مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۴۳/هفته سوم شهریور ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۱۴

ردیابی ژن‌های متالوبتالاکتامازی bla_{SPM1}، bla_{IMP1}، bla_{IMP2}، bla_{VIM1} و bla_{VIM2} در Pseudomonas aeruginosa جداسازی شده از نمونه‌های بالینی مراکز درمانی جنوب تهران و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مهدی روحی بیرون[۱]، دکتر کیومرث امینی[۲]، دکتر مهدی پرویز[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Pseudomonas aeruginosa، یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی و کودکان است. مقاومت به کارباپنم‌ها، به دلیل وجود ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز تهدیدی جدی به شمار می‌آید. هدف از انجام این مطالعه، جداسازی ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز از سویه‌های Pseudomonas aeruginosa جدا شده از بیماران غیر بستری به روش Multiplex PCR (Multiplex polymerase chain reaction) و مقایسه با روش‌های فنوتیپی بود.

روش‌ها: ۵۰ سویه‌ی Pseudomonas aeruginosa جداسازی شد و سپس، آزمون آنتی‌بیوگرام با ۷ آنتی‌بیوتیک مختلف انجام گرفت. برای ۸ سویه‌ی مقاوم به ایمی‌پنم، آزمایش‌های فنوتیپی DDST (Double disk synergy test) و Combine disk انجام گرفت. در نهایت، برای تأیید روش‌های فنوتیپی انجام گرفته، Multiplex PCR برای ردیابی ژن‌های مورد نظر انجام شد.

یافته‌ها: مطابق نتایج آنتی‌بیوگرام، الگوی مقاومت سویه‌های جدا شده نسبت به ایمی‌پنم ۱۶ درصد و نسبت به سفتی‌زوکسیم و مروپنم ۸ درصد بود و در روش DDST و Combine disk، هیچ سویه‌ی متالوبتالاکتاماز مثبتی یافت نشد. نتایج PCR تأیید کننده‌ی روش‌های فنوتیپی بودند و هیچ نمونه‌ی متالوبتالاکتاماز مثبتی شناسایی نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این بررسی، مروپنم و سفتی‌زوکسیم داروهای جایگزین مناسب برای ایمی‌پنم می‌باشند و با توجه به روش‌های فنوتیپی و مولکولی، ژن‌های متالوبتالاکتامازی مورد نظر در بیماران غیر بستری شیوع بالایی ندارند.

واژگان کلیدی: متالوبتالاکتاماز، Multiplex polymerase chain reaction، Pseudomonas aeruginosa

ارجاع: روحی بیرون مهدی، امینی کیومرث، پرویز مهدی. **ردیابی ژن‌های متالوبتالاکتامازی bla_{SPM1}، bla_{IMP1}، bla_{IMP2}، bla_{VIM1} و bla_{VIM2} در Pseudomonas aeruginosa جداسازی شده از نمونه‌های بالینی مراکز درمانی جنوب تهران و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۳): ۱۱۴۶-۱۱۳۷

مقدمه

Pseudomonas aeruginosa، به عنوان یک عامل فرصت طلب و مقاوم به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها، در عفونت‌های بیمارستانی نقش مهمی ایفا می‌نماید. در سال‌های اخیر، میزان مقاومت به کارباپنم‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از Pseudomonas افزایش یافته

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
۳- مربی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: کیومرث امینی
Email: kamini@iau-saveh.ac.ir

است. مقاومت به کاربا‌پنم‌ها به ویژه ایمی‌پنم، به دلیل وجود خانواده‌ی ژن‌های متالوبتالاکتامازی شامل IMP، VIM و SPM با فراوانی بیشتر و SIM و GIM با فراوانی کمتر می‌باشد.

مقاومت بالای باکتری‌های مولد این آنزیم‌ها و شکست آنتی‌بیوتیک درمانی و ایجاد عفونت‌های شدید مانند سپتی‌سمی و پنومونی، خطر مرگ و میر ناشی از عفونت با این سویه‌ها را نسبت به سایر باکتری‌های مقاوم به ایمی‌پنم در عفونت‌های بیمارستانی افزایش می‌دهد.

