مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهدسال ۶۴، شماره ۲
فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۰، صفحه ۲۷۳۰-۲۷۲۰

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 64, No.2 P: 2720-2730
May-Jul 2021

مقاله اصلی

بررسی تولید متالوبتالاکتامازها و ردیابی ژن‌های $bla_{VIM-1,2}$ و $bla_{IMP-1,2}$ در جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه‌های بالینی مراکز درمانی استان خراسان رضوی

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۲/۰۸- تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۰۳/۰۷

غلامرضاهاشمی‌تبار * [۱]
کوثر اسدالله پور [۲]
مهرناز راد[۳]

[۱]استاد گروه پاتوبیولوژیِ دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
[۲]گروه پاتوبیولوژیِ دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
[۳]دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
Email: hashemita@gmail.com

خلاصه

مقدمه: *سودوموناس آئروژینوزا* پاتوژن فرصت طلب و یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. بتالاکتامازهای کلاس B که متالوبتالاکتاماز نامیده می‌شوند، به دلیل هیدرولیز پنی‌سلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کرباپنم‌ها مشکلات عمده ای برای درمان بیماری‌های عفونی بوجود می‌آورند. در این مطالعه، حضور ژن‌های متالوبتالاکتاماز به روش فنوتیپی وفراوانی ژن‌های $bla_{IMP1,2}$ و $bla_{VIM1,2}$ در سویه‌های ایزوله که ازنمونه‌های بیمارستانی استان خراسان رضوی جدا شده است مورد بررسی قرار گرفتند.

روش کار: در مجموع ۷۴ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* طی سال‌های ۹۷-۱۳۹۶ از بیمارستان‌های استان خراسان رضوی جمع آوری گردید و با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. دراین سویه‌ها، تولید متالوبتالاکتامازها به روش فنوتیپی Combined disk و وجود ژن‌های $bla_{IMP1,2}$ و $bla_{VIM1,2}$ به روش Multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: در بین نمونه‌ها بالاترین میزان عفونت مربوط به نمونه ادرار (۴۵,۹۴٪) می‌باشد. درمجموع ۳۸ نمونه (۵۱,۳۵٪) به روش Combined disk متالوبتالاکتاماز مثبت تشخیص داده شدند. با روش Multiplex PCR ۱۱ نمونه (۱۴,۸٪) حاوی ژن bla_{VIM1}، ۳ نمونه (۴٪) حاوی ژن bla_{VIM2} و ۱۲ نمونه (۱۶,۲٪) حاوی ژن bla_{IMP2} بوده و هیچ کدام از سویه‌ها حاوی ژن bla_{IMP1} نبوده اند.

نتیجه گیری: نظربه افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی در بیماران، شناسایی و ردیابی ژن‌های متالو بتالاکتامازی و انتخاب داروی مناسب، می‌تواند گامی‌اساسی در درمان وکنترل عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها به شمار رود.

کلمات کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، متالو بتالاکتاماز، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* جزو ۵ پاتوژن فرصت طلب انسانی به خصوص در بیماران دارای نقص ایمنی می‌باشد که عامل عفونت‌های فرصت طلب بیمارستانی بوده و حامل مقاومت چندگانه دارویی می‌باشد (۱). عفونت‌های بیمارستانی یکی از معضلات مطرح پزشکی درکشورهای توسعه یافته و نیز در حال توسعه می باشد که موجب اشاعه بیماری‌های عفونی در جامعه می گرد (۲). عفونت با این باکتری می تواند موجب سپتی سمی، پنومونی، منتژیت و بیماری‌های کشنده دیگری شود (۳).

مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری ناشی از مقاومت ذاتی به دلیل نفوذ پذیری کم، وجود سیستم‌های تراوشی، اکتساب ژن مقاومت از طریق پلاسمید، ترانسپوزون‌ها، اینتگرون‌ها و تولید بیوفیلم می‌باشد (۴، ۵). طی سالیان متمادی مصرف بی رویه ی آنتی بیوتیک‌ها، عدم توجه به نسخه ی تجویزی پزشک، استفاده انبوه از آنتی بیوتیک‌ها در صنعت تولیدات غذایی و عواملی از این دست در افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی بسیاری از باکتری‌ها تاثیرگذار بوده است (۶) . امروزه از داروهای کارباپنم برای درمان سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک استفاده می‌شود، ولی اخیرا شیوع مقاومت به کارباپنم‌ها، یکی از مهم ترین نوع مقاومت به آنتی بیوتیک در *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد که در سراسر جهان در حال افزایش است (۷).

یکی از مکانیسم‌های مقاومت آنتی بیوتیکی دراین باکتری تولید بتالاکتامازها است که این آنزیم‌ها می‌توانند بسیاری از آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام مانند : پنی سیلین، سفالوسپورین و کارباپنم (به استثنای مونوباکتام‌ها) را غیر فعال سازند (۸) . درحال حاضر بتالاکتامازها به چهار رده A,B,C,D آمبلر تقسیم بندی می‌شوند (۹).

