

بررسی فراوانی ژن های متالوبتالاکتاماز blaVIM و blaIMP در سویه های ادراری

سودوموناس آئروژینوزا جدا شده در ایلام

محمد ماسبی^{۱*}، فاطمه قنبری^۲، مجتبی داریویی^۱، نورخدا صادقی فرد^۲

(۱) دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس، فارس، ایران

(۲) مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

(۳) کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۴

چکیده

مقدمه: بتالاکتامازهای کلاس B از جمله IMP و VIM که متالوبتالاکتاماز (MBL) خوانده می شوند، به دلیل هیدرولیز پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و کرباپنم ها (به استثنای مونوباکتام ها مانند آزترونام)، مشکلات عمده ای برای درمان بیماری های عفونی به وجود می آورند. در این مطالعه، فراوانی ژن های متالوبتالاکتاماز bla_{VIM} و bla_{IMP} در سویه های ادراری سودوموناس آئروژینوزا در ایلام مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش ها: در مجموع ۶۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا از آزمایشگاه مرکزی ایلام، جمع آوری گردید و با استفاده از روش های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. از روش دیسک دیفیوژن برای تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها استفاده گردید. جهت شناسایی سویه های مولد MBL از روش دیسک دیفیوژن به عنوان غربالگری و از روش دیسک ترکیبی سفتازیدیم به تنهایی و در ترکیب با EDTA به عنوان روش تاییدی استفاده گردید. آزمون PCR این سویه ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت بررسی ژن های bla_{VIM} و bla_{IMP} انجام شد.

یافته های پژوهشی: در مجموع ۱۷ سویه به روش دیسک دیفیوژن به سفتازیدیم مقاوم بودند که با روش ترکیبی تمامی این سویه ها به عنوان تولیدکننده MBL تشخیص داده شدند. از این تعداد ۶ سویه با روش PCR، حاوی ژن bla_{VIM} بود و هیچ کدام از سویه ها دارای ژن bla_{IMP} نبودند. تمامی سویه ها دارای ژن VIM به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه جز پیراسیلین تازوباکتام مقاوم بودند.

بحث و نتیجه گیری: در این مطالعه bla_{VIM}، ژن غالب در میان سویه های مقاوم به سفتازیدیم بود. با توجه به اهمیت سویه های مولد متالوبتالاکتاماز در بیمارستان ها، شناسایی سریع و ردیابی این سویه ها می تواند گامی مهم و اساسی در درمان و کنترل عفونت های ناشی از این سویه ها به شمار رود.

واژه های کلیدی: متالوبتالاکتاماز، سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

جزء کلاس D اگزاسیلینازها (OXA-23 تا OXA-27) باشند (۹). متالوبتالاکتامازهای نوع IMP، GIM، VIM و SPM در سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شده اند. نخستین کرباپنماز به نام IMP-1 در سودوموناس آئروژینوزا در طی سال های ۱۹۹۴-۱۹۹۲ در ژاپن کشف شد. ژن این آنزیم ها توسط پلاسمیدهای با وزن مولکولی بالا درون کاست های ژنی حاوی کلاس یک و سه اینتگرون ها حمل می گردند. در طی سال های ۲۰۰۰ به بعد آنزیم های IMP مختلفی مثل IMP-7، IMP-9، IMP-13، IMP-16 و IMP-18 در سودوموناس آئروژینوزا کشف گردیدند. نوع دیگر کرباپنماز VIM-1 بود که نخستین بار در سال ۱۹۹۷ در ایتالیا کشف شد. مشابه ژن IMP ژن VIM-1 قسمتی از کاست ژنی درون In70 از اینتگرون کلاس یک می باشد. در طی سال های بعد VI(10)M های دیگری مانند VIM-2، VIM-3، VIM-4، VIM-5، VIM-7، VIM-8، VIM-11، VIM-13، VIM-15 و VIM-16 کشف گردیدند (۱۳-۱۱). چندین روش مختلف برای تشخیص آزمایشگاهی سویه های مولد MBL گزارش شده است. استفاده از نوار Etest که هزینه های زیادی دارد و استفاده از دیسک های ترکیبی سفنازیدیم یا ایمپ پنم به تنهایی و در ترکیب با EDTA از جمله روش هایی هستند که در شناسایی سویه های مولد متالوبتالاکتاماز از آن ها استفاده می شود (۱۴).

