مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۲, شمـاره‌ی ۹۳, مهـر و آبـان ۱۳۹۳, صفـحات ۷۷ تا ۸۵

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی متالوبتالاکتامازها در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

فاطمه همتی[۱]، دکتر رحیم سروری زنجانی[۲]، دکتر فخری حقی[۳]، دکتر حبیب ضیغمی[۳]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، گروه میکروب شناسی r_sorouri@yahoo.com

دریافت: ۹۲/۷/۷ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا پاتوژنی فرصت طلب و یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی است. با توجه به مقاومت روز افـزون سودوموناس آئروژینوزا به داروهای ضد میکروبی و به خصوص نسبت به ترکیبات بتالاکتام اهمیت مقاومت این باکتری دو چندان می‌شود. هـدف از این مطالعه تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی متالوبتالاکتامازهای IMP, SPM, SIM در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های شهر زنجان با دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی بود.*

روش بررسـی: *در ایـن مطالعـه‌ی توصـیفی مقطعـی، ۱۲۰ ایزولـه سـودوموناس آئروژینـوزا از نمونـه‌هـای بـالینی مختلـف از بیمارسـتان‌هـای شهر زنجان طی سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ جمع‌آوری گردید. پس از تایید ایزوله‌ها با تست‌های بیوشـیمیایی، حـساسیت آنتـی‌بیـوتیکی آن‌هـا بـا روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Baur) طبق توصیه‌ی CLSI نسبت به ۷ آنتـی‌بیوتیـک تعیـین گردیـد. بـرای بررسـی وجـود MBL_S در سـویه‌هـای جدا شده، از روش دیـسک ترکیبـی (Combined Disk) اسـتفاده و حـضور ژن‌هـای bla_{IMP}, bla_{SPM}, bla_{SIM} بـا اسـتفاده از روش PCR شناسایی گردید.*

یافته‌ها: *در این مطالعه به ترتیب بیشترین و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم (۴۳/۳ درصد) و آمیکاسین (۲۱/۶ درصد) مشاهده شد. از ۱۲۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا، ۳۵ ایزوله (۲۹/۲ درصد) مقاوم به ایمی‌پنم بودند. نتایج حاصـل از دیـسک ترکیبـی نـشان داد که ۱۰۰ درصد ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم، مولد متالوبتالاکتاماز بودند. از ۳۵ ایزوله مولد MBL، ۲۸ ایزوله (۸۰ درصـد) حامـل ژن bla_{IMP}، ۲۰ ایزوله (۵۷/۱ درصد) حامل ژن bla_{SPM}، ۵ ایزوله (۱۴/۳ درصد) حامل ژن bla_{SIM} و ۱ ایزوله (۲/۸ درصد) حامل هر سه ژن bla_{IMP}, bla_{SPM}, bla_{SIM} بودند.*

نتیجه‌گیری: *افزایش مقاومت نسبت به آزترئونام و ایمی‌پنم، می‌تواند به‌عنوان یک هشدار بـرای گـسترش مقاومـت آنتـی‌بیوتیـک در ایزولـه‌هـای سودوموناس آئروژینوزا و شکست درمانی عفونت‌های ناشی از این باکتری به شمار آید.*

واژگان کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا، متالوبتالاکتاماز، مقاومت آنتی‌بیوتیکی*