متالو بتالاکتامازها (Metallo-β-lactamase) از جمله آنزیم‌های بتالاکتامازی اند که یکی از مکانیسم‌های اصلی مقاومت باکتری علیه آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام اند و در گروه B از طبقه بندی آمبلر وگروه ۳ از طبقه بندی Bush قرار دارند (۱۰). متالو بتالاکتامازها به طور کلی به چند خانواده تقسیم می شوند: *VIM*، *SPM*، *IMP* ، *GIM*، *SIM* ، *AIM*، *DIM* . دراین میان *IMP* و *VIM* به طور وسیعی مورد توجه و مطالعه قرار گرفته شده اند که توسط ژن‌های ***blaIMP*** و ***blaVIM*** کد می‌شوند. حداقل۱۴ نوع *VIM*و 23 نوع *IMP* متفاوت، تعیین هویت شده‌اند (۱۱) .

بسیاری از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* قادرند چندین نوع از بتالاکتامازهای وسیع الطیف را تولید کنند که آنها را قادر می سازد علیه آنتی بیوتیک‌های رایج مصرفی مقاوم باشند. بتالاکتامازها توسط مهارکننده‌های بتالاکتام مانند کلاولانیک اسید مهار می شوند (۱۲) . مطالعه این آنزیم‌ها به جهت تشخیص سریعتر و بررسی میزان شیوع، برای جلوگیری از گسترش این نوع مقاومت بسیار ضروری می‌باشد. لذا ما در این مطالعه به بررسی تولید ژن‌های متالو بتالاکتامازی ***blaIMP*** و ***blaVIM*** توسط این باکتری به روش فنوتیپی Combined disk و ژنوتیپی Multiplex PCR در میان نمونه‌های بالینی مراکز درمانی استان خراسان رضوی می‌پردازیم.

روش کار

در این مطالعه ۷۴ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* که از نمونه‌های بالینی جدا شده از ادرار، زخم، تراشه، کشت خون، سوختگی، ترشحات درن، برونش و چشم بیماران، درمراکز درمانی استان خراسان رضوی جمع آوری و مورد بررسی قرار گرفتند.

خالص سازی ایزوله‌های جمع آوری شده بر اساس دستورالعمل‌های استاندارد انجام گرفته و از محیط‌های کشت انتخابی و افتراقی مثل محیط ستریماید آگار، بلاد آگار برای خالص سازی، و از آزمایش‌های بیوشیمیایی جهت تائید تشخیص استفاده شد. نمونه‌ها بر روی محیط‌های بلاد آگار و ستریماید آگار به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شده. بعد از رشد باکتری نمونه‌ها با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی: کاتالاز، اکسیداز، تست OF، ایندول، رشد در محیط مک کانکی، بررسی حرکت در محیطMotility ، واکنش در محیط TSI و هیدرولیز اوره شناسایی ومورد تائید قرار گرفتند.

جهت بررسی ایزوله‌های فنوتیپی مولد ژن‌های متالوبتالاکتاماز از روش دیسک ترکیبی Combined disk استفاده شد. در این روش از کلنی کشت ۲۴ ساعته، سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه کرده و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. ۱۵ دقیقه پس از تلقیح، دیسک ایمی‌پنم ۱۰میکروگرم در سمتی از پلیت و دیسک EDTA/IPM در گوشه دیگر پلیت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون تفاوت‌هاله ی عدم رشد مقایسه گردید. در صورت مشاهده‌هاله عدم رشد بیشتر و یا مساوی ۷ میلی متر اطراف دیسک EDTA/IPM، در مقایسه با دیسک ایمی‌پنم تنها، سویه ی مورد بررسی را می‌توان طبق استاندارد CLSI به عنوان مولد آنزیم متالو بتالاکتاماز در نظر گرفت (۱۳).

سوش استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* PA83(KM359726) به عنوان سویه‌ی کنترل مثبت در نظر گرفته شد (۱۴).

برای شناسایی ژن‌های مقاومت متالو بتالاکتامازی از روش Multiplex PCR استفاده گردید. DNA جدایه‌ها با روش جوشاندن استخراج شدند. بدین صورت که ابتدا در لوله‌های اپندروف ۱/۵ سی سی مقدار ۰/۵ سی سی آب مقطر ریخته شده و سپس از کشت ۲۴ ساعته و خالص باکتری در محیط نوترینت آگار سوسپانسیون تهیه گردید. درب لوله‌های اپندروف با پارافیلم پوشانده شد و لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجه قرار داده شدند و بلافاصله پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه به فریزر در دمای ۲۰ - منتقل شدند . لوله‌های حاوی سوسپانسیون ۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و سپس مایع رویی محتوی DNA توسط سمپلر به لوله‌های دیگر جهت نگه داری و انجام آزمایش انتقال داده شدند (۱۵).

برای انجام واکنش PCR در هر لوله‌ی اپندروف مقدار ۰,۵ لاندا از هر پرایمر (Reverse و Forward)، ۱۲,۵ لاندا از ماده‌ی مستر میکس امپلیکون کره، ۳ لاندا از DNA هر جدایه و آب مقطر استریل ریخته تا به حجم ۲۵ لاندا رسانده شد. مراحل دستگاه ترموسایکلر شامل یک مرحله Initial denaturation در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ سیکل شامل، Denaturation در دمای ۹۴°C به مدت ۴۰ ثانیه و Annealing در دمای ۵۲°C به مدت ۴۰ ثانیه و Extension در دمای ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و نهایتا یک مرحله Final extension با دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت (۱۶).

