بررسی فنوتیپ و ژنوتیپ دو ژن *VIM-I* و *IMP-I* متالوبتالاکتاماز و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان شهید بهشتی شهرستان قم

آرش قاسم عزیزی*[1]، لیلا جمشیدی[2]، محسن میرزایی[3]

۱- دکترای باکتری‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران.
۲- کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران.
۳- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران.

یافته / دوره بیستم / شماره ۱ / بهار ۹۷ / مسلسل ۷۵

چکیده

دریافت مقاله: ۹۶/۱۱/۱ پذیرش مقاله: ۹۶/۱۲/۱۹

مقدمه: سودوموناس آئروژینوزا یک باسیل گرم منفی، اکسیداز مثبت، کاتالاز مثبت، غیرتخمیری، متحرک، هوازی اجباری و فاقد توانایی تخمیر کربوهیدرات است. این باکتری یک پاتوژن فرصت طلب در بیماران دچار اختلال سیستم دفاعی و یکی از مرسوم ترین عوامل عفونتهای بیمارستانی به شمار می‌آید. از آنجا که در برابر طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله پنی سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های وسیع الطیف و کارباپنم‌ها (به استثنای مونوباکتام) مقاوم‌اند، یکی از مشکلات عمده بالینی به شمار می‌روند. VIM و IMP ازجمله ژن‌های پلاسمیدی متالوبتالاکتاماز هستند. هدف از این مطالعه بررسی فنوتیپ و ژنوتیپ ژن‌های متالوبتالاکتاماز VIM-I و IMP-I در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به آنتی بیوتیک ایمی‌پنم از خانواده کارباپنم می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، به واسطه کشت در محیط‌های عمومی و افتراقی و انجام تست‌های استاندارد بیوشیمیایی جداسازی صورت گرفت و برای تایید قطعی و بررسی ژنهای متالوبتالاکتاماز از PCR بهره گرفته شد. برای بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی نمونه‌ها و بررسی فنوتیپی ژنهای متالوبتالاکتاماز از دیسک دیفیوژن استفاده شد.

یافته‌ها: گروه مورد مطالعه، ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا گردآوری شده از بیمارستان شهید بهشتی شهرستان قم بود. از ۱۰۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا مورد مطالعه که جنس و گونه آن‌ها بیشتر به واسطه تست‌های بیوشیمیایی تأیید شده بود، ۴۸ نمونه مولد متالوبتالاکتاماز بود که از این تعداد، ۱۹ نمونه (۳۹/۵۸٪) دارای باندهایی با ۵۸۷ جفت‌باز مربوط به ژن IMP، ۶ نمونه (۱۲/۵٪) دارای باندهایی با ۲۶۱ جفت‌باز مربوط به ژن VIM و ۳ نمونه (۶/۲۵٪) حاوی هر دو ژن بودند. همچنین ۳۶ نمونه (۷۴٪) نسبت به جنتامایسین، ۳۰ نمونه (۶۲٪) نسبت به سیپروفلوکساسین ، ۲۹ نمونه (۶۱٪) نسبت به سفتازیدیم، ۲۷ نمونه (۵۸٪) نسبت به سفتی‌زوکسیم و ۱۹ نمونه (۳۹٪) نسبت به ایمی‌پنم مقاوم بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: در این مطالعه ۴۸ نمونه (۴۸٪) از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مولد MBL بودند. از این ۴۸ جدایه، ۶ نمونه (۱۲/۵٪) دارای ژن VIM، ۱۹ نمونه (۳۹/۵۸٪) دارای ژن IMP و ۳ نمونه (۶/۲۵٪) دارای هر دو ژن بودند. در مقایسه ژن IMP به تنهایی از آزمون فیشر رابطه معناداری یافت شد ($P\leq 0/05$). در حالی که در فنوتیپ و ژن VIM به تنهایی از آزمون فیشر، رابطه معناداری وجود نداشت. درنتیجه نوع عفونت و منطقه و نوع آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده در بخش، می‌تواند در بیان ژن‌های متالوبتالاکتاماز تاثیرگذار باشد.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، متالوبتالاکتاماز، MBL، ژن VIM، ژن IMP.

*آدرس مکاتبه: بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی.
پست الکترونیک: Dr.azizi86@gmail.com

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 12:37 +0330 on Monday November 19th 2018

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 12:37 +0330 on Monday November 19th 2018

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک باسیل گرم منفی، غیرتخمیری، اکسیداز و کاتالاز مثبت، متحرک، هوازی اجباری و فاقد توانایی تخمیر کربوهیدرات است. در خاک، آب، مرداب، سواحل دریا، گیاهان و بافت‌های جانوری رشد می‌کند، به میزان اندکی به صورت فلور طبیعی روده و پوست بدن یافت می‌شوند و همچنین تعدادی به‌عنوان پاتوژن فرصت‌طلب در بیمارانی که دچار اختلال سیستم دفاعی می‌باشند به شمار می‌آیند. سودوموناس آئروژینوزا از مرسوم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد (۱،۲).