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۲- دکترای تخصصی میکروب شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)
۳- دکترای تخصصی باکتری شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان یک پاتوژن متداول بیمارستانی، در طیف وسیعی از عفونت‌ها، از عفونت دستگاه ادراری گرفته تا باکتریمی، نقش دارد. مقاومت ذاتی به مواد ضد میکروبی در این باکتری سبب وخیم‌تر شدن وضعیت درمان عفونت‌های ناشی از آن می‌گردد (۱). نوعی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *سودوموناس آئروژینوزا* به واسطه‌ی تولید آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز صورت می‌گیرد، که عامل مقاومت در برابر بتالاکتام‌ها هستند (۲). متالوبتالاکتامازها از جمله آنزیم‌های بتالاکتامازی هستند که در گروه ۳ از طبقه‌بندی Bush و کلاس B از طبقه‌بندی Ambler قرار دارند (۳). در سایت فعال این آنزیم‌ها فلز روی وجود دارد که برای تخریب حلقه‌ی بتالاکتام مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنزیم‌ها طیف سوبسترایی وسیعی دارند و قادر به هیدرولیز تمام بتالاکتام‌ها به جز منوباکتام‌ها (آزترئونام) هستند (۴). آنزیم‌های MBL داخل اینتگرون واقع شده و توانایی ادغام در پلاسمید یا کروموزوم را دارند، لذا قابلیت انتقال به سایر ایزوله‌های سودوموناس و باکتری‌های دیگر از جمله انتروباکتریاسه‌ها را دارند (۵). آنزیم‌های MBL، اولین بار سال ۱۹۹۱ در ژاپن از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و پس از آن در مناطق دیگر جهان از جمله آسیا، اروپا، استرالیا، امریکای شمالی و جنوبی نیز گزارش شد. در حال حاضر ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مولد MBL از سراسر دنیا گزارش می‌شود (۶). متالوبتالاکتامازها بر اساس ساختار مولکولی به انواع مختلف تقسیم می‌شوند که عبارتند از (۷): IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, NDM, DIM, KHM. که از بین این آنزیم‌ها، آنزیم IMP در *سودوموناس آئروژینوزا* بارزتر و چشمگیرتر می‌باشد. SPM و SIM آنزیم‌هایی هستند که باکتری‌ها را در برابر بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌کنند. به‌همین علت، به‌عنوان یک تهدید و معضل بهداشت جهانی در بیمارستان‌ها مطرح هستند. مطالعه‌ی این آنزیم‌ها جهت تشخیص سریع، شناسایی منبع و میزان شیوع آن‌ها در بین نمونه‌های بالینی، برای جلوگیری از گسترش آن‌ها بسیار ضروریست. لذا برآن شدیم تا با بررسی نمونه‌های بالینی شهر زنجان میزان فراوانی این آنزیم‌ها را در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* مورد مطالعه قرار دهیم.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی توصیفی مقطعی، ۱۲۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* از نمونه‌های بالینی مختلف شامل ادرار، خون، ترشحات تنفسی، مدفوع، تراشه، بافت و ترشحات گوش طی سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ از چهار بیمارستان شهر زنجان جمع‌آوری گردید. جهت تایید ایزوله‌ها از تست‌های بیوشیمیایی مرسوم استفاده شد. تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن (کربی-بائر) انجام شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده محصول شرکت MAST انگلستان و به شرح زیر بودند: آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، آزترئونام (۳۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم). پس از انجام دیسک دیفیوژن، قطر هاله‌ی عدم رشد در اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن با توجه به استانداردهای CLSI به‌صورت حساس، مقاوم و میانه (Intermediat) گزارش گردید (۸).

جهت بررسی فنوتیپی ایزوله‌های مولد MBLs از روش دیسک ترکیبی (Combined Disk) استفاده شد. ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم با استفاده از دیسک‌های ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم) و ایمی‌پنم + اتیلن‌دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) (۱۰ و ۳۰ میکروگرم) مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از انکوباسیون به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، تولید MBLs از طریق افزایش قطر هاله عدم

رشد به اندازه‌ی ۷ میلی‌متر یا بیشتر در اطراف دیسک ایمی‌پنم + EDTA در مقایسه با دیسک ایمی‌پنم مشخص گردید. از سویه‌ی استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 جهت کنترل روش‌های آنتی‌بیوگرام و دیسک ترکیبی استفاده شد. به منظور شناسایی ژن‌های bla_{IMP}, bla_{SPM}, bla_{SIM}، ابتدا DNAی پلاسمیدی سویه‌های مولد MBL، با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Bioneer, Korea) استخراج گردید. سویه‌های حامل ژن‌های bla_{IMP}, bla_{SPM}, bla_{SIM} به عنوان کنترل مثبت (تهیه شده از بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران) استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده به‌صورت جدول ۱ می‌باشد (۱۳): واکنش PCR به صورت Multiplex و در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر حاوی ۳µ l بافرx۱۰، ۱/۵µl dNTP ۱ میلی‌مولار، ۰/۸ µl پرایمر ۱۰ پیکومول از هر کدام، ۲µl آنزیم Taq DNA polymerase 1unit، ۲µl DNA الگو با غلظت µg ۵۰ در طی ۳۰ سیکل، تحت برنامه زمانی ترموسایکلر (ASTEC,) Gene Atlas 322 system, Japan) زیر انجام شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده (۱۳)

