تعیین فراوانی ژن های VIM 2،3،9،11،16 و VIM all تولیدکننده آنزیم متالو بتالاکتاماز در باکتری پسودوموناس آئروژینوزا

راهله ناصریان مقدم[۱]، فاطمه رودباری[۱]، محبوبه نادری نسب[۲]، داوود منصوری[۲]،
سیده زهره میرباقری[۳]، آیدا قلوبی[٤]، امین هوشیار چچکلو[۲]، زهرا مشکات[۲*]

۱) گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران
۲) مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳) گروه میکربیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
٤) گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۷ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱/۱۵**

چکیده

مقدمه: مقاومت آنتی بیوتیکی همواره به عنوان یک مشکل جدی برای سلامت انسان مطرح بوده است و بیماران زیادی را در بیمارستان های سراسر جهان تحت تاثیر قرار داده است. پسودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن گرم منفی و یکی از عوامل شایع عفونت های بیمارستانی است. آنزیم های متالو بتالاکتاماز، اصلی ترین مکانیسم مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام در این باکتری می باشد. ژن های تولیدکننده این آنزیم بیشتر بر روی پلاسمید قرار دارد. هدف از این مطالعه ارزیابی فراوانی ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا مولد متالو بتالاکتاماز که توسط ژن های VIM 2،3،9،11،16 و VIM all ایجاد می گردد.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۱۲۷ ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا با روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی بائر طبق دستورالعمل CLSI، جهت آنتی بیوگرام استفاده گردید. و از روش Combined-disk test جهت شناسایی فنوتایپی ایزوله های تولیدکننده متالو بتالاکتاماز استفاده شد. پس از استخراج DNA، با استفاده از فناوری PCR وجود ژن های VIM all و VIM 2،3،9،11،16 به طور اختصاصی بررسی گردید.

یافته های پژوهش: از کل ۱۲۷ نمونه سودوموناس مورد بررسی ۶۲ ایزوله(۴۹ درصد) مقاوم به ایمپنم بودند و نیز ۳۱ ایزوله(۲۴/۵ درصد) در بررسی فنوتایپی تولیدکننده متالو بتالاکتاماز بودند. هم چنین در بین سویه های مقاوم به ایمیپنم به شکل کلی حضور ژن های VIM all در ۱۲/۵ درصد موارد به دست آمد ولی حضور ژن های VIM 2-3-9-11-16 در نمونه های مورد بررسی شناسایی نشدند.

بحث و نتیجه گیری: یافته های به دست آمده در این تحقیق بیان کننده این موضوع است که باکتری پسودوموناس آئروژینوزا بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی را به سفازولین(۹۸ درصد) و هم چنین به نالیدیسک اسید(۹۱ درصد) و کمترین مقاومت را به سیپرو فلوکسازین(۳۱ درصد) نشان داده است که یکی از دلایل این روند رو به رشد تولید آنزیم های مقاوم به آنتی بیوتیک ها و مکانیسم های شناخته شده این باکتری در ایجاد مقاومت می باشد.

واژه های کلیدی: متالو بتالاکتاماز، پسودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی بیوتیکی، ژن VIM

مقدمه

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
Email: meshkatz@mums.ac.ir

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.43]

پسودوموناس آئروژینوزا باکتری فرصت طلب، گرم منفی و هوازی می باشد این باکتری سومین علت عفونت های بیمارستانی و دومین علت عفونت زخم های سوختگی می باشد، هم چنین یکی از عوامل مهم عفونت های مزمن ریوی و مرگ و میر در بچه ها و بزرگسالان مبتلا به بیماری سیستیک فیبروزیس است. امروزه شاهد گزارشات متعددی مبنی بر شیوع گسترده آن ها به خصوص در بخش های مراقبت های ویژه بزرگسالان و سوختگی هستیم. از عوامل بسیار مهم اما نادر در چنین مقاومت هایی وجود آنزیم های متالو بتالاکتاماز است که باعث ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های دارای حلقه بتالاکتام در باکتری می گردد(۱،۲). ژن های کدکننده این آنزیم ها بر روی پلاسمید یا داخل اینتگرون ها قرار گرفته و می توانند در پلاسمید یا کروموزوم ادغام شوند. لذا قابلیت انتقال به سایر سویه های پسودوموناس و باکتری های دیگر از جمله انترو باکتریاسه را دارد(۳).