مکانیسم‌های مقاومت متعددی از قبیل پمپ افلاکس، کاهش نفوذپذیری غشای خارجی، موتاسیون در آنزیم DNA ژیراز و آنزیم RNA پلیمراز، هیدرولیز آنزیمی (فسفریلاسیون، ادنیلاسیون و استیلاسیون) و تولید انواع بتالاکتاماز برای این باکتری شناسایی شده است (۳). سودوموناس آئروژینوزا تعدادی از بتالاکتامازهای مختلف را تولید می‌کند که می‌تواند بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام (مثل پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کاربا‌پنم‌ها) را غیرفعال می‌کند (۴). متالوبتالاکتامازها، آنزیم‌هایی هستند که توسط باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری (مانند سودوموناس آئروژینوزا) تولید می‌شود و سویه‌هایی که این آنزیم را تولید می‌کنند نسبت به ایمی‌پنم مقاوم می‌باشند (۵). این آنزیم‌ها کاتیون‌های دو ظرفیتی (مانند فلز روی) را به‌عنوان کوفاکتور برای فعالیت آنزیمی خود استفاده می‌کنند. درنتیجه سودوموناس‌های حامل ژن‌های متالوبتالاکتاماز یک تهدید کلینیکی جدی به شمار می‌آیند. متالوبتالاکتامازها علاوه بر مقاومت به کاربا‌پنم‌ها سبب ایجاد مقاومت به آمینوگلیکوزیدها نیز می‌شوند. ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها بر روی پلاسمید قرار دارند که به راحتی می‌توانند به سایر باکتری‌ها انتقال یابند. متالوبتالاکتامازها توسط کلاونیک اسید و سولباکتام و تازوباکتام که بازدارنده‌های بتالاکتامازها هستند، مهار نمی‌شوند و طیف سوبسترای وسیعی دارند به‌طوری که همه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به‌جز مونوباکتام و آزترونام را هیدرولیز می‌کنند. آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز بر اساس ساختمان مولکولی به گروه‌های IMP، VIM، SPM، GIM، AIM، SIM، UIM تقسیم می‌گردند (۸-۶). ژن *IMP* اولین متالوبتالاکتاماز شناخته شده در سودوموناس آئروژینوزا است و به دلیل گسترش سریع به گونه‌های باکتریایی نگرانی بزرگی را به وجود آورده است (۹). ژن *IMP* روی پلاسمید با وزن مولکولی بالایی، درون کاست‌های ژنی حاوی سه اینتگرون کلاس یک حمل می‌شود. ژن *VIM* قسمتی از کاست ژنی از اینتگرون کلاس یک می‌باشد. ژن‌های *VIM* و *IMP* ازجمله ژن‌های پلاسمیدی متالوبتالاکتاماز هستند. مقاومت به کاربا‌پنم‌ها به دلیل وجود ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم متالوبتالاکتاماز می‌باشد که اکثراً بر روی اینتگرون‌های کلاس یک است که به راحتی قابل انتقال به سویه‌های دیگر می‌باشد (۱۰).

هدف از این مطالعه بررسی فنوتیپ و ژنوتیپ ژن‌های متالوبتالاکتاماز *VIM-I* و *IMP-I* در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزاهایی که مقاوم به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم می‌باشند و ترسیم الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای آنها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه نمونه‌ها از بیمارستان شهید بهشتی قم جمع‌آوری شد. سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا از افراد بستری در بخش‌های سوختگی و عفونی به واسطه‌ی کشت در محیط نوترینت آگار، مک‌کانکی و انجام تست‌های استاندارد بیوشیمیایی نظیر اکسیداز، کاتالاز، TSI، اکسیداسیون و فرمانتاسیون (O/F) و رشد باکتری در دمای ۴۲ درجه

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 12:37 +0330 on Monday November 19th 2018

سانتی‌گراد جداسازی و تأیید شد (۱۱). برای تأیید قطعی این باکتری از فرآیند PCR و بررسی ژن *16S rRNA* اقدام شد (۱۲). پس از شناسایی قطعی گونه آئروژینوزا تست آنتی‌بیوگرام انجام شد. با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، تمامی ایزوله‌ها با ایمی‌پنم و ایمی‌پنم +EDTA مورد بررسی قرار گرفتند. دیسک ایمی‌پنم +EDTA به ترتیب با دیسک‌های ایمی‌پنم مورد مقایسه قرار گرفت تا حضور و عدم حضور آنزیم متالوبتالاکتاماز در باکتری مذکور پیگیری شود (۱۲).