ژن	توالی نوکلئوتیدی	اندازه محصول
$bla_{IMP\text{-}F}$	5'-GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC-3'	188 bp
$bla_{IMP\text{-}R}$	5'-CCAAACCACTACGTTATCT-3'	
$bla_{SPM\text{-}F}$	5'-AAAATCTGGGTACGCAAACG-3'	271 bp
$bla_{SPM\text{-}R}$	5'-ACATTATCCGCTGGTACAGG-3'	
$bla_{SIM\text{-}F}$	5'-TACAAGGGATTCGGCATCG-3'	570 bp
$bla_{SIM\text{-}R}$	5'-TAATGGCCTGTTCCCATGTG-3'	

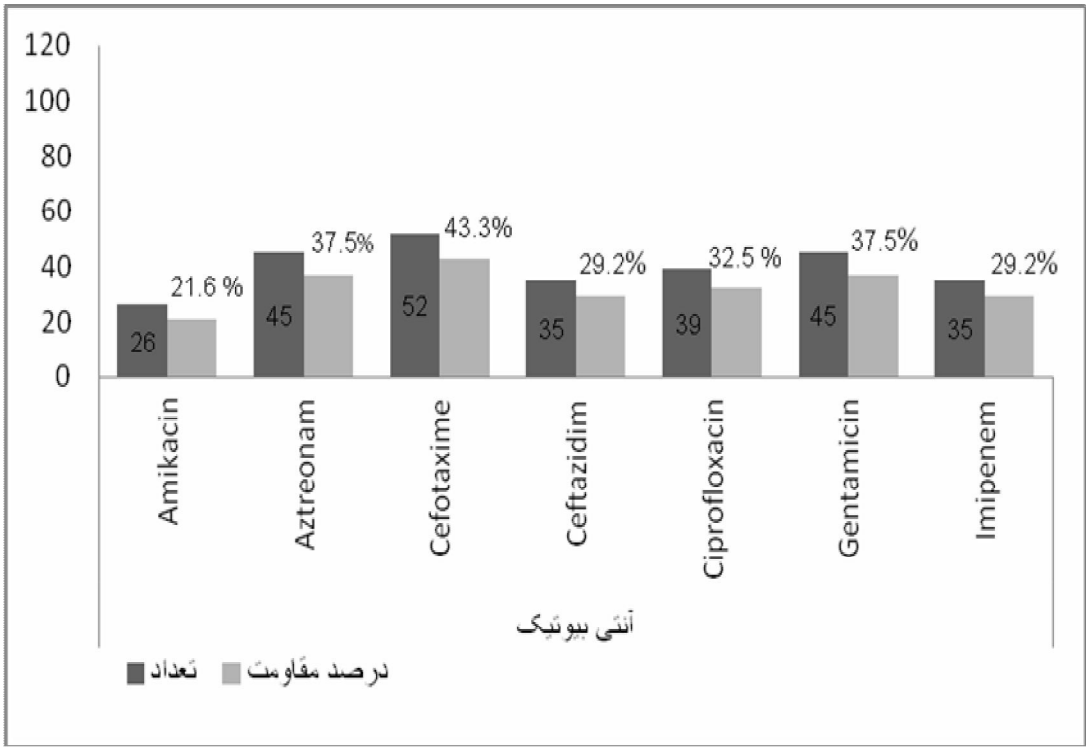
مرحله‌ی اولیه جداسازی دو رشته در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله‌ی باز شدن دو رشته (Denaturing Step) در ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله‌ی اتصال پرایمرها (Annealing Step) در ۵۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت۴۰ ثانیه، مرحله‌ی طویل شدن رشته‌ی هدف (Extension Step) در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و مرحله‌ی طویل شدن نهایی (Final Extension Step) در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه.

پس از انجام PCR، ژل آگارز ۱/۵ درصد جهت الکتروفورز محصولات PCR مورد استفاده قرار گرفت و قطعات ژنی مورد نظر با استفاده از مارکر 100bp Ladder Fermentase ارزیابی شد.