ژن های متالو بتالاکتاماز می توانند بیشتر بر روی اینتگرون کلاس یک که شامل ژن های مقاومت متعددی هستند قرار گرفته و حلقه بتالاکتام را باز کرده و آنتی بیوتیک را غیر فعال کند. بتالاکتامازها بر طبق تقسیم بندی Ambler بر اساس ساختار اولیه شان به چهار کلاس A تا D تقسیم می شوند. کلاس A, C, D بتالاکتاماز هستند و کلاس B متالوبتالاکتاماز است. بتالاکتامازهای وسیع الطیف بیشتر از بتالاکتامازهای کلاس A هستند. بتالاکتامازهای کلاس B متالو بتالاکتامازهایی هستند که وجود یک یا دو یون روی (Zn) در جایگاه فعال آن ها ضروری است. متالو بتالاکتامازها توانایی غیر فعال سازی همه آنتی بیوتیک های بتالاکتام به جز مونو باکتام را دارند(۴،۵)؛ ولی با این وجود مهم ترین راه ایجاد مقاومت به ایمی پنم در پسودوموناس آئروژینوزا از دست دادن پورین D غشاء باکتری به دنبال موتاسیون است. موتاسیون در ژن پورین D به دنبال درمان با ایمی پنم بسیار شایع است و افزایش ۲۵ درصد مقاومت به ایمی پنم در بیماران درمان شده مشاهده می گردد(۲،۵). هم چنین با توجه به نفوذپذیری کم غشای سلولی پسودوموناس آئروژینوزا این باکتری به تعداد کمی از عوامل ضد میکروبی حساس است. بنا بر این عفونت آن به سختی درمان می شود(۳،۶). معرفی کارباپنم ها (هم چون ایمی پنم و مروپنم) به سیستم های بهداشتی و درمانی باعث یک پیشرفت بزرگ و مهم در درمان عفونت های شدید و جدی ناشی از باکتری های مقاوم به عوامل بتالاکتام گردید، البته سویه های مقاوم به کارباپنم ها به طور مکرر در کشورهای مختلف مشاهده شده اند بر پایه مطالعات مولکولی آنزیم های هیدرولیزکننده کارباپنم ها متالو بتالاکتامازها به طور موثری تمامی عوامل بتالاکتام به جز آزترونام را هیدرولیز می کنند. VIM، IMP از مهم ترین متالوبتالاکتامازها از نظر کلینیکی هستند به وسیله ژن های bla-IMP، bla-VIM کد می شوند. حداقل ۱۴ نوع vim و ۲۳ نوع imp متفاوت، تعیین هویت شده اند. از طرف دیگر متالو بتالاکتامازها به چند خانواده تقسیم می شوند که عباتند از SPM, IMP, GIM, SIM , AIM,VIM, DIM: در میان خانواده انتروباکتریاسه دو ژن bla IMP و bla VIM به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته اند که این دو ژن به روش انتقال افقی و از طریق پلاسمید به سایر باکتری ها منتقل می شوند. ژن های کدکننده متالو بتالاکتامازها بر روی اینتگرون ها(integrons) قرار دارند که در این مناطق ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی به صورت دستجات ژنی تجمع می یابند. بسیاری از سویه های سودوموناس آئروژینوزا قادرند چندین نوع از بتالاکتامازهای وسیع الطیف را تولید کنند، که آن ها را قادر می سازد علیه آنتی بیوتیک های رایج مصرفی مقاوم باشند بتالاکتامازها توسط مهارکننده های بتالاکتام مانند کلاولانیک اسید مهار می شوند(۷). هدف از مطالعه حاضر علاوه بر تعیین الگوی حساسیت داروئی سویه های پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بخش های مختلف بیمارستان، تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز و حضور ژن VIM 2،3،9،11،16و VIM all (شامل تمام ژن های VIM هم چون VIM 1, 2, 3,…) هم با روش فنوتایپی و ژنوتایپی بوده است.

مواد و روش ها

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد مورد بررسی و تائید قرار گرفت. در مطالعه حاضر

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.43]

۱۲۷ ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا از تاریخ اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۰ تا آبان ۱۳۹۱ از گروه های مختلف سنی(نمودار شماره ۱) و بخش های سوختگی، ICU، بخش داخلی و سایر بخش ها(نمودار شماره ۲) و از نمونه های مانند زخم، کشت خون، ادرار، برونش و تراشه، و سایر موارد(نمودار شماره ۳) از بیماران بستری در بیمارستان امام رضا(ع) مشهد جمع آوری گردید. در آزمایشگاه با استفاده از آزمایش های میکروب شناسی استاندارد مانند رنگ آمیزی گرم رشد روی محیط کشت مک کانکی آگار، تست های اکسیداز، کاتالاز OF, TSI, SIM, MRVP رشد در ۴۲ درجه سانتی گراد و تولید پیگمان های سبز-آبی ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا از دیگر باکتری های گرم منفی تشخیص داده شد. و جهت انجام آزمایشات بعدی این ایزوله ها در محیط کشت مایع BHI حاوی گلیسرول تلقیح و در دمای ۷۰- نگهداری گردید. آنتی بیوگرام برای مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها با روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی بائر طبق دستورالعمل موسسه استاندارد کلینیکی و آزمایشگاهی CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) بر اساس قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک ها به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم بررسی شدند(۸). جهت ۱۴ آنتی بیوتیک شامل: آموکسیکلاو، سفتریاکسون، سفازولین، سیپروفلوکساسین، سفپیم، کوتریموکسازول، جنتامایسین، سفیکسیم، مروپنم، سفتازیدیم، نالیدیکسیک اسید، ایمی پنم، نیتروفوران، سفالوکسین انجام و تعیین گردید. بدین صورت که سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک فارلند در پلیت های حاوی محیط کشت مولرهینتون آگار تلقیح شد و پس از قرار دادن دیسک هایی آنتی بیوتیکی پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید.

