مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۴، شماره ۱، فروردین ۱۳۹۵
صفحه: ۸۲-۷۴

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 24, No.1, Apr 2016
Pages: 74-82

ردیابی ژن متالوبتالاکتاماز bla_{VIM-1} در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروجینوزا در مشهد

محبوبه نخعی مقدم*[۱]، مریم حسینی حسن‌آبادی [۲]

چکیده

مقدمه: کارباپنم‌ها یکی از آخرین داروهای درمانی برای عفونت‌های تهدیدکننده سودوموناس آئروجینوزا هستند. مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها گاهی ناشی از کارباپنمازهای دسته B مثل متالوبتالاکتاماز رده VIM است که در جوامع رو به افزایش است. هدف اجرای پژوهش حاضر شناسایی ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروجینوزای حامل ژن bla_{VIM-1} در مشهد بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی مقطعی، ۷۰ ایزوله سودوموناس آئروجینوزا از نمونه‌های بیماران بستری در بیمارستان‌های مشهد جمع‌آوری شدند. باکتری‌ها با روش‌های بیوشیمیایی معمول شناسایی شدند. آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی مطابق با روش کربای بایر انجام شد و ایزوله‌های مولد متالوبتالاکتاماز با روش دیسک ترکیبی ایمی پنم و EDTA شناسایی شدند. سپس واکنش زنجیره پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ردیابی ژن bla_{VIM-1} انجام شد.

نتایج: ۲۵ باکتری(۳۵/۷٪) از ۷۰ باکتری جدا شده دارای متالوبتالاکتاماز بودند که در ژنوم ۸ باکتری ژن bla_{VIM-1} ردیابی شد. ۶۵/۶٪ باکتری‌های مقاوم به ایمی‌پنم، متالوبتالاکتاماز تولید می‌کردند. درصد بیشتری از ایزوله‌های مولد متالوبتالاکتاماز نسبت به ایمی‌پنم، مروپنم، کاربنی‌سیلین و سفوتاکسیم مقاوم بودند($p < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق نشان داد که مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در میان ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروجینوزا در ناحیه مورد بررسی بالا بود و متالوبتالاکتاماز تیپ VIM در برخی از آنها ردیابی شد. شناسایی باکتری‌های دارای متالوبتالاکتاماز در پیشگیری و درمان عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک اهمیت بسزایی دارد.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس آئروجینوزا، متالوبتالاکتاماز، ژن bla_{VIM-1}، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

۱- دانشیار میکروب شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران
۲- کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران
* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۵۱۳۸۴۳۵۰۵۰ ، پست الکترونیکی: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۲۶

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سودوموناس آئروجینوزا یک پاتوژن فرصت طلب است که به طور طبیعی در خاک و سطوح موجود در محیط‌های آبی ساکن می‌شود(۱) و یک پاتوژن تهدیدکننده در محیط بیمارستان به حساب می‌آید. این باکتری می‌تواند از فلور بومی بیماران یا از محل‌های مرطوب مثل وسایل پزشکی شسته شده با آب آلوده منشأ بگیرد(۲). سازش‌پذیری و مقاومت ذاتی نسبت به آنتی‌بیوتیک آن را قادر می‌سازد که در دامنه وسیعی از محیط‌های طبیعی و ساختگی حفظ شود. اغلب عفونت بیمارستانی به ویژه در افراد با ضعف سیستم ایمنی ایجاد می‌نماید که درمان عفونت‌ها به‌خاطر گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک محدود می‌شود(۱).

سودوموناس آئروجینوزا از راه‌هایی مثل بتالاکتاماز طیف وسیع، متالوبتالاکتامازها(MBLs)، تغییر در پروتئین‌های اتصالی پنی‌سیلین‌ها، جهش‌های پورین، تغییرات آنزیمی پلاسمیدی، جهش DNA ژیراز و پمپ‌های خروج فعال باعث ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم(ایمی‌پنم و کارباپنم) آنتی‌بیوتیک‌های طیف وسیع هستند که برای درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از سودوموناس آئروجینوزا استفاده می‌شوند. مقاومت اختصاصی به کارباپنم‌ها به فقدان نفوذپذیری پورین، افزایش در بیان پمپ‌های خروج فعال و تولید متالوبتالاکتامازها نسبت داده می‌شود(۳). از آنجایی‌که باکتری‌های مولد بتالاکتامازهای طیف وسیع(ESBL) اغلب مقاوم به چند دارو هستند، کارباپنم‌ها یکی از آخرین انتخاب‌های درمانی برای عفونت‌های تهدیدکننده زندگی در رابطه با این باکتری‌ها هستند. هر چند، چندین مکانیسم مقاومت کارباپنمی گزارش شده‌اند، این مکانیسم‌ها با گسترش کارباپنمازهای دسته A آمبلر(KPCs) و دسته B (VIM, IMP, NDM-1) و رده D (OXA-48) مرتبط هستند. گزارش تولید بتالاکتامازهای طیف وسیع و کارباپنمازها توسط باکتری‌های گرم منفی رو به افزایش است و با توجه به کمبود داروهای ضدمیکروبی جدید یک مشکل سلامت عمومی نوظهور می‌باشد(۴).

