مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۶۳/هفته اول بهمن ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۲

بررسی فراوانی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز bla_{VIM}، bla_{IPM} و bla_{NDM} در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از زخم‌های سوختگی در بیمارستان سوانح سوختگی شهید صدوقی یزد

فاطمه اخوان تفتی[۱]، دکتر گیلدا اسلامی[۲]، دکتر هنگامه زندی[۳]، سید مرتضی موسوی[۱]، محدثه زارعی[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سودوموناس آئروژینوزا نقش عمده‌ای در ایجاد عفونت‌های فرصت طلب و شدید در بیماران سوختگی دارد.آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز توانایی غیر فعال سازی اغلب آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله کارباپنم را دارند و معضلی جدید در درمان بیماران می‌باشند. هدف مطالعه‌ی حاضر، بررسی شیوع آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز bla_{VIM}، bla_{IPM} و bla_{NDM} در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از زخم‌های سوختگی در شهر یزد بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی توصیفی- مقطعی، تعداد ۱۸۰ نمونه زخم سوختگی از بیماران بستری در بیمارستان سوانح سوختگی اخذ شد و سپس در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، کشت داده شد وکلنی‌های مشکوک با روش‌های بیوشیمیایی معمول به عنوان سودوموناس آئروژینوزا تعیین هویت گردید. سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی از روش Kirby-Bauer مطابق با استانداردهای CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)، برای تعیین MIC (Minimum inhibitory concentration) ایمیپنم و مروپنم از روش Etest (Epsilometer test)، برای تشخیص متالوبتالاکتاماز از روش فنوتیپی Etest MBL (Etest metallo-beta-lactamase) و جهت تعیین bla_{IPM}، bla_{VIM} و bla_{NDM} از روش PCR (Polymerase chain reaction) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد.

یافته‌ها: از ۱۸۰ نمونه زخم سوختگی کشت داده شده، ۵۴ ایزوله (۳۰ درصد) به عنوان سودوموناس آئروژینوزا تعیین هویت شد. به ترتیب ۷۰ درصد، ۶۶ درصد و ۷۴ درصد ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا به ارتاپنم، مروپنم و ایمیپنم مقاوم بودند. همچنین ۳۵ ایزوله (۶۴ درصد) و ۴۰ ایزوله (۷۴ درصد) به ترتیب MIC۶ > ۱۶ نسبت به مروپنم و ایمیپنم داشتند و ۲۹/۵ درصد دارای آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز بودند. ۹ ایزوله (۱۶/۶ درصد) و ۵ ایزوله (۹/۲ درصد) از ۵۴ ایزوله‌ی مورد بررسی، دارای bla_{IPM} و bla_{VIM} بودند و ۲ ایزوله (۳/۷ درصد) همزمان دارای bla_{IPM} و bla_{VIM} بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج، شیوع آنزیم‌های MBL (Metallo-beta-lactamase) و مقاومت آنتی بیوتیکی در بیماران بستری بالا است و نیاز است که مانند سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی،مقاومت آنتی بیوتیکی نیز قبل از تجویز آنتی بیوتیک‌ها انجام شود.

واژگان کلیدی: متالوبتالاکتاماز، سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی بیوتیکی

ارجاع: اخوان تفتی فاطمه، اسلامی گیلدا، زندی هنگامه، موسوی سید مرتضی، زارعی محدثه. **بررسی فراوانی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز bla_{VIM}، bla_{IPM} و bla_{NDM} در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از زخم‌های سوختگی در بیمارستان سوانح سوختگی شهید صدوقی یزد.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۶۳): ۱۹۶۴-۱۹۵۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
۲- استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
۳- استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر هنگامه زندی
Email: hengameh_zandi@yahoo.com