شناسایی فنوتیپی ایزوله های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز با روش combined-disk (CD): در این تحقیق از روش combined-disk test جهت شناسایی فنوتیپی ایزوله های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز استفاده شد. در ابتدا ۱۸/۶۱ گرم از disodium EDTA.2H2O را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده، سپس با اضافه کردن هیدروکسیدسدیم PHآن را به ۸ رسانده و اتوکلاو شد. بدین ترتیب محلول EDTA نیم مولاراستریل آماده شد. جهت انجام آزمایش، در محیط مایع برین هارت اینفیوژن(BHI) شیرابه میکروبی با کدورت معادل لوله استاندارد نیم مک فارلند تهیه گردید و پس از ۲۰ دقیقه انکوبه کردن آن، شیرابه را روی محیط مولر هینتون آگار کشت دادیم سپس یک عدد دیسک ایمی پنم و یک عدد دیسک ایمی پنم حاوی ۱۰ میکرولیتر EDTAنیم مولار با فاصله ۲ سانتی متر از یکدیگر روی سطح پلیت قرار داده شد و به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. افزایش قطر هاله عدم رشد به میزان mm ≤۷ در اطراف دیسک ایمی پنم حاوی EDTA نسبت به دیسک ایمی پنم نشان دهنده تولید متالوبتالاکتاماز توسط باکتری می باشد. لازم به ذکر است که سویه استاندارد P. auroginosa ATCC27853 از انستیتو پاستور تهران تهیه و به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تعیین ژن متالوبتالاکتاماز با روش PCR: جهت انجام آزمایشات ژنوتیپی، ابتدا DNA ایزوله های باکتریایی با روش جوشاندن ساده استخراج گردید. برای طراحی پرایمرها توالی ژنی آن ها از بانک ژنی گرفته شد و در مرحله بعد برای پرایمرهای مورد نظر با استفاده از نواحی محافظت شده ژن به وسیله نرم افزارهای Gen Runnerو DNAMAN طراحی گردید. پرایمرهای VIM all ,VIM 2- 3 -9- 11-16 با توالی نوکلئوتیدی ذکر شده در جدول شماره ۱ نشان داده شده است و آزمایش PCR جهت شناسایی ژن های مورد نظر انجام شد. در ابتدا پرایمر VIM all با توالی نوکلئوتیدی ذکر شده در جدول شماره ۱ طراحی و آزمایش PCR جهت شناسایی ژن های متالوبتالاکتامازی VIM all با ترکیب مخلوط اصلی(حجم ۲۵ میکرولیتر) به شرح ذیل انجام گردید: بافر x ۱۰ ۲/۵ µl مخلوط dNTP: ۰/۵ کلریدمنیزیم ۲۵ میلی مولار: ۱/۵ µl آنزیم Taq پلیمراز ۵ u.µl، ۰/۱۲۵ µl از هر پرایمر ۱ µL، DNA الگو: ۱ µL و بقیه آب مقطر. برنامه PCR جهت ۳۵ سیکل تکثیر به دستگاه ترموسایکلر داده شد که شامل مراحل ذیل بود: مرحله اولیه جداسازی یا باز شدن دورشته به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد و سپس ۳۵ سیکل شامل

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.43]

۵۸ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی گراد و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و مرحله طویل شدن یا ساخته شدن رشته هدف به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گردید. از ۱۲۷ نمونه که با پرایمر all مورد PCR قرار گرفته بود. تنها ۱۵ نمونه نیز مثبت شد و از این ۱۵ نمونه استفاده گردید تا پرایمر(VIM(2-3-9-11-16 با استفاده از PCR مورد بررسی قرار گیرد. پرایمر VIM 2-3-9-11-16 با توالی نوکلئوتیدی ذکر شده در جدول شماره ۱ طراحی و آزمایش PCR جهت شناسایی ژن های متالوبتالاکتام با ترکیب مخلوط اصلی(حجم ۲۵ میکرولیتر) به شرح ذیل برای پرایمر انجام گردید: بافر x ۱۰ µl ۲/۵ مخلوط dNTP: ۰/۵ کلریدمنیزیم ۲۵ میلی مولار: µl ۱/۵ آنزیم Taq پلیمراز u.µl ۵، µl ۰/۱۲۵ از هر پرایمر µL ۱، DNA الگو: µL ۱ و بقیه آب مقطر است. برنامه PCR جهت ۳۵ سیکل تکثیر در مورد پرایمر(VIM(2-3-9-11-16 به دستگاه ترموسایکلر داده شد که به قرار ذیل می باشد: مرحله اولیه جداسازی یا باز شدن دورشته به مدت ۶ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد و سپس ۳۵ سیکل شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی گراد و ۵۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و مرحله طویل شدن یا ساخته شدن رشته هدف به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد است. سپس با استفاده از الکتروفورز با ژل آگاروز ۲ درصد و بافر TBE محصولات PCR مورد شناسایی قرار گرفت.