بررسی و تشخیص سریع این آنزیم‌ها هم از لحاظ اپیدمیولوژیک و هم به منظور کمک به پزشکان معالج در انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان موفق بیماران و همچنین، کنترل سویه‌های مقاوم به داروها و جلوگیری از انتشار عفونت‌های مقاوم در بیمارستان‌ها ضروری می‌باشد.

ژن‌های این آنزیم‌ها، در عناصر قابل انتقال از جمله پلاسمیدها و اینتگرون‌ها قرار دارند و به راحتی می‌توانند بین سویه‌های مختلف یک باکتری وحتی باکتری‌های مختلف، انتقال یابند. مقاومت به کاربا‌پنم‌ها (ایمی‌پنم و مروپنم) در Pseudomonas aeruginosa از چندین راه صورت می‌گیرد: کاهش جذب آنتی‌بیوتیک از طریق فقدان یک پورین غشای خارجی تحت عنوان OprD که باعث ایجاد یک مقاومت سطح پایین می‌شود و نیز، دفع فعال دارو از طریق ایفلاکس که مهم‌ترین آن‌ها MexAB-OprM است و به طور ذاتی در باکتری وجود دارد و باعث دفع بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله کاربا‌پنم‌ها می‌شوند (۱).

هدف از انجام این تحقیق، شناسایی ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز در سویه‌های Pseudomonas aeruginosa جدا شده از بیماران غیر بستری با روش Multiplex PCR (Multiplex polymerase chain reaction) و روش فنوتیپی DDST (Double disk synergy test) و Combine disk و مقایسه‌ی آن‌ها با یکدیگر بود.

روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: در این مطالعه‌ی توصیفی- مقطعی، در طول ۶ ماه (از فروردین تا شهریور ۱۳۹۳) از ۵۰ بیمار غیر بستری مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های جنوب غرب تهران، نمونه‌ی مربوط به Pseudomonas aeruginosa جداسازی گردید. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و در محیط ستریمید آگار کشت شد. محیط‌های کشت به مدت ۲۴-۱۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید.

تعیین هویت کلنی‌ها: جهت تعیین هویت کلنی‌های مشکوک، از آزمایش‌های بیوشیمیایی مانند عدم تخمیر گلوکز و لاکتوز در محیط TSI agar (Triple sugar iron agar) تولید اکسیداز، رشد در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، تولید پیگمان سبز- آبی در محیط ستریمید آگار و حرکت در محیط SIM (Sulfide indol motility) استفاده شد (۳-۲).

حساسیت ایزوله‌های Pseudomonas aeruginosa جداسازی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفتی‌زوکسیم (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم) تهیه شده از شرکت پادتن طب، به روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) و مطابق با استانداردهای CLSI

(Clinical and Laboratory Standards Institute) سنجیده شد (۴).

روش DDST: برای بررسی وجود آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز، از روش‌های فنوتیپی DDST و Combine disk استفاده شد. تهیه‌ی سوسپانسیون باکتریایی معادل با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند و سپس تأیید با اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۲۵ نانومتر و OD (Optical density) ۰/۱-۰/۰۸ انجام گرفت. سپس با استفاده از سوآپ استریل، روی سطح محیط Muller-Hinton agar کشت داده شد.

در مرحله‌ی بعد، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بر روی این محیط قرار داده شد. ابتدا دیسک ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم) روی پلیت و دیسک EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) با غلظت ۰/۵ مولار به حجم ۴ میکرولیتر روبه‌روی دیسک ایمی‌پنم و به فاصله‌ی ۲۰-۱۵ میلی‌متر قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، نتیجه خوانده شد (۵-۴). در این روش، در اطراف دیسک ایمی‌پنم، افزایش هاله‌ی عدم رشد، بیانگر وجود آنزیم متالوبتالاکتاماز می‌باشد (۵-۴).

روش Combine disk: دراین روش، ابتدا برای ۸ سویه‌ی مقاوم به ایمی‌پنم، سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک‌فارلند از کلنی‌های ۲۴ساعته تهیه و بر روی سطح محیط مولر هینتون آگار کشت گردید. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه ازتلقیح، دیسک ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم در سمتی از پلیت و دیسک EDTA/IPM در گوشه‌ی دیگر پلیت قرار داده شد و ۲۴ ساعت انکوبه گردید.