مقدمه

در اوایل مصرف آنتی بیوتیک‌ها به نظر می‌رسید که باکتری‌ها مهار شدند، در حالی که استفاده‌ی وسیع از آنتی بیوتیک‌ها با عث ایجاد مسأله‌ی نوپدیدی به نام مقاومت آنتی بیوتیکی شد (۱) و کمی بعد، در بیمارستان‌ها باکتری‌های مقاوم به چند دارو ظاهر شدند و سریع در بیمارستان‌ها و سپس در جوامع انتشار یافتند (۳-۲). سودوموناس آئروژینوزا، یک پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی می‌باشد و می‌تواند در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه، سوختگی و سایر بخش ها ایجاد عفونت نماید (۵-۴). مقاومت ذاتی سودوموناس آئروژینوزا از بسیاری از باکتری‌های گرم منفی بیشتر است؛ زیرا پورین‌های غشای خارجی آن‌ها نسبت به سایر باکتری‌های گرم منفی، نفوذ پذیری بسیار کمتری دارند وسرعت انتشار مواد از آن‌ها ۱۰۰ برابر کمتر است (۸-۶).در سال‌های اخیر، تعداد سویه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم، افزایش یافته است و در برخی مناطق، سویه‌هایی یافت شده است که به انواع آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام مقاومت نشان داده‌اند (۹-۷).

تولیدآنزیم‌های بتالاکتاماز، مکانیسم عمده‌ی مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام است. طبق طبقه‌بندی Ambler، بتالاکتامازها به چهار گروه تقسیم‌بندی می‌شوند؛ گروه‌های A، B، C و D که A، C و D از نوع سرین بتالاکتامازها هستند (۱۰). بتالاکتامازهای کلاس B طبقه‌بندی Ambler متالوبتالاکتاماز هستند (۱۱-۱۰). آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز به طور معمول بر روی اینتگرون‌هایی حمل می‌شوند که آنزیم‌های تغییر دهنده‌ی آمینوگلیکوزیدها را هم دارند (۱۴-۱۲). آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز بر اساس ساختمان ملکولی به شش گروه تقسیم می‌شوند: IPM (Imipenem)، SPM (Sao Paulo metallo-beta- lactamase)، NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase)، VIM (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase)، GIM (German imipenemase) و AIM (Adelaide imipenmase) (۱۶-۱۵) که نوع VIM از سایر انواع شایع‌تر است (۱۷). متالوبتالاکتامازهای کلاس NDM اولین بار در هند گزارش شد (۱۸) و امروزه از کشورهای مختلف مثل هند، پاکستان، سنگاپور، بنگلادش و ۱۳ کشور اروپایی گزارش می‌شود (۱۹). دیده شده است که حضور این کلاس از متالوبتالاکتامازها، علاوه بر مقاومت به کاربپنم‌ها باعث مقاومت آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون‌ها و سایر کلاس‌های آنتی بیوتیکی می‌شود (۲۰). ژن کد کننده‌ی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز، پلاسمیدی است و بنابراین، به راحتی می‌تواند در بین باکتری‌ها منتشر شود (۱۷، ۱۴).

با توجه به اهمیت کاربپنم‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا و لزوم آگاهی از شیوع مقاومت و روش‌های ایجاد مقاومت به این گروه از آنتی بیوتیک‌ها، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی شیوع آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز کلاس bla_{VIM}، bla_{IPM} و bla_{NDM} در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از زخم سوختگی در شهر یزد انجام شد.

روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: در این مطالعه‌ی توصیفی- مقطعی، در طول یک سال (از فروردین تا پایان اسفند ۱۳۹۱،

از ۱۸۰ بیمار بستری در بیمارستان سوانح سوختگی شهید صدوقی یزد که دچار زخم سوختگی بودند و بیش از یک هفته آنتی بیوتیک استفاده نکرده بودند، حین تعویض پانسمان، تعداد ۱۸۰ نمونه زخم سوختگی اخذ گردید. نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد منتقل گردید و در محیط‌های کشت آگار خون‌دار (Merck، آلمان) غنی شده با ۵ درصد خون گوسفندی و محیط ائوزین متیلن بلو (EMB یا Eosin-methylene blue) (Merck، آلمان) کشت داده شد و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند.

تعیین هویت کلنی‌ها: جهت تعیین هویت کلنی‌های مشکوک، از آزمایش‌های بیوشیمیایی مانند عدم تخمیر گلوکز و لاکتوز در محیط TSI (Texas success initiative) (Merck، آلمان)، تولید اکسیداز، مصرف قندها از طریق اکسیداسیون در محیط OF (Oxcidation-fermentation) (Merck، آلمان)، رشد در ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، تولید پیگمان و حرکت استفاده شد.

حساسیت ایزوله‌های سودوموناس ائروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک‌های ایمیپنم، مروپنم و ارتاپنم (Mast، انگلستان) به روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) و مطابق با استانداردهای CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (۲۱) سنجیده شد.