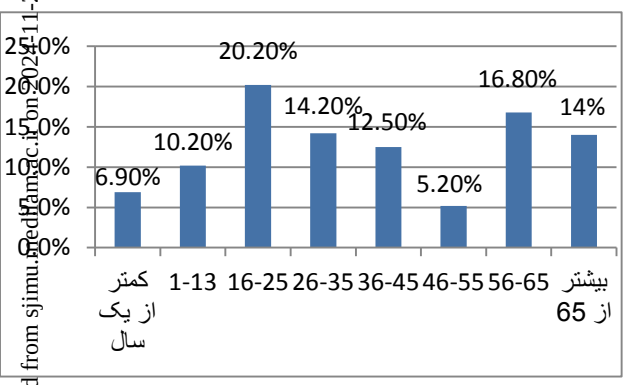
جدول شماره ۱. توالی های نوکلوتیدی بررسی شده

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	سایز قطعه
VIM2 -3-9-11-16-F	5'ATGTTCAAACTTTTGAGTAAGTTATTGG-3	(801bp)
VIM2-3-9-11-16-R	5'-CTACTCAACGACTGAGCGATTTGT-3	(801bp)
VIM-all-F	5'- GGAGATTGAR*AAGCAAATTGGACTT-3	(225bp)
VIM-all-R	5'-AGY*TCTACTGGACCGAAGCGCAC -3'	(225bp)

*.R(A or G) ,Y(C or T)

یافته های پژوهش

نتایج توزیع فراوانی نمونه ها در گروه های سنی مختلف در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است که بیشترین نمونه ها مربوط به گروه سنی ۱۶ تا ۲۵ سال(۲۰/۲۰ درصد) می باشد. در بین نمونه های جدا شده از بخش های مختلف بیشترین تعداد مربوط به بخش

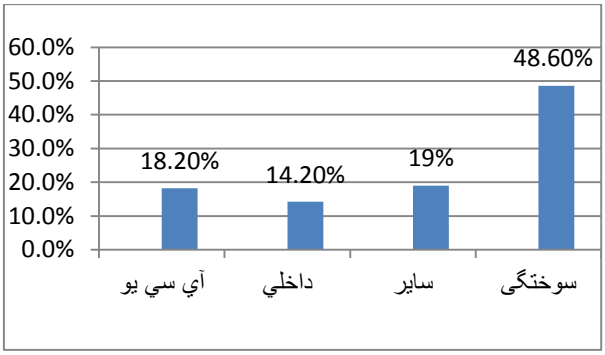


سوختگی(۴۸/۶۰ درصد) و نمونه زخم(۵۶/۷ درصد) بودند(نمودارهای شماره ۲ و ۳). فروانی نمونه ها در بین گرو های سنی، بین گروه های سنی ۲۵-۱۶ (۲۰/۲۰ درصد) و ۶۵-۵۶(۱۶/۸۰ درصد) بالاترین درصد را داشتند.

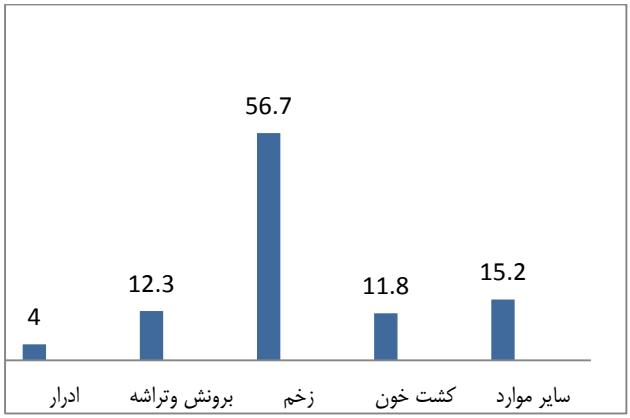
نمودار شماره ۱. توزیع فراوانی نمونه ها در گروه های سنی

[Downloaded from sjimu.medfam.ac.ir on 2024-11-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.43]

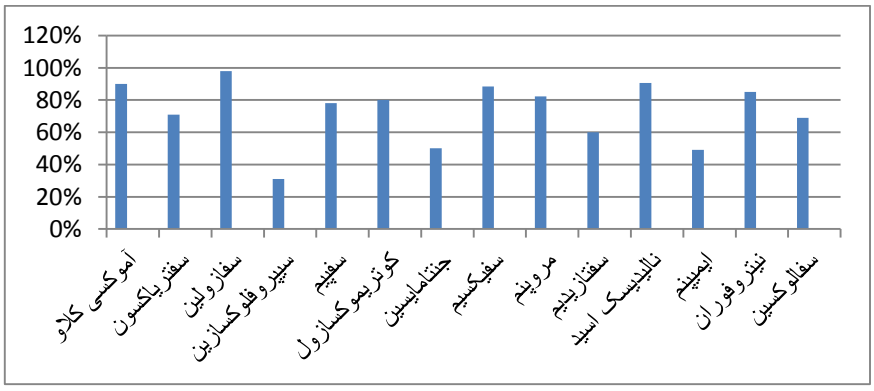


نمودار شماره ۲. توزیع فراوانی بیماران در بخش های مختلف



نمودار شماره ۳. توزیع فراوانی نمونه ها به تفکیک نوع نمونه ارسالی

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام ایزوله ها مقاومت آنتی بیوتیکی که در نمودار شماره ۴ نشان داده شده است، بیشترین مقاومت به سفازولین ۹۸ درصد و کمترین مقاومت به سیپروفلوکسازین ۳۱ درصد می باشد.