پس از ۲۴ ساعت، تفاوت هاله‌ی عدم رشد مقایسه شد. در نمونه‌ی متالوبتالاکتاماز مثبت، تفاوت دو هاله‌ی عدم رشد باید بیش از ۷ میلی‌متر باشد (به شرطی که هاله‌ی ایمی‌پنم زیر ۱۴ میلی‌متر باشد).

روش Multiplex PCR: برای استخراج DNA، ازکیت باکتری‌های گرم منفی شرکت سیناژن (DNA KIT-PR۸۸۱۶۱۳ Cinna Pure) استفاده شد. آزمون Multiplex polymerase chain reaction (M-PCR) شامل مرحله‌ی واسرشت اولیه ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، مرحله‌ی واسرشت ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله‌ی اتصال ۶۱ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله‌ی بسط ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه (تعداد ۳۵ سیکل) و مرحله‌ی بسط نهایی ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود.

پرایمرهای استفاده شده در این آزمون در جدول ۱ آمده است. آزمون Multiplex PCR در دستگاه ترموسایکلر (TECHNE) انجام گردید. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد انتقال داده شد و بعد از رنگ‌آمیزی، در دستگاه ژل داک (BIORAD) مورد بررسی قرار گرفت.

داده‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

از مجموع ۵۰ ایزوله‌ی Pseudomonas aeruginosa، ۲۸ ایزوله (۵۶ درصد) از زنان و ۲۲ ایزوله (۴۴ درصد) از مردان جداسازی گردید که میزان مقاومت در زنان بیشتر از مردان بود (شکل ۱). این اختلاف، با توجه به مقایسه‌ی دو جنس معنی‌دار بود.

از ۵۰ ایزوله‌ی مورد بررسی جهت انجام آزمون

آنتی‌بیوگرام، بیشترین حساسیت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و سفتی‌زوکسیم به میزان ۹۲ درصد و بیشترین مقاومت برای آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم (۶۴ درصد) گزارش شد (جدول ۲) (شکل ۲).

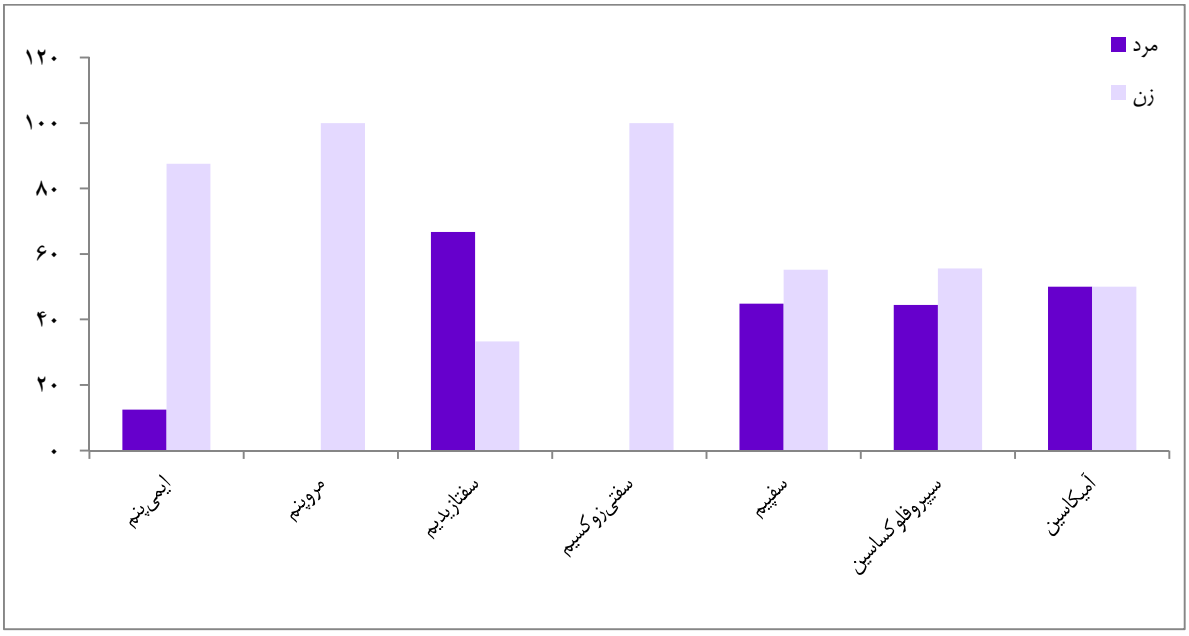
در سنجش متالوبتالاکتاماز به روش فنوتیپی، از روش‌های DDST (Double disk synergy test) و Combine disk استفاده شد. در روش DDST از میان سویه‌های مقاوم به ایمی‌پنم، سویه‌ی مثبتی یافت نشد (شکل ۳).