توالی پرایمرهای استفاده شده از شرکت metabion آلمان به صورت جدول زیر می‌باشد:

جدول۱ - توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های blaVIM1 و blaIMP2

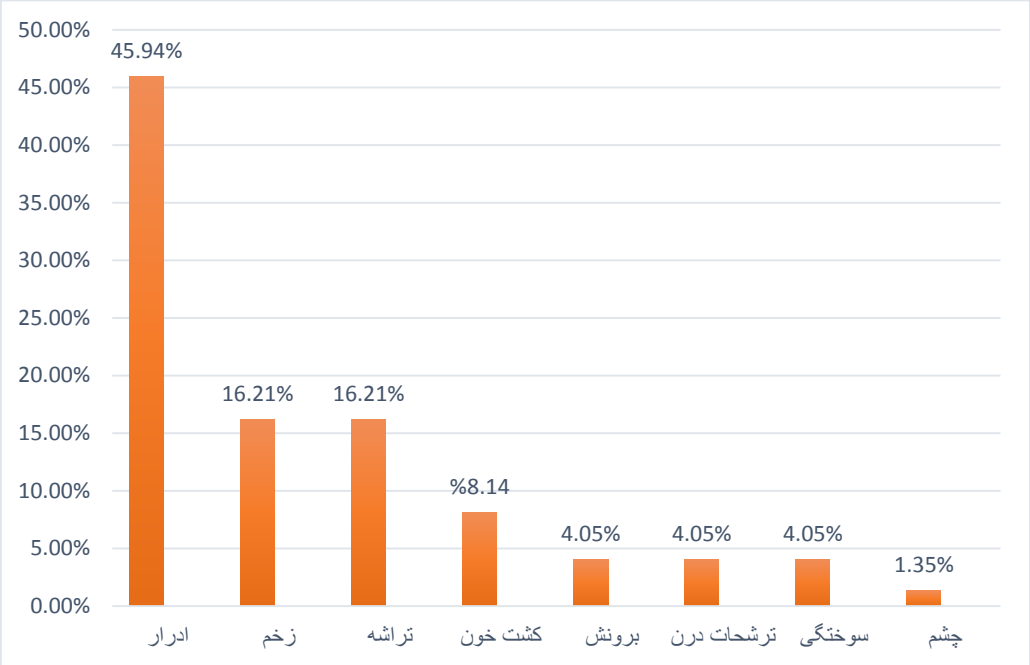
پرایمر	توالی پرایمر	اندازه باند(bp)	منبع
IMP1	Forward: 5'-ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC-3' Reverse: 5'-ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC-3'	۵۸۷	۱۷
IM P2	Forw ard: 5'-GTT TTA TGT GTA TGC TTC C-3' Reverse: 5'-AGC CTG TTC CCA TGT AC-3'	۶۷۸	۱۷
VIM1	Forward: 5'-AGT GGT GAG TAT CCG ACA G-3' Reverse: 5'-ATG AAA GTG CGT GGA GAC-3'	۲۶۱	۱۸
VIM2	Forward: 5'-ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG-3' Reverse: 5'-CTA CTC AAC GAC TGA GCG-3'	۸۰۱	۱۷

پس از تهیه ی ژل آگارز۱,۵ درصد، ۷ میکرولیتر از محصول PCR را درون چاهک ریخته و در چاهک‌های انتهایی از DNA ladder ۱۰۰ bp شرکت Thermo fisher آمریکا برای تعیین اندازه‌ی باندهای DNA استفاده گردید. از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از اتمام الکتروفوز، ژل توسط

دستگاه ژل داکیومنتیشن در معرض اشعه‌ی UV قرار گرفت و نتایج به دست آمده ثبت گردید.

نتایج

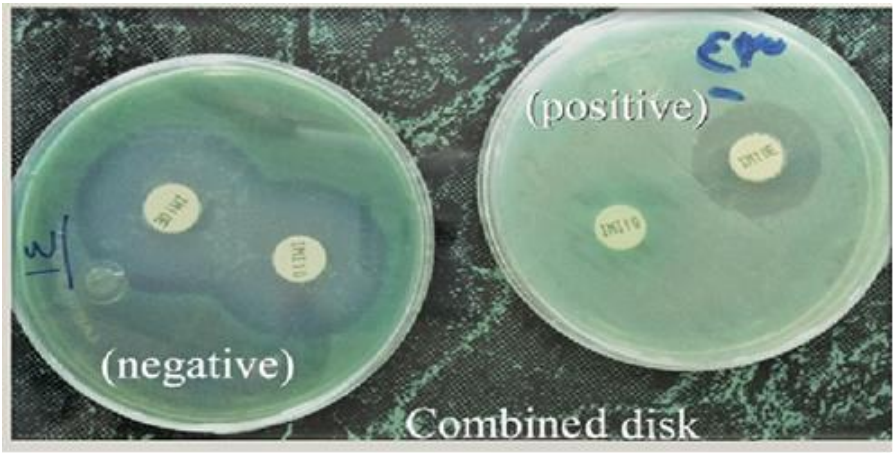
در مجموع ۷۴ نمونه از بیمارستان‌های امام رضا و قائم خراسان رضوی جمع آوری و مورد بررسی قرار گرفتند. مطابق با نمودار ۱ از این تعداد ۴۶ نمونه (۶۲,۱۶٪) متعلق به مردان و ۲۸ نمونه (۳۷,۸۴٪) متعلق به زنان می‌باشد. در این بین به ترتیب ۳۴ نمونه (۴۵,۹۴٪) از ادرار، ۱۲ نمونه (۱۶,۲۱٪) زخم، ۱۲ نمونه (۱۶,۲۱٪) تراشه، ۶ نمونه (۸,۱۴٪) کشت خون، ۳ نمونه (۴,۰۵٪) از سوختگی، ۳ نمونه (۴,۰۵٪) از ترشحات درن، ۳ نمونه (۴,۰۵٪) از برونش و ۱ نمونه (۱,۳۵٪) ازچشم بیماران جداسازی شده است.