برای شناسایی ۲ ژن *VIM* و *IMP* باید DNA باکتری استخراج گردد که در این مطالعه برای استخراج ژنوم باکتری در محیط نوترینت براث کشت داده شد و پس از رسیدن به کدورت مناسب، ۱۰۰ میکرولیتر از کدورت ایجاد شده با ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد (۱۲).

جهت انجام PCR، واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط PCR که شامل جفت پرایمرها (10Pmol/ul)، dNTPs، 210XPCR Buffer، $MgCl_2$، Taq DNA polymerase، Template DNA و آب مقطر استریل ۱۲/۵ میکرولیتر انجام شد. سپس نمونه‌ها به دستگاه ترموسایکلر با برنامه‌ی مناسب انتقال داده شد (۱۳) (جدول ۱). پس از جداسازی قطعی باکتری، با بررسی ژن *16S rRNA* با طول باند 956 bp و جداسازی فنوتیپی نمونه‌های متالوبتالاکتاماز اقدام به شناسایی ژنوتیپی ژن متالوبتالاکتاماز *VIM* و *IMP* با طول 261 bp و 587 bp شد (تصویر ۱ و ۲).

جدول ۱. پرایمرها و شرایط PCR مورد استفاده در این مطالعه

Gene	Primer	PCR program	Reference	Product size(bp)
16S rRNA	F-5'- GGGGGATCTTCGGACCTCA-3' R-5'- TCCTTAGAGTGCCCACCCG-3'	1	12	956
VIM-1	F-5'- AGTGGTGAGTATCCGACAG-3' R-5'- ATGAAAGTGCGTGGAGAC -3'	2	13	261
IMP-1	F-5'-ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC-3 R-5'- ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC -3'	3	13	587

1- 25 cycles (95 °C, 2 min; 58 °C, 40 s; 72 °C, 40 s);
2- 30 cycles (94 °C, 60 s; 55 °C, 1 min; 72 °C, 90 s);
3- 30 cycles (94 °C, 60 s; 55 °C, 1 min; 72 °C, 90 s)

یافته‌ها

در بخش‌های سوختگی و عفونی بیمارستان از افرادی که دارای عفونت‌های ادراری، عفونت‌های سوختگی، پنومونی و یا مشکوک به سپتی‌سمی بودند نمونه‌گیری صورت پذیرفت که حدود ۵۲۰ نمونه از بیمارستان شهید بهشتی قم جمع‌آوری شد و پس از کشت‌های انتخابی، افتراقی و تأیید مولکولی ژن *16S rRNA*، تعداد ۱۰۰ نمونه به صورت قطعی از نمونه‌های جمع‌آوری شده سودوموناس آئروژینوزا بودند. ۳۷ نمونه از کشت‌های ادراری، ۳۶ نمونه از کشت‌های سوختگی، ۱۹ نمونه از کشت خلط و ۸ نمونه از کشت خون بود. از طریق مقایسه طول هاله‌ی دیسک ایمی‌پنم +EDTA و دیسک ایمی‌پنم تعداد ۴۸ نمونه از ۱۰۰ نمونه دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند.

پس از بررسی مولکولی برای ردیابی ژن‌های متالوبتالاکتاماز *VIM* و *IMP*، از ۴۸ نمونه که دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز به صورت فنوتیپی بودند، ۱۹ نمونه دارای ژن *IMP* و ۶ نمونه دارای ژن *VIM* بودند. از این ۲۵ نمونه تنها ۳ نمونه دارای هردو ژن (*VIM* و *IMP*) به صورت مشترک بودند (جدول ۲).

نتایج تست آنتی‌بیوگرام بر اساس مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای این ۱۰۰ نمونه به ترتیب: ۷۴ نمونه (۷۴٪) جنتامایسین،۶۲ نمونه (۶۲٪) سیپروفلوکساسین،۶۱ نمونه (۶۱٪) سفتازیدیم، ۵۸ نمونه (۵۸٪) سفتی‌زوکسیم و ۳۹ نمونه (۳۹٪) ایمی‌پنم بودند (جدول ۳).