مراحل کار بدین صورت بود که سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل کدورت لوله ۰/۵ مک فارلند (۱/۵ × 10^8) تهیه شد و سپس به وسیله‌ی سواپ استریل در محیط مولر هینتون (Merck، آلمان) تلقیح گردید و با استفاده از یک پنس استریل، دیسک‌ها در سطح محیط کشت قرار داده شد. پلیت در حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت انکوبه شد.

برای خواندن نتایج با استفاده از یک خط کش دقیق، قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری در اطراف دیسک بر حسب میلی‌متر اندازه گرفته شد و با استفاده از جدول میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک، به صورت Resistsnt/intermediate/sensitive گزارش شد.

جهت تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC یا Minimum inhibitory concentration) از نوارهای Etest (Epsilometer test) مروپنم (Biomerieux، فرانسه) استفاده شد.

برای بررسی وجود آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز، از نوارهای Etest ایمیپنم و ایمیپنم-EDTA (Ethylene diaminetetra acetic acid) (Biomerieux، فرانسه) استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی با غلظت معادل کدورت لوله‌ی نیم مک فارلند بر روی محیط کشت Mueller- Hinton تلقیح گردید و بعد از گذاشتن نوارها بر روی محیط کشت، در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه شد. نقطه‌ی تلاقی هاله‌ی عدم رشد باکتری در اطراف نوار، به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز به روش فنوتیپی Etest MBL (Etest metallo-beta-lactamase) (Biomerieux، فرانسه) و با استفاده از نوارهای دو سویه‌ی Etest (ایمیپنم/ ایمیپنم-EDTA) تعیین شد. دریک طرف، نوار حاوی غلظت‌های مختلف ایمیپنم (۸-۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در طرف دیگر،

غلظت های مختلف ایمیپنم-EDTA (۲/۰۰۰-۰/۰۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای ایمیپنم-EDTA) بود.

پس از تهیه‌ی سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل لوله‌ی ۰/۵ مک فارلند و تلقیح در محیط آگار Mueller- Hinton (Merck، آلمان) نوار Etest روی محیط قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند.

جهت تعیین وجود آنزیم متالابتالاکتاماز، نقطه‌ی تلاقی هاله‌های تشکیل شده در دو سوی نوار (ایمیپنم و ایمیپنم- EDTA) به عنوان رقت مهاری (MIC) در نظر گرفته شد و با واحد میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت کمی گزارش گردید.

سپس طبق دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده، چنانچه رقت مهاری ایمیپنم-EDTA نسبت به ایمیپنم بیش از سه رقت کاهش داشت و یا نسبت رقت مهاری ایمیپنم به ایمیپنم-EDTA، بزرگ‌تر و یا مساوی ۸ بود، به عنوان سویه‌ی تولید کننده‌ی متالوبتالاکتاماز در نظر گرفته شد.

جهت استخراج Genomic DNA از باکتری‌ها، از روش Salting out استفاده شد (۲۲)؛ بدین ترتیب که پس از کشت شبانه‌ی باکتری‌ها در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ سی‌سی از نمونه‌ها با PBS (Phosphate buffered saline) شستشو داده شد. سپس جهت تهیه‌ی لیز سلولی از NET buffer و SDS (Sodium dodecyl sulfate) استفاده شد.

جهت تخلیص و رسوب‌دهی به ترتیب از نمک اشباع (۵ نرمال) و الکل اتانول مطلق استفاده شد. در نهایت، پس از شستشوی DNA با الکل ۷۰ درصد، نمونه‌ها با آب مقطر محلول شدند و جهت بررسی‌های کمی و کیفی، ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده به ترتیب با روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. DNAهای استخراج شده، جهت انجام مراحل بعدی در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جهت تکثیر bla_{IPM}، bla_{VIM} و bla_{NDM} با استفاده از روش PCR (Polymerase chain reaction) از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های پیش‌گفته که با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ طراحی شده بودند، استفاده شد. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR برای هر کدام از ژن‌ها تهیه گردید. بدین صورت که برای تهیه‌ی مخلوط PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، ۲ µl از DNA استخراج شده با ۲ µl پرایمر و ۱۰ µl از مستر میکس مخلوط شد و در نهایت، حجم واکنش با آب مقطر تزریقی به ۲۰ µl رسانده شد. برای انجام PCR از ترموسایکلر (Quant biotech، انگلیس) استفاده شد. واکنش PCR برای هر ژن به صورت جداگانه انجام گردید.

