دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان اصفهان
دانشکده پزشکی
گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری تخصصی در رشته باکتری شناسی پزشکی

عنوان پایان نامه

بررسی ژنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی و جهشهای ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا همراه با تایپینگ جدایه های دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی به روش (Multilocus Sequence Typing (MLST و بررسی همخوانی بیان ژن *lasI* با ژن *ampC*.

کتابخانه مرکزی
دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
شماره ثبت: ۱۴۶۳٤
تاریخ ثبت: ۱۳۹۳/۷/۵

شماره طرح :
۳۹۰۶۱۴

نگارش:
هومن صدیقیان

استادان راهنما:
جناب آقای دکتر حسین فاضلی
(استادیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان)
جناب آقای دکتر بهرام نصر اصفهانی
(دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان)
استادان مشاور:
جناب آقای دکتر محمدرضا پورمند(دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران)
جناب آقای دکتر محمدرضا مراثی (دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان)

شهریورماه ۱۳۹۲

چکیده:

مقدمه : سودوموناس آئروژینوزا بعنوان یک باکتری فرصت طلب و مقاوم به آنتی بیوتیکها، یکی از مهمترین عوامل عفونتهای بیمارستانی است. روشMultilocus Sequence Typing (MLST)می تواند بعنوان روشی مناسب برای گروهبندی باکتریها در مطالعات اپیدمیولوژی می باشد.پدیدهQuorum Sensing در بیماریزایی و مقاومت آنتی بیوتیکی نقش دارد. بنابراین مهار این پدیده می تواند راهکاری نوین و مناسب در درمان عفونتها باشد.

مواد و روشها : جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا از بیماران عفونی بستری در بیمارستانهای دانشگاهی جمع آوری گردید.با روش انتشار دیسک و روش PCRمقاومت آنتی بیوتیکی این جدایه ها از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی تعیین گردید. همچنین بمنظور بررسی پدیده Quorum sensing ، میزان بیان ژنهای *ampR, lasR, lasI* نسبت به ژن حفاظت شده *rpoD* ، در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا با روش Real-time RT-PCR تعیین شد.تعیین سویه ی جدایه های برگزیده سودوموناس آئروژینوزا با روشMLSTانجام گردید.

یافته ها : در بیمارستان تخصصی کودکان، همه جدایه ها به ایمیپنم حساس بودند. در بیمارستان الزهرا از ۴۸ ٪ جدایه ها به ایمیپنم مقاوم بودند و ۶۰/۸٪ از جدایه ها ژن OXA group-I را دارا بودند. سویه های ST235 و ST274 در این بیمارستان یافت شد. در بیمارستان سینا، ۴۵ ٪ از جدایه ها به ایمیپنم مقاوم بودند. ۵۷٪ جدایه ها ژن OXA group-I را دارا بودند. سویه ST235 در بیمارستان سینا شناسایی شد. در بیمارستان مطهری۷۵ ٪ از جدایه ها به ایمیپنم مقاوم بودند. ۱۰ سویه (۲۵٪) و ۲۸ سویه (۷۰٪) بترتیب دارای ژن بتالاکتامازهای PER و

OXA group-I بودند. سه سویه ST235, ST360, ST861 در این بیمارستان شناسایی شد. همه ۱۰ سویه مورد بررسی دارای افزایش بیان ژن *mexY* بودند.

میزان بیان ژنهای *ampC, ampR, lasI, lasR,* در ۳۵ سویه بالینی از سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت. ۲۸ سویه دارای افزایش بیان*ampC* ،*lasI* و*lasR*بودند اما در ۷ سویه میزان بیان این ژنها کاهش یافته بود. در این ۲۸ سویه، میزان بیان *ampR* بسیار کم افزایش یافته بود اما در ۷ سویه میزان بیان *ampR*افزایش یافته بود.