از طریق مقایسه طول هاله‌ی دیسک ایمی‌پنم +EDTA و دیسک ایمی‌پنم تعداد ۴۸ نمونه از ۱۰۰ نمونه دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند. الگوی مقاومتی برای ۴۸ نمونه‌ای که دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند، تفسیر و در نظر گرفته شد که جنتامایسین/سیپروفلوکساسین با ۳۷ نمونه (۷۷ درصد)

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 12:37 +0330 on Monday November 19th 2018

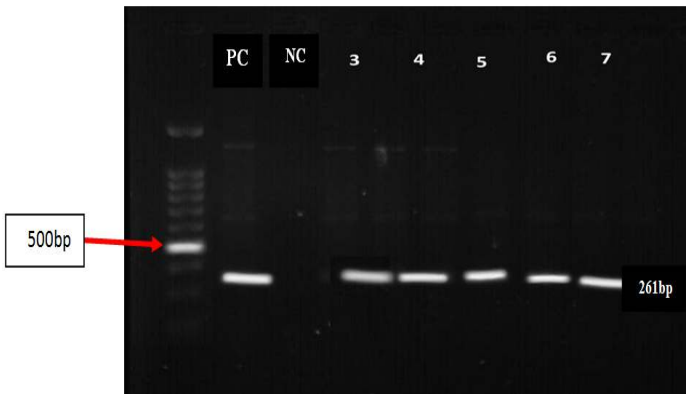
مقاوم‌ترین ترکیب و الگوی آنتی‌بیوتیکی می‌باشد و سفتازیدیم/سفتی‌زوکسیم/ایمی‌پنم با ۸ نمونه (۱۶ درصد) حساس‌ترین و بهترین سینرژیسم در موارد استفاده از داروهای چندگانه می‌باشند.

جدول ۲. ژن‌های متالوبتالاکتاماز در ۴۸ نمونه سودوموناس آئروژینوزا

نوع ژن	تعداد (درصد) نمونه
VIM	6 (12/5%)
IMP	19 (39/59%)
VIM+IMP	3 (6/25%)
None	23 (47/91%)

جدول ۳. الگوی مقاومتی ۴۸ نمونه سودوموناس آئروژینوزا دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز

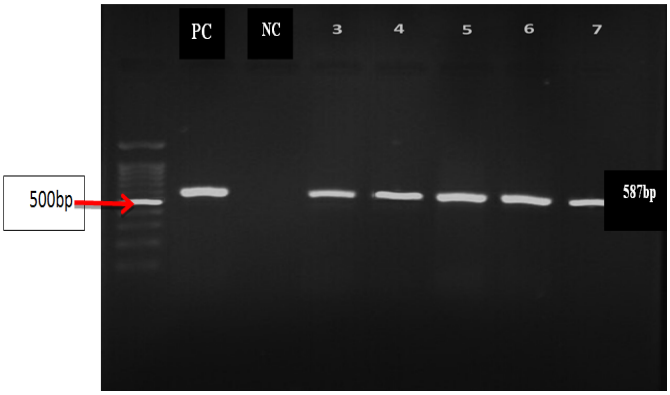
الگوی مقاومتی	تعداد نمونه‌ها
جنتامایسین/سیپروفلوکساسین	۳۷ نمونه (٪۷۷)
جنتامایسین/سیپروفلوکساسین/سفتازیدیم	۳۵ نمونه (٪۷۳)
سیپروفلوکساسین/سفتازیدیم	۳۴ نمونه (٪۷۲)
جنتامایسین/سیپروفلوکساسین/سفتی‌زوکسیم	۲۵ نمونه (٪۵۲)
سیپروفلوکساسین/سفتازیدیم	۲۰ نمونه (٪۴۲)
جنتامایسین/سیپروفلوکساسین/سفتی‌زوکسیم/ایمی‌پنم	۱۶ نمونه (٪۳۴)
سیپروفلوکساسین/ ایمی‌پنم	۱۴ نمونه (٪۲۹)
سفتازیدیم/سفتی‌زوکسیم/ ایمی‌پنم	۸ نمونه (٪۱۶)



تصویر ۱. نتیجه آزمون PCR ژن *VIM-1*

(طول محصول PCR: ۲۶۱ bp).

M: مارکر ۱۰۰bp، PC: کنترل مثبت، NC: کنترل منفی، ۵-۱: سویه‌های ژنوتیپ مثبت ژن *VIM-I*



تصویر ۲. نتیجه آزمون PCR ژن *IMP-I*

(طول محصول PCR: ۵۸۷ bp).

M: مارکر ۱۰۰bp، PC: کنترل مثبت، NC: کنترل منفی، ۵-۱: سویه‌های ژنوتیپ مثبت ژن *IMP-I*

بحث و نتیجه‌گیری

سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل مهم و جدی در عفونت‌های بیمارستانی و مرگ‌ومیر مبتلایان به لوسمی (لنفوم)، سوختگی‌های شدید و بیماران دچار سیستیک فیبروزیس می‌باشد (۱۱).