مقاومت به کرباپنم ها در بین باکتری هایی چون سودوموناس آئروژینوزا به دلیل این که ژن های کدکننده آنزیم های MBL اکثراً بر روی اینتگرون های کلاس یک واقع شده اند، به راحتی بین سویه های مختلف انتقال می یابند (۱۵، ۱۶). سویه های مولد متالوبتالاکتاماز به دلیل توانایی انتقال ژن ها به سایر باکتری ها و کلونیزه شدن طولانی مدت در بیمارستان ها خطری جدی در مراکز درمانی به شمار می روند. تشخیص سریع این سویه ها و گزارش دقیق حضور این باکتری ها در بیمارستان ها می تواند باعث کنترل بهتر و موثر این سویه ها گردد. در این مطالعه به بررسی فراوانی ژن های متالوبتالاکتاماز blaIMP و blaVIM در سویه های ادراری سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از آزمایشگاه مرکزی ایلام پرداخته شد.

مواد و روش ها

در طی آذر تا اسفندماه سال ۱۳۹۱، ۶۰ ایزوله ادراری سودوموناس آئروژینوزا از آزمایشگاه مرکزی ایلام جمع

سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب عامل عمده عفونت در افراد با سیستم ایمنی ضعیف به ویژه افراد بستری در بخش مراقبت های ویژه، در بیماران سوختگی و افرادی با نوتروپنی شدید می باشد. امروزه درمان این عفونت ها به خاطر گسترش مقاومت دارویی در میان ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا مشکل جدی و عمده ای می باشد (۱). شیوع مقاومت به کرباپنم ها یکی از مهم ترین نوع مقاومت به آنتی بیوتیک ها در سودوموناس آئروژینوزا می باشد و این نوع مقاومت در سراسر جهان در حال افزایش است (۲). مقاومت به کرباپنم در سودوموناس آئروژینوزا ممکن است به واسطه کاهش بیان پورین در غشاء (OprD)، افزایش بیان افلاکس پمپ ها (efflux pumps)، کاهش نفوذپذیری غشاء و هم چنین تولید برخی بتالاکتامازها و کرباپنمازها باشد (۳). کرباپنم ها جزو آنتی بیوتیک های بتالاکتام وسیع الطیف بوده و بر علیه برخی از باکتری های گرم منفی و گرم مثبت بسیار موثر هستند. این آنتی بیوتیک ها، نسبت به سفالوسپورینازها و پنی سیلینازها مقاوم هستند. با این وجود در گروه بندی امبلر، بعضی بتالاکتامازهای گروه های A، B و D می توانند کرباپنم ها را هیدرولیز کنند (۴). در این میان، بتالاکتامازهای کلاس B که متالوبتالاکتاماز (MBL) خوانده می شوند از آن جایی که بر روی طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها از جمله پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و کرباپنم ها (به استثنای مونوباکتام ها) موثرند، مشکل عمده بالینی به شمار می روند (۵). متالوبتالاکتامازها جزء کلاس B بتالاکتامازها در طبقه بندی امبلر و گروه سوم طبقه بندی عملکردی Bush می باشند (۶).

متالوبتالاکتامازها دارای اتم روی در جایگاه فعال می باشند. این آنزیم ها برخلاف سرین بتالاکتامازها وابستگی پائینی به منوباکتام ها دارند و به وسیله کالولانیک اسید، تازوباکتام و سولباکتام که بازدارنده های بتالاکتامازها هستند، مهار نمی شوند. در عوض آن ها در محیط *in vitro* به وسیله بازدارنده های متالوبتالاکتامازها شامل اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، سدیم مرکاپتواسستیک اسید (SMA)، ۲ مرکاپتوپروپیونیک اسید (MPA) و دی پیکولینیک اسید (DPA) مهار می شوند (۷، ۸).

کرباپنمازها می توانند جزء کلاس A آنزیم هایی که به وسیله کالولانیک اسید مهار می شوند (NMC، SME، IMI و KPC) یا جزء کلاس B متالوبتالاکتامازها (IMP، VIM، SPM، GIM، SIM، AIM، KHM و NDM) و یا

نمونه ها با دور rpm ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع رویی را دور ریخته و به رسوب حاصل از باکتری ۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد و پس از انتقال کل سوسپانسیون به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل، آن ها را به مدت ۲۰ دقیقه درون بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و پس از این مدت بلافاصله به مدت ۱۰ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه قرار داده شدند. در مرحله بعد به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شدند و بعد از آن ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی درون میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید ریخته شدند و سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول سرد به آن اضافه شد و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردیدند. سپس تمام محتوای میکروتیوب خالی گردید و پس از خشک شدن کامل میکروتیوب ها به رسوب که حاوی DNA بود ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و به صورت خفیف ورتکس گردید.