بحث و نتیجه گیری: نتیجه ها نشان داد که میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های مربوط به کودکان، در مقایسه با جدایه های مربوط به بزرگسالان به شکل قابل توجهی پایینتر است. در این بررسی بیشترین سویه ی بدست آمده ST235 بودند که دارای مقاومت چندگانه بود و این موضوع می تواند در درمان عفونتها به وسیله پزشکان و نیز در کنترل عفونتها مورد توجه قرار گیرد.

بررسیهای مربوط به میزان بیان ژن *mexY* نشان داد که پمپ تراوشی MexXY-OprM در مقاومت نسبت به ایمیپنم نقش ندارد. گرچه این پمپ تراوشی در مقاومت به سیپروفلوکساسین و آمیکاسین نقش بسیار مهمی دارد. الگوی بیان *ampC* با مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های مورد بررسی همخوانی دارد. بر خلاف مطالعات پیشین بیان ژنهای*ampC*، *lasI* و *lasR* با بیان *ampR* همخوانی نداشت.همچنین بر اساس نتیجه های بدست آمده، الگوی بیان*ampC* ، *lasI* و *lasR* نشاندهنده همخوانی میان بیان این ژنها میباشد. بنابراین گمان میشود که عامل یا عاملهای دیگری مانند QS در تنظیم این ژنها نقش داشته باشند.

کلمات کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا ، مقاومت چندگانه، MLST ، Quorum sensing و بتالاکتامازها.

فهرست صفحه

چکیده ---------- الف

فصل اول : کلیات

مقدمه ---------- ۲

تعریف واژه ها ---------- ۲۲

فصل دوم : اهداف و فرضیات

اهداف پژوهش ---------- ۲۴

سوالات پژوهش ---------- ۲۵

فصل سوم : روشها و مواد

نوع مطالعه ---------- ۲۷

جمعیت مورد مطالعه ---------- ۲۷

معیارهای ورود و خروج ---------- ۲۷

مکان و زمان انجام مطالعه ---------- ۲۸

حجم نمونه و روش نمونه گیری ---------- ۲۹

متغییرهای تحقیق ---------- ۳۰

روش کار ---------- ۳۱

ملاحظات اخلاقی ---------- ۴۰

فصل چهارم :

نتایج ---------- ۴۲

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

بحث ---------- ۶۰

نتیجه گیری ---------- ۷۵

پیشنهادها ---------- ۷۸

فهرست منابع ---------- ۷۹

چکیده انگلیسی ---------- ۹۲

پیوستها ---------- ۹۳

فهرست جدولها

صفحه

جدول۱-گروهبندی سودوموناده‌ای دارای اهمیت در پزشکی ---------- ۵

جدول ۲-باکتریهای فرصت طلب و نوع میزبان آنها ---------- ۸

جدول ۳-پرایمرهای مورد استفاده برای انجام واکنش PCR و تعیین توالی برای MLST ---- ۳۹

جدول ۴- مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان تخصصی کودکان ---------- ۴۳

جدول ۵-مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان الزهرا -- ۴۵

جدول ۶- مقاومت آنتی بیوتیکی و گروههای MLST جدایه های سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان الزهرا ---------- ۴۷

جدول ۷-مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان سینا --- ۴۹

جدول۸- مقاومت آنتی بیوتیکی و گروههای MLST جدایه های سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان سینا ---------- ۵۰

جدول ۹-مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان مطهری - ۵۲

جدول۱۰- مقاومت آنتی بیوتیکی وتعیین گروه MLST در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در بیمارستان مطهری. ---------- ۵۴

جدول ۱۱-مقاومت آنتی بیوتیکی۳۵جدایه بالینی مقاوم به ایمیپنم سودوموناس آئروژینوزا - ۵۶

جدول شماره ۱۲- مقایسه نتیجه های بدست آمده از مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های بالینی مورد بررسی در چهار بیمارستان دانشگاهی ---------- ۶۳

جدول شماره ۱۳- فراوانی سویه های دارای مقاومت چندگانه در سه بیمارستان دانشگاهی --۶۳