این باکتری به تنهایی ۳۰ درصد از عفونت‌های بیمارستانی را به علت مقاومت آنتی‌بیوتیکی به خود اختصاص داده و درمان عفونت‌های ناشی از آن، یکی از مشکلات عمده بهداشتی به شمار می‌آید (۱۴).

متالوبتالاکتامازها (MBL) آنزیم‌هایی هستند که توسط سودوموناس آئروژینوزا تولید شده و این سویه‌ها را نسبت به ایمی‌پنم مقاوم می‌سازد (۱۱). استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند در ایجاد سویه‌های تولید کننده MBL نقش داشته باشد (۱۵). بر اساس نتایج این تحقیق از ۱۰۰ نمونه جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا ۴۸ نمونه (۴۸ درصد) مولد آنزیم متالوبتالاکتاماز (با بهره‌گیری از روش CDDT) بودند که این تعداد به روش PCR مورد مطالعه قرار گرفتند؛ ۱۹ نمونه (٪۲۵) دارای ژن *IMP* و ۶ نمونه (٪۱۲/۵)

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 12:37 +0330 on Monday November 19th 2018

آنهـا دارای ژن *VIM* و ۳ نمونـه (۶/۲۵٪) حـاوی هـر دو ژن گزارش شدند.

در مطالعه اخوان‌تفتی و همکاران بر روی بررسـی فراوانـی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا از زخم‌های سوختگی در بیمارستان سوانح سـوختگی یـزد در سال ۱۳۹۱، ۲۹/۵ درصد دارای آنـزیم متالوبتالاکتامـاز بودنـد (۱۰). این نیز نشان دهنده هم‌پوشانی چهار جز یعنـی؛ بخـش سـوختگی، سـودوموناس آئروژینـوزا، آنـزیم متالوبتالاکتامـاز و مقاومت‌های فراوان آنتی‌بیوتیکی است. این موضوع در مطالعـه ما و همچنین مطالعات دیگر قابل پیگیری است.

شاه‌چراغـی و همکـاران در سـال ۱۳۷۸ بـر روی ژن‌هـای متالوبتالاکتاماز، در سویه‌های سودوموناس آئروژینـوزای ایزولـه شده از بیمارستان امام خمینی تهران مطالعه کردند. از مجموع ۲۴۳ نمونـه جمـع‌آوری شـده، ۲۸ سـویه دارای مقاومـت بـه ایمی‌پنم بودند. از این تعداد ۲۲ سویه مولـد MBL بـوده و ۱۵ سویه به روش PCR تأیید گردید و همگی حامـل ژن bla_{VIM-1} بودند (۱۶).

در پژوهش حاضر بـرای تعیـین توزیـع ژن‌هـای کدکننـده توکسین‌های *VIM-1* و *IMP-1* در نمونـه‌هـا از تکنیـک PCR استفاده شد که در بین ۱۰۰ سـویه سـودوموناس آئروژینـوزای مورد مطالعه که جنس و گونه آن‌ها پیشتر به واسطه تست‌های بیوشیمیایی تأیید شده بود، بیشترین فراوانی ژنی متعلق به ژن *IMP-1* به میزان ۲۵ درصد و کمترین فراوانـی مربـوط بـه ژن *VIM-1* به میزان ۱۲/۵ درصد مشاهده شد.

در این مطالعه وجود ژن‌های متالوبتالاکتامـاز بـا توجـه بـه مطالعات دیگر همخوانی دارد اما دلیـل دیـده نشـدن ژن‌هـای متالوبتالاکتاماز در سایر جدایه‌ها (از ۴۰ جدایه فقط ۲۵ جدایه دارای ژن‌های *VIM* و *IMP* بودند) نشان‌دهنده‌ی آن است کـه تنوع و شیوع سـایر تیـپ‌هـا در کـلاس متالوبتالاکتامـاز رو بـه افزایش است و به علت دارا بودن ترانسـپوزون‌هـای متنـوع در سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند ژن‌های مختلف را بیان نکنـد و از سوی دیگر دریافت ترانسپوزون‌ها از سایر باکتری‌هـای گـرم منفی می‌تواند از علل بیان نشدن ژن‌ها در برخـی از جدایـه‌هـا باشد (۱۷).