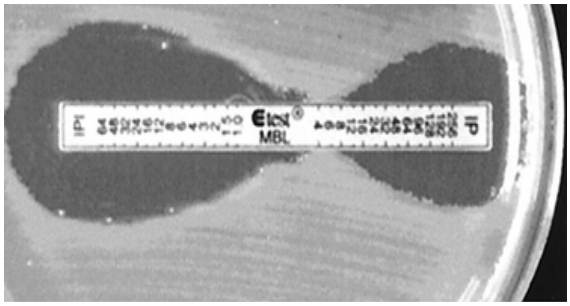
یافته‌ها

از مجموع ۱۸۰ ایزوله‌ی کشت داده شده، ۵۴ ایزوله که تولید کننده‌ی پیگمان بودند، نمای اکسیداتیو در محیط OF و توانایی رشد در ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد داشتند، به عنوان سودوموناس آئروژینوزا مورد تأیید قرار گرفتند. از این تعداد، ۱۸ ایزوله (۳۳ درصد) از زخم افراد مؤنث و ۳۶ ایزوله (۶۷ درصد) مربوط به افراد مذکر بود.

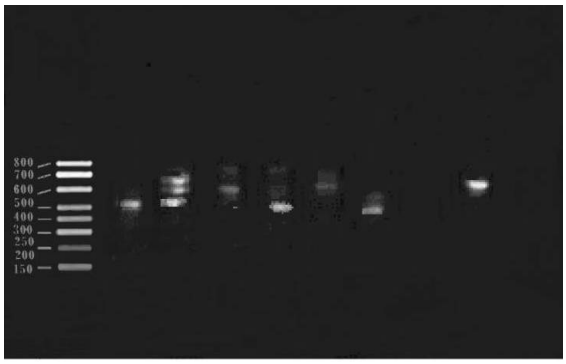
با روش دیسک دیفیوژن، از ۵۴ ایزوله‌ی مورد بررسی به ترتیب ۳۸ ایزوله (۷۰ درصد) به ارتاپنم، ۳۶ ایزوله (۶۶ درصد) به مروپنم و ۴۰ ایزوله (۷۴ درصد) به ایمیپنم مقاوم بودند.

MIC ایزوله‌های مقاوم به مروپنم و ایمیپنم به روش Etest بررسی شد. ۳۵ ایزوله (۶۴ درصد) مقاوم به مروپنم MIC > ۱۶ و ۴ ایزوله که با روش دیسک دیفیوژن به مروپنم مقاوم بودند، MIC < ۲ داشتند. ۴۰ ایزوله (۷۴ درصد) مقاوم به ایمیپنم MIC > ۱۶ داشتند.

در سنجش متالوبتالاکتاماز به روش فنوتیپی، از نوارهای Etest ایمیپنم و ایمیپنم–EDTA استفاده شد و ۲۹/۵ درصد دارای آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز بودند (شکل‌های ۱ و ۲).

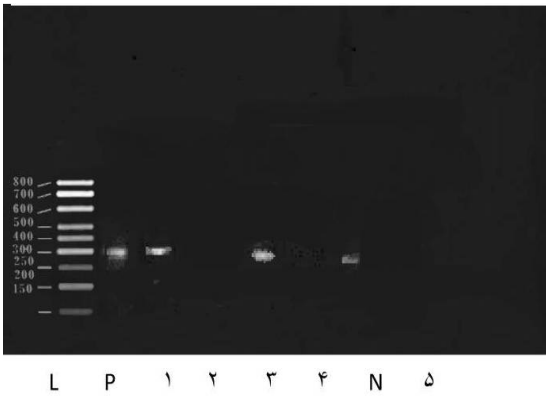


شکل ۱. تعیین متالوبتالاکتاماز به روش Etest



شکل ۲. الکتروفورز محصول Polymerase chain reaction (PCR) برای ژن bla_{ipm} (طول قطعه ۵۲۸)؛ P: کنترل مثبت؛ L: ladder50bp؛ N: کنترل منفی

از روش PCR برای بررسی وجود یا عدم وجود ژن‌های bla_{IPM}، bla_{VIM} و bla_{NDM} استفاده شد. ۹ ایزوله (۱۶/۶ درصد) و ۵ ایزوله‌ی (۹/۲ درصد) مورد بررسی به ترتیب دارای bla_{IPM} و bla_{VIM} بودند و ۲ ایزوله (۳/۷ درصد) همزمان دارای bla_{VIM} و bla_{IPM} بودند (شکل ۳).