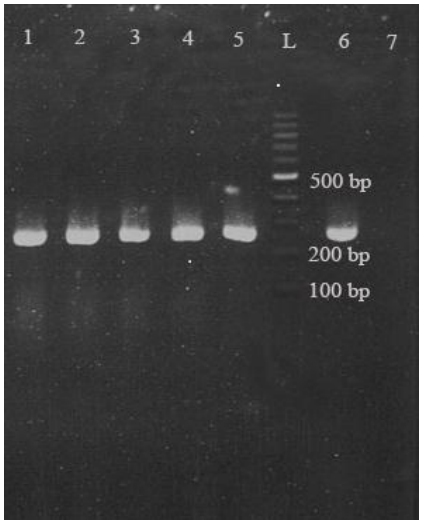
نمودار شماره ٤. آنتی بیوگرام ایزوله های مقاوم به آنتی بیوتیک های مختلف

هم چنین در بررسی فنوتیپی که با روش combined-disk (CD) از ۶۲ ایزوله(۴۹ درصد) که مقاوم به ایمی پنم بودند نیز ۳۱ ایزوله(۲۴/۵ درصد) به عنوان تولیدکننده متالوبتالاکتاماز شناسایی شدند. هم چنین به روش مولکولی در بین سویه های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز حضور ژن های VIM all در ۱۲/۵۹

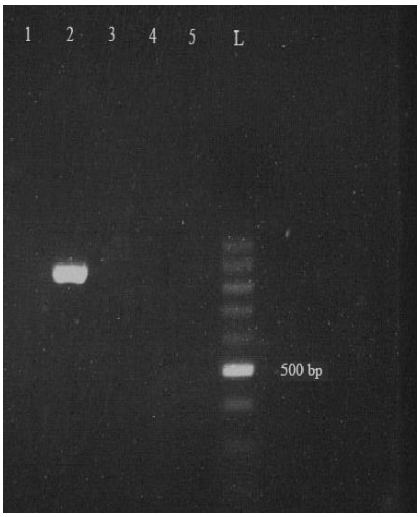
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.43]

درصد موارد به دست آمد که تصویر آن در شکل شماره ۱ نشان داده شده است و حضور ژن های VIM 2-3-9-11-16 در نمونه های مورد بررسی شناسایی نگردید که در شکل شماره ۲ نشان داده شده است.



شکل شماره ۱. ژل حاوی نمونه های PCR شده VIM all
چاهک های شماره ۱ تا ۵ نمونه های بالینی، چاهک شماره شش کنترل مثبت
چاهک شماره هفت کنترل منفی می باشد. چاهک L نیز نشانگر DNA 100bp می باشد.



شکل شماره ۲. ژل حاوی نمونه های PCR شده VIM 2-3-9-11-16
چاهک شماره ۱ کنترل منفی، چاهک شماره ۲ کنترل مثبت، چاهک شماره
۳ تا ۵ نمونه های بالینی و چاهک L نشانگر DNA100bp

بحث و نتیجه گیری

آنزیم های متالو بتالاکتاماز اوایل دهه ۱۹۹۰ میلادی در باکتری پسودوموناس آئروژینوزا شناسایی شدند. پسودوموناس آئروژینوزا عامل بسیاری از عفونت های بیمارستانی است و متالو بتالاکتامازها موثرترین آنتی بیوتیک های مورد استفاده علیه عفونت های ایجاد شده می باشند. به علت ایجاد سپتی سمی و پنومونی و هم چنین ایجاد عفونت های شدید، این با کتری جزء عوامل عفونت زا خطرناک قرار می گیرد. تشخیص به موقع آنزیم های که باعث از بین رفتن

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.43]

ساختار و اثر آنتی بیوتیک ها می گردد بسیار مفید و مهم می باشد زیرا از انتشار عفونت در جامعه جلوگیری می کند و هم چنین بررسی در رابطه با افزایش مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها باید جزء برنامه های ثابت در سراسر جهان قرار گیرد تا افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی کنترل گردد(۹،۱۰).