در سـایر مطالعـات اکثـراً ژن *VIM* بـا فراوانـی بـالایی جداسازی و مشاهده شده است؛ اما در مطالعه فلاح و همکاران در سال ۲۰۱۳ که در تهران انجام شد، ۴/۹٪ سـویه‌هـا حـاوی ژن *IMP* بودند و ژن *VIM* در هیچ‌کـدام از سـویه‌هـا مشـاهده نشد (۱۸). نتایج حاصل از این بررسی با نتـایج مطالعـه حاضـر هم‌خوانی دارد. می‌توان دلیل آن را این گونـه بیـان نمـود کـه *IMP* اولـین متالوبتالاکتامـاز شـناخته شـده در سـودوموناس آئروژینوزا می‌باشد و به دلیل گسترش سریع این ژن که دلیـل این گسترش نیز، قرار گرفتن ایـن ژن‌هـا روی اینتگـرون‌هـای کلاس یک می‌باشد که به راحتی بین سویه‌های مختلف انتقال می‌یابند. از سوی دیگر سویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز به دلیل توانایی انتقال ژن‌ها بـه سـایر بـاکتری‌هـا خطـر جـدی دارنـد (۲۰،۱۹).

در مطالعه گلشنی و همکاران با بررسـی روی ۱۰۰ ایزولـه بالینی، مقاومـت نسـبت بـه سـفتازیدیم، سیپروفلوکساسـین و ایمـی‌پـنم در کـل ۵۷٪، ۵۶٪ و ۵۵٪ بـود (۲۰). در مطالعـه جمـالی و همکـاران در سـال ۱۳۸۷، ۱۸۶ بیمـار سـوختگی بررسـی شـدند کـه بیشـترین مقاومـت بـه سـفتی‌زوکسـیم و سفوتاکسیم با مقاومت ۱۰۰٪ و کمترین مقاومت به ایمـی‌پـنم با ۶۱/۸٪ مشاهده گردید (۲۱). این نتایج حاکی از شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیمـاران سـوختگی نسـبت بـه سـایر بیماران بستری است. در مطالعـه کلانتـر و همکـاران در سـال ۲۰۱۲ بر روی بروز و الگوی حساسیت آنزیم متالوبتالاکتاماز از نمونـه‌هـای سـودوموناس آئروژینـوزای جـدا شـده از بیمـاران

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 12:37 +0330 on Monday November 19th 2018

سوختگی در استان کردستان مشاهده شد که از ۱۰۰ نمونه زخم سوختگی، ۲۲ نمونه (۲۲ درصد) مولد MBL بودند که مقاومت به سفتازیدیم ۹۶ درصد، سفتریاکسون ۸۹ درصد، سفوتاکسیم ۸۸ درصد، سفپیم ۷۲ درصد، جنتامایسین ۵۴ درصد، ایمی‌پنم ۲۱ درصد و سیپروفلوکساسین ۳۱ درصد گزارش شد (۲۲).

در نتایج تحقیق حاضر، ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا برخلاف سایر باکتری‌های گرم منفی، مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، نشان دادند. به طوری که بیشترین میزان مقاومت نسبت به جنتامایسین در ایزوله‌های جدا شده از نمونه سوختگی بود که درنهایت درمان عفونت‌های سودوموناسی را با مشکل مواجه می‌کند. غیرفعال شدن دارو مهم‌ترین عامل ایجاد مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها می‌باشد که در کلینیک با آن مواجه هستیم (۱۳). همچنین ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا در این تحقیق مقاومت بالایی به کارباپنم‌ها و سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم نشان دادند که نسبت به مطالعات قبلی که در ایران انجام شده روند افزایشی داشته است و این پدیده می‌تواند تهدید مهمی در درمان عفونت‌های بیمارستانی باشد. موضوع افزایش مقاومت به بتالاکتام‌ها می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلفی باشد. مقاومت اکتسابی باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، احتمالاً از طریق جهش ژن‌های کروموزومی یا انتقال از راه پلاسمید به دست آمده است (۲۱). عموماً تغییرات وابسته به کروموزوم در حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شامل تغییر در نفوذپذیری آنتی‌بیوتیک یا تغییر در توانایی پروتئین‌های باند کننده به پنی‌سیلین‌ها (PBP) برای شناسایی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد؛ اما بعضی از بتالاکتامازها توسط کروموزوم کد می‌شوند (۱۷).

مقاومت کد شده توسط پلاسمید نسبت به بتالاکتام‌ها، همیشه به‌صورت معرفی یک ژن بتالاکتاماز می‌باشد؛ که این می‌تواند تغییر در نفوذپذیری باکتری، تغییر در افینیتی اهداف آنتی‌بیوتیک، نقص در القاء اتولیز، تولید بتالاکتامازها را تحت تأثیر قرار دهد.