به نظر می‌رسد که متالوبتالاکتامازها به سرعت در حال گسترش هستند. در بعضی کشورها باکتری‌های سودوموناس آئروجینوزای دارای MBL حدود ۲۰٪ ایزوله‌های بیمارستانی را شامل می‌شوند، در حالی‌که در کشورهای دیگر این مقدار هنوز پایین است(۵). تمامی MBL ها ایمی‌پنم را هیدرولیز می‌کنند، اما توانایی آنها برای این منظور به مقدار قابل توجهی متفاوت است(۶). این آنزیم‌ها برای هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام نیاز به یون روی دارند و به خاطر وابستگی به یون روی، همگی با EDTA و همینطور سایر عوامل کیلیت‌کننده کاتیون‌های دو ظرفیتی مهار می‌شوند و این یکی از ویژگی‌های انحصاری متالوبتالاکتامازهاست(۵،۶).

باکتری‌های مولد MBL می‌توانند انواع زیادی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شامل پنی‌سیلین، سفالوسپورین، کارباپنم، سفامایسین را هیدرولیز کنند، اما قادر به هیدرولیز آزترونام نیستند. به‌علاوه فعالیت متابولیکی آنها با مهارکننده‌های بتالاکتاماز مثل کلاوونات، تازوباکتام و سالباکتام خنثی نمی‌شود. MBLهایی که گسترش جغرافیایی بیشتری دارند شامل ایمی پنماز(IMP)، متالوبتالاکتاماز کدشده اینتگرونی ورونا (VIM: Verona imipenemase) و NDM هستند. MBLها در سودوموناس آئروجینوزا و آسینتوباکتر و بتازگی در اعضای انتروباکتریاسه شایع هستند(۶). اطلاع از وجود ژن‌های مولد این آنزیم‌ها در عوامل بیماری‌زایی شایع و نیز میزان شیوع آنها در جوامع، ما را در پیشگیری و درمان عفونت‌های ناشی از آنها و توسعه تکاملی آنها کمک می‌نماید. از آن‌جایی‌که سودوموناس آئروجینوزا یکی از عوامل عفونی شایعی است که از نمونه‌های کلینیکی در بیمارستان‌های مشهد جدا می‌شود(۷) و اطلاع کافی از ژن‌های مولد متالوبتالاکتاماز در این باکتری در بیمارستان‌های مشهد وجود ندارد، هدف از اجرای این پژوهش ردیابی ژن متالوبتالاکتاماز نوع bla_{VIM-1} در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروجینوزا در مشهد بود.

روش بررسی

جمع‌آوری و ذخیره‌سازی باکتری‌ها

در این مطالعه توصیفی مقطعی، باکتری‌ها از نمونه‌های مختلف(خون، ادرار، گوش، تراشه، زخم و مایع صفاقی) بیماران

Archive of SID
www.SID.ir

بستری در بیمارستان‌های امام رضا و قائم مشهد در سال ۱۳۹۳ که به آزمایشگاه بیمارستان ارسال شده بودند، جمع‌آوری شدند. بعد از تحویل باکتری‌های سودوموناس آئروجینوزا از آزمایشگاه‌های بیمارستان‌ها، باکتری‌ها در آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در محیط ائوزین متیلن بلو(EMB) آگار(شرکت Pronadisa- اسپانیا) با روش ایزوله کشت شدند تا برای اطمینان دوباره مورد شناسایی قرار گیرند. برای شناسایی باکتری‌ها از آزمایش‌های بیوشیمیایی افتراقی مرسوم شامل آزمایش اکسیداز، کاتالاز، اندول، حرکت، رشد در ۴۲°C، رشد در محیط ستریماید آگار(Merck- آلمان) و TSI آگار (Merck- آلمان) استفاده شد(۸). باکتری‌های شناسایی شده، در محیط EMB آگار با روش ایزوله کشت داده شدند و از کلنی‌های تک برای نگهداری در محیط کرایو استفاده شد.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها

برای این منظور از روش انتشار در آگار مطابق با استانداردهای CLSI استفاده شد(۹). سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل لوله نیم مک فارلند تهیه و در سطح محیط مولرهینتون آگار با روش یکنواخت کشت شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (ایمی‌پنم، مروپنم، سفوتاکسیم، کاربنی‌سیلین و سفپودوکسیم) با غلظت استاندارد تهیه شده از شرکت MAST انگلستان در سطح محیط با فواصل استاندارد قرار داده شد. پلیت‌ها مدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت در انکوباتور ۳۷°C در شرایط هوازی گذاشته شدند. بعد از دوره رشد، قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه گرفته شد و حساسیت یا مقاومت بر اساس جدول استاندارد CLSI(Clinical Laboratory Standard Institute) گزارش گردید. از اشریشیا کلی سویه ATTC ۲۵۹۲۲ (American Type Culture Collection)، تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران، به‌عنوان سویه استاندارد استفاده شد.

شناسایی فنوتیپی باکتری‌های مولد متالوبتالاکتاماز

برای شناسایی باکتری‌های مولد متالوبتالاکتاماز از دو دیسک ایمی‌پنم(شرکت MAST انگلستان) استفاده شد که به دیسک دوم ۱۰ میکرولیتر EDTA(مرک- آلمان) ۰/۵ مولار اضافه گردید. به این ترتیب که سوسپانسیون باکتریایی با غلظت نیم مک فارلند با روش کشت یکنواخت در سطح محیط مولرهینتون آگار کشت شد. سپس دیسک‌های فوق با فاصله ۳ سانتی‌متر بر روی محیط قرار داده شدند. پلیت‌ها مدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت در انکوباتور ۳۷°C در شرایط هوازی گذاشته شدند. بعد از دوره گرماگذاری قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر اندازه گیری شد. اگر قطر هاله عدم رشد دیسک ترکیبی ۷ میلی‌متر یا بیشتر، از قطر حاوی ایمی‌پنم بزرگ‌تر بود، باکتری به‌عنوان مولد MBL شناسایی شد(۱۰).

ردیابی ایزوله‌های حامل ژن bla_{VIM-1}

ابتدا DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت شرکت سیناژن(ایران) استخراج شد. برای ردیابی ژن bla_{VIM-1} از پرایمر اختصاصی VIM-1 (VIM-F: 5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG-3') و (VIM-R: 5'-ATGAAAGTGCGTGGAGAC-3') برای تکثیر قطعه‌ای با طول ۲۶۱ جفت باز(bp)، استفاده شد(۷). توالی ژن از پایگاه اینترنتی NCBI گرفته شد و با توالی پرایمر مطابقت داده شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار BLAST اختصاصیت پرایمرها برای توالی مورد نظر بررسی شد. مراحل انجام PCR پس از بهینه شدن شرایط در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: شرایط انجام PCR پس از بهینه شدن برای تکثیر ژن bla_{VIM-1}

مراحل	درجه حرارت (°C)	زمان	تعداد چرخه
شروع	۹۴	۴ دقیقه	۱
واسرشت	۹۴	۱ دقیقه	
اتصال	۵۵	۱ دقیقه	۳۰
طویل شدن	۷۲	۱ دقیقه	
طویل شدن نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

Archive of SID
www.SID.ir

مخلوط واکنش با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ µl از DNA پلاسمیدی(۸۰-۵۰ نانوگرم)، ۲/۵ µl بافر(۱۰X) PCR ، ۱ µl از هر کدام از پرایمرها با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ µl مخلوط dNTP با غلظت ۱۰ پیکومول، ۰/۷۵ µl $MgCl_2$ با غلظت ۵۰mM و ۰/۲۵ µl آنزیم Taq DNA پلیمراز(۵ u/µl) بود.

برای اطمینان از تکثیر DNA باکتریایی، محصولات PCR در کنار نشانگر ۱۰۰ bp (Fermentas- Lativa) و نمونه کنترل مثبت که از انستیتو پاستور تهران گرفته شده بود، بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند.