یافته‌ها

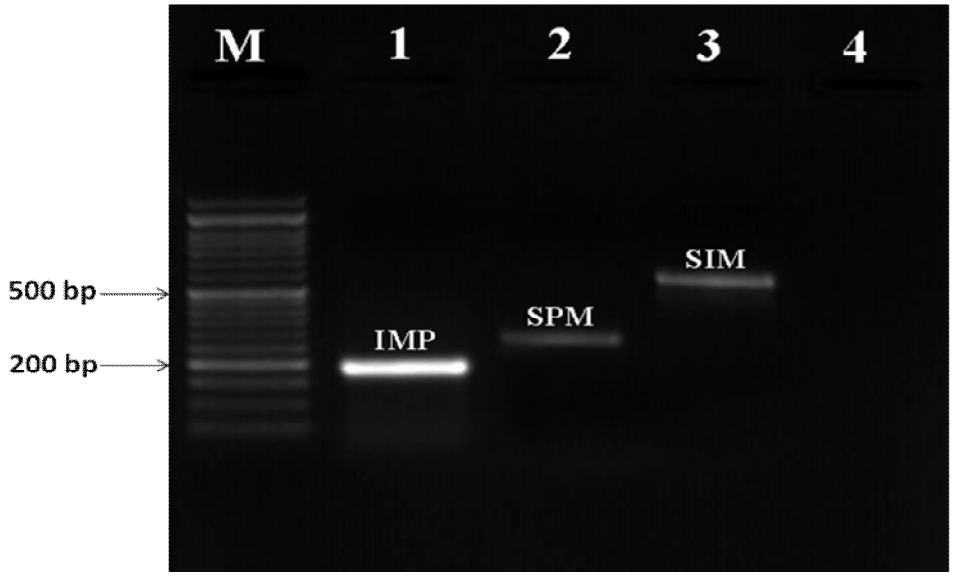
از ۱۲۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزای* جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی، ۳۹ (۳۲/۵ درصد) ایزوله مربوط به نمونه‌های ادرار، ۳۳ (۲۷/۵ درصد) ایزوله مربوط به خون، ۲۱ (۱۷/۵ درصد) ایزوله مربوط به ترشحات تنفسی، ۱۰ (۸/۳ درصد) ایزوله مربوط به مدفوع و ۱۷ (۱۴/۲ درصد) ایزوله مربوط به‌تراشه، بافت و ترشحات گوش بود. از نمونه‌های بالینی مورد بررسی، ۵۱ (۴۲/۵ درصد) نمونه مربوط به جنس مذکر و ۶۹ (۵۷/۵ درصد) نمونه مربوط به جنس مونث بودند. نتایج حاصل از این تحقیق، بیشترین و کمترین میزان مقاومت را به ترتیب مربوط به سفوتاکسیم در ۵۲ ایزوله (۴۳/۳ درصد) و آمیکاسین در ۲۶ ایزوله (۲۱/۶ درصد) نشان داد. میزان مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها به شرح ذیل بود:

مقاومت به ایمی‌پنم در ۳۵ ایزوله (۲۹/۲ درصد)، آزترئونام در ۴۵ ایزوله (۳۷/۵ درصد)، جنتامایسین در ۴۵ ایزوله (۳۷/۵ درصد)، سفتازیدیم در ۳۵ ایزوله (۲۹/۲ درصد)، سیپروفلوکساسین در ۳۹ ایزوله (۳۲/۵ درصد)، (نمودار ۱). میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام و آمینوگلیکوزید، به طور میانگین ۳۴/۴ درصد و ۲۹/۵ درصد بود. ۶۵ درصد ایزوله‌ها نسبت به سه خانواده از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مقاوم بودند و به عنوان ایزوله‌هایی با مقاومت چند دارویی (Multi Drug Resistance) در نظر گرفته شدند (۹).