با بررسی نتایج می‌توان گفت که سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده از مراکز درمانی دارای مقاومت‌های چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف مانند خانواده‌ی بتالاکتام می‌باشد.

تشخیص سودوموناس آئروژینوزا و استفاده از آنتی‌بیوگرام در کاهش بروز این فاجعه یعنی MDR (Multi Druge Resistant) در این باکتری فرصت‌طلب نقش بسیار حائز اهمیتی دارد که باید پزشکان در بالین برای عدم بروز همچنین مشکلاتی با پیگیری از پاراکلینیک همکاری لازم را به جا آورند (۲۳).

تشکر و قدردانی

از کلیه افرادی که ما را در انجام این پروژه یاری کردند کمال تقدیر و سپاسگزاری را داریم.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 12:37 +0330 on Monday November 19th 2018

References

1. Jawetz M, Dyire B. Pseudomonas Species that isolated from Patients. Adelberg's Medical Microbiology. 2013: 322-326
2. Zafer MM, Horif H. Antimicrobial resistance pattern and their beta-lactamase encoding genes among Pseudomonas aeruginosa strains isolated from cancer patients. Bio Med Res Int. 2014: 29; 80-81.
3. Aokis-Hirakata Y, Kondoh A, Gondoh N, Yanagihara K, Miyazaki Y. Virulence of metallo bta lactamase producting P. aeruginosa invitro. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 1876-1878.
4. Lamia T, Bousselmi K, Saida BR, Allah MA. Epidemiological profile and antibiotic susceptibility of P. aeruginosa isolates within the burned patient hospitalized in the intensive care unit. Tunis Med. 2007; 85(2): 124-127.
5. Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Gales A. Evaluation of a new E test for detection metallo beta lactamases in routine clinical testing. J Clin Microbiol. 2002; 40: 2755-2759.
6. Poirel L, Guibert M, Girlich D, Naas T, Nordmann P. Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of ampC-ampR from Morganella morganii clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(4): 769-776.
7. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of Psedomonas aeruginosa producing metallo-beta-lactamases in large centralized laboratory. J Clin Microbiol. 2005; 43(7): 3129-3135.
8. Yokoe DS, Salin H. Epidemiology and prevention of nosocomial infections. In: Sherwood LG, Blacklow NR. Infectious disease. 2004. 78-82.
9. Pitout JD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL. Molecular epidemiology of metallo-β- lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. J Clin Microbiol. 2007; 45: 294-298.
10. Akhavan-Tafti F, Eslami G, Zandi H, Mousavi SM, Zarei M. Prevalence of Blavim, Blaipm and Blandm Metallo-Beta-Lactamases Enzymes in Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Burn Wounds in Shahid Sadoughi Burn Hospital, Yazd, Iran. J Isfahan Med Sch. 2014; 31(236): 1955-1964.
11. Fazeli N, Momtaz H. Virulence Gene Profiles of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Isolated From Iranian Hospital Infections. Iran Red Crescent Med J. 2014; 16(10): 157-162.
12. Altaai ME, Aziz IH, Marhoon AA. Identification Pseudomonas aeruginosa by 16SrDNA gene for Differentiation from Other Pseudomonas Species that isolated from Patients and Environment. J Baghdad Sci. 2014; 11(2): 1028-1034.
13. Sefraoui I. Holinaria M. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. Microbial Drug Resist. 2014; 20(2): 156-161.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 12:37 +0330 on Monday November 19th 2018

