

Frequency of bla_{KHM-1}, bla_{IMP-1,2} and bla_{SPM-1} genes in clinical isolates of metallo β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized burned patients in Ghotbeddin Shirazi Hospital

S. RostamPour*

AA. Gorzin**

Gh. Motamedi***

*M.Sc. in Biology, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Sanandaj, Iran

**Assistant Professor of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

***Assistant Professor of Parasitology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

*Abstract

Background: Metallo- β -lactamase (MBL) producing *Pseudomonas aeruginosa* is an important gram negative opportunistic bacterium in hospitals which its increasing number is of clinicians' concerns.

Objective: The aim of this study was to evaluate the frequency of bla_{IMP-1}, bla_{IMP-2}, bla_{SPM-1} and bla_{KHM-1} genes in clinical isolates of MBL producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized burned patients in Ghotbeddin Shirazi Center.

Methods: This cross-sectional study was conducted in 210 burn wound samples from 2012 to 2013. Sensitivity of confirmed *Pseudomonas aeruginosa* was examined for standard antimicrobial agents using disk diffusion method. Detection of MBL producing isolates was performed by the double disk synergy test (DDST) and the desired genes were detected by PCR. Data were analyzed using Chi-square test.

Findings: By the phenotypic methods, 42 isolates (20%) were identified as *Pseudomonas aeruginosa* that were resistant to the most studied antibiotics including Carbapenem (100%) and were only sensitive to Colicitin (100%). 26 isolates (61.9%) were identified as MBL producing *Pseudomonas aeruginosa*. 9 isolates (34.61%) carried the bla_{IMP-2} and bla_{KHM-1} genes. The bla_{IMP-1} and bla_{SPM-1} genes were not found in any of the isolates.

Conclusion: With regards to the results, it is suggested to periodically study the reasons for antibiotic resistance in each center.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Beta-lactamase IMP-1, Burns, Hospitals

Citation: RostamPour S, Gorzin AA, Motamedi Gh. Frequency of bla_{KHM-1}, bla_{IMP-1,2} and bla_{SPM-1} genes in clinical isolates of metallo β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized burned patients in Ghotbeddin Shirazi Hospital. J Qazvin Univ Med Sci. 2015; 19 (2): 21-29.

Corresponding Address: Ali Akbar Gorzin, Department of Bacteriology and Virology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Email: gorzin@sums.ac.ir

Tel: +98-71-32305884

Received: 23 Aug 2014

Accepted: 17 Dec 2014

فراوانی ژن‌های bla_{IMP-1,2}، bla_{KHM-1} و bla_{SPM-1} در نمونه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا تولیدکننده متالوبتالاکتاماز در بیماران مرکز سوختگی قطب‌الدین شیرازی

سجاد رستم پور*

دکتر علی اکبر گرزین**

دکتر غلامرضا معتمدی***

* کارشناس ارشد زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنجند، سنجند، ایران
 ** استادیار باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، فارس، ایران
 *** استادیار انگل‌شناسی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی، تلفن ۰۷۱-۳۲۳۰۵۸۸۴

Email: gorzin@sums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۲۶

*چکیده

زمینه: سودوموناس آئروژینوزاهای تولیدکننده متالوبتالاکتاماز (MBL) از مهم‌ترین باکتری‌های فرصت‌طلب گرم منفی در بیمارستان‌ها هستند که افزایش آن‌ها در مراکز درمانی از نگرانی‌های پزشکان است.

هدف: مطالعه به منظور تعیین فراوانی ژن‌های bla_{IMP-1}، bla_{IMP-2}، bla_{SPM-1} و bla_{KHM-1} در نمونه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزای تولیدکننده متالوبتالاکتاماز جدا شده از بیماران سوختگی بستری در مرکز درمانی قطب‌الدین شیرازی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مقطعی در سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ بر روی ۲۱۰ نمونه زخم سوختگی انجام شد. نمونه‌های تأیید شده سودوموناس آئروژینوزا نسبت به داروهای ضد میکروبی پیشنهادی استاندارد با روش دیسک دیفیوژن مطالعه شدند. شناسایی نمونه‌های MBL به روش Double Disk Synergy Test (DDST) و تشخیص ژن‌های مورد مطالعه به روش PCR انجام شد. داده‌ها با آزمون‌های آماری مجذور کای تحلیل شدند.

