزا* ازجمله ارگانیسم‌هایی هستند که تولید آنزیم در آنها به‌صورت القایی روی می‌دهد. ایزوله‌های واجد آمپی‌سیلینازهای القایی مقاومت خاصی در برابر سفوکسیتین دارند (۱۵).

افزایش ظهور گونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی، به‌خصوص مقاومت چنددارویی، مشکلات بسیاری درزمینهٔ درمان عفونت‌های ناشی از آنها ایجاد کرده است. علاوه بر این، بررسی‌ها نشان داده‌اند ارتباط مستقیمی بین مقاومت *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌ها و مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد (۱۲، ۱۳). ژن‌های ESBL در بروز مقاومت‌های چندگانه به دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها نقش دارند و از همین رو بروز و انتشار ژن‌های مختلف ESBL مشکلات بسیاری در درمان عفونت‌های ناشی از آنها ایجاد می‌کند (۱۲). با توجه به شیوع مقاومت در سویه‌های *سودوموناس ائروژینوزا*، به‌عنوان یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی، در تحقیق حاضر میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی، فعالیت بتالاکتامازی طیف گسترده (ESBL)، فعالیت AmpC بتالاکتامازی و همچنین فراوانی ژن‌های دخیل در القای مقاومت در سویه *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از نمونه‌های بالینی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

این مطالعه روی *سودوموناس ائروژینوزا*های جداشده از ۱۲۰ نمونه بالینی بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان میلاد تهران به‌صورت سرپایی و بستری از تاریخ اردیبهشت ماه ۱۴۰۱ تا مرداد ماه ۱۴۰۱ انجام شد. نمونه‌ها روی محیط‌های کشت بلاد آگار، EMB آگار و مک کانکی آگار کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند. در آزمایشگاه برای شناسایی و جداسازی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل SIM، TSI، MR-VP، سیمون سیترات، اکسیداز و کاتالاز انجام شدند.

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی

این تست به روش دیسک دیفیوژن (کربی-بائر) براساس استانداردهای CLSI انجام شد. بر این اساس سوسپانسیون میکروبی استاندارد با غلظت نیم مک فارلند از هر جدایه *سودوموناس آئروژینوزا* تهیه شد و به‌صورت چمنی بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل آمیکاسین (۳۰ میکرولیتر)، سفتازیدیم (۳۰ میکرولیتر)، مروپنم (۱۰ میکرولیتر)، سیپروفلوکساسین (۵ میکرولیتر)، لووفلوکساسین (۱۰ میکرولیتر)، پیپراسیلین (۱۰۰ میکرولیتر)، کولیستین (۱۰ میکرولیتر) و جنتامیسین (۱۰ میکرولیتر) (شرکت پادتن طب) به فاصله حداقل ۲ سانتی‌متر از یکدیگر روی محیط کشت قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. با استفاده از خط‌کش، قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر اندازه گرفته و میزان حساسیت باکتری نسبت به

10.22108/bjm.2024.141472.1593

آنتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت حساس، نیمه‌حساس و مقاوم گزارش شد.

از سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۶).

تشخیص فنوتیپ ESBL با روش دیسک ترکیبی

پس از انجام تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی، سویه‌های مقاوم به یکی از سفالوسپورین‌های نسل سوم مطالعه‌شده برای تشخیص فنوتیپ ESBL با روش دیسک ترکیبی انتخاب شدند. برای انجام این مرحله دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰ میکرولیتر) و سفوتاکسیم (۳۰ میکرولیتر) و دیسک کلاونیک اسید (۱۰ میکرولیتر) (شرکت پادتن طب) به فاصله ۲۰ میلی‌متری روی کشت چمنی جدایه‌های مدنظر روی محیط آگار قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اگر افزایش قطر هاله مربوط به کلاونیک نسبت به هریک از آنتی‌بیوتیک‌ها در مقایسه با قطر هاله آنها به تنهایی به میزان ۵ میلی‌متر بود، تأییدکنندهٔ وجود ESBLs است (۱۷).

جدول ۱. پرایمرهای استفاده‌شده در PCR

Table 1. primers used in PCR

ژن	توالی پرایمر	bp	منبع
CMY	F: TGG CCG TTG CCG TTA TCT AC R: CCC GTT TTA TGC *ACC* CAT GA	۸۷۰	(۱۹)
DHA	F: AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T R: CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	۴۰۵	(۱۹)
MOX	F: GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT R: CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	۵۲۰	(۱۹)
FOX	F: AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G R: CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	۱۹۰	(۱۹)
MIR	F: TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG R: CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	۳۰۲	(۱۹)
ACC	F: AAC AGC TCT AGC AGC CGG TTA R: TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	۳۴۶	(۱۹)
TEM	F: TCG CCG CAT ACA CTA TTC TCA GAA TG R: ACG CTC *ACC* GGC TCC AGA TTT AT	۴۵۴	(۲۰)
SHV	F: ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG R: TGC TTT GTT CGG GCC AA	۷۴۷	(۲۰)
CTX	F: ATG TGC AGY *ACC* AGT AA? GTK ATG GC R: TGG GT AA TA GT *ACC* AGA AC AGC G	۵۹۳	(۲۰)

تست سینرژیسم دو دیسک (DDS) برای بررسی سویه‌های AmpC

در تست DDS[1]، یک دیسک سفتازیدیم و یک دیسک سفوکسیتین به فاصله ۲۰ میلی‌متری روی کشت چمنی جدایه‌های مدنظر روی محیط آگار قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد پلیت‌ها ازنظر قطر هاله تشکیل‌شده بررسی شدند. اگر در اطراف دیسک سفتازیدیم یک هاله بزرگ و اطراف دیسک سفوکسیتین هاله کوچک تشکیل شود و هاله سفتازیدیم در سمت هاله سفوکسیتین دارای انتهای صاف باشد، تست DDS مثبت گزارش می‌شود (۱۸).