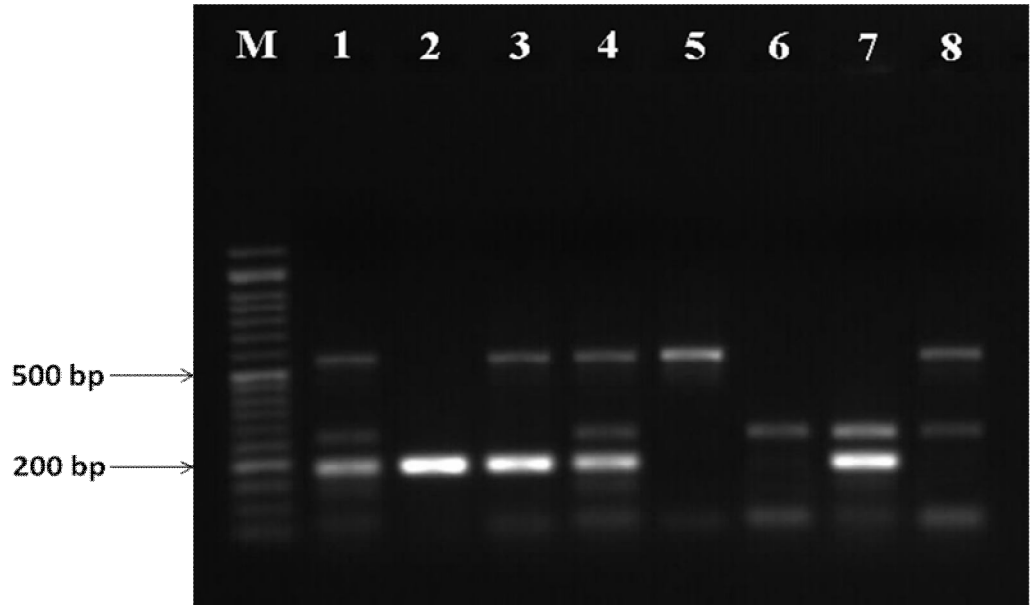


نمودار ۱: درصد مقاومت ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی

نتایج بررسی فنوتیپی به روش دیسک ترکیبی نشان داد که از ۱۲۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا*، ۳۵ (۲۹/۲ درصد) ایزوله مولد متالوبتالاکتاماز بودند. در بین ایزوله‌های مولد متالوبتالاکتاماز، ۳۴/۳ درصد مربوط به نمونه‌های ادرار، ۲۸/۶ درصد مربوط به نمونه‌های خون، ۱۷/۱ درصد مربوط به نمونه‌های تنفسی، ۸/۶ درصد مربوط به نمونه‌های مدفوع و ۱۱/۴ درصد مربوط به تراشه، بافت و ترشحات گوش بودند. از ۳۵ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزای* مولد متالوبتالاکتاماز، ۲۸ ایزوله (۸۰ درصد) حامل ژن bla_{IMP}، ۲۰ ایزوله (۵۷/۱ درصد) حامل ژن bla_{SPM}، ۵ (۱۴/۳ درصد) ایزوله حامل ژن bla_{SIM} و ۱ (۲/۸ درصد) ایزوله حامل هر سه ژن bla_{IMP}, bla_{SPM}, bla_{SIM} بودند. همچنین ۱۲ ایزوله (۳۴/۳ درصد) حامل دو ژن bla_{IMP}, bla_{SPM}، ۲ ایزوله (۵/۸ درصد) حامل ژن‌های bla_{IMP}, bla_{SIM} و ۲ ایزوله (۵/۸ درصد) حامل ژن‌های bla_{SPM}, bla_{SIM} بودند (شکل ۲ و ۱).



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR سویه‌های کنترل مثبت حامل ژن‌های bla_{SPM}، bla_{IMP} و bla_{SIM} بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. M: ماکر وزن مولکولی (۱۰۰ bp)، چاهک ۱: نمونه‌ی کنترل مثبت واجد ژن bla_{IMP}، چاهک ۲: نمونه‌ی کنترل مثبت واجد ژن bla_{SPM}، چاهک ۳: نمونه‌ی کنترل مثبت واجد ژن bla_{SIM} .



شکل ۲: الکتروفورز محصول Multiplex PCR ژن‌های bla_{SPM}، bla_{IMP} و bla_{SIM} بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد. M: ماکر وزن مولکولی (۱۰۰ bp)، چاهک ۱: نمونه‌ی کنترل مثبت واجد ژن‌های bla_{SPM}، bla_{IMP}و bla_{SIM}، چاهک ۲: نمونه‌ی بالینی واجد ژن bla_{IMP}، چاهک ۳: نمونه‌ی بالینی واجد ژن‌های bla_{IMP}و bla_{SIM}، چاهک ۴: نمونه‌ی بالینی واجد ژن‌های bla_{SPM}، bla_{IMP} و bla_{SIM}، چاهک ۵: نمونه‌ی بالینی واجد ژن bla_{SIM}، چاهک ۶: نمونه‌ی بالینی واجد ژن bla_{SPM}، چاهک ۷: نمونه‌ی بالینی واجد ژن‌های bla_{IMP} و bla_{SPM}، چاهک ۸: نمونه‌ی بالینی واجد ژن‌های bla_{SPM}و bla_{SIM}.