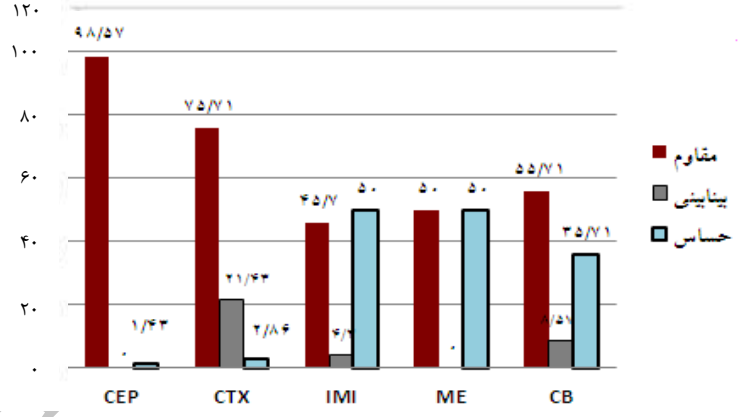
محاسبات آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها بر اساس میانگین قطر هاله عدم رشد پس از سه بار تکرار و به‌صورت درصد مشخص گردید. برای مقایسه مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک بین دو گروه باکتری‌های مولد MBL و فاقد MBL از آزمون کای اسکویر(Chi square) استفاده شد و p-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در مجموع ۷۰ ایزوله سودوموناس آئروجینوزا از نمونه‌های بیماران بستری جدا شد که باکتری‌ها با روش‌های بیوشیمیایی افتراقی مرسوم شناسایی شدند. باکتری‌ها همگی غیرتخمیری، متحرک، اندول منفی، کاتالاز و اکسیداز مثبت بودند و در محیط ستریماید آگار و در ۴۲°C رشد داشتند.

با انجام آزمایش فنوتیپی تعیین متالوبتالاکتاماز مشخص گردید که ۳۵/۷٪ (۲۵ از ۷۰) از باکتری‌های جدا شده دارای متالوبتالاکتاماز بودند. حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها در نمودار ۱ و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های دارای MBL و ایزوله‌های فاقد MBL در جدول ۲ مقایسه شده است که میزان مقاومت ایزوله‌های مولد MBL بیشتر از ایزوله‌های فاقد MBL بود. مقاومت نسبت به ایمی‌پنم، مروپنم، سفوتاکسیم و کاربنی‌سیلین به‌طور معنی‌داری در میان ایزوله‌های دارای متالوبتالاکتاماز بیشتر از ایزوله‌های فاقد متالوبتالاکتاماز بود($p \leq ۰/۰۵$).



نمودار ۱: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های سودوموناس آئروجینوزای جدا شده در این تحقیق (CEP؛ سفپودوکسیم، CTX؛ سفوتاکسیم، IMI؛ ایمی پنم، ME؛ مروپنم، CB؛ کاربنی سیلین)

جدول ۲: حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروجینوزا در دو گروه دارای متالوبتالاکتاماز و فاقد متالوبتالاکتاماز

آنتی بیوتیک	MBL^+ (%)			MBL^- (%)		
	مقاوم	بینابینی	حساس	مقاوم	بینابینی	حساس
مروپنم*	۱۹ (۷۶)	۰	۶ (۲۴)	۱۶ (۳۵/۶)	۰	۲۹ (۶۴/۴)
ایمی پنم*	۲۱ (۸۴)	۱ (۴)	۳ (۱۲)	۱۱ (۲۴/۴)	۲ (۴/۴)	۳۲ (۷۱/۱)
سفپودوکسیم	۲۵ (۱۰۰)	۰	۰	۴۴ (۹۷/۷۷)	۰	۱ (۲/۲۲)
سفوتاکسیم*	۲۳ (۹۲)	۱ (۴)	۱ (۴)	۳۰ (۶۶/۶۶)	۱۴ (۳۱/۱۱)	۱ (۲/۲۲)
کاربنی سیلین*	۱۹ (۷۶)	۲ (۸)	۴ (۱۶)	۲۰ (۴۴/۴)	۴ (۸/۹)	۲۱ (۴۶/۷)

*مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک بین ایزوله های مولد متالوبتالاکتاماز و فاقد آن اختلاف معنی‌دار داشت.