آزمایش PCR: جهت بررسی حضور ژن های bla_{IMP} و bla_{VIM} از پرایمرهای اختصاصی این ژن ها که در جدول شماره ۱ آورده شده است، استفاده گردید.

جهت واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر، سه میکرولیتر از DNA باکتری استخراج شده به سایر اجزاء PCR که حاوی ۲/۵ میکرولیتر از بافر، ۱/۵ میلی مول از MgCl₂، ۰/۷۵ میلی مول از مخلوط چهارگانه dNTP، ۲/۵ پیکومول از هر پرایمر و ۰/۲ واحد آنزیم Taq polymerase اضافه گردید.

برنامه PCR به صورت First Denaturation در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۶ درجه سانتی گراد برای VIM و دمای ۴۵ درجه سانتی گراد برای IMP به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت Final Extension در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶ دقیقه تنظیم گردید. الکتروفورز نمونه ها در ژل آگارز ۱ درصد انجام شد و از مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Fermentase) برای سنجش اندازه محصولات PCR مورد انتظار استفاده گردید. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، نتایج، با دستگاه Gel Documentation زیر نور ماورای بنفش (UV) مشاهده شدند.

آوری گردید. ایزوله ها با استفاده از تست های بیوشیمیایی از جمله تست اکسیداز، کاتالاز، تست OF، تست MR/VP، بررسی حرکت و تولید اندول در محیط کشت SIM، واکنش در محیط کشت TSI و رشد در ۴۲ درجه سانتی گراد، شناسایی و مورد تایید قرار گرفتند (۱۷).

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های سفتریاکسون، سفپیم، آزوترئونام، جنتامایسین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، ایمی پنم، پپراسیلین تازوباکتام و سفتازیدیم (تهیه شده از شرکت Mast) به روش انتشار در آگار (Kirby-Bauer) با استفاده از پروتکل CLSI 2011 بررسی شد (۱۸).

شناسایی سویه های تولیدکننده MBL: جهت شناسایی سویه های مولد MBL از روش دیسک دیفیوژن به عنوان غربالگری و از روش دیسک ترکیبی سفتازیدیم به تنهایی و در ترکیب با EDTA به عنوان روش تأییدی استفاده گردید.

برای تهیه EDTA ۰/۵ مولار ۱۸/۶۱ گرم EDTA در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل و pH آن را با NaOH در عدد ۸ تنظیم و سپس حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر رسانیده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد در داخل اتوکلاو استریل گردید.

برای انجام روش تأییدی از باکتری هایی که به روش دیسک دیفیوژن نسبت به سفتازیدیم مقاوم یا نیمه حساس بودند سوسپانسیونی برابر نیم مک فارلند تهیه گردید و با استفاده از سوآپ استریل به صورت چمنی بر روی محیط کشت مولر هیتون تلقیح شدند و پس از آن دو عدد دیسک سفتازیدیم با فاصله بر روی سطح پلیت حاوی کشت باکتری قرار داده شد و به یکی از دیسک ها ۱۰ μl از EDTA ۰/۵ مولار اضافه گردید. پس از ۱۸-۱۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قطر هاله عدم رشد اطراف دو دیسک اندازه گیری شد و در مواردی که قطر هاله عدم رشد در دیسک سفتازیدیم و EDTA نیم مولار نسبت به قطر هاله عدم رشد در دیسک سفتازیدیم به تنهایی ۷ میلی متر یا بیشتر باشد به عنوان سویه تولیدکننده متابولاکتاماز در نظر گرفته شد (۱۹).