بحث

متالوبتالاکتامازها به‌دلیل ایجاد مقاومت به کاربا‌پنم‌ها که از موثرترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده علیه عفونت‌های سودوموناسی هستند، بسیار قابل توجه می‌باشند. افزایش مصرف داروهای بتالاکتام و بستری طولانی مدت بیماران، باعث انتشار باکتری‌های مولد MBL بین سویه‌های مختلف باکتری‌ها شده است. نکته‌ی قابل توجه در مورد نوع نمونه و فراوانی ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق، این است که سویه‌های جدا شده از نمونه‌های ادرار حامل ژن‌های مقاومتی بیشتری بودند، با توجه به اینکه آنزیم‌های MBL داخل اینتگرون واقع شده و توانایی ادغام در پلاسمید یا کروموزوم را دارند، لذا قابلیت انتقال به سایر پاتوژن‌های ادراری از جمله *اشریشیاکلی* را دارند.

نتایج آنتی‌بیوگرام به‌دست آمده از مطالعات قبلی انجام گرفته در ایران، حاکی از افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سال‌های اخیر می‌باشد. طی مطالعه‌ای که صادری و همکاران در سال ۲۰۱۰ در تهران انجام دادند، درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آمیکاسین، جنتامایسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین به‌ترتیب ۷۳، ۸۶، ۷۳، ۵۵ درصد گزارش گردید. در مطالعه‌ی ما میزان مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها پایین بود که احتمالا به دلیل تفاوت در نحوه‌ی درمان و آنتی‌بیوتیک‌های تجویز شده باشد (۱۰). در مطالعه‌ی دیگری که توسط فولادی در سال ۸۹ در تهران انجام گرفت، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، سفوتاکسیم، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم به ترتیب ۸۶/۴، ۴۳/۶، ۲۵/۵، ۲۰/۹، ۲۰/۹ درصد بود، که در مقایسه با مطالعه‌ی ما تفاوت برای جنتامیسین و سفتازیدیم قابل توجه می‌باشد (۱۱). در تحقیق حاضر ۸۰ درصد از باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* دارای ژن bla_{IMP}، ۵۷/۱ درصد از باکتری‌ها دارای ژن bla_{SPM}، ۱٤/۳ درصد از باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* دارای ژن bla_{SIM}، بودند. همه‌ی باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شده که از لحاظ فنوتیپی دارای MBL مثبت بودند، حداقل دارای یک ژن MBL مورد مطالعه، و برخی هر سه ژن مورد بررسی را دارا بودند. در مطالعه‌ایی که گومز و همکاران در سال ۲۰۱۰ برای شناسایی متالوبتالاکتامازها در سودوموناس‌های مقاوم به ایمی‌پنم انجام دادند، نشان داده شد که ۳۴/۵ درصد از نمونه‌های خون مقاوم به ایمی‌پنم بودند. از بین نمونه‌های واجد آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز ۸۱ درصد حامل ژن bla_{SPM} گزارش شد، در حالی که این میزان در مطالعه‌ی حاضر ۵۷/۱ درصد است، که به این ترتیب نسبت به مطالعه‌ی برزیل ۲۳/۹ درصد کمتر است، دلیل این تفاوت می‌تواند در ارتباط با منطقه‌ی خاص جغرافیایی باشد (۱۲). طی مطالعه‌ای که توسط الینگتون و همکاران بر روی ۶۰ ایزوله‌ی سودوموناس، کلبسیلا و اسینتوباکتر انجام گرفت، ۱۱ ایزوله مولد ژن bla_{IMP} بودند در حالی‌که در مطالعه‌ی اخیر ۸۰ درصد سویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز حامل ژن bla_{IMP} بود. همچنین در مطالعه‌ی آن‌ها ایزوله‌ای که حامل ژن‌های bla_{SPM} و bla_{SIM} باشد، شناسایی نشد. در حالی‌که در مطالعه‌ی ما فراوانی این ژن‌ها به ترتیب ۵۷/۱ و ۱۴/۳ درصد بود، این میزان نشان‌دهنده‌ی افزایش فراوانی نمونه‌های SPM و SIM مثبت در سال‌های اخیر، در این منطقه می‌باشد (۱۳). در سال ۲۰۰۸ در تایوان مطالعه‌ای در مورد آنزیم‌های متالوبتالاکتامازها انجام شد که در این مطالعه ژن‌های bla_{VIM}, bla_{IMP}، bla_{SIM}, bla_{SPM} و bla_{GIM} مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که ژن‌های $bla_{VIM2,3,11}$ در میان ایزوله‌ها دارای بیشترین میزان می‌باشند. ژن‌های bla_{GIM}, bla_{SPM}, bla_{SIM} وجود نداشتند (۱٤). در بررسی که در سال ۲۰۰۸ در هند انجام شد ۲۰/۸ درصد از ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مولد MBL بودند، که با مطالعه‌ی ما مطابقت داشت (۱۵). در مطالعه‌ی صادر و همکاران میزان شیوع ژن bla_{SPM}، ۵۵/۶ درصد گزارش شد که مشابه

