

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

راهله ناصریان مقدم<sup>۱</sup>، فاطمه رودباری<sup>۱</sup>، محبوبه نادری نسب<sup>۲</sup>، داوود منصوری<sup>۲</sup>، سیده زهره میرباقری<sup>۳</sup>، آیدا قلوبی<sup>۴</sup>، امین هوشیار چچکلو<sup>۴</sup>، زهرا مشکات<sup>۴\*</sup>

- (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 میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
(۴) گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۷

### 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. پseudomonas 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 پseudomonas آئروژینوزا مولد متالو بتالاکتاماز که توسط ژن های 16، 11، 9، 3، 2 و VIM all ایجاد می گردد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه ۱۲۷ ایزوله پseudomonas 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 16، 11، 9، 3، 2 و VIM به طور اختصاصی بررسی گردید.

**یافته های پژوهش:** از کل ۱۲۷ نمونه پseudomonas 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 ایمپنم به شکل کلی حضور ژن های VIM all در ۱۲/۵ درصد موارد به دست آمد ولی حضور ژن های 16-11-9-3-2 و VIM 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 پseudomonas 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، پseudomonas 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.

شود (۳۶). معرفی کاربایم 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 کاربایم ها به طور مکرر در کشورهای مختلف مشاهده شده اند بر پایه مطالعات مولکولی آنزیم های هیدرولیزکننده کاربایم ها متالو بتالاکتامازها به طور موثری تمامی عوامل بتالاکتام به جز آزترونام را هیدرولیز می کنند. VIM، IMP از مهم ترین متالو بتالاکتامازها 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 عبارتند از SPM، IMP، DIM، VIM، AIM، SIM، GIM 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 (integrans) 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 دارویی سویه های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بخش های مختلف بیمارستان، تولید آنزیم متالو بتالاکتاماز و حضور ژن 2، 3، 9، 11، 16 و VIM all (شامل تمام ژن های VIM هم چون VIM 1، 2، 3، ... (VIM هم با روش فنوتایپی و ژنوتایپی بوده است.

#### مواد و روش ها

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

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 سیستمیک 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 (۲، ۱). 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 سودوموناس 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 متالو بتالاکتاماز 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 سودوموناس 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 سودوموناس آئروژینوزا این باکتری به تعداد کمی از عوامل ضد میکروبی حساس است. بنا بر این عفونت آن به سختی درمان می

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، ایمپنم، نیتروفوران، سفالوکسین انجام و تعیین گردید. بدین صورت که سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک فارلند در پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون 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 هیدروکسید سدیم

PH آن را به ۸ رسانده و اتوکلاو شد. بدین ترتیب محلول EDTA نیم مولار استریل 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 ایمپنم و یک عدد دیسک ایمپنم حاوی ۱۰ میکرولیتر EDTA نیم 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  $\leq 7$  mm در اطراف دیسک ایمپنم حاوی EDTA نسبت به دیسک ایمپنم 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 Runner* و *DNAMAN* طراحی گردید. پرایمرهای 16-11-9-3-2-VIM all, VIM 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  $10 \times 10^{-5}$   $\mu\text{L}$  dNTP: ۰/۵ کلریدمنیزیم ۲۵ میلی مولار:  $1/5 \mu\text{L}$  آنزیم *Taq* پلیمراس ۵  $\mu\text{L}$  و  $1/25 \mu\text{L}$  از هر پرایمر  $1 \mu\text{L}$ ، DNA الگو:  $1 \mu\text{L}$  و بقیه آب مقطر. برنامه *PCR* جهت ۳۵ سیکل تکثیر به دستگاه ترموسایکلر داده شد که شامل مراحل ذیل بود: مرحله اوایه جداسازی یا باز شدن دورشته به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد و سپس ۳۵ سیکل شامل

Taq پلیمرز ۵ u.μl، ۰/۱۲۵ μl از هر پرایمر ۱ μL، DNA الگو: ۱ μL و بقیه آب مقطر است. برنامه PCR جهت ۳۵ سیکل تکثیر در مورد پرایمر (2-3-9-11-16) VIM 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 طولیل 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.