استخراج DNA: جهت استخراج DNA و انجام PCR از روش جوشاندن (boiling) استفاده گردید به این صورت که ابتدا یک کلنی از باکتری در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB درون فالتون ۱۵ میلی لیتری کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس

جدول شماره ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن blaIMP و blaVIM

ژن	F(5' → 3')	R(5' → 3')	اندازه محصول bp	دمای آنیلینگ
<i>bla_{VIM}</i>	TTTGGTCGCATATCGCAACG	CCATTCAGCCAGATCGGCAT	500	56
<i>bla_{IMP}</i>	GCTAAAGATACTGAAAAATTAGT	TCATTTGTTAATTCAGATGCATA	587	45

یافته های پژوهش

نتایج تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن نشان داد که ۲۴ سویه (۴۰ درصد) به سفتریاکسون، ۴۴ سویه (۷۳/۳ درصد) به سفپیم، ۳۱ سویه (۵۱/۶ درصد) به آزوترونام، ۲۶ سویه (۴۳/۳ درصد) به جنتامایسین، ۲۷ سویه (۴۵ درصد) به آمیکاسین، ۲۱ سویه (۳۵ درصد) به سیپروفلوکساسین، ۱۹ سویه (۳۱/۶ درصد) به افلوکساسین، ۹

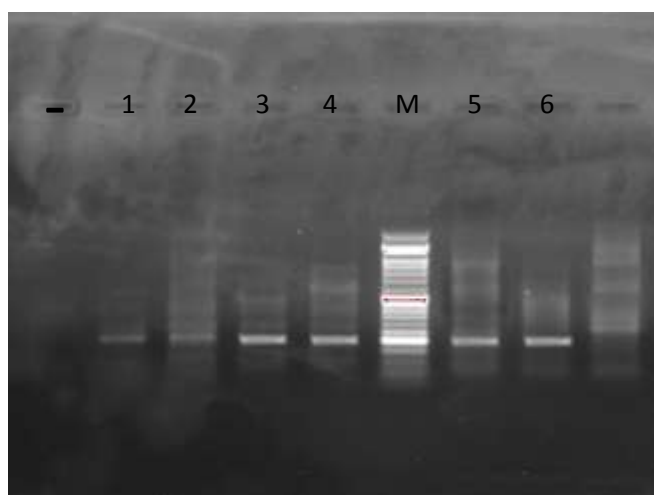
سویه (۱۵ درصد) به ایمی پنم، ۱۴ سویه (۲۳/۳ درصد) به پپیراسیلین-تازوباکتام و ۱۶ سویه (۲۶/۶ درصد) به سفنازیدیم مقاوم هستند. از مجموع ۶۰ نمونه مورد مطالعه، ۱۷ سویه (۲۸/۳ درصد) نمونه با روش دیسک دیفیوژن به سفنازیدیم غیر حساس (مقاوم و نیمه مقاوم) بودند که تمامی این ۱۷ نمونه با روش تائیدی به عنوان مولد MBL تشخیص داده شدند (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱. روش فنوتیپی تشخیص سویه های مولد MBL با استفاده از دیسک ترکیبی

نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های تولیدکننده MBL نشان داد که این سویه ها دارای مقاومت بالایی به بیشتر آنتی بیوتیک ها بودند به طوری که در بین ۱۷ سویه مولد متالوبتالاکتاماز ۸۸/۲ درصد، ۸۸/۲ درصد، ۱۰۰ درصد، ۹۴/۱ درصد، ۹۴/۱ درصد، ۷۶/۴ درصد، ۶۴/۷ درصد، ۳۵/۲ درصد، ۵۲/۹ درصد و ۱۰۰ درصد به ترتیب به سفپیم، سفتریاکسون، آزوترونام، جنتامایسین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، پپیراسیلین-تازوباکتام، ایمی پنم و سفنازیدیم مقاوم بودند.

هم چنین نتایج حاصل از PCR نشان داد که ۶ سویه از ۱۷ سویه مولد MBL (۳۵/۶ درصد)، حاوی ژن blaVIM هستند (تصویر شماره ۲). در صورتی که ژن blaIMP در هیچ کدام از سویه ها مشاهده نشد. سویه هایی که با روش ژنوتیپی دارای ژن VIM بودند به طور ۱۰۰ درصد به تمام آنتی بیوتیک های مورد مطالعه به جز پپیراسیلین-تازوباکتام (۳ سویه) مقاوم بودند.