استخراج DNA و روش ژنوتیپی تعیین سویه‌های AmpC و ESBL

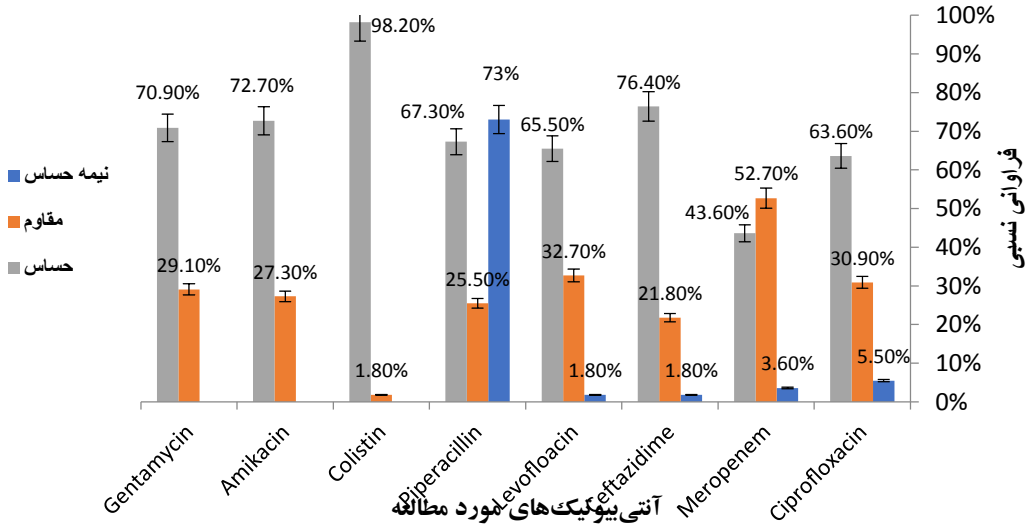
استخراج DNA به روش ستونی برحسب دستورالعمل سازنده کیت (شرکت سیناژن) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد نیاز از مقالات استخراج‌شده و توالی آنها با نرم‌افزار BLAST در سایت NCBI بررسی شد. سپس با نرم‌افزار Oligo7 عدم تشکیل ساقه و لوپ، بررسی و برای سنتز توالی به شرکت ماکروژن کشور

[1] Double Disk Synergy

کره سفارش داده شد (جدول ۱). به‌منظور تکثیر ژن‌های مطالعه‌شده، هر واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از master mix(2X) به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر، آب مقطر استریل به میزان ۹ میکرولیتر، هرکدام از پرایمرها به میزان ۱۰ پیکومول و DNAی الگو به میزان ۲۰ نانوگرم افزوده و با دمای دناتوره‌کنندهٔ ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمر ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای طویل‌سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و طی ۳۰ سیکل در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. با هر سری اجرای PCR، یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی استفاده شد.

آنالیز آماری نتایج

برای آنالیز آماری اطلاعات جمع‌آوری‌شده از نرم‌افزار SPSS ver-22 و آزمون خی استفاده شد. مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.



نمودار ۱. درصد فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

Figure-1. frequency of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains

یافته‌ها

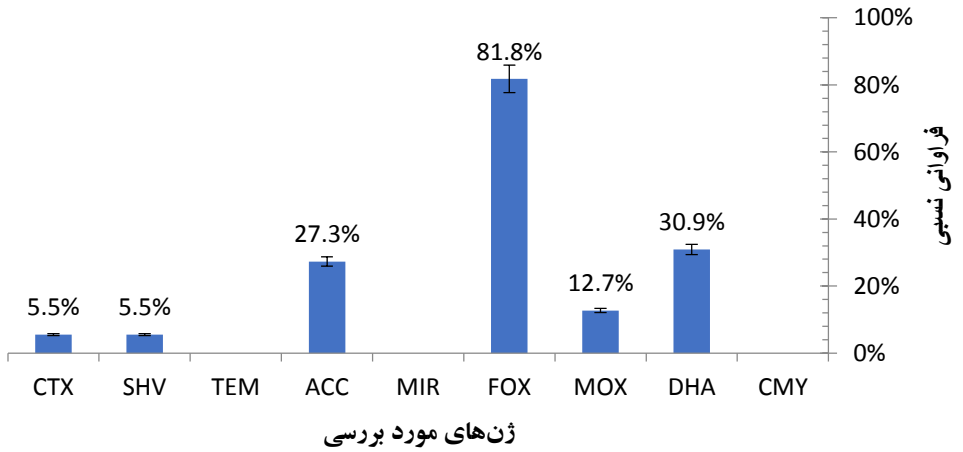
از نمونه‌های بالینی مراجعه‌کنندگان سرپایی و بستری‌شده در بیمارستان میلاد تهران، تعداد ۵۵ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* براساس تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. براساس نتایج به‌دست‌آمده از تست مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کمترین مقاومت سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مطالعه‌شده نسبت به آنتی‌بیوتیک کولیستین (۱/۸ درصد) و بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک مروپنم (۵۲/۷ درصد) تعیین شد (نمودار ۱).