در مطالعه حاضر جهت غربالگری سویه های تولید کننده متالوبتالاکتاماز به صورت فنوتایپی از روش combined-disk (CD) استفاده شد. مشخص گردید که ۲۴/۵ درصد سویه های مقاوم به ایمی پنم، تولیدکننده متالو بتالاکتاماز می باشند. در مطالعه خسروی و همکاران در سال ۲۰۰۷ این میزان ۱۹/۵۱ درصد(۱۱) و در مطالعه صادری و همکاران ۶۳/۳ درصد می باشد(۱۲) در مطالعه شاهچراغی و همکاران این میزان ۷۲ درصد است(۱۳) و در کشور کره ۳۱ درصد گزارش شده است(۱۴) نتایج مطالعه حاضر با مطالعه خسروی تقریباً مشابه است ولی با مطالعات دیگر تفاوت دارد که ناشی از عوامل مختلف از جمله محیطی، مصرف غیر اصولی آنتی بیوتیک و عدم رعایت اصول کنترل عفونت در بیمارستان می باشد. نتایج به دست آمده در زمینه تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری های جدا شده از بیماران نشان می دهد که به سختی می توان آنتی بیوتیکی را بدون دغدغه مقاومت به کار برد. بررسی انجام شده حاکی از آن است که اگر چه بعضی از آنتی بیوتیک ها هنوز تاثیر نسبتاً خوبی بر سودوموناس آئروژینوزا دارند؛ ولی برخی دیگر عملاً از دایره کاربرد خارج شده و یا به زودی خارج خواهند شد. هر چند عمده ترین علت مقاومت دارویی را به وجود ژن های قابل انتقال نسبت داده اند؛ اما نباید از نظر دور داشت که فشار انتخابی ناشی از استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها به گزینش باکتری های با مقاومت چند دارویی می انجامد.

تائید نهایی با روش PCR برای وجود ژن های متالو بتالاکتاماز یک مرحله مهم می باشد، در این تحقیق هم چنین از آزمون PCR برای تائید نهایی ایزوله های تولیدکننده متالو بتالاکتاماز استفاده شد.

در مطالعه ای که در ایتالیا در سال ۲۰۰۴ انجام گرفت، از ۸۲ سویه پسودوموناس آئروژینوزا، ۴ سویه به روش فنوتایپی تولیدکننده متالو بتالاکتاماز بوده اند، که در روش PCR هم این ۴ سویه ژن VIM را در بر داشتند. این محققین معتقد بودند که سویه های تولید کننده متالو بتالاکتاماز، موارد مهمی از سویه های مقاوم به ایمی پنم در بین گونه های جدا شده از بیماران می باشد(۱۵). در مطالعه دیگری که در کره در سال ۲۰۰۵ انجام گرفت از ۱۱۶ ایزوله کلینیکی تنها ۲۱ ایزوله ژن VIM را داشتند(۱۶).

در مطالعه حاضر و مطالعات بالا تنها ژن VIM بررسی گردید به علت شیوع فراوانی و اهمیتی که این ژن در ایران و جهان دارد، به طور مثال در کشور تایوان بر روی ژن های زیر کلاس BI شامل VIM ,IMP, SPM, GIM مطالعه گسترده ای انجام گرفت. بعد از بررسی مولکولی به این نتیجه رسیدند که ژن های VIM بیشترین فراوانی را نسبت به دیگر ژن ها در باکتری پسودوموناس آآئروژینوزا دارا است(۱۷).

مطالعه مشابه نیز در ژاپن انجام گرفت که نشان داد آنزیم های که توسط ژن های VIM, IMP تولید می شوند بیشترین فراوانی را نسبت به سایر آنزیم های متالو بتالاکتاماز دارا می باشند(۱۸).

در مطالعه ای که در اهواز بر روی عفونت های حاصل از زخم های سوختگی انجام گرفت از ۱۰۰ ایزوله که به روش مولکولی بررسی گردید ۸ درصد آن ها ژن VIM را نشان دادند و در بقیه نمونه ها ژن VIM شناسایی نگردید. نتیجه این تحقیق ونتایج دیگر در مورد ژن های متالوبتالاکتاماز بر ارزش و اهمیت ژن VIM نیز نسبت به مابقی ژن های متالو بتالاکتاماز می افزاید(۱۱).

در مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج فوق و نتایجی که خسروی و همکاران به دست آورده است میزان مقاومت به ایمی پنم در تمام آن ها افزایش نشان می دهد که بیان کننده افزایش مقاومت به این آنتی بیوتیک مهم در حیطه درمان می باشد و از سوی مراکز مسئول باید مورد توجه قرار گیرد. زیرا این روند نگران کننده می باشد(۲۲-۱۹،۱۷،۱۱،۶).

در کشور پرتغال در سال ۲۰۰۸ از ۴۰ ایزوله مثبت با روش فنوتایپی تنها(۱۹ درصد) با PCR تائید شدند که همه از نوع VIM بودند(۲۳).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.43]

در سال ۲۰۱۰ در مطالعه ای که در شمال غرب ایران انجام گرفت از ۱۳۹ سویه تنها(۳۷/۵ درصد) دارای MBLs بودند و در روش مولکولی ۶ ایزوله ژن IMP و ۱۸ ایزوله ژن VIM را بیان کردند(۲۴).

در مطالعه ای که توسط Park در کره انجام گرفت از ۹۹ نمونه مورد بررسی ۳۱ ایزوله با روش های فنوتایپی مثبت بودند و از این تعداد ۲۹ ایزوله ژن VIM و دو ایزوله ژن IMP را نشان دادند(۲۵).