تصویر شماره ۲. تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR. ستون ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ مربوط به قطعه ژن VIM به اندازه ۵۰۰bp را نشان می دهد. M مارکر مولکولی ۱۰۰bp - کنترل منفی می باشد.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر آنتی بیوتیک های ایمی پنم، پپراسیلین تازوباکتام و سفنازیدیم موثرترین آنتی بیوتیک بر علیه سویه های سودوموناس آئروژینوزا بودند. هم چنین در بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی، همه سویه های مولد ژن VIM به تمام آنتی بیوتیک های مورد مطالعه به جزء پپراسیلین تازوباکتام مقاوم بودند. بر طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه می توان نتیجه گرفت که موثرترین آنتی بیوتیک بر علیه سویه های مولد ژن VIM پپراسیلین-تازوباکتام می باشد.

متالوبتالاکتامها همه بتالاکتامها جز آزوترونوم را هیدرولیز می نمایند اما در این مطالعه همه سویه های مولد متالوبتالاکتامها به آزوترونوم نیز مقاوم بودند. این می تواند به دلیل مکانیزم های دیگر مانند تولید ESBL، افلاکس پمپ ها و یا تولید بالای سفالوسپورین ها باشد(۴).

در این مطالعه برای شناسایی سویه های مولد آنزیم MBL از EDTA که یک بازدارنده متالوبتالاکتامازی است، استفاده گردید. استفاده از این روش به راحتی قابل تفسیر، ساده و مشکلات سمی سایر بازدارنده های MBL مانند ۲- مرکاپتوپروپیونیک اسید و یا پر هزینه بودن مانند Etest را ندارد و هم چنین از حساسیت بالایی برخوردار است(۲۲). مطالعه حاضر با مطالعه ای که توسط فلاح و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تهران که ۴/۹ درصد سویه ها حاوی ژن IMP بودند اما ژن VIM در هیچ کدام از سویه ها مشاهده نشد هم خوانی ندارد و علت آن با توجه به یافته ها در مطالعه فلاح به نظر می رسد ایزوله های تولیدکننده MBL علت اصلی مقاومت به ایمی پنم نباشند و احتمالاً مکانیزم های دیگری در ایجاد مقاومت به این آنتی بیوتیک ها درگیر

متالوبتالاکتامها به عنوان یکی از مهم ترین مکانیسم های دخیل در ایجاد مقاومت به کارباپنم ها که از موثرترین آنتی بیوتیک های مورد استفاده علیه سودوموناس آئروژینوزا می باشند، مورد توجه قرار گرفته اند. به دلیل مقاومت بالای باکتری های مولد این آنزیم به آنتی بیوتیک ها و ایجاد عفونت های شدید مثل سپتی سمی و پنومونی، میزان مرگ و میر ناشی از این نوع باکتری ها در عفونت های بیمارستانی بیشتر از انواع باکتری های فاقد این آنزیم ها می باشد. شناسایی و تشخیص این آنزیم ها هم به لحاظ درمان مناسب و کنترل سویه های مقاوم و هم از لحاظ اپیدمیولوژیک ضروری به نظر می رسد. از آن جایی که ژن های کدکننده این آنزیم ها بر روی عناصر قابل انتقال از جمله پلاسمید، ترانسپوزون و اینتگرون قرار دارند، به راحتی می توانند بین سویه های مختلف یک باکتری و یا باکتری های مختلف انتقال پیدا کنند و هم چنین سویه های مولد این ژن ها به دلیل پیوستگی ژنتیکی، به آنتی بیوتیک هایی از قبیل سولفونامیدها، کینولون ها و آمینوگلیکوزیدها نیز مقاومت نشان می دهند(۱۵،۱۶،۲۰). تنوع متالوبتالاکتامها در سویه های سودوموناس آئروژینوزا باعث محدودیت درمانی، حداقل در سه قاره آسیا، اروپا و آمریکای جنوبی شده است. با توجه به این که سویه های تولیدکننده MBL به بسیاری از مواد ضد میکروبی مقاوم می باشند. پس باید به فکر سنتز ترکیبات ضد میکروبی قوی تر با مکانیسم عمل بهتر بود و یا از داروهای قدیمی با سمیت زیاد مثل Polymyxin B و Colistine استفاده نمود(۲۱).

متالوبتالاکتاماز تشخیص داده شدند که حاکی از حساسیت بالای این تست می باشد. از این تعداد فقط ۶ نمونه با انجام PCR حاوی ژن VIM و ۱۱ نمونه منفی بودند در این مورد شاید باکتری ها دارای ژن هایی غیر از VIM و یا از مکانیسم های مقاومتی دیگر استفاده می کنند.