براساس نتایج به‌دست‌آمده از آزمون شناسایی فنوتیپ ESBL، در این تحقیق هیچ‌کدام از جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به‌عنوان ESBL تشخیص داده نشدند. براساس نتایج به‌دست‌آمده از تست DDS نیز، ۶۱/۸ درصد (۳۴ سویه) از جدایه‌ها به‌عنوان مولد AmpC شناسایی شدند. علاوه بر این، ارتباط معناداری بین سویه‌های دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و سویه‌های مولد AmpC مشاهده شد ($p<0.001$).

جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به‌دست‌آمده در این تحقیق ازنظر وجود یا عدم وجود ژن‌های *ACC*، *MIR*، *FOX*، *DHA*، *CMY*، *TEM*، *SHV* و CTX بررسی شدند. فراوانی نسبی ژن‌های مدنظر در نمودار ۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده ۲۷/۳ درصد (۱۵ سویه) از سویه‌ها حامل ژن *ACC*، ۸۱/۸

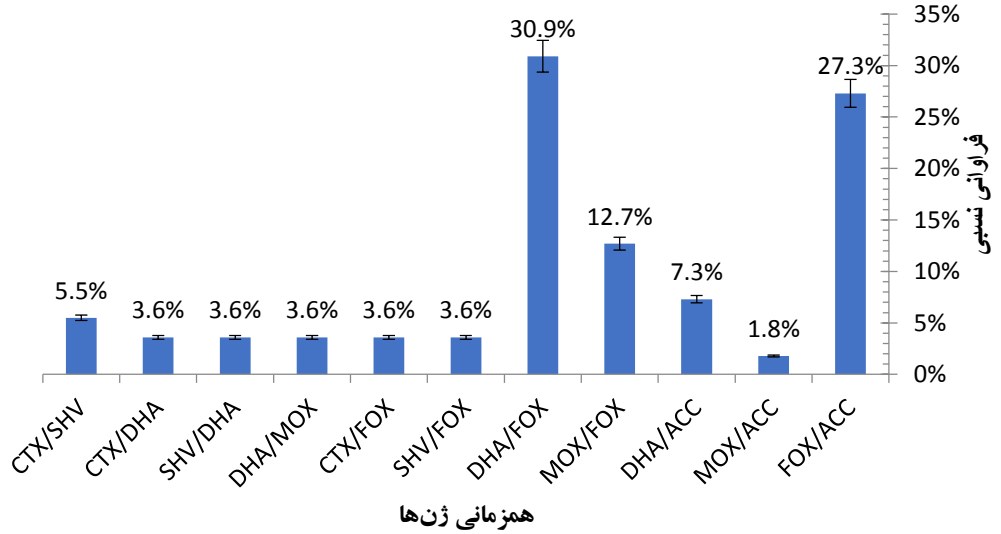
درصد (۴۵ سویه) حامل ژن *FOX*، ۱۲/۷ درصد (۷ سویه) حامل ژن *MOX*، ۳۰/۹ درصد (۱۷ سویه) حامل ژن *DHA*، ۵/۵ درصد (۳ سویه) حامل ژن *SHV*، ۵/۵ درصد (۳ سویه) حامل ژن *CTX* بودند و هیچ‌یک از سویه‌های بررسی‌شده حامل ژن‌های *MIR*، *CMY* و *TEM* تشخیص داده نشدند.

بررسی حضور همزمان ژن‌های مطالعه‌شده نشان داد (نمودار ۳) بیشترین حضور همزمان مربوط به ژن‌های DHA و FOX (۳۰/۹ درصد) و کمترین نیز مربوط به ژن‌های ACC و MOX (۱/۸درصد) است. همچنین در این مطالعه ژن‌های *CTX-ACC*، *CTX-MOX*، *SHV-ACC* و *SHV-MOX* به‌صورت همزمان مشاهده نشدند.



نمودار ۲. فراوانی نسبی ژن‌ها در بین سویه‌های بررسی‌شده

Figure 2. relative frequency of genes among the strains.