شکل ۳. الکتروفورز محصول Polymerase chain reaction (PCR) برای ژن bla_{vim} (طول قطعه ۲۹۰)؛ P: کنترل مثبت؛ L: ladder50bp؛ N: کنترل منفی

بحث

عفونت‌های سوختگی به عنوان یک عفونت بیمارستانی، عامل مهمی در مرگ و میر بیماران و ناتوانی‌های بعد از سوختگی محسوب می‌شود. سودوموناس آئروژینوزا یک بیماری‌زای فرصت طلب است که در محیط‌های مرطوب بیمارستانی به خوبی رشد می‌کند. حساسیت کم به آنتی بیوتیک‌ها از خصوصیات بارز این باکتری محسوب می‌شود که درمان را دشوار می‌سازد. قدرت بیماری‌زایی این باکتری هنگامی آشکار می‌شود که در معرض نقاطی از بدن که سد دفاعی طبیعی خود را از دست داده‌اند (مثل زخم‌های سوختگی، محل ورود کاتتر و ...) قرار بگیرد. سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و مسؤول مر گ و میر

بالا در بخش‌های سوختگی است.

کارباپنم‌ها از جمله مهم‌ترین آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا هستند. پیدایش آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز که نه تنها باعث مقاومت به کارباپنم‌ها بلکه باعث ایجاد مقاومت به سایر آنتی بیوتیک‌ها از جمله آمینوگلیکوزیدها نیز می‌شدند، معضل جدیدی در درمان بیماران مبتلا ایجاد کرد. در مطالعه‌ی حاضر میزان شیوع متالوبتالاکتامازهاو الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از زخم سوختگی مورد بررسی قرار گرفت. به طور خلاصه، مقایسه‌ای بین نتایج این مطالعه با مطالعات مشابه صورت گرفته است.

در مجموع به ترتیب ۷۰، ۶۶ و ۷۴ درصد ایزوله‌ها به آنتی بیوتیک‌های ارتاپنم، مروپنم و ایمیپنم مقاوم بودند. در مطالعه‌ی میر صالحیان و همکاران (۱۵) که بر روی ۱۷۰ ایزوله‌ی سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از زخم سوختگی انجام شد، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های کلاس آمینوگلیکوزیدها (آمیکاسین ۸۱ درصد، جنتامایسین ۸۸ درصد، توبرامایسین ۸۴ درصد) بود و ۵۲/۹ درصد ایزوله‌ها به ایمیپنم مقاوم بودند؛ در حالی که در مطالعه‌ی حاضر، ۷۴ درصد ایزوله‌ها به ایمیپنم و ۶۶ درصد به مروپنم مقاوم بودند که می‌تواند نشانگر افزایش روند مقاومت به این کلاس از آنتی بیوتیک باشد.

در چین مطالعه‌ی Wang و همکاران برای بررسی سیر مقاومت به ایمیپنم و مروپنم در سال‌های ۰۸-۲۰۰۳ انجام شد و بیش از ۷۰ درصد ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا به این دو آنتی بیوتیک، حساس بودند (۲۳)؛ اما در مطالعه‌ی Gill و همکاران گزارش شده است که تنها ۹/۷ درصد و ۱۴/۶ درصد ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا به آنتی بیوتیک‌های ایمیپنم و مروپنم حساس بودند (۲۴). به نظر می‌رسد الگوی مقاومت به این گروه از آنتی بیوتیک‌ها، بر حسب الگوی مصرف آن در کشورهای مختلف، متفاوت است. وجود مقاومت به آنتی بیوتیک ارتاپنم با وجود این که این آنتی بیوتیک هنوز در کشور ما مورد مصرف قرار نگرفته است، مطلب قابل توجهی است که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. پیشنهاد می‌شود که این مطلب در مورد این باکتری در سایر شهرها وسایر باکتری‌ها و با تعداد نمونه‌های بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز در ۲۹/۵ درصد ایزوله‌ها مشاهده شد.گلشنی و همکاران در زاهدان در بررسی‌های خود نشان دادند که ۱۸ درصد ایزوله‌ها، مولد MBL بودند (۱۷). در مطالعه‌ی میر صالحیان و همکاران (۱۵) و نوروزی و همکاران (۲۵) بر روی ایزوله‌های اخذ شده از بیماران بستری در بخش سوختگی، به ترتیب ۱۱/۱ و ۸ درصد ایزوله‌ها دارای MBL بودند. ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا در مطالعه‌ی دوستی و همکاران در زنجان از ۷۰ ایزوله‌ی سودوموناس آئروژینوزای اخذ شده از بخش ICU (Intensive care unit)، ۷۸ درصد مولد MBL بودند (۲۶). در فرانسه، در مطالعه‌ی Walsh (۲۷) ۴۶ درصد ایزوله‌ها (که بیشتر آن‌ها از کشت خون جدا شده بودند) و در مطالعه‌ی Pitout و همکاران (۱۶) نیز از ۲۴۱ ایزوله، ۴۶ درصد دارای آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز بودند. خوشبختانه در مطالعات مختلف در کشور ما، شیوع آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز از دو مطالعه‌ی ذکر شده کمتر بوده است.