از آن جا که بیشتر اینتگرون های حاوی ژن های متالوبتالاکتاماز VIM و IMP، آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها را نیز کد می کنند، درمان عفونت ناشی از باکتری حاوی این ژن ها به دلیل فقدان آنتی بیوتیک جدید که طیف درمان وسیعی داشته باشد، مشکلات عمده ای را ایجاد می کند. لذا شناسایی و ردیابی سویه های مولد این آنزیم ها می تواند گامی اساسی در درمان عفونت ناشی از این سویه ها باشد.

References

1. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 2009;73:338–44.
2. Kouda S, Kuwahara R, Ohara M, Shigeta M, Fujiwara T, Komatsuzawa H, et al. First isolation of blaIMP-7 in a *Pseudomonas aeruginosa* in Japan. *J Infect Chemother* 2007;13: 276–7.
3. Walsh TR, Toleman, M.A., Poirel, L., Nordmann, P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? . *Clin Microbiol Rev* 2005;18, 306–325.
4. Walsh TR, Tolman, M.A., Poirel, L., Nordmann, P. Metallo- β -Lactamases: the quiet before the storm? . *J Clin Microbiol* 2002;18, 3798-3801.
5. Galleni M, Lamotte-Brasseur, J., Rossolini, G.M., Spencer, J., Diderg, O., Free, J.M. Standard Numbering Scheme for Class B β -Lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2001;45 660-663.
6. Bush K, Jacoby, G.A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; 969–976.
7. Marchiaro P, Ballerini, V., Spalding, T., Cera, G., Mussi, M.A., Moran-Barrio, J., Vila, A.J., Viale, A.M., Limansky, A.S.,. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. *Antimicrob Chemother*. 2008;62, 336–344.
8. Laraki N, Franceschini, N., Rossolini, G.M., Santucci, P., Meunier, C., dePauw, E., Amicosante, G., Frere, J.M., Galleni, M. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*.

باشند زیرا ۱۰۰ درصد سویه ها برای ژن VIM و ۹۵/۱ درصد برای ژن IMP منفی بودند (۲۳). اما با مطالعه ای که در کشور کره در سال ۲۰۰۵ و در ایتالیا در سال ۲۰۰۴ (۲۴،۲۵) و در اهواز توسط خسروی و همکاران در سال ۲۰۰۸، در تهران توسط شاهچراخی و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام گرفته هم خوانی دارد چون که در این مطالعات ژن VIM مشاهده شد اما ژن IMP مشاهده نشد (۲۶،۲۷). متالوبتالاکتاماز VIM از جمله متالوبتالاکتامازهای مهم در باکتری سودوموناس آئروژینوزا بوده و نسبت به سایر MBL ها از فراوانی بالایی برخوردار است. بنا بر این به نظر می رسد ژن VIM در میان MBL ها در ایران غالب باشد.

در این مطالعه ۱۷ سویه غیر حساس به سفنازیدیم بودند که همه آن ها با روش فنوتیپی CAZ+EDTA مولد

9. Queenan AM, Bush, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20, 440–458.
10. Hall BG, Salipante, S.J., Barlow, M. The Metallo- β -Lactamases Fall into Two Distinct Phylogenetic Groups. *journal of molecular evolution*. 2003;57, 249–254.
11. Tanya S, Yordanov, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology* 2009;59, 1133–1148.
12. Hirakata Y, Yamaguchi, T., Nakano, M., Izumikawa, K., Mine, M., Aoki, S., Kondoh, A., Matsuda, J., Hirayama, M., Yanagihara, K., Miyazaki, Y., Tomono, K., Yamada, Y., Shimeru Kamihira, S., Kohno, S. Clinical and Bacteriological Characteristics of IMP-Type Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37, 26–32.
13. Lee K, Lim, J.B., Yum, J.H., Yong, D., Chong, Y., Kim, J.M., Livermore, D.M. blaVIM-2 Cassette Containing Novel Integrons in Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* Isolates Disseminated in a Korean Hospital. *antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46 1053–1058.
14. Hemalatha V, Sekar, U., Kamat, V., . Detection of metallo β lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients. *Indian J Med Res*. 2005;122, 148-152.
15. Cornaglia G, Mazzariol, A., Lauretti, L., Rossolini, G.M., Fontana, R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas*