www.SID.ir

از ۷۰ باکتری جدا شده، ۳۲ ایزوله(۴۵/۷٪) مقاوم به ایمی‌پنم بودند که از بین باکتری‌های مقاوم به ایمی‌پنم، ۲۱ باکتری(۶۵/۶٪) مولد متالوبتالاکتاماز بودند. در این تحقیق در میان باکتری‌های مولد MBL با آزمایش فنوتیپی، یک ایزوله نسبت به ایمی‌پنم بینابینی و نسبت به مروپنم مقاوم بود و یک ایزوله نیز حساس به ایمی‌پنم و مقاوم به مروپنم بود. برای دو ایزوله نیز در تست فنوتیپی MBL، قطر هاله ایمی‌پنم(۲۱ میلی‌متر) کمتر از قطر هاله عدم رشد برای دیسک ترکیبی(ایمی‌پنم و EDTA) (۲۹ و ۳۴ میلی‌متر) بود و در نتیجه طبق پیش‌فرض(مطابق با رفرنس) مولد MBL در نظرگرفته شدند. توانایی MBLها برای هیدرولیز ایمی‌پنم به مقدار قابل توجهی فرق می‌کند. در میان ۷۰ باکتری جدا شده، ۳۵ ایزوله(۵۰٪) مقاوم به مروپنم بودند که از بین باکتری‌های مقاوم به مروپنم، ۲۱ ایزوله(۶۰٪) مولد متالوبتالاکتاماز بودند. ۲۷ ایزوله سودوموناس آئروجینوزا نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش مقاوم بودند که بین آنها ۱۸ باکتری دارای متالوبتالاکتاماز بودند. بدین ترتیب درصد بیشتری از باکتری‌های دارای متالوبتالاکتاماز مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی داشتند(۷۲٪ در مقابل ۲۰٪).

۸۴٪ درصد باکتری‌های مولد MBL مقاوم به ایمی‌پنم و مروپنم بودند. از ۲۵ ایزوله سودوموناس آئروجینوزای مولد MBL (با روش فنوتیپی) ۸ باکتری(۳۲٪) ژن bla_{VIM-1} در آنها ردیابی شد(شکل ۱).

شکل ۱: ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن bla_{VIM-1} بر روی آگاروز ۱/۵٪ در کنار نشانگر استاندارد ۱۰۰ جفت بازی، M: نشانگر مولکولی، Neg: کنترل منفی و Pos: کنترل مثبت، بقیه نمونه ها هستند.

بحث

تولید متالوبتالاکتاماز یکی از مکانیسم‌های مهم در مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم است(۱۱). جداسازی باسیل‌های گرم منفی مولد MBL به‌ویژه سودوموناس آئروجینوزا یک مشکل رو به رشد در محیط‌های بیمارستانی است(۱۲). استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و درمان عفونت‌های باکتریایی موجب انتخاب سویه‌های مقاوم شده است و از آنجاکه ژن‌های آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز اغلب روی اینتگرون کلاس ۱ واقع شده‌اند، متاسفانه خطر انتقال ژن‌های مقاومت از سویه‌های مزبور به باکتری‌های حساس رو به افزایش است(۱۳).

باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باعث مرگ و میر بالایی در جوامع می‌شوند. اطلاع از وجود ژن‌های مولد متالوبتالاکتاماز در باکتری‌های شایع از نظر بیماری‌زایی و نیز میزان شیوع آنها در جوامع ما را در پیشگیری و درمان عفونت‌های ناشی از آنها کمک می‌نماید. در این تحقیق از ۷۰ ایزوله سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از بیماران بستری، در ۲۵ باکتری(۳۵/۷٪) وجود متالوبتالاکتاماز با روش فنوتیپی شناسایی شد و از بین آنها ۸ ایزوله حامل ژن bla_{VIM-1} بودند. از ۷۰ ایزوله، ۴۵/۷٪ باکتری‌ها مقاوم به ایمی‌پنم و ۵۰٪ مقاوم به مروپنم بودند.

در یک گزارش در سال ۱۳۹۳ بر روی ۸۲ ایزوله بالینی سودوموناس آئروجینوزا از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های شهرهای تهران و قزوین، بیشترین مقاومت

www.SID.ir
Archive of SID

آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های سودوموناس آئروجینوزا به‌ترتیب نسبت به دیسک‌های سفپودوکسیم(۹۸/۸٪) و سفوتاکسیم(۹۷/۶٪) بود و ۴۳ (۵۲/۴٪) ایزوله سودوموناس آئروجینوزا دارای الگوی مقاومت دارویی چندگانه بودند(۱۴). در این تحقیق نیز مشابه با تحقیق حاضر، بیشترین میزان مقاومت نسبت به سفپودوکسیم(۹۸/۵۷٪) و سفوتاکسیم(۷۵/۷۱٪) بود و ۲۷ ایزوله(۳۸/۶٪) نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه مقاوم بودند(۱۴). از ۱۰۰ باکتری سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از بیماران سوختگی در کردستان، ۲۲٪ آنها مولد متالوبتالاکتاماز بودند که در مقایسه با تحقیق حاضر درصد کمتری مولد متالوبتالاکتاماز بودند(۱۵). در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۱۵ از عفونت‌های بیمارستانی اصفهان منتشر شده است، از ۱۰۶ باکتری سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از نمونه‌های مختلف، ۶۲ ایزوله(۵۸/۵٪) مقاوم به ایمی‌پنم بود و حضور MBL در۴۲٪ ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم با روش دیسک ترکیبی تائید شد. با روش PCR ژن bla_{VIM-1} در هیچ‌یک از ایزوله‌ها ردیابی نشد(۱۶). در تحقیق حاضر درصد ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم کمتر(۴۵/۷٪) از گزارش فوق بود، اما درصد بیشتری(۶۵/۶٪) از این ایزوله‌ها دارای MBL بودند و ژن bla_{VIM-1} در میان آنها ردیابی شد. اختلاف می‌تواند مربوط به انتشار ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در منطقه یا بیمارستان خاص و یا اختلاف در روش‌های آزمایش باشد.