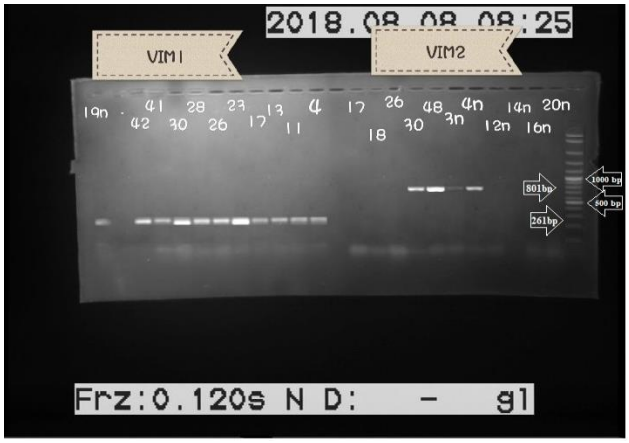
نمودار ۱. توزیع فراوانی محل اخذ نمونه‌های بالینی مورد مطالعه

در سنجش متالو بتالاکتاماز به روش فنوتیپی Combined disk، از مجموع ۷۴ ایزوله تعداد ۳۸ نمونه (۵۱,۳۵٪)هاله عدم رشد آنها اطراف دیسک IMP/EDTA بیشتر یا مساوی ۷ میلی متر، نسبت به دیسک IMP تنها بوده که طبق تصویر ۱ به عنوان مولد آنزیم متالو بتالاکتاماز در نظر گرفته شد.

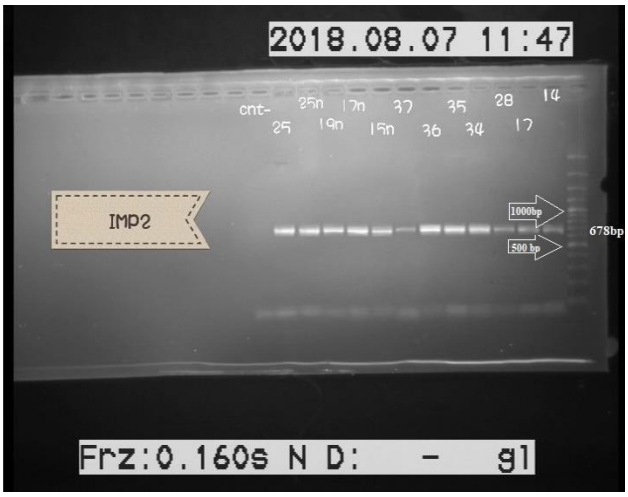
در روش Multiplex PCR مطالعه‌ی ژنوتیپی نمونه‌ها نشان داد که مطابق با تصویر ۲، ۱۱ نمونه (۱۴,۸٪) حاوی ژن blaVIM۱، ۳ نمونه (۴٪) حاوی ژن blaVIM۲ بوده و مطابق تصویر۳، ۱۲ نمونه (۱۶,۲۱٪) حاوی ژن blaIMP۲ بودند و هیچکدام از سویه‌ها حاوی ژن blaIMP۱ نبودند. ۳ایزوله دارای هر دو ژن blaVIM۱ و blaIMP۲ می‌باشند و ۱ نمونه دارای هر دو ژن blaVIM۲,۱ با هم می‌باشد.



شکل۱. محیط کشت مولر هینتون آگار و دیسک‌های آنتی بیوتیکی در روشCombined disk



شکل۲. یافته‌های PCR برای نمونه‌های bla_{VIM1} مثبت ۲۶۱ bp و bla_{VIM2} مثبت ۸۰۱ bp در ژل الکتروفورز



شکل۳. تصویریافته‌های PCR برای نمونه‌های bla_{IMP2} مثبت در محدوده ۶۷۸ bp در ژل الکتروفورز

بحث ونتیجه گیری

در حال حاضر استفاده بیش از حد و خود سرانه از آنتی بیوتیک‌ها یکی از دلایل مهم شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی می‌باشد .افزایش بی رویه مصرف داروهای بتالاکتام وسیع الطیف و بستری طولانی مدت بیماران سبب انتشار باکتری‌های تولید کننده متالوبتالاکتاماز می‌شوند. باکتری‌های مولد متالوبتالاکتاماز معمولا دارای الگوی مقاومت دارویی چندگانه هستند که عامل عفونت‌های جدی می‌باشند و درمان آنها مشکل آفرین بوده و منجر به افزایش مرگ و میر می‌گردد. به طوری که میزان مرگ و میر در بیمارانی که توسط سویه‌های تولید کننده ی متالوبتالاکتاماز عفونی شده اند، نسبت به بیمارانی که توسط سویه‌های متالوبتالاکتاماز منفی عفونی شده اند، بیشتر است (۱۹). این آنزیم‌ها توانایی هیدرولیز تمامی‌آنتی بیوتیک‌های گروه بتالاکتام را دارند که بیشتر در باکتری‌های سودوموناس و اسینتوباکتر یافت می‌شوند که باعث میشود درمان عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* و مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری یکی از مشکلات عمده بهداشتی به شمارآید. علاوه بر آن شناخت وضعیت مقاومت *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج در بیمارستان‌ها، باعث تعیین خط مشی درمانی مناسب و به موقع در برخورد اولیه و کنترل مقاومت این باکتری می‌باشد (۲۰).