همان طور که مشاهده می کنید در سراسر جهان ژن VIM یک متالو بتالاکتاماز بسیار مهم در ایجاد مقاومت های آنتی بیوتیکی می باشد هم چنین در مطالعه Kim از ۱۱۶ ایزوله کلینیکی پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمی پنم نیز ۲۲ ایزوله با روش فنوتایپی متالو بتالاکتاماز مثبت بودند و با روش PCR نیز ۲۱ ایزوله ژن VIM را داشتند(۱۶).

در مطالعه حاضر از ۱۲۷ ایزوله نیز ۲۴/۵ درصد از ایزوله های مورد بررسی فنوتایپی مثبت گزارش شدند که(۱۲ درصد) آن ها VIM all را نشان دادند و هم چنین VIM 2-3-9-11-16 نیز گزارش نگردید که در نهایت با بررسی های انجام شده به این موضوع می رسیم که مقاومت به ایمی پنم در سال های اخیر نسبت به گذشته افزایش(۲۲/۲۸ درصد) را نشان می دهد و هم چنین مشخص شد سویه های مورد آزمایش به سفازولین و نالیدیسک اسید بسیار نگران کننده است. افزایش ایزوله های مقاوم به آنتی بیوتیک ها می توانند باعث انتقال ژنتیکی مقاومت به باکتری های گرم منفی دیگر گردد و این گونه شاهد افزایش خطر ساز مقاومت آنتی بیوتیکی باشیم.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی مشهد با کد ۹۱۱۳۰۸ می باشد که بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تقدیر و تشکر می شود.

References

1.Fazeli H, Bafghi MF, Faghri J, Akbari R. [Molecular study of per and VEB Genes is multidrug resistant Pseudomonas aeroginosa isolated]. J Kerman Uni Med Sci 2012;19:345-53. (Persian)

2.Mirsalehian A, Bahador A, Bigverdi R, Goli H. [Prevalence of MBL-producing Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients]. Tehran Uni Med Sci 2011;68:21-8. (Persian)

3.Akingbade O, Balogun S, Ojo D, Afolabi R, Motayo B, Okerentugba P, et al. Plasmid profile analysis of multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from wound infections in South West, Nigeria. World Appl Sci J 2012;20(6):766-75. doi: 10.5829/idosi.wasj.2012.20.06.667

4.Shakibaie MR, Adeli S, Salehi MH. Antibiotic resistance patterns and extended-spectrum β-lactamase production among Acinetobacter spp. isolated from an intensive care Unit of a hospital in Kerman Iran. Antimicrob Resis Infect Cont 2012;1:1. doi:10.1186/2047-2994-1-1

5.Yatsuyanagi J, Saito S, Harata S, Suzuki N, Ito Y, Amano KI, et al. Class 1 integron containing metallo β-lactamase gene blaVIM-2 in Pseudomonas aeruginosa clinical strains isolated in Japan. Antimicrob Age Chemother 2004;48:626-8. doi: 10.1128/AAC.48.2.626-628.2004

6.Okesola AO, Oni AA. Occurrence of extended spectrum beta lactamase Producing Pseudomonas aeruginosa strains in Southwest Nigeria. Res J Med Sci 2012;6:93-6. doi: 10.3923/rjmsci.2012.93.96

7.Tan J, Pitout JD, Guttman DS. New and sensitive assay for determining Pseudomonas aeruginosa metallo beta lactamase resistance to imipenem. J Clin Microbiol 2008;46:1870-2. doi: 10.1128/JCM.02175-07

8.Samberg ME, Orndorff PE, Monteiroriviere NA. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes surface conditions and synthesis methods. Nanotoxicol 2011;5:244-53. doi: 10.3109/17435390.2010.525669

9.Sadeghifard N, Valizadeh A, Zolfaghary MR, Maleki MH, Maleki A, Mohebi R, et al. Relationship between the presence of the nalc mutation and multidrug resistance in Pseudomonas aeruginosa. Int J Microbiol 2012;2012. doi: 10.1155/2012/575193

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.43]