جدول شماره ۱۴- مقایسه نتیجه های بدست آمده از مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های بالینی مورد بررسی در تعدادی از بیمارستانهای دانشگاهی در مناطق گوناگون کشور ---------- ۶۴

جدول شماره ۱۵ – الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، میزان بیان ژنهای موثر در مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژنهای بتالاکتاماز و گروهبندی جدایه ها ---------- ۷۱

فهرست شکلها صفحه

شکل ۱- فراوانی عفونتهای بیمارستانی بر حسب نوع بافت درگیر ——— ۵

شکل۲-باکتری سودوموناس آئروژینوزا که دارای تک تاژک قطبی میباشد ——— ۸

شکل ۳- دسته بندی بتالاکتامازهای موجود در سودوموناس آئروژینوزا که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفته اند ——— ۳۹

شکل ۴-ساختمان سه بخشی یک پمپ تراوشی (efflux pump) ——— ۴۳

شکل ۵ - ژنهای مربوط به Quorum sensing و ارتباط آنها با یکدیگر ——— ۴۵

شکل۶- نقش پدیده Quorum sensing در تاثیر بر روی فرایندهای گوناگون در سودوموناس آئروژینوزا ——— ۴۷

شکل ۷-درگاهWWW.pubmlst.org برای انجام MLST برای سودوموناس آئروژینوزا ——۴۹

شکل ۸-فرمول محاسبه میزان بیان نسبی در روش Realtime RT-PCR ——— ۵۰

شکل ۹- بررسی فیلوژنی سویه های بدست آمده از جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در بیمارستانها ——— ۵۲

شکل ۱۰- میزان بیان *lasI* در ۳۵ جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا ——— ۵۴

شکل ۱۱- میزان بیان *lasR* در ۳۵ جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا ——— ۵۶

شکل ۱۲- میزان بیان *ampC* و *ampR* در ۳۵ جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا ——— ۶۳

شکل ۱۳- سویه های بدست آمده از نمونه های بالینی در بیمارستانهای الزهرا در اصفهان، سینا در تهران و مطهری در تهران ---------- ۶۳

شکل ۱۴ - بررسی فیلوژنی جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا بر اساس گروههای گوناگون بدست آمده با روش MLST ---------- ۶۴

فهرست منابع:

1- Ducel G, Fabry J, Nicolle L. WHO Prevention of hospital-acquired infections A PRACTICAL GUIDE, 2nd edition, 2002.

2- Borriello SP, Murray PR, Funke G, TOPLEY WILSON'S MICROBIOLOGY& MICROBIALI NFECTIONS, 10th ed. Washington, D.C., USA: Edward Arnold; 2005.

3- Murray PR, Rosenthal KS, PfaUer MA,Medical microbiology,. 5th ed. Philadelphia: ELSEVIER; 2005.

4- Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens P.M. and Van Bambeke F. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:560–578.

5-Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, and Fridkin SK. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with health-care-associated infections: annual summary of data reported to the

National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infec Control Hosp Epidemiol.*2008;29: 996–1011.

6- Zhanel GG, Decorby M, Adam H, Mulvey MR, McCracken M, Lagace-Wiens P, Nichol KA, Wierzbowski A, Baudry PJ, Tailor F, Karlowsky JA, Walkty A, Schweizer F, Johnson J, and Hoban D J. Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in Canadian hospitals: results of the Canadian Ward Surveillance Study. *Antimicrob Agents Chemother.*2010;54: 4684–4693.

7-Lambert ML, Suetens C, Savey A, Palomar M, Hiesmayr M, Morales I, Agodi A, Frank U, Mertens K, Schumacher M and Wolkewitz M. Clinical outcomes of health- care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11: 30–38.

8-Mahar P, Padiglione AA, Cleland H, Paul E, Hinrichs M and Wasiak J. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in burns patients: risk factors and outcomes. *Burns.*2010; 36: 1228–1233.