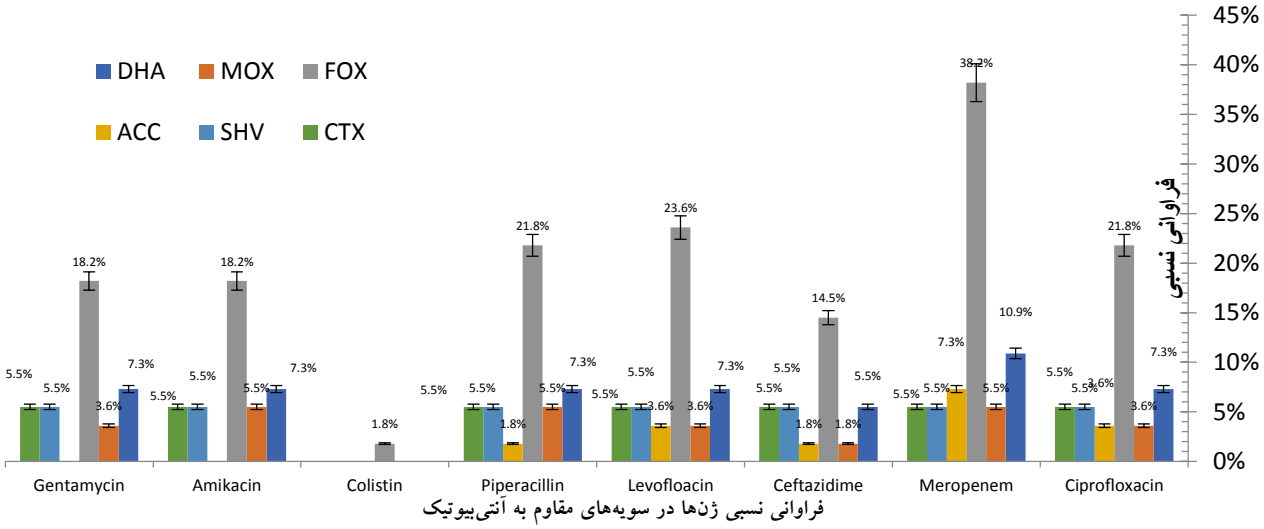
نمودار ۳. فراوانی نسبی همزمانی ژن‌ها

Figure 3. relative frequency of gene coexistence

بررسی فراوانی ژن‌های بررسی‌شده در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مدنظر در نمودار ۴ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد در تمامی سویه‌های مقاوم مورد بررسی بیشترین فراوانی مربوط به ژن *FOX* و کمترین فراوانی مربوط به ژن *MOX* بود. در این میان سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم بیشترین فراوانی ژن‌های مطالعه‌شده را داشتند. همچنین

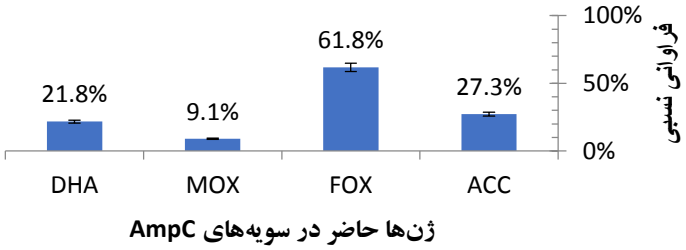
10.22108/bjm.2024.141472.1593

کمترین فراوانی ژن‌ها در سویه مقاوم به آنتی‌بیوتیک کولیستین مشاهده شد. فراوانی ژن‌های *SHV* و *CTX* در بین تمامی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به یک میزان (۵/۵ درصد) مشاهده شد. همچنین با بررسی‌های آنالیز آماری بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم، لوفلوکساسین، پیپراسیلین، آمیکاسین و جنتامیسین و ژن‌های *SHV* و *CTX*، بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین و جنتامایسین و ژن *ACC* و بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و ژن *FOX* ارتباط معناداری مشاهده شد (P value < 0.05).



نمودار ۴. فراوانی نسبی ژن‌ها در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به آنتی‌بیوتیک

Figure 4. relative frequency of genes in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains



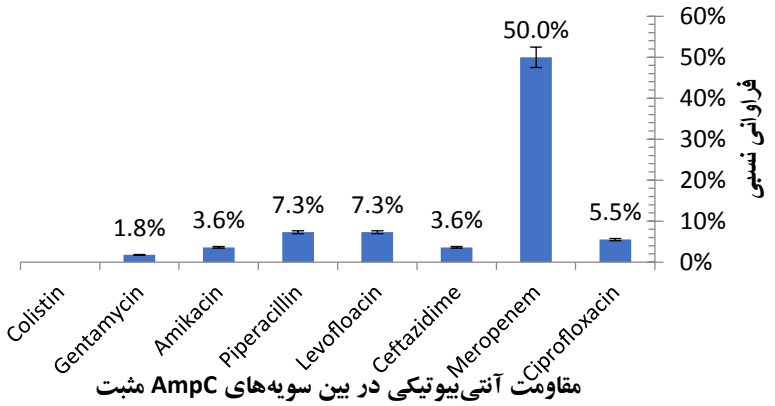
نمودار ۵. فراوانی نسبی ژن‌ها در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* AmpC مثبت.

Figure 5. relative frequency of genes in AmpC positive *Pseudomonas aeruginosa* strains

نتایج بررسی فراوانی ژن‌های بررسی‌شده در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* AmpC مثبت نشان داد بیشترین فراوانی ژنی در سویه‌های AmpC مثبت مربوط به ژن FOX (۶۱/۸ درصد) و کمترین فراوانی مربوط به ژن MOX (۹/۱ درصد) است (نمودار ۵). علاوه بر این، بین ژن‌های *ACC* و *FOX* و سویه‌های AmpC مثبت ارتباط معناداری مشاهده شد (P value < 0.05).