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه ،۳۸ نمونه (۵۱,۳۵٪) با روش **Combined disk** مثبت بودند و ژن‌های مقاومت متالوبتالاکتامازی را دارا می‌باشند.

در مطالعه فاضلی و همکاران بر روی نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران سوانح سوختگی در اصفهان، در مجموع ۱۱۱ نمونه، از۷۴ سویه ی مقاوم به ایمی‌پنم ۴۱ سویه (۵۵,۴٪) به روش **Combined disk**، متالوبتالاکتاماز مثبت بودند که (۲۱).

نتایج تحقیقات ماسپی و همکاران در سال ۱۳۹۳ در ایلام از مجموع ۶۰ سویه ادراری *سودوموناس آئروژینوزا* در مجموع ۱۷ سویه که به روش دیسک دیفیوژن به سفتازیدیم مقاوم بودند، با روش **Combined disk** تمامی‌سویه‌ها تولید کننده ی متالو بتالاکتاماز تشخیص داده شده اند که مشابه با یافته‌های ما می‌باشد(۲۲).

در مطالعه عبیری و همکاران در سال ۲۰۱۵ در کرمانشاه بعد از انجام تست آنتی بیوگرام از ۲۲۵ ایزوله جدا شده دریافتند از ۷۶ نمونه مقاوم به ایمی‌پنم ۴۵ نمونه (۵۹,۲٪) به روش **Combined disk** مثبت بودند (۲۳).

در مطالعه همتی و همکاران سال ۱۳۹۲ در زنجان نتایج بررسی به روش **Combined disk** نشان داد که از ۱۲۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا*، ۳۵نمونه (۲۹,۲٪) مولد متالو بتالاکتاماز بودند (۲۴).

در پژوهش **Kali** و همکارانش در ۲۰۱۳ در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستانی در هند از ۴۹ نمونه ایزوله ی باکتری ۱۱ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* در تست **combined disk** از نظر وجود ژن‌های متالو بتالاکتاماز مثبت بودند (۲۵). نتایج این تحقیقات تایید کننده ی یافته‌های ما می‌باشد.

در مطالعه روحی و همکاران در سال ۱۳۹۴ در تهران در روش **Combined disk** هیچ سویه متالوبتالاکتاماز مثبتی یافت نشد که با یافته‌های ما مغایرت دارد که می‌تواند ناشی از فاصله زمانی و مکانی با ما باشد(۱۳).

نتایج **Multiplex PCR** نیز بیانگر حضور ژن‌های **MBL** می‌باشد. ۱۱نمونه (۱۴,۸٪) حاوی ژن ***bla$_{VIM1}$***، ۳ نمونه (۴٪) حاوی ژن ***bla$_{VIM2}$*** و ۱۲ نمونه (۱۶,۲٪) حاوی ژن ***bla$_{IMP2}$*** بودند وهیچکدام از سویه‌ها حاوی ژن ***bla$_{IMP1}$*** نبودند. ۳ ایزوله دارای هر دو ژن ***bla$_{VIM1}$*** و ***bla$_{IMP2}$*** می‌باشند و ۱ نمونه دارای هر دو ژن ***bla$_{VIM,2,1}$*** با هم می‌باشد. همچنین از بین نمونه‌های ***bla$_{VIM1}$*** فقط دو نمونه به روش **combined disk** مثبت بوده اند. از بین ۳ نمونه ***bla$_{VIM2}$*** مثبت، دو نمونه به روش **combined disk** مثبت بودند و مابقی نمونه‌ها منفی گزارش شده اند و از بین ۱۲ نمونه ***bla$_{IMP2}$*** مثبت،۴ نمونه به روش **combined disk** مثبت گزارش شده اند . این امر میتواند نشان دهنده این باشد که این

ژن‌های مقاومت متالو بتالاکتامازی در نمونه‌ها وجود دارد ولی به دلیل عدم بیان ژن به روش فنوتیپی شناسایی نشدند. و نمونه‌هایی که به روش فنوتیپی مثبت بوده اند اما ژن‌های مورد مطالعه در آنها وجود نداشت احتمالا انواع مختلف دیگری از ژن‌های مقاومت را دارا بوده اند.

در پژوهش فاضلی و همکاران از مجموع ۱۱۱ ایزوله ی *سودوموناس آئروژینوزا*، به روش **PCR** ۳۴ ایزوله (۴۳/۳ ٪) از نظر وجود ژن ***VIM*** مثبت بودند که تقریبا مشابه با یافته‌های ما می‌باشد (۲۱).

در پژوهش رحیم زاده ترابی و همکاران در سال ۱۳۹۵ در اصفهان در بین ۹۹ نمونه، تعداد ۳۱ سویه (۶۳ ٪) مقاوم به دارو، ۳۱ نمونه شامل ژن متالو بتالاکتاماز $bla_{IMP1,2}$ بوده و هیچ کدام از سویه‌ها دارای ژن bla_{VIM} نبودند که با میزان ژن bla_{VIM} در یافته‌های ما متفاوت است (۲۶).

در مطالعه امینی و همکاران در سال ۲۰۱۷ دریافتند ازتعداد ۶۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* ۸ ایزوله (۲۸,۵٪) مولد ژن bla_{SPM-1} بودند و ژن‌های bla_{VIM-1} مشاهده نشد (۲۷).