9- Mauldin PD, Salgado CD, Hansen IS, Durup DT and Bosso JA. Attributable hospital cost and length of stay associated with health care-associated infections

caused by antibiotic-resistant Gram- negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.*2010; 54: 109–115.

10-Tumbarello M, Repetto E, Trecarichi EM, Bernardini C, Pascale G, Parisini A, Rossi M, Molinari MP, Spanu T, Viscoli C, Cauda R and Bassetti M. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and mortality. *Epidemiol Infect.* 2011; 32: 65–71.

11- Zhao WH and Hu ZQ.β-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Rev Microbiol.* 2010; 36: 245–258.

12- Ramirez MS and Tolmasky ME.Aminoglycoside modifying enzymes.*Drug Resist.* 2010; 13: 151–171.

13- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromo-somally encoded resistance mecha-nisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22: 582–610.

14- Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.* 2009; 58: 1133–1148.

15- Pfeifer Y, Cullik A and Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol.*2010; 300: 371–379.

16-Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram- negative bacteria.*Antimicrob Agents Chemother.*2000; 44: 2233–2241.

17-Poole K. Resistance to β-lactam antibiotics.*Cell. Mol Life Sci.* 2004; 61: 2200–2223.

18- Paul M, Yahav D, Bivas A, Fraser A, and Leibovici L. Anti- pseudomonal β-lactams for the initial, empirical, treatment of febrile neutropenia: comparison of β-lactams. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;11: 516-9.

19- Lodge JM, Minchin SD, Piddock LJ and Busby JW. Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal *ampC* β-lactamase.*Biochem J.* 1990; 272: 627–631.

20- Livermore DM. β-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8: 557–584.

21- Jacoby GA. AmpC β-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22: 161–182.

22- Xavier DE, Picao RC, Girardello R, Fehlberg LC, and Gales AC. Efflux pumps expression and its association with porin down- regulation and β-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiol.*2010; 10: 217-224.

23- Jones RN. Important and emerging β-lactamase-mediated resistances in hospital-based pathogens: the Amp C enzymes. *Diagn Microbiol Infec Dis.* 1998; 31: 461–466.

24- Rodriguez-Martinez JM, Poirel L and Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*2009; 53: 4783–4788.

25- Poirel L, NaasT and Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.*2010b; 54: 24–38.

26- Zhao WH, Chen G, Ito R and Hu ZQ. Relevance of resistance levels to carbapenems and integron-borne $bla_{\text{IMP-1}}$, $bla_{\text{IMP-7}}$, $bla_{\text{IMP-10}}$ and $bla_{\text{VIM-2}}$ in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.* 2009;58: 1080–1085.

27- Paterson DL and Bonomo RA. Extended-spectrum β-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 657–686.

28- Poirel L, Naas T and Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.*2010b; 54: 24–38.

29- Hocquet D, Plesiat P, Dehecq B, Mariotte P, Talon D and Bertrand X. Nationwide investigation of extended-spectrum β-lactamases, metallo-β-lactamases, and extended- spectrum oxacillinases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonasaeruginosa* strains in France. *Antimicrob Agents Chemother.*2010; 54: 3512–3515.

30- Woodford N, Zhang J, Kaufman ME, Yarde S, Tomas MM, Faris C, Vardhan MS, Dawson S, Cotterill SL and Livermore DM. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum β-lactamases in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother.*2008; 62: 1265–1268.

31- Glupczynski Y, Bogaerts P, Deplano A, Berhin C, Huang TD, Van Eldere J and Rodriguez-Villalobos H. Detection and characterization of class A extended-spectrum- β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospi-tals. *J Antimicrob Chemother.*2010; 65: 866–871.

32- Picao RC, Poirel L, Gales AC and Nordmann, P. Further iden-tification of CTX-M-2 extended-spectrum β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*2009b; 53: 2225–2226.

33- Poole K, Frank D. and Tolmasky M. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbio*. 2011;2(65): 1-13.

34- Strateva T and Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*. 2009;58(9):1133–48.

35- Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, et al. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients.*Burns*. 2010; 36(1):70-74.