- aeruginosa producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis* 2000;31, 1119-1125.
16. Yatsuyanagi J, Saito, S., Harata, S., Suzuki, N., Ito, Y., Amano, K.,. Class 1 integron containing metallo-beta-lactamase gene blaVIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48, :626-628.
17. Forbes BA, Sahm, D.F., Weissfeld, A.S. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th ed. Mosby Company. 2002;389-391.
18. CLSI. Performance standards for Antimicrobial susceptibility Testing. Twenty-First Informational Supplement. 2011;M100-S21 60. 311.
19. Pandya NP, Prajapati, S.B., Mehta, S.J., Kikani, K.M., Joshi P.J. Evaluation of various methods for detection of metallo- β -lactamase production in gram negative bacilli. *Int J Biol Med Res Original Article*. 2011; 2, 775-777.
20. Nordmann P, Poirel, L. Emerging carbapenemases in gram negative aerobes. *Microbiol Infect* 2002;8, 321-331.
21. Sacha P, Wiczorek, P., Hauschild, T., Zorawski, M., Olszanska, D., Trynieszewska, E.,. Metallo- β -Lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* a novel mechanism resistance to β -lactam antibiotics. *Folia Histochemica et cytobiologica*. 2008;46, 137-142.
22. Pitout JD, Gregson, D.B., Poirel, L., McClure, J.A., Le, P., Church, D.L. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005;43, 3129-3135.
23. Fallah F, Shams Borhan, R., Hashemi, A. Detection of bla(IMP) and bla(VIM) metallo- β -lactamase genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Int J Burn Trauma*. 2013;3, 122-124.
24. Luzzaro F, Endimiani, A., Docquier, J.D., Mugnaioli, C., Bonsignori, M., Amicosante, G., al.,. Prevalence and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;48, 131-135.
25. Kim IS, Lee, N.Y., Ki, C.S., Oh, W.S., Peck, K.R., Song, J.H. Increasing prevalence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and molecular typing of metallo-beta-lactamase producers in a Korean hospital. *Microb Drug Resist*. 2005;11, 355-359.
26. Shahcheraghi f, Nikbin, V.S., Feizabadi, M.M. Identification and genetic characterization of metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* in Tehran, Iran. *New Microbiologica* 2010;33, 243-248.
27. Khosravia A, Mihania, F. Detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2008;60, 125-128.

Prevalence of metallo- β -lactamase blaIMP and blaVIM genes in urinary isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Ilam

Maspi M^{*}, Ghanbari F^{2,3}, Darbouy M¹, Sadeghifard N²

(Received: February 9, 2014 Accepted: March 5, 2015)

Abstract

Introduction: class B beta-lactamases such as IMP and VIM that read metallo- β -lactamase (MBL), due to the hydrolysis of penicillins, cephalosporins and carbapenems for the treatment of infectious diseases, major difficulties create. In study, the prevalence of MBL blaIMP and blaVIM genes in urinary isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were investigated in ilam province.

Materials & methods: A total of 60 strains of *P. aeruginosa* Central Laboratory of ilam, were collected and were identified using biochemical methods Antibiotic susceptibility testing by the disk diffusion method (Kirby-Bauer) for antibiotics cefepiem, ceftriaxone, Aztreonam, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, ofloxacin, ceftazidime, piperacillin tazobactam and imipenem was performed. Then strain insensitive to ceftazidime, the method Ceftazidime - EDTA Combined disk synergy test (CDST-CAZ) Was used to detect MBL-producing strains. The PCR test strains using specific primers for

blaIMP and blaVIM genes was investigated.

Findings: A total of 17 strains were resistant to ceftazidime. With method CDST all strains non-susceptible to ceftazidime, were MBL-producers. PCR and sequencing methods proved that 6 isolates were positive for blaVIM genes, whereas none were positive for blaIMP genes. All isolates that were positive for VIM gene were resistant to all antibiotics studied except piperacillin tazobactam.

Discussion & conclusion: In this study, blaVIM dominant gene in *P. aeruginosa* urinary strains resistant to ceftazidime was administrative. Given the importance of MBL-producing strains in hospitals, rapid detection of these strains could be crucial step in the treatment and control of infections caused by these strains is considered.

Keywords: MBL, *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiotic resistance.

1. Dept of Microbiology, Science and Research branch, Islamic Azad University Fars, Fars, Iran.

2. Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

3. Student Researches Committee, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran.

* Corresponding author: Email: mohammadmasbi@gmail.com