در مطالعه صدیقی و همکاران در سال ۲۰۱۵ در اصفهان، بر خلاف نتایج ما هیچ کدام از این جدایه‌ها با استفاده از آزمایش **PCR** ژن bla_{VIM-1} را نشان ندادند که با یافته‌های ما مغایرت دارد(۲۸).

روحی و همکاران در سال ۱۳۹۴ در ردیابی ژن‌های متالوبتالاکتامازی $bla_{VIM1,2}$ و $bla_{IMP1,2}$ در *سودوموناس آئروژینوزای* نمونه‌های بالینی در بیمارستان‌های اصفهان، در روش **PCR** هیچ سویه ی متالوبتالاکتاماز مثبتی یافت نشد که میتواند نشان از این داشته باشد که مقاومت این سویه‌ها ناشی از ژن‌های دیگری می‌باشد (۱۳).

در مطالعه عبیری و همکاران در سال ۲۰۱۵ ازنمونه‌های بیمارستانی در کرمانشاه، بعد از انجام تست آنتی بیوگرام از ۲۲۵ ایزوله جدا شده دریافتند ۳۴ نمونه (۷۵٪) ژن bla_{IMP-1} راحمل می‌کنند و یک نمونه (۲,۲ ٪) دارای ژن bla_{VIM-1} می‌باشد (۲۳).

در پژوهش صدرالدین امین و همکاران در سال ۲۰۱۶ از ۱۰۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا*، ۱۳ سویه دارای ژن bla_{Imp-1} بودند ولی هیچ یک از ایزوله‌ها ژنbla_{VIM-1} را نداشتند که در تعداد ژن bla_{IMP} که به نتایج حاصله ما نزدیک می‌باشد (۱۴).

نتایج تحقیقات ماسپی و همکاران در سال ۱۳۹۳ درایلام ۶ سویه با روش **PCR**، حاوی ژن $bla_{VIM1,2}$ بوده وهیچ کدام از سویه‌ها دارای ژن bla_{IMP1} نبودند (۲۲).

در پژوهش همتی و همکاران در سال۱۳۹۲ در زنجان از ۱۲۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* ۳۵ ایزوله (۲۹٪/۲) مقاوم به ایمی‌پنم بودند. از ۳۵ ایزوله مولد متالو بتالاکتاماز (۸۰٪) حامل ژن bla_{IMP1} (۵۷,۱٪) حامل bla_{SPM1} (۱۴,۳٪) حامل ژن bla_{SIM1} و(۲,۸٪) حامل هر سه ژن بودند که نشان دهنده شیوع مقاومت در این مناطق می‌باشد (۲۴).

در مطالعه میهنی و همکاران از مجموع ۱۰۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* که از عفونت‌های سوختگی از بیمارستان‌های اهواز جدا شد، ۸ ایزوله دارای ژن ***VIM*** بودند و ایزوله ای که دارای ژن ***IMP*** باشد شناسایی نشد. این مقادیر کمتر از یافته‌های ما می‌باشد که میتواند به علت اختلاف زمانی زیاد باشد که خود شاهدی بر این مدعی است که مقاومت‌های متالوبتالاکتامازی در سال‌های اخیر در حال گسترش است (۲۹).

در مطالعه ای که **Pitout** و همکاران در سال ۲۰۰۷ درکانادا انجام دادند (۳۵٪) از ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مولد ژن‌های متالوبتالاکتاماز بودند، که در این بین (۹۶٪) حاوی ژن ***VIM*** و (۴٪) حاوی ژن ***IMP*** بودند (۳۰).

در مطالعه **Al-Charrakh** و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مراکز درمانی بغداد دریافتند از ۷۵ نمونه ایزوله *سودوموناس آئروژینوز*در بین ۴ نمونه مقاوم به کارباپنم به روش **PCR** ۳ نمونه ژن bla_{IMP} و ۱ نمونه ژن bla_{SPM-1} یافت شدند (۳۱).

در پژوهش **Meawed** و همکاران درسال ۲۰۱۷ با مطالعه بر روی بیماران مصری برونشیتی، از مجموع ۴۳ ایزوله جدا شده، هر دو ژن bla_{IMP1} و bla_{VIM} از نمونه‌ها جدا شدند و۸ جدایه bla_{IMP1} مثبت بودند. در ۳ ایزوله ژن bla_{IMP2} ،وجود داشت، ۵ ایزوله bla_{VIM} مثبت بودند وایزوله‌های باقی مانده هر دو ژن را داشتند (۳۲).

مطالعات اخیر نشان دهنده ی افزایش شیوع مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها توسط متالوبتالاکتامازها می‌باشد و از آنجائی که *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب در محیط‌های بیمارستانی مطرح می‌باشد، باید ایزوله‌های مقاوم هر چه سریعتر در آزمایشگاه‌های بالینی تشخیص داده شوند تا درمان مناسب جهت عفونت‌های حاصل از آنها صورت بگیرد و ازشیوع هر چه بیشتر سویه‌های مقاوم جلوگیری به عمل آید. باتوجه به نتایج فوق پیشگیری، کنترل و درمان عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* با توجه به گسترش شیوع گونه‌های مقاوم، اهمیت فوری دارد.