به ترتیب ۱۶/۶ و ۹/۲ درصد نمونه‌ها دارای ژن‌های bla_{VIM} و bla_{IPM} بودند. در مطالعه‌ی میر صالحیان و همکاران (۱۵) ۱۷۰ نمونه از بیماران مبتلا به عفونت سوختگی ایزوله شد که از این تعداد، ۵۲/۹ درصد نمونه‌ها به ایمیپنم مقاوم بودند و با روش Etest MBL وجود متالوبتالاکتاماز بررسی شد که ۱۱/۱ درصد نمونه‌ها مثبت بودند. تمام این ایزوله‌ها دارای bla_{VIM} بودند و هیچ کدام دارای ژن bla_{IPM} نبودند (۱۵).

در مطالعه‌ی شاهچراغی و همکاران بر روی سویه‌های سودوموناس ائروژینوزای ایزوله شده، ۲۸ ایزوله دارای MIC > ۴ بودند که از این تعداد، ۱۵ ایزوله دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز از کلاس bla_{VIM} بودند (۲۸). در مطالعه‌ی Pituot و همکاران ۴۳ درصد و ۲ درصد ایزوله‌هابه ترتیب دارای bla_{VIM} و bla_{IPM} بودند (۱۶). در مطالعه‌ی دوستی و همکاران در زنجان ۵۶ درصد و ۲۴/۳ درصد ایزوله‌ها به ترتیب دارای bla_{VIM} و bla_{IPM} بودند (۲۶).

همان‌طور که ملاحظه می‌شود، در بیشتر مطالعات، شیوع bla_{VIM} در جوامع مورد بررسی از bla_{IPM} بیشتر است. ۲ عدد از ایزوله‌ها در مطالعه‌ی حاضر همزمان دارای bla_{VIM} و bla_{IPM} بودند. در مطالعه‌ی Farzana و همکاران ۶۵/۷ درصد ایزوله‌ها مولد بیش از یک نوع MBL بودند (۲۹). همان‌طور که ملاحظه می‌شود، شیوع این دوکلاس از متالولاکتامازها در مناطق مختلف کشور متفاوت است.

هیچ کدام از ایزوله‌های مورد بررسی، دارای bla_{NDM} نبودند. در مطالعه‌ی Al-Agamy و همکاران نیز bla_{NDM} در ایزوله‌ها مشاهده نشد (۳۰). در مطالعه‌ی Farzana و همکاران در بنگلادش ۳۵ ایزوله‌ی مقاوم به ایمیپنم از نظر وجود آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز بررسی شدند. از این تعداد، ۱۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا بودند. در مجموع، ۲۲ درصد ایزوله‌های مورد بررسی در این مطالعه، دارای bla_{NDM} بودند (۲۹).

البته در مطالعات مختلف مثل مطالعه‌ی Jovcic و همکاران (۱۹) عنوان شده است که این گروه از متالوبتالاکتامازها بیشتر در هند دیده شده‌اند و سویه‌های دارای این نوع متالوبتالاکتاماز که در کشورهای اروپایی موجود بوده‌اند، از اشخاصی ایزوله شده‌اند که مسافرت به این کشور داشته‌اند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر و مطالعات مشابه، مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در کشور ما در حال گسترش است و به علاوه، مقاومت کرباپنم‌ها که امروزه خط اول درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا هستند، به دلیل گسترش سویه‌های مولد MBL در حال افزایش است. همان‌طور که در نتایج مطالعه‌ی حاضر مشاهده شد، به دلیل تشابه ساختاری بین بعضی از آنتی بیوتیک‌ها (مثل ارتاپنم و مروپنم) قبل از مصرف، مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها ایجاد شده است. به دلایل پیش‌گفته، لازم است پزشکان قبل از دریافت نتایج آنتی بیوگرام، اقدام به درمان بیمار نکنند.