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* AmpC مثبت و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های AmpC مثبت نسبت به آنتی‌بیوتیک مروپنم (۵۰ درصد) بوده و همچنین هیچ‌کدام از

سویه‌های AmpC مثبت نسبت به آنتی‌بیوتیک کولیستین مقاوم نبودند (نمودار ۶). بین سویه‌های AmpC مثبت و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، مروپنم، سفتازیدیم، لوفلوکساسین، پیپراسیلین، آمیکاسین و جنتامایسین ارتباط معناداری مشاهده شد (P value < 0.05).



نمودار ۶. فراوانی نسبی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* AmpC مثبت.

Figure 6. relative frequency of antibiotic resistance among AmpC positive Pseudomonas aeruginosa strains.

بحث

سازمان بهداشت جهانی *سودوموناس آئروژینوزا* را به‌عنوان یک پاتوژن «اولویت بحرانی[۱]» مقاوم به چند دارو شناسایی کرده است که در برابر آن استراتژی‌های درمانی و کنترل عفونت جدید به فوریت مورد نیاز است. امروزه، تولید آنزیم‌های بتالاکتامازها توسط سویه‌های پاتوژن‌های باکتری‌های گرم منفی، یکی از مهم‌ترین عوامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است. بتالاکتامازها آنزیم‌های باکتریایی هستند که قادرند آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را هیدرولیز کنند و سبب بی‌اثرشدن این ترکیبات شوند (۲۱).

در مطالعه حاضر، میزان مقاومت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بررسی‌شده، سیپروفلوکساسین، مروپنم، سفتازیدیم، لوفلوکساسین، پیپراسیلین، کولیستین، آمیکاسین و جنتامایسین به‌ترتیب ۳۰/۹، ۵۲/۷، ۲۱/۸، ۳۲/۷، ۲۵/۵، ۱/۸، ۲۷/۳ و ۲۹/۱ درصد مشاهده شد. در این میان، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک مروپنم و کمترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک کولیستین مشاهده شد. طی مطالعه حیدری و همکارانش در سال ۲۰۲۲، مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به این ترتیب گزارش شد؛ کولیستین ۳/۹، مروپنم ۵۲/۱، آمیکاسین ۷۰/۶، سیپروفلوکساسین ۶۵/۷، پیپراسیلین ۵۹/۸، سفتازیدیم ۵۹/۸، آزترونام ۵۴/۹، توبرامایسین ۵۲، جنتامایسین ۵۱، سفپیم ۳۷/۹ و پیپراسیلین تازوباکتام ۴۲/۲ درصد. همچنین در این مطالعه ۶۰ (۵۲/۲ درصد) سویه *سودوموناس آئروژینوزا* از مجموع ۱۱۵ سویه بررسی‌شده کارباپنماز مشاهده شدند (۲۲). میزان مقاومت‌ها در این مطالعه نسبت به مطالعه حاضر بالاتر است. همچنین در مطالعه حیدری همانند مطالعه حاضر بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک کولیستین گزارش شده است. دلیل مقاومت بالا در این مطالعه می‌تواند به‌دلیل تفاوت در موقعیت جغرافیایی این دو مطالعه باشد؛ زیرا نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در مطالعه حیدری و همکاران از منطقه جنوب‌غربی کشور ایران بوده است.

اثربخشی آنتی‌بیوتیک کولیستین برای سویه‌های

[۱] critical priority

سودوموناس آئروژینوزا در سایر مطالعات نیز مشاهده شده است. این اثربخشی را می‌توان با عواملی مانند هزینه قابل توجه کولیستین، سمیت کلیوی و استفاده محدود آن در خارج از بیمارستان توضیح داد (۲۳). گزارش‌هایی مبنی بر توصیه آمیکاسین و سیپروفلوکساسین به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر در برابر عفونت‌های بیمارستانی *سودوموناس آئروژینوزا* وجود دارد (۲۴, ۲۵). در این مطالعه نیز این گروه‌های آنتی‌بیوتیکی اثر مناسبی بر سویه‌های مطالعه‌شده داشتند.

یکی دیگر از یافته‌های مهم تحقیق حاضر، میزان مقاومت بالای ۵۲/۷ درصد در برابر آنتی‌بیوتیکی مروپنم بود. در مطالعات قبلی، میزان مقاومت به کارباپنم از ۱۷/۵ تا ۱۰۰ درصد بسیار متفاوت بوده است (۲۶-۳۱).

طی مطالعه Hosu و همکارانش در سال ۲۰۲۱، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به این ترتیب گزارش شد؛ از ۲۰۴ سویه بررسی‌شده با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، مقاومت به پیپراسیلین (۶۴/۲ درصد)، پس از آن آزترونام (۵۷/۸ درصد)، سفپیم (۵۱/۵ درصد)، سفتازیدیم (۵۱ درصد)، پیپراسیلین/تازوباکتام (۵۰/۵ درصد)، ایمی‌پنم (۴۶/۶ درصد) جنتامایسین (۳۵/۳ درصد)، مروپنم (۲۴ درصد) و آمیکاسین (۲۰/۱ درصد) مشاهده شد. توبرامایسین با حساسیت ۹۱/۷ درصد قوی‌ترین آنتی‌بیوتیک بود و پس از آن دوریپنم و سیپروفلوکساسین (۸۸/۷ درصد) و لووفلوکساسین (۸۰/۱ درصد) قرار گرفتند (۳۲).