از ۱۳۱ سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان امام رضای مشهد، ۴۹/۶٪ مولد متالوبتالاکتاماز و ۶۳ باکتری مقاوم به ایمی‌پنم بودند که با روش فنوتیپی مشخص شد ۵۶ ایزوله(۸۸/۸٪) از آنها دارای MBL هستند. از میان باکتری‌های مقاوم به ایمی‌پنم، ۵۸/۷٪ دارای متالوبتالاکتاماز VIM-1 بودند(۷). نتایج این مطالعه نیز مشابه با تحقیق حاضر وجود شیوع به نسبت بالای ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم و ایزوله‌های دارای متالوبتالاکتاماز را در بیمارستان‌های مشهد نشان می‌دهد. البته در این تحقیق شیوع باکتری‌های مولد متالوبتالاکتاماز VIM-1 بیشتر از تحقیق حاضر بوده است که احتمال دارد به شیوع سویه‌های مقاوم در مقطع زمانی خاص در بیمارستان یا منطقه‌ای خاص مرتبط باشد. در تحقیقی از بیماران یک بیمارستان سوختگی در تهران در سال ۱۳۸۸، از ۲۵۵ باکتری سودوموناس آئروجینوزای مقاوم به ایمی‌پنم، ژن bla_{VIM} در ۵ ایزوله ردیابی شد. محققین معتقدند که شیوع MBL در میان ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم پایین است و در مقاومت به این آنتی‌بیوتیک، مکانیسم‌های دیگری می‌تواند مؤثر باشد(۱۱). اختلاف در تعداد و درصد باکتری‌های مولد MBL و همچنین شیوع ژن bla_{VIM-1} در ایزوله‌های سودوموناس آئروجینوزای مناطق مختلف می‌تواند به ناحیه جغرافیایی، روش شناسایی، شیوع عفونت خاص در یک منطقه یا عفونت بیمارستانی در یک بیمارستان و یا عوامل مشابه دیگر مربوط باشد.

در مطالعه‌ای که در سال‌های ۲۰۰۷ و ۲۰۰۸ میلادی بر روی ۲۸۳ ایزوله بالینی سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از بیمارستانی در کشمیر هند، ۳۸ باکتری(۱۳/۴۲٪) مقاوم به ایمی‌پنم بودند. با آزمایش فنوتیپی(دیسک ترکیبی) مشخص شد ۳۳ باکتری(۱۱/۶۶٪) از ایزوله‌ها مولد MBL هستند(۱۷). از ۱۹۵ باکتری سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از نمونه‌های بیماران بستری در ترکیه در سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۲، با استفاده از روش فنوتیپی مشخص شد که ۵۲ باکتری(۲۶/۷٪) مولد MBL هستند(۱۸) که کمتر از شیوع MBL در تحقیق حاضر بود. مطالعات مولکولی نشان داد که ۴ ایزوله متالوبتالاکتاماز نوع VIM-2 را داشتند(۱۸). در یک تحقیق در بیمارستانی در اسپانیا، در بین پنج ایزوله سودوموناس آئروجینوزا با آزمایش غربالگری متالوبتالاکتاماز E-test مثبت شدند که در یکی از سویه‌ها مشتق جدیدی از ژن bla_{VIM}(bla_{VIM-13}) در آن ردیابی شد(۱۲). در گزارش ارائه شده از یک تحقیق در جنوب برزیل، در بین ۳۱ باکتری سودوموناس آئروجینوزای مقاوم به کارباپنم که از بیماران بستری در دو بیمارستان برزیل جدا شد، شیوع باکتری‌های مولد MBL در یک بیمارستان ۳۰/۴٪(تا حدودی مشابه با تحقیق حاضر) و در دیگری ۳/۱٪ بود(۱۹). بدین ترتیب شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و شیوع متالوبتالاکتامازها در یک منطقه در بیمارستان های مختلف نیز می‌تواند متفاوت باشد.