در روش Combine disk از میان سویه‌های مقاوم به ایمی‌پنم، سویه‌ی مثبتی یافت نشد (شکل ۴).

آزمون M-PCR برای بررسی وجود یا عدم وجود ژن‌های bla_{SPM1}، bla_{IMP2}، bla_{IMP1}، bla_{VIM1} و bla_{VIM2} استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Multiplex PCR (Multiplex polymerase chain reaction).

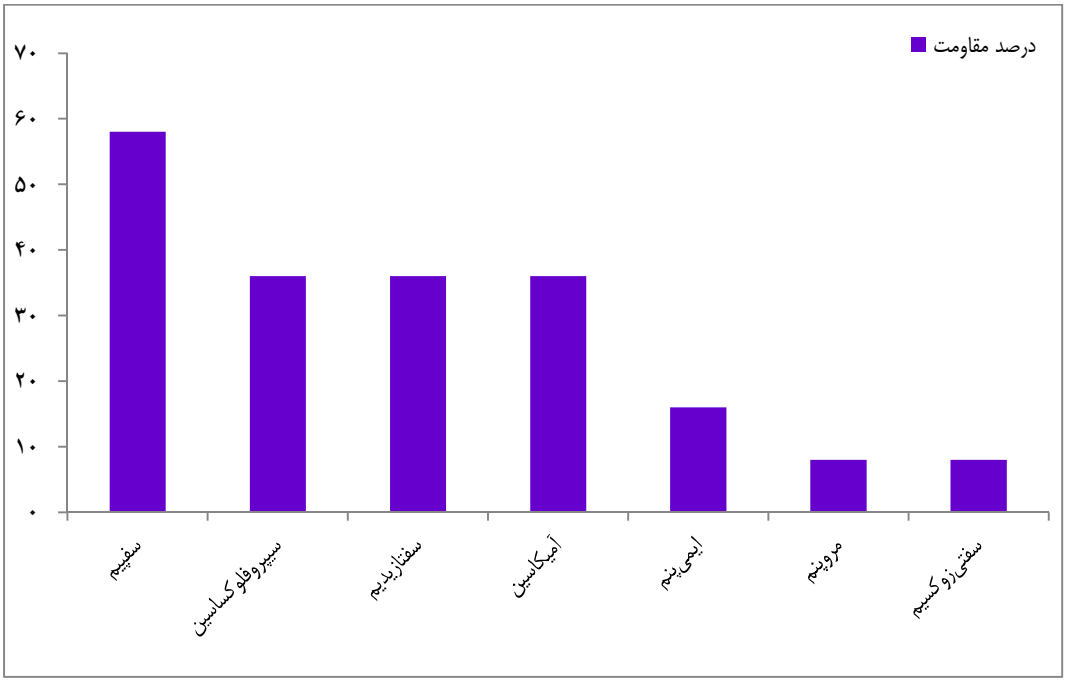
پرایمر	توالی پرایمر	ژن هدف	اندازه‌ی باند (bp)
SPM_1	Forward: ۵´CCTACAATCTAACGGCGACC۳´ Reverse: ۵´TCGCCGTGTCCAGGTATAA۳´	SPM_1	۷۸۶
IMP_1	Forward: ۵´TGAGCAAGTTATCTGTATTC۳´ Reverse: ۵´TTAGTTGCTTGGTTTTGATG۳´	IMP_1	۷۴۰
IMP_2	Forward: ۵´GGCAGTCGCCCTAAAACAAA۳´ Reverse: ۵´GGCAGTCGCCCTAAAACAAA۳´	IMP_2	۷۳۷
VIM_1	Forward: ۵´TTATGGAGCAGCAGCAACCGATGT۳´ Reverse: ۵´CAAAAGTCCCGCTCCAACGA۳´	VIM_1	۹۲۰
VIM_2	Forward: ۵´AAAGTTATGCCGCACTCACC۳´ Reverse: ۵´TGCAACTTCATGTTATGCCG۳´	VIM_2	۸۶۵