طی مطالعه Ejikeugwu و همکارانش در سال ۲۰۲۱، با بررسی نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از منابع مختلف نتایج آنتی‌بیوگرام سویه‌ها به این صورت گزارش شد؛ سفتریاکسون ۶۴/۶ درصد، سفوکسیتین ۸۰/۳ درصد، ایمی‌پنم ۶۶/۷ درصد، سفتازیدیم ۵۴/۴ درصد، ارتاپنم ۶۱/۲ درصد، افلوکساسین ۶۳/۳ درصد، جنتامایسین ۵۵/۸ درصد، آمیکاسین ۶۳/۹ درصد، سیپروفلوکساسین ۸۱ درصد، سفوتاکسیم ۷۹/۶ درصد، مروپنم ۶۰/۵ درصد، آمپی‌سیلین ۸۱ درصد و آزترونام ۵۸/۵ درصد مقاومت داشتند (۳۳).

با توجه به نتایج تست Double Disk Synergy Test برای بررسی سویه‌های AmpC مثبت در این مطالعه ۶۱/۸ درصد (۳۴ سویه) از سویه‌ها مولد AmpC شناسایی شدند. در این مطالعه هیچ‌یک از سویه‌های بررسی‌شده ازنظر فنوتیپی ESBLs مثبت مشاهده نشدند.

طی مطالعه طهماسبی و همکارانش در سال ۲۰۱۸، ۸۳/۱ درصد سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* ازنظر فنوتیپی تولیدکنندهٔ AmpC و ۹۵/۷ درصد از سویه‌ها از نوع ESBLs بودند (۳۴). طی مطالعه Ejikeugwu و همکارانش در سال ۲۰۲۱، با بررسی نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از منابع مختلف تولید آنزیم AmpC به روش فنوتیپی Double Disk Synergy Test بررسی شد. نتایج این تحقیق به این صورت گزارش شد، از ۵۶ سویه جداشده از کشتارگاه ۹ نمونه (۱۶/۱ درصد)، از ۴۸ نمونه جداشده از طیور ۷ نمونه (۱۴/۶ درصد) و از ۴۳ نمونه جداشده از مقعد گاو ۸ نمونه (۱۸/۶ درصد) AmpC مثبت بودند (۳۳).

در بسیاری از مطالعات صورت‌گرفته دربارهٔ حضور و مکانیسم فعالیت ژن‌های AmpC و خانواده‌های مختلف AmpC، گزارش شده است حضور آنتی‌بیوتیک‌های مختلف که اثر عملکردی متفاوتی دارند، می‌تواند ژن‌های تنظیمی خانواده AmpC را به نوعی تغییر دهد که تظاهرات مقاومتی جدیدی را در پی داشته باشد. حضور ژن‌های تنظیمی مانند AmpR در سویه‌های مختلف، تأییدکنندهٔ این مطلب است که بالابودن مقادیر حداقل غلظت مهاری سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* طی سال‌های اخیر، به‌دلیل فعالیت‌های این گروه‌های تنظیمی به‌شدت افزایش یافته است (۳۴).

همچنین با بررسی‌های مولکولی انجام‌شده دربارهٔ ژن‌های مربوط به تولید آنزیم‌های AmpC، ۲۷/۳ درصد سویه‌ها حامل ژن ACC، ۸۱/۸ درصد حامل ژن FOX، ۱۲/۷ درصد حامل ژن MOX و ۳۰/۹ درصد حامل ژن DHA مشاهده شدند. در بررسی‌های مولکولی انجام‌شده دربارهٔ ژن‌های مربوط به تولید آنزیم‌های ESBLs، ۵/۵ درصد از سویه‌ها حامل ژن SHV و ۵/۵ درصد سویه‌ها حامل ژن CTX بودند. همچنین هیچ‌کدام از سویه‌ها حامل ژن TEM مشاهده نشدند. همچنین در مطالعه جمشیدی و همکاران از میان ۸۰ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* مطالعه‌شده، ۵ درصد حامل ژن AmpC بودند (۳۵). در تحقیقی که توسط طهماسبی و همکاران (۲۰۱۸) انجام شد، ۲۲/۱ درصد سویه‌ها حامل ژن FOX، ۱۱/۵۷ درصد حامل ژن ACC، ۲/۱ درصد حامل ژن DHA و ۷/۳۶ درصد حامل ژن MOX گزارش شدند (۳۴). در این مطالعه نیز مانند مطالعه حاضر، بیشترین فراوانی را ژن FOX داشت. نتایج تحقیق Ejikeugwu و همکاران (۲۰۲۱) ۲۹/۲ درصد از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* حامل ژن CMY و ۱۲/۵ درصد حامل ژن FOX گزارش شدند و هیچ‌یک از سویه‌ها حامل ژن ACC و DHA نبودند (۳۳). در مطالعه حاضر، فراوانی ژن *FOX* بیشتر از مطالعه Ejikeugwu و همچنین ژن‌های *ACC* و *DHA* به‌ترتیب ۲۷/۳ درصد و ۳۰/۹ درصد مشاهده شد. دلیل اختلاف در مطالعات احتمالاً به‌دلیل منبع نمونه‌برداری است. به نظر می‌رسد سویه‌های عامل بیماری در حیوانات و سویه‌های عامل بیماری در انسان متفاوت بوده‌اند و از این نظر ممکن است حامل ژن‌های متفاوتی باشند.

