

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^{۱*}، لیلا جمشیدی^۲، محسن میرزایی^۳

- 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، غیر تخمیری، متحرک، هوازی اجباری و فاقد توانایی تخمیر کربوهیدرات است. این باکتری یک پاتوژن فرصت طلب در بیماران دچار اختلال سیستم دفاعی و یکی از مرسوم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌آید. از آنجا که در برابر طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف و کارباپنم‌ها (به استثنای مونوباکتام) مقاوم‌اند، یکی از مشکلات عمده بالینی به شمار می‌رود. *VIM* و *IMP* از جمله 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 آنتی‌بیوتیک ایم‌پنم 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 آنتی‌بیوتیکی 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 جتاما‌یسین، ۳۰ نمونه (۶۲٪) نسبت به سیپروفلوکساسین، ۲۹ نمونه (۶۱٪) نسبت به سفنازیدیم، ۲۷ نمونه (۵۸٪) نسبت به سفتی‌زوکسیم و ۱۹ نمونه (۳۹٪) نسبت به ایم‌پنم 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 ($P < 0.05$). در حالی که در فنوتیپ و ژن *VIM* به تنهایی از آزمون فیشر، رابطه معناداری وجود نداشت. در نتیجه نوع عفونت و منطقه و نوع آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده در بخش، می‌تواند در بیان ژن‌های متالوبتالاکتاماز تأثیرگذار باشد.

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

*آدرس مکاتبه: بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی.

پست الکترونیک: Dr.azizi86@gmail.com

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک باسیل گرم منفی، غیر تخمیری، 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 پلیمرز، 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. در نتیجه 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 کلونیک اسید و سولباکتام و تازوباکتام که بازدارنده‌های بتالاکتامازها هستند، مهار نمی‌شوند و طیف سوبسترای وسیعی دارند به طوری 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* از جمله ژن‌های پلاسمیدی متالوبتالاکتاماز هستند. مقاومت به کارباپنم‌ها به دلیل وجود ژن‌های کدکننده‌ی 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، مک کانکی و انجام تست‌های استاندارد بیوشیمیایی نظیر اکسیداز، کاتالاز، TSI، اکسیداسیون و فرمانتاسیون (O/F) و رشد باکتری در دمای ۴۲ درجه

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 ایممی‌پنم EDTA+ و دیسک ایممی‌پنم 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 هر دو ژن (*IMP* و *VIM*) 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٪) ایممی‌پنم بودند (جدول ۳).

از طریق مقایسه طول هاله‌ی دیسک ایممی‌پنم EDTA+ و دیسک ایممی‌پنم 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)

سانتی‌گراวดاسازی 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 ایممی‌پنم و ایممی‌پنم EDTA+ مورد بررسی قرار گرفتند. دیسک ایممی‌پنم EDTA+ به ترتیب با دیسک‌های ایممی‌پنم مورد مقایسه قرار گرفت تا حضور و عدم حضور آنزیم متالوبتالاکتاماز در باکتری مذکور پیگیری شود (۱۲).

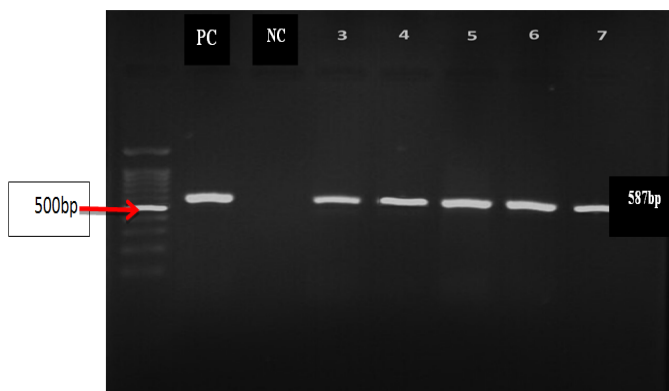
برای شناسایی ۲ ژن *VIM* و *IMP* باید DNA باکتری استخراج گردد که در این مطالعه برای استخراج ژنوم باکتری در محیط نوترینت برات کشت داده شد و پس از رسیدن به کدورت مناسب، ۱۰۰ میکرولیتر از کدورت ایجاد شده با ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراود جوشانده شد (۱۲).

جهت انجام PCR، واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط PCR که شامل جفت پرایمرها Taq، MgCl₂، 210XPCR Buffer، dNTPs، (10Pmol/ul)، 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'-GGGGATCTTCGGACCTCA-3' R-5'-TCCTTAGAGTGCCACCCG-3'	1	12	956
VIM-1	F-5'-AGTGGTGTAGTATCCGACAG-3' R-5'-ATGAAAGTGCCTGGAGAC-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)

تصویر ۲. نتیجه آزمون PCR ژن *IMP-I*

(طول محصول PCR: ۵۸۷ bp.)