شکل ۱. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر حسب جنس

جدول ۲. میزان حساسیت سویه‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن

نوع آنتی‌بیوتیک	میزان مقاومت (درصد)	حساسیت متوسط (درصد)	میزان حساسیت (درصد)
ایمی‌پنم	۱۶	–	۸۴
مروپنم	۸	–	۹۲
سفپیم	۶۰	۱۰	۳۰
سفتازیدیم	۶۴	۶	۳۰
سفتی‌زوکسیم	۸	–	۹۲
سیپروفلوکساسین	۳۶	–	۶۴
آمیکاسین	۳۶	۲۴	۴۰



شکل ۲. مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها به کل آنتی‌بیوتیک‌ها

شکل ۳. نتیجه‌ی آزمون DDS (Double disk synergy)

شکل ۴. نتیجه‌ی آزمون Combine disk

از مجموع ۵۰ ایزوله‌ی جدا شده‌ی Pseudomonas aeruginosa، هیچ سویه‌ی متالوبتالاکتاماز مثبتی یافت نشد. بررسی‌های آماری نشان داد که بین جنسیت و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین ارتباط معنی‌داری وجود دارد. در حالی که بین حساسیت نسبت به ایمی‌پنم و حساسیت نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها ارتباط معنی‌داری یافت نشد.

بحث

Pseudomonas aeruginosa، یکی از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی است که جهت درمان آن، آنتی‌بیوتیک‌های متعددی مانند آمینوگلیکوزیدها، کینولون ها و بتالاکتام ها به کار می‌روند، اما شیوع عفونت های بیمارستانی سویه های مقاوم بسیار گزارش شده است (۴). متالوبتالاکتامازها، به دلیل ایجاد مقاومت به کارباپنم‌ها که از مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده علیه عفونت‌های ناشی از Pseudomonas هستند، بسیار حایز اهمیت می‌باشند.

در مطالعاتی انجام گرفته در بیمارستان‌های کشورهای مختلف، بدون مصرف قبلی کارباپنم‌ها نیز Pseudomonasهای مولد IMP و VIM مشاهده شده است که بیانگر انتقال این ژن بین سویه‌های مختلف می‌باشد. سویه‌های دارای این ژن‌ها، به دلیل پیوستگی ژنتیکی، به خانواده‌ی مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سولفانامیدها، کینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها نیز مقاومت نشان می‌دهند. از طرف دیگر، مکانیزم‌های دیگر شایع در Pseudomonas aeruginosa مانند Efflux pumps و Amp C کروموزومی نیز می‌توانند به طور هم‌زمان در ایجاد مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نقش داشته باشند (۷-۶، ۴).

در این تحقیق، میزان مقاومت به آمیکاسین ۳۶ درصد گزارش شد. Makedou و همکاران نشان داد که ۱۵ درصد سویه‌ها مقاوم به آمیکاسین بودند (۸). شاهچراغی و همکاران، نشان دادند که ۹۳/۴ درصد از سویه‌ها مقاوم به آمیکاسین بودند (۴). موحدی و همکاران در تحقیقی که بر روی کودکان بخش NICU (Neonatal intensive-care unit) مرکز طبی کودکان انجام داد، با مقاومت ۱۸ درصد در مواجهه با آنتی‌بیوتیک آمیکاسین مواجه شدند (۹).

در این بررسی، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۳۶ درصد گزارش شد. در تحقیق دوستی و همکاران در بیمارستان ولی عصر (عج) زنجان، ۴۰/۶ درصد از سویه‌های Pseudomonas aeruginosa جدا شده از نمونه‌های بالینی، به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (۱۰). در پژوهش فاضلی و همکاران از بیمارستان سوانح سوختگی امام موسی کاظم (ع) اصفهان نیز ۹۸/۷ درصد از سویه‌های Pseudomonas aeruginosa جدا شده از بیماران، مقاومت به این آنتی‌بیوتیک را از خود نشان دادند (۱۱).