طی مطالعه Hong و همکارانش در سال ۲۰۱۹، روی باکتری‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه جداشده از انسان و طیور، ۲۶/۴ درصد از سویه‌های بررسی‌شده حامل ژن *CMY* بوده‌اند و هیچ‌یک از سویه‌ها حامل ژن *FOX*، *ACC* و *DHA* مشاهده نشدند (۳۶). ممکن است دلیل تفاوت در نوع ژن‌های عامل مقاومت، تفاوت در باکتری مطالعه‌شده در این تحقیقات باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، سویه‌های حامل ژن‌های بررسی‌شده از مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها برخوردار بودند. همچنین در این مطالعه بین سویه‌های AmpC مثبت و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها ارتباط معنی‌داری مشاهده شد. در این مطالعه مشخص شد مقاومت بتالاکتاماز طیف گسترده (ESBL) در سویه‌های مطالعه‌شده وجود ندارد و تعداد کمی از سویه‌ها حامل ژن‌های این نوع مقاومت بودند. از آنجا که اکثر مقاومت‌ها القایی هستند، به نظر می‌رسد در سال‌های اخیر آنتی‌بیوتیک‌هایی که موجب القای این نوع مقاومت می‌شوند، به مقدار کمتری در درمان استفاده شده‌اند که این مقاومت کاهش یافته است؛ اما به‌دلیل استفاده بیشتر از سفالوسپورین‌های نسل سوم این مقاومت همچنان به میزان بالایی در سویه‌های پاتوژن وجود دارد.

References

1. Diggle SP, Whiteley M. Microbe Profile: Pseudomonas aeruginosa: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 2020; 166(1): 30-33. https://doi.org/10.1099/mic.0.000860
2. Taghinejad J, Hosseinzadeh M, Molayi Kohneshahri S, Javan Jasor V. Pseudomonas aeruginosa: A biological review. *Laboratory & Diagnosis*, 2017; 8(34): 67-82. http://labdiagnosis.ir/article-1-202-en.html [In Persian].
3. Ruedas-López A, Alonso-García I, Lasarte-Monterrubio C, Guijarro-Sánchez P, Gato E, Vázquez-Ucha JC, et al. Selection of AmpC β-lactamase variants and metallo-β-lactamases leading to ceftolozane/tazobactam and ceftazidime/avibactam resistance during treatment of MDR/XDR Pseudomonas aeruginosa infections. *Antimicrobial Agents*

and Chemotherapy, 2022; 66 (2): e02067-21. https://doi.org/10.1128/aac.02067-2
4. Jangra V, Sharma N, Chhillar AK. Therapeutic approaches for combating Pseudomonas aeruginosa Infections. *Microbes and Infection*, 2022; 24 (4): 104950. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.104950
5. Siegel RE. Emerging gram-negative antibiotic resistance: daunting challenges, declining sensitivities, and dire consequences. *Respiratory Care*, 2008; 53 (4): 471-9. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18364060/
6. Farrokhnazar E, Khaki P, Moradi Bidhendi S. Investigation of ampC & esbl genes in Escherichia coli isolated from human and poultry. *Journal of Microbial World*, 2014; 7 (2): 138-47. [In Persian].
7. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010; 54 (3): 969-76. https://doi.org/10.1128/aac.01009-09
8. Bonomo RA. β-Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017; 7 (1). 10.1101/cshperspect.a025239
9. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, 2001; 14 (4): 933-51. https://doi.org/10.1128/cmr.14.4.933-951.200
10. Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β-lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2011; 65: 455-78. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102911
11. Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum β-lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 2021; 3 (3). https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092
12. 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; 155 (6): 409-21. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.02.009
13. George A. Jacoby. AmpC beta-Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22 (1): 161-82. https://doi.org/10.1128/cmr.00036-08
14. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2002; 46 (1): 1-11. https://doi.org/10.1128/aac.46.1.1-11.2002
15. Upadhyay S, Sen MR, Bhattacharjee A. Presence of different beta-lactamase classes among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa expressing AmpC beta-lactamase enzyme. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 2010; 4 (04): 239-42. https://doi.org/10.3855/jidc.497
16. PA W. *Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement*. CLSI document M100-S20. 2010. http://www.clsi.org
17. Rafiee R, Eftekhar F, Tabatabaei SA, Minaee Tehrani D. Prevalence of Extended-Spectrum and Metallo β-Lactamase Production in AmpC β-Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Burns. *Jundishapur J Microbiol*. 2014 Sep; 7(9): e16436. https://doi.org/10.5812/jjm.16436
18. Kaur J, Chopra S, Sheevani, Mahajan G. Modified Double Disc Synergy Test to Detect ESBL Production in Urinary Isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. *J Clin Diagn Res*, 2013; 7 (2): 229-33. https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/.2734
19. Mohamed MSE, Hassan AT, Ahmed SMK. Prevalence of carbapenemases among Klebsiella pneumoniae strains isolated from respiratory tract specimens. *The Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 2016; 38 (105): 1-8. https://platform.almanhal.com/Reader/Article/101831
20. Schill F, Abdulmawjood A, Klein G, Reich F. Prevalence and characterization of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) and AmpC β-lactamase producing Enterobacteriaceae in fresh pork meat at processing level in Germany. *International journal of food microbiology*, 2017; 257: 58-66. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.010
21. Sader HS, Carvalhaes CG, Shortridge D, Castanheira M. Comparative activity of newer β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations against Pseudomonas aeruginosa from patients hospitalized with pneumonia in European medical centers in 2020. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2022;