Archive

www.SID.ir

پیشنهاد می‌شود آزمایشات تولید متالوبتالاکتاماز در میان باکتری‌های حساس به ایمی‌پنم نیز انجام شود. در این تحقیق تعداد ۴ ایزوله غیرمقاوم(بینابینی یا حساس) به ایمی‌پنم آزمایش فنوتیپی مثبت برای تولید MBL داشتند که به‌نظر می‌رسد آنها نیز مولد MBL باشند. لازم است در این زمینه تحقیقات بیشتری به‌عمل آید.

محدودیت‌های تحقیق: ۱) کمبود منابع در دسترس که تولید متالوبتالاکتاماز در همه ایزوله‌ها و نه فقط در ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم بررسی شده باشد(به‌خصوص منابع مربوط به مطالعات در ایران). این احتمال هست که باکتری به ایمی‌پنم مقاوم نباشد، اما نسبت به کاربانم دیگری مثل مروپنم مقاوم باشد. ۲) محدودیت زمان که امکان آزمایش تعداد بیشتری از ایزوله‌ها نبود.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق، بالا بودن مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی را در میان ایزوله‌های سودوموناس آئروجینوزا در ناحیه مورد بررسی و تولید متالوبتالاکتامازهای طیف وسیع را در میان آنها تأیید نمود. همچنین وجود ژن bla_{VIM} در ۳۲٪ ایزوله‌های مولد MBL ردیابی شد. بر این اساس لزوم مدیریت صحیح تجویز آنتی‌بیوتیک به‌منظور کنترل مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در جامعه‌مان بیش از پیش نمایان است. همچنین شناسایی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و مولد متالوبتالاکتاماز در میان ایزوله‌های سودوموناس آئروجینوزا در آزمایشگاه‌ها ضرورت دارد.

سپاسگزاری

این پژوهش با همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد برای انجام طرح پژوهشی مصوب با شماره ۶۳۶ انجام گرفت که بدین‌وسیله از تمامی سروران ارجمند در این حوزه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References:

1- Gellatly SL, Hancock RE. ***Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses.*** Pathog Dis 2013; 67(3): 159-73.

2- Vaishali G, Renu B, Vaishali D. ***Different methods of detection of metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa from tertiary care centre.*** Int J Sci Stud 2015; 2(12): 155-59.

3- Ochoa SA, López-Montiel F, Escalona G, Cruz-Córdova A, Dávila LB, López-Martínez B, et al. ***Pathogenic characteristics of P. aeruginosa strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation.*** Bol Med Hosp Infant Mex 2013; 70(2): 133-44.

4- Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Bogaerts Y, Nordmann P. ***Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β-lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases.*** Clin Microbiol Rev 2011; 49(4): 1608-13.

5- Bora A, Sanjana R, Jha BK, Surya, Mahaseth SN, Pokharel K. ***Incidence of metallo-beta-lactamase producing clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumonia in central Nepal.*** BMC Res Notes 2014; 7(1): 557.

6- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. ***Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?*** Clin Microbiol Rev 2005; 18(2): 306-25.

7- Mirbagheri SZ, Meshkat Z, Naderinasa M, Rostami S, Nabavinia MS, Rahmati M. ***Study on imipenem resistance and prevalence of bla_{VIM1} and bla_{VIM2} metallo-beta lactamases among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa from Mashhad, Northeast of Iran.*** Iran J Microbiol 2015; 7(2): 72-8.

Archive of SID
www.SID.ir

8- Finegold SM, Baron EJ, Bailey WR. ***Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 8th Edition.*** Mosby, St. Louis, MO, 1990.

9- ***National Committee for Clinical Laboratory Standards, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 12th informational supplement, M100-S12,*** National Committee for Clinical Laboratory standards, Wayne: Pa. 2002.

10- Farajzadeh Sheikh A, Rostami S, Jolodar A, Tabatabaiefar MA, Khorvash F, Saki A, et al. ***Detection of metallo-Beta lactamases among carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa.*** Jundishapur J Microbio 2014; 7(11): e12289.

11- Lari AR, Azimi L, Soroush S, Taherikalani M. ***Low prevalence of metallo-beta-lactamase in P. aeruginosa isolated from a tertiary burn care center in Tehran.*** Int J Immunopathol Pharmacol 2015; 1-6.

12- Juan C, Beceiro A, Gutierrez O, Albertı S, Garau M, Pe´rez JL, et al. ***Characterization of the new metallo-β-lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate in Spain.*** Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(10): 3589-96.