36- Kalantar E, Taherzadeh S, Ghadimi T, et al. *Pseudomonas aeruginosa*, an emerging pathogen among burn patients in Kurdistan Province, Iran. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health*. 2012;43(3):712-17.

37- Poirel L, Nordmann P, Lagrutta E, Cleary T and Munoz-Price LS. Emergence of KPC- producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.*2010c; 54: 3072-6.

38- Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vazquez GJ, Sante MI, Aquino EE, Goering RV and Hanson ND. Surveillance of carbapenem- resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.*2009a; 53: 1660–1664.

39- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L and Nordmann P. Metallo-β-lactamases: the quiet before the storm. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 306–325.

40- Bartlett JG. *Pocket Book of Infectious Disease Therapy.*2004. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

41- Gilbert DN, Moellering RC and Sande MA. *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 2003*. Hyde Park: Antimicrobial Therapy, Inc.2003.

42- Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*2005; 49: 479–487.

43- Morita Y, Tomida J, Kawamura K. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbio*. 2012;3(408):1-13.

44- Juhas M, Eberl L and Tümmler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology*. 2005;7(4): 459–471.

45- Johnson JK, Arduino SM, Stine OM, Johnson JA, Harris AD. Multilocus Sequence Typing Compared to Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2007;11:3707–3712.

46- Kidd TJ, Grimwood K, Ramsay KA, Rainey PB, Bell SC. Comparison of Three Molecular Techniques for Typing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Sputum Samples from Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2011;1:263–268.

۴۷ - ژاپونی ع، فرشاد ش،البرزی ع، کلانی م، نصیری ج. الگوی حساسیت و مقاومت متقاطع آنتی بیوتیکها علیه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی در جنوب ایران. مجله بیماریهای عفونی و گرمسیری. ۱۳۸۵؛ ۱۱(۳۵): ۱۸-۱۳.

۴۸- شاهچراغی ف،نیکبین وس. بررسی مولکولی بتالاکتامازهای TEMو SHV، PER،VEB درسویه های پسودوموناس آئروژینوزا جداشده از نمونه های زخم در دو بیمارستان تهران به روش PCR . مجله میکروبشناسی پزشکی ایران. ۱۳۸۶ ؛ ۱(۴): ۲۷ -۲۱ .

۴۹-کیانپورف، هوایی ا، حسینی م م. بررسی سودوموناس آئروجینوزا جداشده از عفونتهای پوستی وتعیین الگوی مقاومت دارویی آنها از بیماران بستری شده در بیمارستان الزهرای(س) اصفهان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان. ۱۳۸۹ ؛ ۲۱(۱۱۰):۵۰۸-۵۰۳ .

50- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement M100-S12. Wayne, PA: CLSI, 2010.

51-Bogaerts P, Huang T, Rodriguez-Villalobos H, et al. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas putida* isolates producing VIM-2 and VIM-4 metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.*2008;61(3):749-751.

52- Savli H, Karadenizli A, Kolayli F,Gundes S,Ozbek U and Vahaboglu H.Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene

quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *J Med Microbiol.* 2003;52:403–408.

53-Pfaffi MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.*Nucleic Acids Research*. 2001;29(9), 2003-7.

54- Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa.J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5644–9.

55- Glupczynski Y, Bogaerts P, Deplano A, Berhin1 C, Huang T D, Van Eldere J and Rodriguez-Villalobos H. Detection and characterization of class A extended-spectrum β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother*.2010; 65: 866–871.

56- Pourakbaril B, Sadr A, Ashtiani MT, et al. Five-year evaluation of the antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing bloodstream infections in Iran. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2005; 6(2): 120-12.

57- Ghorashi Z, Nezami N, Ghotaslou R, et al. Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* drug resistance in Tabriz Children Hospital.*Pakistan Journal of Biological Science*. 2010; 13(8): 400-404.

58- Oulia P, Bahar MA, Sadri, et al. Antibiotic resistance patterns of isolated *pseudomonas aeruginosa* strains from infections of burned patients. *J med council of IRI.* 2007; 25(1): 26-33.

59- Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, et al. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients.*Burns.* 2010; 36(1):70-74.

60- Shakibaie MR, Shahcheraghi F, Hashemi A and Saeed-Adeli N. Detection of TEM, SHV and PER type Extended-spectrum β-lactamase genes among clinical strains of *pseudomonas aeruginosa* isolated from burnt patients at Shafa hospital, Kerman, Iran. *Iranina journal of Basic Medical Sciences*.2008;11(2): 104-111.

61- Yousefi S, Farajnia S, Nahaei MR, Akhi MT, Ghotaslou R, Soroush MH, Naghili B and Jazani NH. Detection of metallo-β-lactamase–encoding genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in northwest of Iran. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.2010;68: 322–325.

62- Shahcheraghi F, Nikbin VS and Feizabadi MM. Identification and genetic characterization of metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* in Tehran, Iran. *New Microbiologica*.2010;33: 243-248.

۶۳- ح فاضلی، ز مصلحی تکانتپه، غ ایراجیان، م صالحی. تعیین الگوی مقاومت دارویی و شناسایی ژن متالو بتالاکتاماز bla-VIM سویه های پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بستری دربیمارستان سوانح وسوختگی امام موسی کاظم اصفهان (۸۸-۱۳۷۸) ، مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، سال ۳، شماره ۴ ، ۱۳۸۸، صص ۸-۱

۶۴- ا میر صالحیان، م م فیض آبادی، ف نخجوانی، ف جبل عاملی، ح گلی. فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف نوع PER-10 وOXA-1 در ایزول ههای پسودوموناس آئروژینوزا در بیماران سوختگی. مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره ۶۶، شماره ۵، ۱۳۸۷، ۷-۳۴۳.

۶۵-پ اولیا، م بهار، ح صادری، ح امینی. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های سودوموناس آئروجینوزا جداشده از عفونت های بیماران مبتلاء به سوختگی. مجله علمی سازمان نظام پزشکی جمهوری اسلامی ایران، دوره ۲۵، شماره ۱ ، بهار ۱۳۸۶، ۳۳- ۲۶.

۶۶- ف کیانپور ، ا هوایی، م م حسینی. بررسی سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از عفونت های پوستی و تعیین الگوی مقاومت دارویی آن ها از بیماران بستری شده در بیمارستان الزهرای (س) اصفهان. **مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال ۲۸ ، شماره ۱۱۰، ۱۳۸۹.**

۶۷- ف شاهچراغی، و س نیک بین، ف شورج. بررسی مولکولی بتالاکتامازهای PER,VEB,SHV,TEM در سویه های پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های زخم در دو بیمارستان تهران به روش PCR. مجله میکروبشناسی پزشکی ایران، سال ۱ شماره ۴ ۱۳۸۶، صفحه های ۲۱-۲۷ .

۶۸-ش جمالی، م ع بهار، س م هوشمند. بررسی شیوع ژنهای متالوبتالاکتامازی bla_{VIM}, bla_{IMP} در سویه های سودوموناس آئروجینوزا مقاوم به ایمی پنم جدا شده از زخم بیماران دچار سوختگی بستری در بیمارستان سوانح و سوختگی شهید مطهری تهران. دانش میکروبشناسی، سال ۱، شماره ۱، ۱۳۸۷ .

۶۹-۱ میرصالحیان، ف اکبری نخجوانی، م م فیض آبادی. فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف نوع PER-1, OXA-10 در ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا در بیماران سوختگی. مجله دانشکده پزشکی،۱۳۸۷، دوره ۷۷، شماره ۵، ۳۴۷-۳۴۳ .

70- Empel J, Filczak K, Mrowka A, Hryniewicz W, Livermore DM, Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* Infections with PER-1 Extended-Spectrum β-lactamase in Warsaw, Poland: Further Evidence for an International Clonal Complex. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):2829–34.