10.Hoban DJ, Bouchillon SK, Hawser SP, Badal RE. Trends in the frequency of multiple drug-resistant Enterobacteriaceae and their susceptibility to ertapenem, imipenem and other antimicrobial agents data from the study for monitoring antimicrobial resistance trends 2002 to 2007. Diagn Microbiol Infect Dis 2010;66:78-86. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.06.009
11.Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo β-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn patients in Ahwaz Iran. Diagno Microbiol Infect Dis 2008;60:125-8. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.08.003
12.Owlia P, Saderi H, Karimi Z, Rad A, Bagher SM, Bahar MA. Phenotypic detection of metallo beta lactamase producing Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burned patients. Iranian J Pathol2008;3:20-5.
13.Fazeli H, Moslehi Z, Irajian G, Salehi M. Determination of drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in Pseudomonas aeruginosastrains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital Esfahan Iran 2008-9. Iran J Med Microbiol 2010;3:1-8.
14.Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-β-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005;18:306-25. doi: 10.1128/CMR.18.2.306-325.2005
15.Luzzaro F, Endimiani A, Docquier JD, Mugnaioli C, Bonsignori M, Amicosante G, et al. Prevalence and characterization of metallo-β-lactamases in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa. Diag Microbiol Infect Dis 2004;48:131-5. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2003.09.005
16.Kim IS, Lee NY, Ki CS, OH WS, Peck KR, Song JH. Increasing prevalence of imipenem resistant Pseudomonas aeruginosa and molecular typing of metallo β-lactamase producers in a Korean hospital. Microbial Drug Resis 2005;11:355-9. doi: 10.1089/mdr.2005.11.355
17.Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Chen YH. Molecular characterisation of the metallo β-lactamase genes in imipenem resistant gram negative bacteria from a University hospital in Southern Taiwan. Int J Antimicrob Age 2008;32:475-80. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.07.009
18.Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-β-lactamases and integrases carried by gram negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J Clin Microbiol 2003;41:5407-13. doi: 10.1128/JCM.41.12.5407-5413.2003
19.Salimizand H, Habibi M, Shahcheraghi F. [Metallo β-lactamases among multidrug resistant gram negative bacteria isolated from clinical specimens during 2009 in Sanandaj Kurdistan Province]. Zahedan J Res Med Sci 2012;14:48-51. (Persian)
20.Mohamed SA, Alahmady ZZ. Detection of bla VIM and bla IMP metallo β-lactamase genes by Multiplex PCR among carbapenem resistant Acinetobacter baumannii strains isolated from ventilator associated pneumonia in ICU patients. Microbiol Res Int 2015;3:1-7.
21.Sepehriseresht S, NajarPeerayeh S, Sattari M, Rezaee M. [Production of plasmid mediated ß-lactamases in Pseudomonas aeruginosa isolated from burn]. Hakim Res J 2007;10:61-5. (Persian)
22.Strateva T, Yordanov D. Pseudomonas aeruginosa–a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol 2009;58:1133-48. doi: 10.1099/jmm.0.009142-0
23.Pena A, Donato A, Alves A, Leitao R, Cardoso O. Detection of Pseudomonas aeruginosa producing metallo-β-lactamase VIM-2 in a central hospital from Portugal. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008;27:1269-71. doi: 10.1007/s10096-008-0579-2]
24.Yousefi S, Farajnia S, Nahaei MR, Akhi MT, Ghotaslou R, Soroush MH, et al. Detection of metallo β-lactamase encoding genes among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in northwest of Iran. Diagn Microbiol Infect Dis 2010;68:322-5. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.06.018
25.Oh EJ, Lee S, Park YJ, Park JJ, Park K, Kim SI, et al. Prevalence of metallo β-lactamase among Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo β-lactamase. J Microbiol Meth 2003;54:411-8. doi: 10.1016/s0167-7012(03)00090-3

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.43]

Metallo-beta-Lactamase Producing Pseudomonas aeruginosa

Naserianmoghadam R[1], Roodbari F[1], Naderinasab M[2], Mansouri D[2], Mirbagheri Z[3], Gholoobi A[4], Chichaklu A[2], Meshkat Z[2]*

(Received: December 27, 2016 Accepted: April 4, 2017)

Abstract

Introduction: Antibiotic resistance crisis has always been a serious problem for human health and many hospitalized patients are affected worldwide. Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative pathogen and one of the most common causes of nosocomial infections. The main mechanism of resistance to beta-lactam antibiotics is the presence of metallo-beta-lactamase (MBL) enzymes. Most of the MBL genes are found in plasmids. The aim of this study was to evaluate the frequency of MBL-producing P. aeruginosa isolates caused by VIM-all and VIM 2, 3, 9, 11and16 genes.

Materials & Methods: Antimicrobial susceptibility of 127 clinical isolates of P. aeruginosa was determined using the standard Kirby-Bauer disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Combined-disk test was used for phenotypic determination of MBLs-producing isolates. After DNA extraction, VIM-all and in specific, VIM 2, 3, 9, 11 and 16 genes were amplified using PCR method.

Findings: A total Of 127 clinical isolates of P. aeruginosa, 62 isolates (49%) were resistant to imipenem and 31 isolates (24.5%) showed phenotypic evidences of MBL production. Moreover, among imipenem resistant strains VIM-all genes were found in 12.5% of cases, but the VIM 2-3-9-11 and 16 genes were not detected in samples.

Discussion & Conclusions: The results obtained in this study suggest that in P. aeruginosa, the highest antibiotic resistance observed was to cefazolin (98%) followed by nalidixic acid (91%) and the least resistance were to ciprofloxacin (31%). One of the reasons for this trend is the growth of antibiotic-resistant bacteria and the known mechanisms of bacterial resistance.

Keywords: Metallo-beta-lactamase, Pseudomonas aeruginosa, Antibiotic resistance, VIM gene

1. Dept of Cell and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Mazandaran University, Mazandaran, Iran
2. Antimicrobial Resistance Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3. Dept of Microbiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Dept of Modern Sciences and Technologies, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
**Corresponding author Email: meshkatz@mums.ac.ir*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.43]