M: مارکر ۱۰۰ bp، PC: کنترل مثبت، NC: کنترل منفی، ۱-۵: 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 سیستم 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 ایمپ‌پنم 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 (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٪)

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

جدول ۲. ژن‌های متالوبتالاکتاماز در ۴۸ نمونه سودوموناس

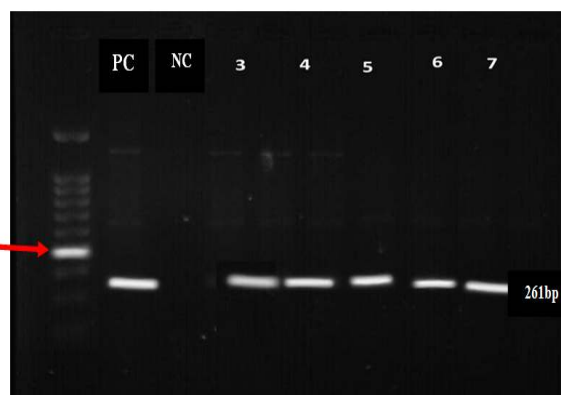
آنزیم‌ها

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

جدول ۳. الگوی مقاومتی ۴۸ نمونه سودوموناس آئروژینوزا دارای

آنزیم متالوبتالاکتاماز

الگوی مقاومتی	تعداد نمونه‌ها
جنتامایسین/سیپروفلوکساسین	۲۷ نمونه (۷۷٪)
جنتامایسین/سیپروفلوکساسین/سفنازیدیم	۲۵ نمونه (۷۳٪)
سیپروفلوکساسین/سفنازیدیم	۲۴ نمونه (۷۲٪)
جنتامایسین/سیپروفلوکساسین/سفتی‌زوکسیم	۲۵ نمونه (۵۲٪)
سیپروفلوکساسین/سفنازیدیم	۲۰ نمونه (۴۲٪)
جنتامایسین/سیپروفلوکساسین/سفتی‌زوکسیم/ایمی‌پنم	۱۶ نمونه (۳۴٪)
سیپروفلوکساسین/ایمی‌پنم	۱۴ نمونه (۲۹٪)
سفنازیدیم/سفتی‌زوکسیم/ایمی‌پنم	۸ نمونه (۱۶٪)

تصویر ۱. نتیجه آزمون PCR ژن *VIM-I*

(طول محصول PCR: ۲۶۱ bp.)

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

افزایش است و به علت دارا بودن ترانسپوزون‌های متنوع در سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند ژن‌های مختلف را بیان نکند و از سوی دیگر دریافت ترانسپوزون‌ها از سایر باکتری‌های گرم منفی می‌تواند از علل بیان نشدن ژن‌ها در برخی از جدایه‌ها باشد (۱۷).

در سایر مطالعات اکثراً ژن *VIM* با فراوانی بالایی جداسازی و مشاهده شده است؛ اما در مطالعه فلاح و همکاران در سال ۲۰۱۳ که در تهران انجام شد، ۴/۹٪ سویه‌ها حاوی ژن *IMP* بودند و ژن *VIM* در هیچ‌کدام از سویه‌ها مشاهده نشد (۱۸). نتایج حاصل از این بررسی با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. می‌توان دلیل آن را این‌گونه بیان نمود که *IMP* اولین متالوبتالاکتاماز شناخته شده در سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد و به دلیل گسترش سریع این ژن که دلیل این گسترش نیز، قرار گرفتن این ژن‌ها روی اینتگرون‌های کلاس یک می‌باشد که به راحتی بین سویه‌های مختلف انتقال می‌یابند. از سوی دیگر سویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز به دلیل توانایی انتقال ژن‌ها به سایر باکتری‌ها خطر جدی دارند (۲۰، ۱۹).

در مطالعه گلشنی و همکاران با بررسی روی ۱۰۰ ایزوله بالینی، مقاومت نسبت به سفنازیدیم، سیپروفلوکساسین و ایمپی‌پنم در کل ۵۷٪، ۵۶٪ و ۵۵٪ بود (۲۰). در مطالعه جمالی و همکاران در سال ۱۳۸۷، ۱۸۶ بیمار سوختگی بررسی شدند که بیشترین مقاومت به سفتی‌زوکسیم و سفوتاکسیم با مقاومت ۱۰۰٪ و کمترین مقاومت به ایمپی‌پنم با ۶۱/۸٪ مشاهده گردید (۲۱). این نتایج حاکی از شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران سوختگی نسبت به سایر بیماران بستری است. در مطالعه کلانتر و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی بروز و الگوی حساسیت آنزیم متالوبتالاکتاماز از نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران

آنها دارای ژن *VIM* و ۳ نمونه (۶/۲۵٪) حاوی هر دو ژن گزارش شدند.