13- Yatsuyanagi J, Saito S, Harata S, Suzuki N, Ito Y, Amano K, Enomoto K. ***Class 1 integron containing Methallo-β-lactamase gene blaVIM-2 in P. aeruginosa clinical strains isolated in Japan.*** Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(2): 626-28.

14- Peymani A, Yeylagh Beigi M, Mohammadi Ghanbarlou M, Najafipour R, Samimi R. ***Multidrug resistance in Pseudomonas aeruginosa and Enterobacter cloacae isolated from intensive care units of Qazvin and Tehran hospitals.*** J Clin Res Paramed Sci 2014; 3(1): 16-24. [Persian]

15- Kalantar E, Torabi V, Salimizand H, Soheili F, Ramezanzadeh R. ***Incidence and susceptibility pattern of metallo-beta-lactamase producers among P. aeruginosa isolated from burn patients at Kurdistan province.*** Jundishapur J Microbiol 2012; 5(3): 507-10. [Persian]

16- Sedighi M, Vaez H, Moghoofeie M, Hadifar S, Oryan G, Faghri J. ***Molecular detection of metallo-β-lactamase gene blaVIM-1 in imipenem-resistant P. aeruginosa strains isolated from hospitalized patients in the hospitals of Isfahan.*** Adv Biomed Res 2015; 4: 57.

17- Bashir D, Thokar MA, Fomda BA, Bashir G, Zahoor D, Ahmad S, et al. ***Detection of metallo-beta-lactamase (MBL) producing Pseudomonas aeruginosa at a tertiary care hospital in Kashmir.*** Afr J Microbiol Res 2011; 5(2): 164-72.

18- Er H, Altındiş M, Aşık G, Demir C. ***Molecular epidemiology of beta-lactamases in ceftazidime-resistant P. aeruginosa isolates.*** Mikrobiyol Bul 2015; 49(2): 156-65. [Article in Turkish]

19- Wirth FW, Picoli SU, Cantarelli VV, Gonçalves AL, Brust FR, Santos LM, et al. ***Metallo-beta-lactamase-producing P.*** aeruginosa in two hospitals from southern Brazil. Braz J Infect Dis 2009; 13(3): 170-72.

Archive of SID
www.SID.ir

Detection of Metallo-beta-lactamase bla$_{VIM-1}$ Gene in Clinical Isolates of Pseudomonas Aeruginosa in Mashhad

***Mahboobeh Nakhaei Moghaddam (PhD)*[*1], Maryam Hosseini Hasanabady (MSc)*[2]**

[1,2] *Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.*

Received: 11 Aug 2015 ***Accepted:*** 17 Dec 2015

Abstract

Introduction: Carbapenems are one of the latest drugs for treatment of threatening infections of *Pseudomonas aeruginosa*. Resistance to these antibiotics is sometimes caused by carbapnmase class B, such as VIM metallo-beta-lactamase (MBL) that is growing in the communities. The aim of this study was to detect the of metallo-beta-lactamase *bla$_{VIM-1}$* gene among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Mashhad.

Methods: In this cross-sectional study, 70 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were collected from samples of inpatients at hospitals in Mashhad. Bacteria were identified by conventional biochemical methods. Antibiotic susceptibility testing was examined in accordance with the Kirby-Bauer method. Metallo-beta-lactamase-producing isolates were identified using a combination disc of imipenem and EDTA. Then, polymerase chain reaction was performed using specific primers to detect *bla$_{VIM-1}$* gene.

Results: 25 (35.7%) out of 70 isolated bacteria had metallo-beta- lactamase, which *bla$_{VIM-1}$* gene were detected in the genome of 8 isolates. 65.6% of resistant bacteria to imipenem produced metallo-beta-lactamase (MBL). A higher percentage of MBL- producing isolates were resistant to imipenem, meropenem, carbenicillin and cefotaxime ($p < 0.05$).

Conclusion: The results of the study showed that antibiotic resistance among examined clinical isolates of *Paeruginosa* was high and VIM-type metallo-beta-lactamase was detected among them. Identification of bacteria with metallo-beta-lactamase (MBL) is very important in the prevention and treatment of infections resistant to antibiotics.

Keywords: *Pseudomonas Aeruginosa*, Metallo-beta-lactamase, *bla$_{VIM-1}$* Gene, Antibiotic Resistance

This paper should be cited as:

Mahboobeh Nakhaei Moghaddam, Maryam Hosseini Hasanabady. ***Detection of metallo-beta-lactamase blavim-1 gene in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in Mashhad.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 24(1): 74-82.

Corresponding author: Tel: 05138435050, email: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

Archive of SID