References

1. Levy SB. The challenge of antibiotic resistance. Sci Am 1998; 278(3): 46-53.
2. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(6): 1379-82.
3. Troillet N, Samore MH, Carmeli Y. Imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. Clin Infect Dis 1997; 25(5): 1094-8.
4. Estahbanati HK, Kashani PP, Ghanaatpisheh F. Frequency of Pseudomonas aeruginosa serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. Burns 2002; 28(4): 340-8.
5. Poole K, Krebes K, McNally C, Neshat S. Multiple antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: evidence for involvement of an efflux operon. J Bacteriol 1993; 175(22): 7363-72.
6. Sung JY, Cho HH, Kwon KC, Koo SH. Chromosomal Mutations in oprD, gyrA, and parC in Carbapenem Resistant Pseudomonas aeruginosa. Korean J Clin Microbiol 2011; 14(4): 131-7.
7. Shojapour M, Shariati L, Karimi A, Zamanzad B. Prevalence of TEM-1 type beta-lactmase genes in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn infections using Duplex PCR in Shahrekord. Arak University of Medical Sciences Journal 2011; 14(1): 55-61. [In Persian].
8. 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(5): 1633-41.
9. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa: risk factors and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(1): 43-8.
10. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. J Antimicrob Chemother 2005; 55(6): 1050-1.
11. Kalantar D, Mansouri SH, Razavi M. Emergence of imipenem resistance and presence of metallo-?-lactamases enzymes in multi drug resistant gram negative bacilli isolated from clinical samples in Kerman, 2007-2008. J Kerman Univ Med Sci 2010; 17(3): 208-14. [In Persian].
12. Lolans K, Queenan AM, Bush K, Sahud A, Quinn JP. First nosocomial outbreak of Pseudomonas aeruginosa producing an integron-borne metallo-beta-lactamase (VIM-2) in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(8): 3538-40.
13. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005; 18(2): 306-25.
14. Samuelsen O, Buaro L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa in a low prevalence country. J Antimicrob Chemother 2008; 61(4): 827-30.
15. Mirsalehian A, Nakhjavani F, Bahador A, Jabal ameli F, Bigverdi R. Prevalence of MBL-producing Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Tehran University Medical Journal 2011; 68(10): 563-9.
16. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of Pseudomonas aeruginosa producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol 2005; 43(7): 3129-35.
17. 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.
18. Hammerum AM, Toleman MA, Hansen F, Kristensen B, Lester CH, Walsh TR, et al. Global spread of New Delhi metallo-?-lactamase 1. The Lancet Infectious Diseases 2010; 10(12): 829-30.
19. Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, et al. Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates from Serbia. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(8): 3929-31.
20. Huang YT, Chang SC, Lauderdale TL, Yang AJ, Wang JT. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa carrying metallo-beta-lactamase genes in Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 59(2): 211-6.
21. Wikler MA, Cockerill FR, Udley MN, Craig WA, liopoulos GM, cht DW, et al. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Clinical and Laberatory Standards Intitute 2006; 26(2): 1-65.
22. Grody WW, Nakamura RM, Kiechle FL, Strom C. Molecular Diagnostics: Techniques and