71- Glupczynski Y, Bogaerts P, Deplano A, Berhin C, Huang TD, Van Eldere J, Rodriguez-Villalobos H. Detection and characterization of class A extended-spectrum beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa isolates in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 866–871.

72- Kouda S, Ohara M, Onodera M, Fujiue Y, Sasaki M, Kohara T, Kashiyama S. Increased prevalence and clonal dissemination of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with the blaIMP-1 gene cassette in Hiroshima. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64: 46–51.

73- Ranellou K, Kadlec K, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Schwarz S, Tsakris S. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates of the international clonal complex 11 carrying the blaPER-1 extended-spectrum b-lactamase gene in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67: 357–361.

74- Cholley P, Thouverez M, Hocquet D, van der Mee-Marquet N, Talon D, BertrandX. Most Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Hospitals in Eastern France Belong to a Few Clonal Types. *J Clin Microbiol.* 2011; 6:2578–2583.

75- Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Musilek M. Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Research in Microbiology*. 2010;161: 234-242.

76- Yousefi S, Nahaei MR, Farajnia S, Aghazadeh M, Iversen A, Edquist P, Maãtallah M and Giske CG. A multiresistant clone of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 773 spreading in a burn unit in Orumieh, Iran. *APMIS*.2013;121(2): 146-152.

77- Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:1633-41.

78- Hocquet D, Roussel-Delvallez M, Cavallo JD, Plesiat P. MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:1582-3.

79- Juhas M, Eber L and Tümmler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world Of *Pseudomonas. Environmental Microbiology.*2005;7(4): 459–471.

80- Holden MT, Chhabra SR, de Nys R, Stead P, Bainton NJ, Hill PJ, Manefield M, Kumar N, Labatte M, England D. Quorum sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria, *Mol Microbiol.* 1999;33: 1254–1266.

81- Fuqua C, Greenberg EP. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2002;3(9): 685-695.

82- Juhas M, Eberl, Tümmler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas. Environmental Microbiology* .2005;7(4): 459–471.

83- Balasubramanian D , Kong K, Jayawardena SR, Leal SM, SautterRT, Mathee K. Coregulation of beta-lactam resistance, alginate production and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.* 2011; 60: 147–156.

84- Bratu S, Gupta J, Quale J. Expression of the las and rhl quorum-sensing systems in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* does not correlate with efflux pump expression or antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58: 1250–1253.

85- Kong KF, Jayawardena SR, Indulkar SD, Del Puerto A, Koh CL, Høiby N and Mathee N. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR Is a Global Transcriptional Factor That Regulates Expression of AmpC and PoxB β-Lactamases, Proteases, Quorum Sensing. Virulence Factors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(11): 4567–4575.

Molecular epidemiology and mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates and detection of relation between expression of lasI and ampC.

Abstract:

In this study the contributions of different resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates were investigated. The real-time RT-PCR was performed to determine the expression level of *mexY*, ampC and *oprD* for isolates. The isolates were typed by multilocus sequence typing (MLST). Also this study investigated the relation between expression of the *las* and ampC in clinical isolates of *P. aeruginosa*.75% clinical isolates were multidrug-resistant. The $bla_{\text{OXA group-I}}$ and bla_{PER} alleles were identified in 28 and 10 *P. aeruginosa* isolates respectively. The majority of bla_{PER} positive isolates belonged to the same MLST clone and was identified as ST235. The types of remaining isolates were ST360 and ST861. Among 10 bla_{PER} positive isolates, eight isolates demonstrated reduced *oprD* expression and *mexY* overexpression. Our data further highlight the epidemic potential of the international clone ST235. According to the results different resistant mechanisms identified among ST235 isolates which were resistance to ceftazidime, imipenem, ciprofloxacin and amikacin. In contrast to previous study, current study demonstrated that the expression pattern of *ampC* was identical to the *lasI* expression pattern among clinical isolates. It seems there was a direct or indirect relation between Quorum sensing and antibiotic resistance.

Keywords: MexXY, MLST, PER, *Pseudomonas aeruginosa*, ST235.