در این مطالعه درصد مقاومت جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در روش‌های فنوتیپی مورد استفاده بالا بوده و نقش ژن $bla_{VIM1,2}$, bla_{IMP2} به عنوان یکی از مکانیسم‌های مقاومت آنتی بیوتیکی، با توجه به حضور آن در جدایه‌ها حائز اهمیت می‌باشد. علاوه بر آن فشار انتخابی ناشی از استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها به ایجاد باکتری‌های با مقاومت چند دارویی می انجامد و با توجه به اینکه باکتری‌های مقاوم میتوانند ژن‌های مقاومت را به سایر باسیل‌های گرم منفی از جمله، انترو باکتریاسه‌ها انتقال دهند، از این رو شناسایی سریع و ردیابی ایزوله‌های مولد آنزیم‌های متالو بتالاکتاماز می‌تواند گامی‌مهم و اساسی در درمان عفونت‌های ناشی از ایزوله‌ها ی مقاوم به شمار رود.

تشکر و قدردانی

با تشـــکر ویژه از جناب آقای دکتر مهدی عســـکری، آقای دکترکیارش قزوینی، آ قای دکتر علی نعمتی و ســـر کار خانم باقرزاده که در این مهم ما را یاری دادند..

تعارض منافع

این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

References

1. Farhat U, Salman A, Jawad A. Antimicrobial susceptibility and ESBL prevalence in *seudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the North West of Pakistan. Burns. 2009; 35: 1020_5

2. Arvanitidou M, Katikaridou E, Douboyas J, Tsakris A. Prognostic factors for nosocomial bacteraemia outcome: a prospective study in a Greek teaching hospital. Journal of Hospital Infection. 2005; 61:219-224.

3. Eriksen HM, Iversen BG, Aavitsland P. Prevalence of nosocomial infections in hospitals in Norway, 2002 and 2003. Journal of Hospital Infection 2005; 60:40-45.

4. Arabestani MR, Rajabpour M, Mashouf RY, Alikhani MY, Mousavi SM. Expression of Effulux Pump MexAB-OprM and OprD of Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Clinical Samples using qRT-PCR. Archives of Iranian Medicine (AIM). 2015;18(2).

5. Walsh T. The emergence and implications of metallo-betalactamases in Gram-negative becteria. *Clinical Microbiology Infeciont.* 2007; 13(1):113.

6. May TB, shinabarger D, Maharaj R, Kato J,Chu L, DeVault JD, et al. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenicfactor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. Clinical Microbiology Reviews.1991; 4(2):191-206.

7. Kouda S, Kuwahara R, Ohara M, Shigeta M, Fujiwara T, Komatsuzawa H, et al. First isolation of blaIMP- in a Pseudomonas aeruginosa in Japan. Journal of Infection and Chemotherapy (JIC) 2007; 13: 276–7.10

8. Wilson R, Ruth Bd, Dowling Rb. Pseudomonas aeruginosa and other related species. Thorax1998; 53:213-219.

9. George AJ. The New beta- lactamases. The New England Journal of Medicine 2005; 352: 380-91

10. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. Â- lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. Current Opinion in Microbiology Journal. 2005; 8:525-33.

11. Neyestanaki DK, Mirsalehian A, Rezagholizadeh F, Jabalameli F, Taherikalani M, Emaneini M. Determination of extended spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases and AmpC-beta-lactamases among carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Burns. 2014;40(8):1556-61.

12. Tan J, Pitout JD, Guttman DS. New and sensitive assay for determining Pseudomonas aeruginosa

metallo-betalactamase resistance to imipenem. Journal of Clinical Microbiology 2008; 46:1870-1872

13. Rouhibiroun M,Amini K, Parvis M. Detection of blaSPM1, blaIMP1, blaIMP2, blaVIM1 and blaVIM2 metallobacterial genes in Pseudomonas aeruginosa isolated from clinical specimens in southern Tehran hospitals and evaluation of antibiotic resistance. Journal of Isfahan Medical School. 1394;33(343):1137-46.

14. Sadredinamin M, Hashemi A, Goudarzi H, Tarashi S, Yousefi Nojookambari N, Taki E. Detection of blaIMP, blaVIM and OprD Genes among Pseudomonas aeruginosa Isolated from Burn Patients . Journal of Mazandaran Univercity Medical Sciences. 2016; 26 (138) :181-186

15. Mohseni N. The presence of efflux pump genes MexAB-OprM and antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates of human and animal origin Using Multiplex PCR: Ferdowsi University of Mashhad Faculty of Veterinary; 2017.

16. Saderi H, Lotfalipour H, Owlia P, Salimi H. Detection of metallo-β-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients in Tehran, Iran. Laboratory Medicine. 2010;41(10):609-12.

17. Shibata N, Doi Y, Yamane 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. Journal of Clinical Microbiology. 2003;41:5407-5413.

18. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, et al. Outbreak of infections caused by Pseudomonas aeruginosa producing VIM-1 carbapenemase in Greece. Journal of Clinical Microbiology. 2000;38:1290-1292.

19. Hirajata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, et al. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo- B-lactamase producing paseudomonas aeruginosa. Clin infect Dis. 2003;37: 26-32

20. Yu WL, Chuang YC, Walter-Rasmussen J. Extended-spectrum Beta-lactamases in Taiwan: Epidemiology, Detection, Treatment and Infection Control. J Microbial Immunol Infect 2006; 39:264-277.