Applications for the Clinical Laboratory. New York, NY: Academic Press; 2009.
23. Wang H, Chen M, Ni Y, Liu Y, Sun H, Yu Y, et al. Antimicrobial resistance among clinical isolates from the Chinese Meropenem Surveillance Study (CMSS), 2003-2008. Int J Antimicrob Agents 2010; 35(3): 227-34.
24. Gill MM, Usman J, Kaleem F, Hassan A, Khalid A, Anjum R, et al. Frequency and antibiogram of multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa. J Coll Physicians Surg Pak 2011; 21(9): 531-4.
25. Norozi F, Kalantar D, Mansoouri SH, Moradi M, Alipour E, Orangi M. Detection of Imipenem resistance and beta-lactamase enzymes MBL in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in Burn Hospital Center in Shiraz. Iranian Journal of Infectious Diseases 2010; 15(49): 37-42.
26. Doosti M, Ramazani A, Garshasbi M. Identification and characterization of metallo-beta-lactamases producing Pseudomonas aeruginosa clinical isolates in University Hospital from Zanjan Province, Iran. Iran Biomed J 2013; 17(3): 129-33. [In Persian].
27. Walsh TR. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect 2005; 11 (Suppl 6): 2-9.
28. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Shooraj F, Shafiei M. Investigation of blaIMP-1, blaVIM-1 and blaSPM-1 MBL Genes among Clinical Strains of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran. Pajoohandeh Journal 2009; 14(2): 67-72. [In Persian].
29. Farzana R, Shamsuzzaman S, Mamun KZ. Isolation and molecular characterization of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 producing superbug in Bangladesh. J Infect Dev Ctries 2013; 7(3): 161-8.
30. Al-Agamy MH, Shibl AM, Zaki SA, Tawfik AF. Antimicrobial resistance pattern and prevalence of metallo-betalactamases in Pseudomonas aeruginosa from Saudi Arabia. African Journal of Microbiology Research 2011; 5(30): 5528-33.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 16.09.2013
Vol. 31, No. 263, 1st Week, February 2014
Accepted: 23.11.2013

Prevalence of *bla$_{VIM}$*, *bla$_{IPM}$* and *bla$_{NDM}$ Metallo-Beta-Lactamases* Enzymes in Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Burn Wounds in Shahid Sadoughi Burn Hospital, Yazd, Iran

Fatemeh Akhavan-Tafti[1], Gilda Eslami PhD[2], Hengameh Zandi PhD[3], Seyed-Morteza Mousavi[1], Mohadeseh Zarei[1]

Original Article

Abstract

Background: Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium that plays a major role in development of opportunistic and severe infections in burn patients. Occurrence of enzymes capable of inactivating all beta-lactams including carbapenems is new problem in treatment of patients. The objective of this study was to investigate the prevalence of Metallo-Beta-Lactamases (MBL) enzymes *bla$_{VIM}$, bla$_{IPM}$ and bla$_{NDM}$* in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn wounds in Yazd city, Iran.

Methods: In this cross-sectional study, 180 burn wound-specimens were collected from burn-hospital belonged to Shahid Sadoughi University of Medical Sciences in Yazd during one year and were cultured at microbiology laboratory of School of Medicine of this university. Suspected colonies were identified by conventional biochemical methods such as utilization of sugars, motility, and oxidase production. Sugar utilization in the Oxidation-Fermentation medium (OF), growth at 42°C and pigment production tests were performed for oxidase positive and non-fermentative colonies on Triple Sugar Iron (TSI) test. Antibiotic susceptibility was determined by Kirby-Bauer methods according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standards. Etest metallo-beta-lactamase (Etest MBL) method was used for phenotypic detection of MBL and *bla$_{VIM}$, bla$_{IPM}$ and bla$_{NDM}$* were determined by polymerase chain reaction (PCR) method using specific primers.

Findings: Out of 180 burn wound specimens, 54 (30%) was identified as Pseudomonas aeroginosa. Out of 54 isolates, 70%, 66% and 74% were resistance to ertapenem, meropenem and imipenem respectively; 64% and 74% of isolates were resistant to meropenem and imipenem respectively. MBL enzymes were detected in 29.5% of isolates. Nine isolates (16.6%) and 5 isolates (9.2%) had bla$_{VIM}$ and bla$_{IPM}$ respectively and 2(3.7%) isolates had bla$_{VIM}$ and bla$_{IPM}$ simultaneously. None of the isolates had bla$_{NDM}$.

Conclusion: The results of this study show that the prevalence of MBL enzymes and antibiotic resistance in burn patients is high and it is necessary to determine susceptibility testing before treatment.

Keywords: Metallo-Beta-Lactamases (MBL) Enzymes, Pseudomonas aeruginosa, Antibiotic resistance

Citation: Akhavan-Tafti F, Eslami G, Zandi H, Mousavi SM, Zarei M. **Prevalence of *bla$_{VIM}$, bla$_{IPM}$* and *bla$_{NDM}$ Metallo-Beta-Lactamases* Enzymes in Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Burn Wounds in Shahid Sadoughi Burn Hospital in Yazd.** J Isfahan Med Sch 2014; 31(263): 1955-64

1- MSc Student, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
2- Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
3- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
Corresponding Author: Hengameh Zandi PhD, Email: hengameh_zandi@yahoo.com