41 (2): 319-24. https://doi.org/10.1007/s10096-021-04363-7
22. Heidari R, Farajzadeh Sheikh A, Hashemzadeh M, Farshadzadeh Z, Salmanzadeh S, Saki M. Antibiotic resistance, biofilm production ability and genetic diversity of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa strains isolated from nosocomial infections in southwestern Iran. *Molecular Biology Reports*, 2022; 49 (5): 3811-22. https://doi.org/10.1007/s11033-022-07225-3
23. Azimi A, Peymani A, Kianoush Pour P. Phenotypic and molecular detection of metallo-β-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with burns in Tehran, Iran. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2018 ;51(5):610-5. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0174-2017
24. Motbainor H, Bereded F, Mulu W. Multi-drug resistance of blood stream, urinary tract and surgical site nosocomial infections of Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa among patients hospitalized at Felegehiwot referral hospital, Northwest Ethiopia: a cross-sectional study. *BMC infectious diseases*, 2020; 30; 20 (1): 92. https://doi.org/10.1186/s12879-020-4811-8
25. Mekonnen H, Seid A, Molla Fenta G, Gebrecherkos T. Antimicrobial resistance profiles and associated factors of Acinetobacter and Pseudomonas aeruginosa nosocomial infection among patients admitted at Dessie comprehensive specialized Hospital, North-East Ethiopia. A cross-sectional study. *Plos One*, 2021; 16 (11): e0257272. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257272
26. El-Mahdy R, El-Kannishy G. Virulence factors of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa in hospital-acquired infections in Mansoura, Egypt. *Infection and drug resistance*, 2019; 12: 3455. https://doi.org/10.2147/IDR.S222329
27. Rodulfo H, Arcia A, Hernández A, Michelli E, Martinez DdV, Guzman M, et al. Virulence factors and integrons are associated with MDR and XDR phenotypes in nosocomial strains of Pseudomonas aeruginosa in a Venezuelan university hospital. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2019;61. https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961020
28. Lila G, Mulliqi G, Raka L, Kurti A, Bajrami R, Azizi E. Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in University clinical center of Kosovo. *Infection and drug resistance*, 2018; 11: 2039. https://doi.org/10.2147/IDR.S174940
29. Rouhi S, Ramazanzadeh R. Prevalence of blaOxacillinase-23and blaOxacillinase-24/40-type Carbapenemases in Pseudomonas aeruginosa Species Isolated From Patients With Nosocomial and Non-nosocomial Infections in the West of Iran. *Iranian Journal of Pathology*, 2018; 13 (3): 348. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30636958/
30. Kresken M, Körber-Irrgang B, Korte-Berwanger M, Pfennigwerth N, Gatermann SG, Seifert H, et al. Dissemination of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates and their susceptibilities to ceftolozane-tazobactam in Germany. *International journal of antimicrobial agents* 2020; 55 (6): 105959. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105959
31. Hemmati H, Hasannejad-Bibalan M, Khoshdoz S, Khoshdoz P, Yaghubi Kalurazi T, Sedigh Ebrahim-Saraie H, et al. Two years study of prevalence and antibiotic resistance pattern of Gram-negative bacteria isolated from surgical site infections in the North of Iran. *BMC research notes*, 2020; 13 (1): 1-6. https://doi.org/10.1186/s13104-020-05223-x
32. Hosu MC VS, Okuthe GE, Apalata T. Detection of extended spectrum beta-lactamase genes in Pseudomonas aeruginosa isolated from patients in rural Eastern Cape Province, South Africa. *Scientific reports* 2021; 11 (1): 1-8. https://doi.org/10.1038/s41598-021-86570-y
33. Ejikeugwu C, Nworie O, Saki M, Al-Dahmoshi HOM, Al-Khafaji NSK, Ezeador C, et al. Metallo-β-lactamase and AmpC genes in Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Pseudomonas aeruginosa isolates from abattoir and poultry origin in Nigeria. *BMC Microbiology*, 2021; 21 (1): 124. https://doi.org/10.1186/s12866-021-02179-1
34. Tahmasebi H, Alikhani MY, Dehbashi S, Arabestani MR. Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Different Antibiotic Groups in Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa Containing p-AmpC and Their Relationship with Antibiotic Resistance Pattern. *Avicenna Journal of Clinical Medicine*, 2018; 24 (4): 277-84. http://dx.doi.org/10.21859/ajcm.24.4.277 [In Persian].

35. Jamshidi Gohar M, Rahimi Fard N, Hosseini Doust SR. The pattern of antibiotic resistance within clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa and detection of AmpC. *Medical Sciences Journal*, 2018; 28 (3): 212-9. http://tmuj.iautmu.ac.ir/article-1-1443-en.html [In Persian].

36. Hong JS, Song W, Park H-M, Oh J-Y, Chae J-C, Shin S, et al. Clonal spread of extended-spectrum cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae between companion animals and humans in South Korea. *Frontiers in microbiology*, 2019; 10: 1371. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01371