در مطالعه اخوان‌تفتی و همکاران بر روی بررسی فراوانی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا از زخم‌های سوختگی در بیمارستان سوانح سوختگی یزد در سال ۱۳۹۱، ۲۹/۵ درصد دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند (۱۰). این نیز نشان دهنده هم‌پوشانی چهار جز یعنی؛ بخش سوختگی، سودوموناس آئروژینوزا، آنزیم متالوبتالاکتاماز و مقاومت‌های فراوان آنتی‌بیوتیکی است. این موضوع در مطالعه ما و همچنین مطالعات دیگر قابل پیگیری است.

شاه‌چراغی و همکاران در سال ۱۳۷۸ بر روی ژن‌های متالوبتالاکتاماز، در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای ایزوله شده از بیمارستان امام خمینی تهران مطالعه کردند. از مجموع ۲۴۳ نمونه جمع‌آوری شده، ۲۸ سویه دارای مقاومت به ایمپی‌پنم بودند. از این تعداد ۲۲ سویه مولد MBL بوده و ۱۵ سویه به روش PCR تأیید گردید و همگی حامل ژن *bla_{VIM-1}* بودند (۱۶).

در پژوهش حاضر برای تعیین توزیع ژن‌های کدکننده توکسین‌های *VIM-I* و *IMP-I* در نمونه‌ها از تکنیک PCR استفاده شد که در بین ۱۰۰ سویه سودوموناس آئروژینوزای مورد مطالعه که جنس و گونه آن‌ها پیشتر به واسطه تست‌های بیوشیمیایی تأیید شده بود، بیشترین فراوانی ژنی متعلق به ژن *IMP-I* به میزان ۲۵ درصد و کمترین فراوانی مربوط به ژن *VIM-I* به میزان ۱۲/۵ درصد مشاهده شد.

در این مطالعه وجود ژن‌های متالوبتالاکتاماز با توجه به مطالعات دیگر هم‌خوانی دارد اما دلیل دیده نشدن ژن‌های متالوبتالاکتاماز در سایر جدایه‌ها (از ۴۰ جدایه فقط ۲۵ جدایه دارای ژن‌های *VIM* و *IMP* بودند) نشان‌دهنده‌ی آن است که تنوع و شیوع سایر تیپ‌ها در کلاس متالوبتالاکتاماز رو به

مقاومت کد شده توسط پلاسمید نسبت به بتالاکتام‌ها، همیشه به صورت معرفی یک ژن بتالاکتاماز می‌باشد؛ که این می‌تواند تغییر در نفوذپذیری باکتری، تغییر در افینیتی اهداف آنتی‌بیوتیک، نقص در القاء اتولیز، تولید بتالاکتام‌ها 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 فرصت طلب 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.

سوختگی در استان کردستان مشاهده شد که از ۱۰۰ نمونه زخم سوختگی، ۲۲ نمونه (۲۲ درصد) مولد MBL بودند که مقاومت به سفنازیدیم ۹۶ درصد، سفتریاکسون ۸۹ درصد، سفوناکسیم 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 در نهایت 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 کاربامپن‌ها 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 بتالاکتام‌ها توسط کروموزوم کد می‌شوند (۱۷).

References

- Jawetz M, Dyire B. *Pseudomonas* Species that isolated from Patients. *Adelberg's Medical Microbiology*. 2013: 322-326
- 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.
- Aokis-Hirakata Y, Kondoh A, Gondoh N, Yanagihara K, Miyazaki Y. Virulence of metallo beta lactamase producing *P. aeruginosa* invitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 1876-1878.
- 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.
- 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.
- 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.
- Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in large centralized laboratory. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(7): 3129-3135.
- Yokoe DS, Salin H. Epidemiology and prevention of nosocomial infections. In: Sherwood LG, Blacklow NR. *Infectious disease*. 2004. 78-82.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

14. Park JJ, Oh EJ, Lee S, Kim SI, Park UJ, Kang MW. Prevalence of metallo beta lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter 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 metallobeta lactamase in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* 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.

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 L², Mirzaee M³

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 metallobeta lactamase genes from PCR was used. For review antibiotic resistance and study metallobeta lactamase genes phenotype 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%) MBL producers. 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.