Rossolini و Mantengoli نیز مکانیسم‌های ایجاد مقاومت و روند افزایش میزان شیوع مقاومت را در بین باکتری Pseudomonas aeruginosa بررسی نمودند (۱۲). مقایسه‌ی نتایج این تحقیق با سایر مطالعات نشان داد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران سوانح سوختگی (۹۸/۷ درصد) بیش از سایر موارد است که این امر، می‌تواند به دلیل ضعف سیستم ایمنی و مقاومت کمتر بیماران سوختگی به دلیل ضعف جسمانی ناشی از سوختگی باشد.

در این تحقیق، ۱۶ و ۸ درصد از سویه‌ها به ترتیب به ایمی‌پنم و مروپنم مقاوم بودند. بررسی‌ها نشان می‌دهد، میزان مقاومت نسبت به ایمی‌پنم نیز در چند سال اخیر، به دلیل انتشار و انتقال ژن‌های کد کننده‌ی متالوبتالاکتاماز در حال افزایش است.

Luzzaro و همکاران نشان دادند که ۱۵ درصد سویه‌های Pseudomonas aeruginosa، مقاوم به ایمی‌پنم بودند (۱۳). تحقیق حاضر، نتایج مشابهی را با پژوهش Luzzaro و همکاران نشان داد، اما نسبت به سایر مطالعات، مقاومت کمتری را نشان داد. دلیل این امر، می‌تواند نوع نمونه‌های گرفته شده‌ی Pseudomonas aeruginosa باشد که از بیماران غیر بستری آزمایشگاه‌های تشخیص طبی جدا شده بودند و به همین دلیل، مقاومت کمتری را نسبت به ایمی‌پنم نشان دادند.

Franco و همکاران، طی تحقیقی در بیمارستان‌های برزیل، مشاهده کردند که ۱۰۰ درصد بیماران مقاوم به ایمی‌پنم بودند (۶). در پژوهش دوستی و همکاران ۵۵/۱ درصد از بیماران مقاوم به ایمی‌پنم بودند (۱۰).

در این تحقیق، ۸ درصد از سویه‌ها مقاومت نسبت به مروپنم را نشان دادند. در مطالعه‌ی دوستی و همکاران، ۹۸/۶ درصد از سویه‌ها مقاوم به مروپنم بودند (۱۰). در تحقیق Franco و همکاران، ۸۸/۴ درصد مقاومت به مروپنم گزارش شد (۶). نتایج بیانگر کارایی بیشتر این آنتی‌بیوتیک می‌باشد.

میهنی و خسروی ۸۱ درصد مقاومت به سفتازیدیم را گزارش کردند (۱۴). با مقایسه‌ی نتایج تحقیق حاضر با سایر مطالعات، کمترین میزان مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک گزارش شد.

همچنین، در تحقیق حاضر، میزان مقاومت با توجه به شکل ۱، در زنان بیشتر از مردان بود که وجود این اختلاف معنی‌دار به ویژه در میان آنتی‌بیوتیک‌های سفتی‌زوکسیم، مروپنم و ایمی‌پنم مشاهده گردید. این یافته، می‌تواند مؤید این نکته باشد که میزان مصرف آنتی‌بیوتیک در میان زنان بالاتر از مردان است و به دنبال آن، ایجاد مقاومت در این افراد، بیشتر مشاهده می‌گردد.

آزمایش DDST بر روی ۸ نمونه‌ی مقاوم به ایمی‌پنم انجام گرفت و نتیجه ی هر ۸ مورد منفی بود. مقایسه ی این نتایج با نتایج آزمون مولکولی نشان دهنده عدم وجود ژن‌های متالوبتالاکتامازی در سویه‌های مورد بررسی است.

دوستی و همکاران در تحقیقی برای جداسازی ژن‌های متالوبتالاکتامازی Pseudomonas aeruginosa، ۴۴ نمونه‌ی مقاوم به ایمی‌پنم را بررسی کردند که در ۳۳ نمونه، آزمایش DDST مثبت بود (۱۰).

همچنین، در تحقیق دیگری که برای جداسازی ژن متالوبتالاکتاماز bla_{VIM} بر روی بیماران بستری در بیمارستان سوانح سوختگی انجام شد، از بین ۴۱ نمونه‌ی مقاوم به ایمی‌پنم، ۳۴ نمونه DDST مثبت داشتند (۱۱).