۵۸ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی گراد و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و مرحله طولیل 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 (2-3-9-11-16) VIM با استفاده از PCR مورد بررسی قرار گیرد. پرایمر 2-3-9-11-16 VIM 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 ۲/۵ μl مخلوط dNTP: ۰/۵ کلریدمنیزیم ۲۵ میلی مولار: ۱/۵ آنزیم

جدول شماره ۱. توالی های نوکلئوتیدی بررسی شده

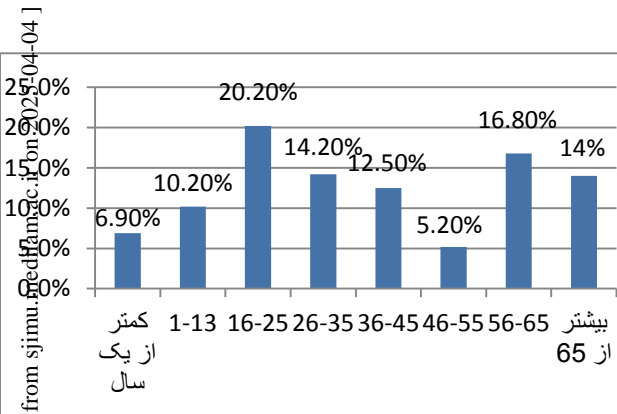
سایز قطعه	توالی نوکلئوتیدی	پرایمر
(801bp)	5'ATGTTCAAACCTTTTGTAGTAAGTTATTGG-3	VIM2 -3-9-11-16-F
(801bp)	5'-CTACTCAACGACTGAGCGATTGT-3	VIM2-3-9-11-16-R
(225bp)	5'- GGAGATTGAR <sup>*</sup> AAGCAAATTGGACTT-3	VIM-all-F
(225bp)	5'-AGY <sup>*</sup> TCTACTGGACCGAAGCGCAC -3'	VIM-all-R

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

## یافته های پژوهش

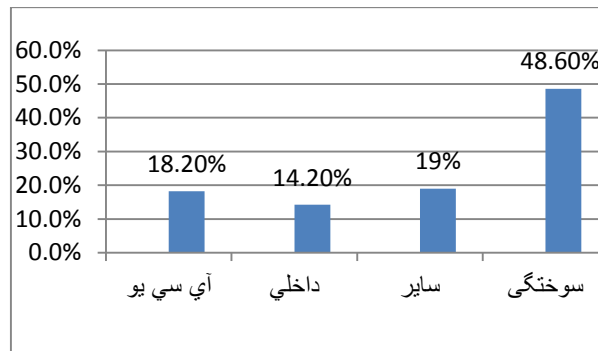
### بخش

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

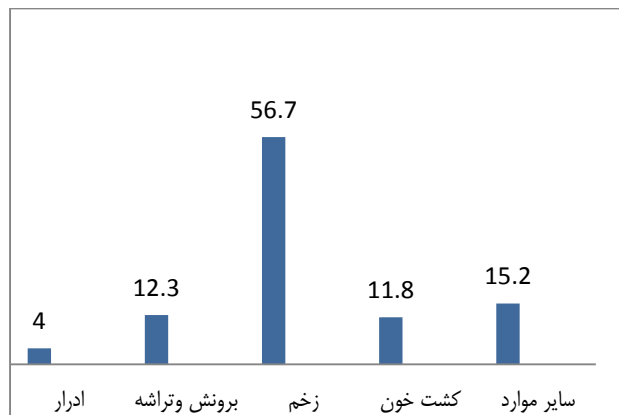


سوختگی (۴۸/۶۰ درصد) و نمونه زخم (۵۶/۷ درصد) بودند (نمودارهای شماره ۲ و ۳). فراوانی نمونه ها در بین گروه های سنی، بین گروه های سنی ۱۶-۲۵ (۲۰/۲۰ درصد) و ۵۶-۶۵ (۱۶/۸۰ درصد) بالاترین درصد را داشتند.

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



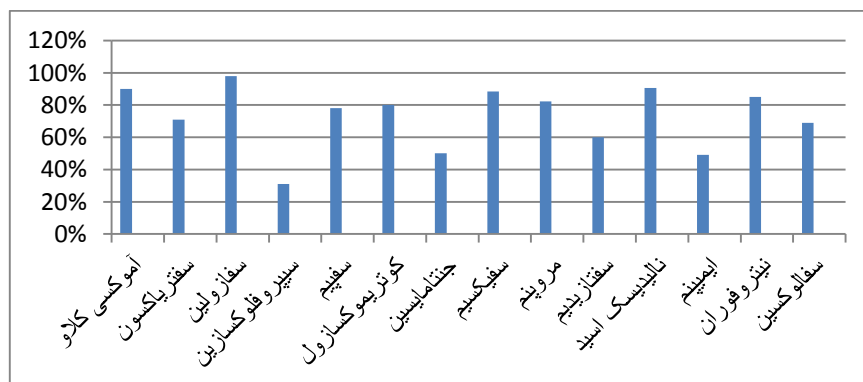
نمودار شماره ۲. توزیع فراوانی بیماران در بخش های مختلف



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

سفازولین ۹۸ درصد و کمترین مقاومت به سیپروفلوکسازین ۳۱ درصد می باشد.