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

22. Maspi M, Ghanbari F, Darboie M, Sadeghifard N. Prevalence of metallo-β-lactamase blaIMP and blaVIM genes in urinary isolates of Pseudomonas aeruginosa in Ilam. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2015; 23 (2) :141-148

23. Abiri R, Pantea Mohammadi NS, Rezaei M. Detection and genetic characterization of metallo-β-lactamase IMP-1 and VIM-2 in Pseudomonas aeruginosa strains from different hospitals in Kermanshah, Iran. Jundishapur Journal of microbiology. 2015;8(9).

24. Hemmati F, Soroori Zanjani R, Haghi F, Zeighami H. Determination of Antibiotic Resistance Profile and Frequency of Metallo-Beta- Lactamases in Pseudomonas Aeruginosa Isolates. Journal of Zanjan University of Medical Sciences. 2014; 22 (93) :77-85

25. Kali A, Srirangaraj S, Kumar S,Divya HA, Kalyani A, Umadevi S. Detection of metallo-betalactamase producing Pseudomonas aeruginosa in intensive care units. Academy of Management Journal 2013, 6, 12, 686-693.

26. Rahim Zadeh Torabi L, Doody, Golshani. Evaluation of prevalence of blaIMP and blaVIM beta-lactamase genes in resistant pseudomonas aeruginosa strains in Isfahan province health centers. journal of the Mashhad University of Medical Sciences. 2016Vol. 59, No. 3 P: 139-147

27. Amini K, Mobasseri P. Detection rate of metallo-β-lactamase-expressing genes; blaVIM-1, blaVIM-2 and blaSPM-1 in Pseudomonas aeruginosa isolates. Journal of Basic Medical Sciences 2017;2(1):41-45.

28. Sedighi M, Vaez H, Moghoofeie M, Hadifar S, Oryan G, Faghri J. Molecular detection of metallo-β-lactamase gene blaVIM-1 in imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa strains isolated from hospitalized patients in the hospitals of Isfahan. Advanced Biomedical Research. 2015;4.

29. Mihani F, Khosravi A. Isolation of Pseudomonas aeruginosa strains producing metallo beta lactamases from infections in burned patients and identification of blaIMP and blaVIMgenes by PCR. Iran J Med Microbiol 2007; 1:23– 31.

30. Pitout JD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL. Molecular epidemiology of

metallo-βlactamase-producing Pseudomonas aeruginosa in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. J Clin Microbiol 2007; 45:294–298.

31. Al-Charrakh AH, Al-Awadi SJ, Mohammed AS. Detection of metallo-β-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa isolated from public and private hospitals in Baghdad, Iraq. Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences. 2016;54(2):107-13

32. Meawed TE, Gad DM. Clinical and Microbiological Characteristics of Metallo β-lactamase producing Pseudomonas aueroginosa in a sample of Egyptian Patients with Bronchiectasis. The Egyptian Journal of Medical Microbiology. 2017;26(3).

Original Article

Investigation the production of Metallo-β-lactamase and detecting *bla*$_{VIM\ (1,2)}$, *bla*$_{IMP(1,2)}$ genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in clinical samples of health centers in Khorasan Razavi province

Received: 26/02/2021 - Accepted: 28/05/2021

Gholam reza Hashemi Tabar [1*]
Kowsar Assad Allah Poor [2]
Mehrnaz Rad [3]

[1] *DVM, Ph.D, Professor Department of Pathobiology Faculty of Veterinary Medicin Ferdowsi University of Mashhad*
[2] *Department of Pathobiology Faculty of Veterinary Medicin Ferdowsi University of Mashhad*
[3] *DVM, Ph.D, Associate Professor Department of Pathobiology Faculty of Veterinary Medicin Ferdowsi University of Mashhad*

Email: hashemita@gmail.com

Abstract

Introduction: Metallo-β-lactamase (MBL) produsing *Pseudomonas aeruginosa* has emerged as a threat to hospital infection control, due to its multi-drug resistance. Nowadays treatment of this infection is a serious problem due to spreading of antibiotic resistance. In this study, the frequency of ***bla***$_{VIM\ (1,2)}$ **,** ***bla***$_{IMP(1,2)}$ genes in *P.aeruginosa* strains isolated from samples of of health centers in Khorasan Razavi province was investigation by phenotypic and genotypic methods.

Methods: Totally 74samples of *P.aeruginosa* were collected from Khorasan Razavi's hospitals during the years of 2017-18 and identified by biochemical methods. In these strains, the production of Metallo-β-lactamase was measured by Combined disk method and the presence of ***bla***$_{VIM\ (1,2)}$ **,** ***bla***$_{IMP(1,2)}$ gene was investigated by multiplex PCR methoded until theoretical saturation. Colaizzi method was used to analyze the data.

Results: The highest rate of infection is related to urinary culture (45.94%). Totally, 38 samples (51.35%) were diagnosed as MBL by Combined disk method. in Multiplex PCR 11 samples (14.8%) contained *bla*$_{VIM1}$ gene, 3 samples (4%) contained *bla*$_{VIM2}$ genes. 12 samples (16.2%) contained *bla*$_{IMP2}$ genes and None of the strains contain the *bla*$_{IMP1}$ gene.

Conclusion: The *bla*$_{VIM1}$ and *bla*$_{IMP1}$ gene has the highest frequency among the samples and The highest rate of infection is related to the urine specimen. Considering the increasing of antibiotic resistance, identifying the type of resistance and selecting the appropriate drug can be a major step in the treatment and control of infections caused by these bacteria.

Keywords: Metallo-Beta-Lactamases Gens; *Pseudomonas Aeruginosa*; Multidrug Resistanc