مطالعه‌ی ما بود و میزان شیوع bla_{IMP}، ۸/۳ درصد مشاهده گردید. فراوانی IMP در مطالعه‌ی حاضر نسبت به مطالعه‌ی انجام گرفته در برزیل بسیار بالا بود، این بررسی نشان‌دهنده‌ی میزان شیوع بالای این ژن، در این ناحیه می‌باشد (۱۶). در بررسی که میهنی و همکاران انجام دادند ایزوله‌ای که حامل ژن bla_{IMP} باشد، شناسایی نشد، لیکن در مطالعه‌ی ما فراوانی این ژن ۸۰ درصد بود، این آمار بالا به نظر می‌رسد به‌دلیل ظهور باکتری‌های مقاوم و مولد MBL و الگوی درمانی وابسته به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در مواجهه با بیماری‌ها، منجر به افزایش باکتری‌های مولد متالوبتالاکتاماز گردیده است (۱۷). در بررسی که سال ۲۰۰۷ توسط شکیبایی در کرمان، بر روی ۱۲۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* انجام گرفت، هیچ ایزوله‌ای مولد MBL گزارش نگردید. مطالعات اخیر نشان دهنده‌ی افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها توسط متالوبتالاکتامازها در ایران می‌باشد (۱۸). در مطالعه‌ی آراناگیری از ۱۶۷ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا*، ۷۰/۱ درصد ایزوله‌ها مولد MBL بودند، از بین این ایزوله‌ها، ۲ (۳ درصد) ایزوله حامل ژن bla_{IMP} گزارش شد، که این میزان در مقایسه با مطالعه‌ی ما بسیار پایین بود (۱۹). در مطالعه‌ی حاضر فراوانی ژن‌های متالوبتالاکتامازی بیشتر از مطالعات قبلی انجام گرفته در ایران است، که نشان دهنده‌ی افزایش شیوع سویه‌های مولد متالوبتالاکتامازها می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مقاومت روز افزون *سودوموناس آئروژینوزا* به داروهای ضد میکروبی بخصوص نسبت به ترکیبات بتالاکتام، امروزه شاهد سویه‌هایی با مقاومت چندگانه هستیم. یکی از دلایل این مقاومت به سبب تولید آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز می‌باشد، ژن‌های کد کننده متالوبتالاکتامازها اغلب بر روی اینتگرون‌ها به‌ویژه اینتگرون کلاس I قرار دارد، به علت سیار بودن این عناصر ژنتیکی انتشار این آنزیم‌ها در بخش‌های مختلف بیمارستان به وفور دیده می‌شود. به منظور جلوگیری از گسترش این سویه‌ها، شناسایی روتین این نوع مقاومت‌ها در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی باید مورد توجه قرار گیرد.

References

1- Sacha P, Wieczorek P, Hauschild T, Zórawski M, Olszańska D, Tryniszewska E. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*: a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008; 46: 137-42.

2- Flalagas ME, Karageorgopoulos DE. Extendedspectum β-lactamase-producing Organisms. *J Hospital Infection*. 2009; 73: 345-54.

3- Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. B-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2005; 8: 525-33.

4- Tsakris A, Ikonomidis A, Poulou A, et al. Clusters of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones producing different carbapenemases in an intensive care unit. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 588-94.

5- Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized labratory. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 3129-35.

6- Mendiratta DK, Deotale V, Narang P. Metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital from a rural area. *Indian J Med Res*. 2005; 121: 701-03.

7- Gupta V. Metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Investing Drugs*. 2008; 17: 131-43.

8- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21th informational supplement. *CLSI document M100-S21*. 2011.

9- Elizabeth BH, Vincent HT. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 2010; 10: 441-51.

10- Saderi H, Lotfalipour H, Owlia P, Salimi H. Detection of metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Tehran, Iran. *Science*. 2010; 41: 10.

11- Imani Foolad AA, Rostami Z, Shapouri R. Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimen by phenotypic and genotypic methods, Zanjan, Iran. *Iranian J Med Microbiol.* 2011; 10: 189-98.

12- Gomes FMR, Caiaffa-Filho HH, Burattin MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian university Hospital. *Clin Sci*. 2010; 65: 825-29.

13- Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-b-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59: 321-22.

14- Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Chen YH. Molecular characterization of the metallo-β-lactamase genes in imipenem-resistant gram-negative bacteria from a university hospital in Southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 32: 475-80.

15- Varaiya A, Kulkarni N, Kulkarni M, Bhalekar P, Dogra J. Incidence of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in ICU patients. *Indian J Med Res*. 2008; 127: 398-402.

16- Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPS, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-β-lactamases produces by carbapenem-resitant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazillian hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11: 73-6.

17- Mihani F, Khosravi A. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo-beta -lactamases from infections in burned patients and identification of bla_{IMP} and bla_{VIM} genes by PCR. *Iranian J Med Microbiol.* 2007; 1: 23-31.

18- Shakibaie MR, Shahcheraghi F, Hashemi A, Adeli NS. Detection of TEM, SHV and PER type extended-spectrum- lactamase genes among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burnt patients at shafa-Hospital, Kerman, Iran. *Iranian J Med Sci*. 2008; 11: 49-54.

19- Arunagiri K, Sekar B, Sangeetha G, John J. Detection and characterization of metallo-β-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* by phenotypic and molecular methods from clinical samples in a tertiary care hospital. *West Indian Med J*. 2012; 61: 778.

Determination of Antibiotic Resistance Profile and Frequency of Metallo-Beta- Lactamases in *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates

Hemmati F[1], Sourouri Zanjani R[2], Haghi F[1], Zeighami H[1]

[1]Dept. of Microbiology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

[2]Dept. of Microbiology, School of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Sourouri Zanjani R, Dept. of Microbiology, School of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

E-mail: r_sorouri@yahoo.com

Received: 29 Sep 2013 **Accepted:** 2 Mar 2014

***Background and Objective*:** *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen and one of the most frequent pathogens in nosocomial infections. This bacterium shows high resistance to majority of antibiotics including â-lactams. The aim of this study was to investigate the pattern of antimicrobial resistance and evaluation of IMP, SPM and SIM Metallo- Beta- Lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*, in clinical samples isolated from Zanjan hospitals, by phenotypic and PCR methods.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 120 *Pseudomonas aeruginosa* isolates were collected from the various clinical specimens in Zanjan hospitals from 2013 to 2014. After identification of isolates using biochemical tests, the antibiotic susceptibility test (Kirby-Baur method) was done according to CLSI advice against 7 antibiotics. The Combined Disk method was then carried out for detection of MBLs and the bla_{IMP}, bla_{SPM} and bla_{SIM} genes were determined by a PCR method.

Results: In this study, Cefotaxime and Amikacin with 43.3% and 21.6% showed the highest and lowest resistance against isolates, respectively. From a total of 120 isolates, 35 (29.2%) strains were imipenem resistant and metallo- beta-lactamase producer. From 35 MBL producing isolates, 28 (80%) strains, 20 (57.1%) strains and 5 (14.3%) strains carried bla_{IMP}, bla_{SPM} and bla_{SIM} genes, respectively and 1 (2.8%) isolate carried all bla_{IMP}, bla_{SPM} and bla_{SIM} genes.

Conclusion: According to the results, high prevalence of resistance to aztreonam and imipenem can be a warning against treatment process and distribution of resistance to other strains.

Keywords: Antibiotic resistance, Mtallo-Beta-Lactamase, Pseudomonas aeruginosa