در مطالعه‌ی شاهچراغی و همکاران، از ۲۸ سویه‌ی مقاوم به ایمی‌پنم، ۲۲ سویه به روش DDST، متالوبتالاکتاماز مثبت بودند که از این میان، ۱۵ سویه به روش PCR حاوی ژن bla_{VIM1} بودند (۴).

در تحقیق دیگری که شاهچراغی و همکاران در بیمارستان‌های کرمان انجام دادند، هیچ سویه‌ی متالوبتالاکتاماز مثبتی مشاهده نکردند و روش DDST نیز تأیید کننده‌ی روش PCR بوده است (۱۵).

در این بررسی، از ۸ نمونه‌ی مقاوم به ایمی‌پنم که آزمایش Combine disk در مورد آن‌ها انجام گرفت، نتیجه ی هر ۸ مورد منفی بود. نتایج آزمون PCR بیانگر عدم وجود ژن مقاومت در ایزوله‌ها و وجود مقاومت در روش دیسک دیفیوژن بود. با توجه به نتایج آزمون PCR، به این نکته می‌توان اشاره نمود که وجود مقاومت می‌تواند ناشی از سایر آنزیم‌های تولید شده توسط باکتری و بروز پدیده‌ی مقاومت در آن باشد.

در مطالعه‌ی فاضلی و همکاران، از ۴۱ سویه‌ی مقاوم به ایمی‌پنم، در ۳۳ سویه نتیجه‌ی آزمون Combine disk مثبت بود (۱۱).

برای ردیابی ژن‌های $bla_{SPM۱}$، $bla_{IMP۲}$، $bla_{IMP۱}$، $bla_{VIM۱}$ و $bla_{VIM۲}$ از تکنیک Multiplex PCR استفاده شد. در این مطالعه، نتیجه‌ی تکنیک PCR تأیید کننده‌ی دو روش فنوتیپی DDST و Combine disk بود. مشابه این نتیجه را شاهچراغی و همکاران در تحقیقی در کرمان گزارش نمودند؛ به طوری که هیچ سویه‌ی متالوبتالاکتاماز مثبتی مشاهده نکردند (۴). در مطالعه‌ی دیگری که فاضلی و همکاران انجام دادند، با استفاده از PCR وجود ژن bla_{VIM} را بررسی کردند که ۴۳ درصد از سویه‌ها حاوی ژن bla_{VIM} بودند و سازگاری حدود ۹۰ درصد رانشان دادند (۱۱).

تشکر و قدردانی

از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد که در انجام مراحل عملی این تحقیق همکاری نمودند، تشکر می‌گردد.

References

1. Essa EA, Afifi IK. Multiplex PCR study of nosocomial Pseudomonas aeruginosa for genes of metallo-beta-lactamases: could such enzymes bring us to end of antibiotics? Egyptian J Med Microbiol. 2007:16(1): 189-200.
2. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, and Adelberg's medical microbiology. 23th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2004. p. 407-10.
3. Norouzi J. Practical methods in identification of bacteria. 2nd ed. Tehran, Iran: Hayyan Publication; 2004. p. 156-62. [In Persian].
4. 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. Pejouhandeh 2009; 14(2): 67-72. [In Persian].
5. Taghvaee R, Shojapour M, Sadeghi A, Pourbabaie AA. The study of antibiotic resistance pattern and the frequency of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from medical centers in Arak City, Iran. Qom Univ Med Sci J 2013; 7(4): 36-41. [In Persian].
6. Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa in a Brazilian university hospital. Clinics (Sao Paulo) 2010; 65(9): 825-9.
7. Essa EA, Afifi IK. Multiplex PCR study of nosocomial Pseudomonas aeruginosa for genes of metallo-beta-lactamases: could such enzymes bring us to end of antibiotics? Egyptian J Med Microbiol. 2007:16(1): 189-200.
8. 8-Makedou KG, Tsiakiri EP, Bisiklis AG, Chatzidimitriou M, Halvantzis AA, Ntoutsou K, et al. Changes in antibiotic resistance of the most common Gram-negative bacteria isolated in intensive care units. J Hosp Infect 2005; 60(3): 245-8.
9. Movahedi Z, Pourakbari B, Mahmoudi S, Sabouni F, Ashtiani Haghi MT, Hosseinpour Sadeghi R, et al. Pseudomonas aeruginosa infection among cystic fibrosis and ICU patients in the referral children medical hospital in Tehran, Iran. J Prev Med Hyg 2013; 54(1): 24-8.
10. Doosti M, Ramazani A, Faghihi M. Isolation and assessment of phenotypic and genotypic characteristics of metallo-beta-lactamase genes in Pseudomonas auroginosa strains isolated from clinical samples at Vali-e-Asr Hospital in