14. Park JJ, Oh EJ, Lee S, Kim SI, Park UJ, Kang MW. Prevalence of metallo beta lactamase among Psedomonas aeruginosa and Acintobacter baumannii in Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo beta lactamase. J Microbiol Methods. 2003; 23(54): 411-418.
15. Gendrin C, Contreras-Martel C, Bouillot S, Elsen S, Lemaire D, Skoufias DA. Structural basis of cytotoxicity mediated by the type III secretion toxin ExoU from Pseudomonas aeruginosa. PLoS Pathog. 2012; 8(4): 1002637.
16. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Shvrj F. Molecular study of Beta-Lactamase PER, VEB, SHV and TEM strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from wound infections in two hospitals of Tehran by PCR. J Med Microbiol. 2007; 1(4): 21-27.
17. Henrich-Freise B, Wiegand L, Sherwood KY, Wiedermann B. Detection of VIM-Z metallo beta lactamase in P. aeruginosa from Germany. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 15(49): 1668-1669.
18. Fallah F, Borhan RS, Hashemi A. Detection of bla(IMP) and bla(VIM) metallo-β-lactamases genes among Pseudomonas aeruginosa strains. Int J Burns Trauma. 2013; 3(2): 122-124.
19. Mihani F, Khosravi A. Isolation of Pseudomonas aeruginosa strains producing metallo beta lactamases from infections in burned patients and identification of blaIMP and blaVIM genes by PCR. Iranian J Med Microbiol. 2007; 1(1): 23-31.
20. Golshani Z, Ahadi AM, Sharifzadeh A. Occurrence of Ambler Class B Metallo-β - Lactamase Gene in Imipenem-Resistant Pseudomonas Aeruginosa Strains Isolated from Clinical Samples. Zahedan J Res Med Sci. 2014; 16(2): 6-9.
21. Jamali SH, Bahar MA, Hoshmand M. Prevalence of VIM & IMP metallobetalactamase in imipenem resistant Pseudomonas aeroginosa isolated from burn patients. Knowledge Microb. 2009; 12(5): 19-25.
22. Kalantar E, Torabi V, Salimizand H, Soheili F, Ramezanzadeh R. Incidence and Susceptibility Pattern of Metallo-Beta-Lactamase Producers among Pseudomonas aeruginosa Isolated from Burn Patients at Kurdistan Province. Jundishapur J Microbiol. 2012; 5(3): 507-551.
23. Mathlouthi N, Sasni M, Moazen F. Emergence of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii clinical isolates collected from some Libyan hospitals. Microbial Drug Resist. 2015; 21(3): 335-341.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 12:37 +0330 on Monday November 19th 2018

Study Phenotype and genotype *bla (IMP)* and *bla(VIM)* metallo-β-lactamases genes and pattern antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical samples Beheshti Hospital in the city of Qom

***Ghasem azizi A*[*1], *Jamshidi L*[2], *Mirzaee M*[3]**

1. PhD bacteriology ,Department of biology ,faculty of basic science , Azad university of Borujerd ,Borujerd,Iran, Dr.azizi86@gmail.com.
2. MSc Microbiology, Department of Microbiology , faculty of basic science , Azad university of Borujerd ,Borujerd,Iran.
3. Assistant Professor, Department of Microbiology , faculty of basic science , Azad university of Borujerd ,Borujerd,Iran.

Received: *21 Jun 2018* **Accepted:** *10 March 2018*

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative bacillus that an opportunistic pathogen in patients with immune system disorder is known. One of the common causes of nosocomial infections is considered. Organisms oxidase positive, catalase positive, animated, and aerobic and lacks the ability to ferment carbohydrates. Group B beta-lactamase, which called MBL. Since the range generally makes antibiotics such as penicillin, cephalosporin, carbapenem broad spectrum and (with the exception of monobactams) are effective, are the clinical problem. Metallo -beta-lactamase (*VIM/ IMP*) are plasmid genes. The aim of this study was to evaluate the phenotype and genotype of MBL genes *VIM-I* and *IMP-I* in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa imipenem resistant to antibiotics.

Materials and Methods:in this study by cultivating in public and differential culture and perform biochemical tests isolated for definitive confirmation and study metallobetalactamase genes from PCR was used.For review antibiotic resistance and study metallobetalactamase genes phonotype by disc diffusion.

Results: Group study, Pseudomonas aeruginosa isolates were collected from Beheshti Hospital in Qom. Then MBL genes VIM-I and IMP-I after amplification with along 261 bp and 587 bp were observed on gel electrophoresis. From 100 isolates of P. aeruginosa examined 48 isolates (48%) MBLproducers. Forty eight samples was MBL producers. 19 samples (58.39%) have bands of molecular weight of 587 gene *IMP* and 6 samples (5.12%) have bands of molecular weight of 261 gene *VIM* also 48 strains of 3 samples (25.6 percent) were containing both genes .antibiotic resistance to gentamicin samples, 36 samples (74%), ciprofloxacin 30 samples (62%), ceftazidime 29 samples (61%) ceftizoxime 27 samples (58%) and imipenem 19 samples (39%) were resistant.

Conclusion*:* Compared *IMP* gene alone fisher test $P \leq 0.05$ significant relationship was found while the phenotype and gene *VIM* alone test, fisher $P \leq 0.05$ was used, there was no significant relationship. as a result of infection and region and type of antibiotics used in the sector can affect the expression of MBL.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Metallo-β-lactamases, MBL, Genes *VIM* and *IMP*.

Citation: Ghasem azizi A, Jamshidi L, Mirzaee M. The Study Phenotype and genotype bla (*IMP*) and bla(*VIM*) metallo-β-lactamases genes and pattern antibiotic resistance Pseudomonas aeruginosa isolates from clinical samples Beheshti Hospital in the city of Qom. Yafte. 2018; 20(1):32-40.