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام ایزوله ها مقاومت آنتی بیوتیکی که در نمودار شماره ۴ نشان داده شده است، بیشترین مقاومت به



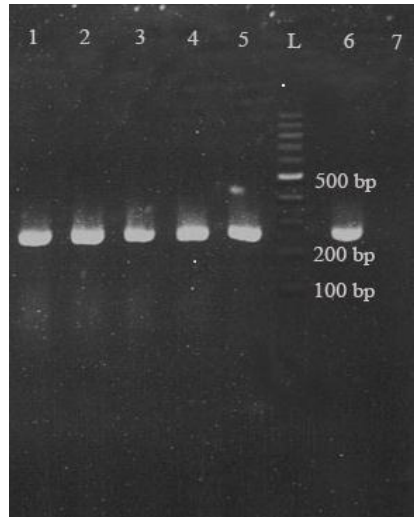
نمودار شماره ۴. آنتی بیوگرام ایزوله های مقاوم به آنتی بیوتیک های مختلف

عنوان تولیدکننده متالوتالاتاماز شناسایی شدند. هم چنین به روش مولکولی در بین سویه های تولیدکننده متالوتالاتاماز حضور ژن های VIM all در ۱۲/۵۹

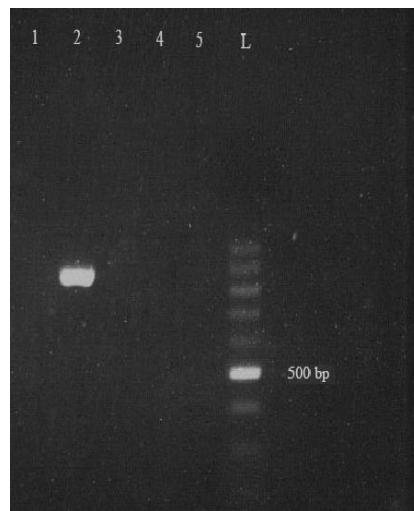
هم چنین در بررسی فنوتیپی که با روش combined-disk (CD) از ۶۲ ایزوله (۴۹ درصد) که مقاوم به امی پنم بودند نیز ۳۱ ایزوله (۲۴/۵ درصد) به

نمونه های مورد بررسی شناسایی نگردید که در شکل شماره ۲ نشان داده شده است.

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



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 DNA 100bp

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 باکتری جزء عوامل عفونت زا خطرناک قرار می گیرد. تشخیص به موقع آنزیم های که باعث از بین رفتن

### بحث و نتیجه گیری

آنزیم های متالو بتالاکتاماز اوایل دهه ۱۹۹۰ میلادی در باکتری پseudomonas آئروژینوزا شناسایی شدند. پseudomonas آئروژینوزا عامل بسیاری از عفونت های بیمارستانی است و متالو بتالاکتامازها موثرترین

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 متالوبتالاکتاماز 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 متالوبتالاکتاماز یک مرحله مهم می باشد، در این تحقیق هم چنین از آزمون PCR برای تائید نهایی ایزوله های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز استفاده شد.

در مطالعه ای که در ایتالیا در سال ۲۰۰۴ انجام گرفت، از ۸۲ سویه سودوموناس آئروژینوزا، ۴ سویه به

روش فنوتایپی تولیدکننده متالوبتالاکتاماز 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 متالوبتالاکتاماز، 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 IMP, VIM, 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 سودوموناس آئروژینوزا دارا است (۱۷).

مطالعه مشابه نیز در ژاپن انجام گرفت که نشان داد آنزیم های که توسط ژن های IMP, VIM تولید می شوند بیشترین فراوانی را نسبت به سایر آنزیم های متالوبتالاکتاماز 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 و نتایج دیگر در مورد ژن های متالوبتالاکتاماز بر ارزش و اهمیت ژن VIM نیز نسبت به مابقی ژن های متالوبتالاکتاماز می افزایش (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).

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 in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* 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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamase gene blaVIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa*

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 *Pseudomonas aeruginosa* 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

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, Monteoriviere 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



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  $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz Iran. *Diagn 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 Pathol* 2008;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 aeruginosa* strains 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- $\beta$ -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- $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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- $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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- $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo  $\beta$ -lactamase. *J Microbiol Meth* 2003;54:411-8. doi: 10.1016/s0167-7012(03)00090-3

### The Frequency of VIM 2, 3, 9, 11 and VIM among

## Metallo-beta-Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa*

Naserianmoghadam R<sup>1</sup>, Roodbari F<sup>1</sup>, Naderinasab M<sup>2</sup>, Mansouri D<sup>2</sup>,  
Mirbagheri Z<sup>3</sup>, Gholoobi A<sup>4</sup>, Chichaklu A<sup>2</sup>, Meshkat Z<sup>2\*</sup>

(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, 11 and 16 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