Zanjan province. Sci J Kurdistan Univ Med Sci 2013; 18(2): 97-105. [In Persian].

11. Fazeli H, Moslehi TZ, Irajian GR, Salehi MR. Determination of drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in Pseudomonas aeruginosa strains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran (2008-9). Iran J Med Microbiol 2009; 3(4): 1-8. [In Persian].

12. Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant Pseudomonas aeruginosa. Clin Microbiol Infect 2005; 11(Suppl 4): 17-32.

13. Luzzaro F, Endimiani A, Docquier JD, Mugnaioli C, Bonsignori M, Amicosante G, et al. Prevalence and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 48(2): 131-5.

14. Mihani F, Khosravi A. Seperation of Pseudomonas aeroginosa spieces producing of metalobetalactamase from patients infected to burned infections and identification of bla_{IMP}, bla_{VIM} With PCR method. Iran J Med Microbiol 1997:1(1): 23-32. [In Persian].

15. Shakibaie MR, Shahcheraghi F, Hashemi A, Adeli S. Detection of TEM SHV and PER ESBL genes among clinical strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from burnt patients at Shafa hospital Kerman, Iran. Iran J Basic Med Sci 2008; 11(2): 104-11.

Journal of Isfahan Medical School Received: 29.04.2015

Vol. 33, No. 343, 3rd Week, September 2015 Accepted: 05.08.2015

Detecting Metallo-Beta-Lactamase (MBL) Genes of blaSPM1, blaIMP1, blaIMP2, blaVIM 1, and blaVIM in Isolated Pseudomonas aeruginosa from Clinical Samples and its Antibiotic Resistance

Mahdi Rouhi-Biroon MSc[1], Kumarss Amini PhD[2], Mahdi Parviz PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Pseudomonas aeruginosa is one of the important factors for nosocomial infections, particularly in patients with impaired immune systems and children. Carbapenems resistance, due to the presence of metallo-beta-lactamase (MBL) genes encoding enzymes, is considered as a serious threat. This study aimed to detect metallo-beta-lactamase genes encoding enzymes in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from non-hospitalized patients and to assess its antibiotic resistance.

Methods: Fifty strains of Pseudomonas aeruginosa were isolated and antibiogram test was investigated with 7 different antibiotics. For 8 imipenem-resistant strains, phenotypic testing was performed via double disk synergy test (DDST) and combine disk methods. Finally, to confirm phenotypic methods, multiplex polymerase chain reaction (PCR) test was performed for detection of target genes.

Findings: According to the results of the antibiogram test, 16% of the samples were resistant to imipenem and 8% to meropenem or ceftizoxime. DDST and Combine disk methods did not found any beta-lactamase positive strain. Results of phenotypic methods were confirmed via multiplex PCR and no metallo-beta-lactamase specimen was identified.

Conclusion: According to the study, meropenem and ceftizoxime are good alternative medicines for imipenem. As appropriate phenotypic and molecular methods showed, the metallo-beta-lactamase genes were not prevalent in non-hospitalized patients.

Keywords: Metallo-beta-lactamase, Multiplex polymerase chain reaction (PCR), Pseudomonas aeruginosa

Citation: Rouhi-Biroon M, Amini K, Parviz M. **Detecting Metallo-Beta-Lactamase (MBL) Genes of blaSPM1, blaIMP1, blaIMP2, blaVIM 1, and blaVIM in Isolated Pseudomonas aeruginosa from Clinical Samples and its Antibiotic Resistance.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(343): 1137-46

1- Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
3- Instructor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
Corresponding Author: Kumarss Amini PhD, Email: kamini@iau-saveh.ac.ir