یافته‌ها: ۴۲ نمونه سودوموناس آئروژینوزا (۲۰٪) به صورت فنوتیپی تعیین هویت شدند که به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده از جمله گروه کارباپنم (۱۰۰٪) مقاوم بودند و تنها نسبت به کلیستین (۱۰۰٪) حساسیت مشاهده شد. با روش DDST، ۲۶ نمونه (۶۱/۹٪) به عنوان تولیدکننده متالوبتالاکتاماز شناسایی شدند. در روش مولکولی، ۹ نمونه (۳۴/۶۱٪) حامل ژن‌های bla_{IMP-2} و bla_{KHM-1} بودند و هیچ کدام حامل ژن‌های bla_{SPM-1} و bla_{IMP-1} نبودند.

نتیجه‌گیری: با توجه یافته‌ها، پیشنهاد می‌شود شناسایی دلایل این مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در هر مرکز به صورت دوره‌ای مطالعه شود.

کلیدواژه‌ها: سودوموناس آئروژینوزا، بتالاکتاماز، bla_{IMP-1}، سوختگی‌ها، بیمارستان‌ها

*مقدمه

یا سرکوب شده نظیر بیماران مبتلا به ایدز، سرطان، سیستمیک فیبروزیس و وابسته به کاتتر است. قربانیان سوانح سوختگی نیز به دلیل صدمه‌های شدید پوستی، مستعد عفونت‌های بیمارستانی از جمله سودوموناس آئروژینوزا هستند.^(۱) این باکتری با توجه به قدرت تولید آنزیم‌های متعدد، به سرعت نسبت به داروهای مختلف مقاوم می‌شود و همین امر عامل اصلی ازدیاد مرگ و میر (به خصوص در مراکز سوختگی) است.^(۲)

سودوموناس‌ها باکتری‌های گرم منفی هوازی و از خانواده سودوموناداسه هستند. اعضای این خانواده قدرت متابولیسمی متنوع و توانایی زندگی در محیط‌های مختلف را دارند.^(۱) یکی از مهم‌ترین گونه‌های این باکتری که به عنوان عامل یک عفونت فرصت‌طلب در بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده است، سودوموناس آئروژینوزاست.^(۲) سودوموناس آئروژینوزا عامل بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی در بیماران با ایمنی تضعیف شده

تولید کننده آنزیم متالوبتالاکتاماز در باکتری‌های گرم منفی به ویژه سودوموناس آئروژینوزا مطرح شده‌اند.^(۱۰) با توجه به نقش و اهمیت مکانیسم‌های مقاومت در عفونت‌های فرصت طلب به ویژه سودوموناس آئروژینوزا در بین بیماران سوختگی و با توجه به این که آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز تأثیر مخربی بر روی داروهای گروه کارباپنم (ایمی‌پنم و مروپنم) دارند، این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ژن‌های bla_{IMP-1}، bla_{IMP-2}، bla_{SPM1} و bla_{KHM-1} در نمونه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتاماز جدا شده از بیماران سوختگی بستری در مرکز درمانی قطب‌الدین شیرازی انجام شد.

* مواد و روش‌ها:

این مطالعه مقطعی از مهر ماه ۱۳۹۱ تا مهر ماه ۱۳۹۲ بر روی ۲۱۰ نمونه انجام شد که از بیماران بستری در بیمارستان سوختگی قطب‌الدین شیرازی جمع‌آوری شده بودند. نمونه‌هایی که به وسیله سوآپ استریل به طور مستقیم از زخم بیماران گرفته شده بودند، پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی مرکز تحقیقات سوختگی شیراز منتقل و با استفاده از روش‌های استاندارد تشخیص میکروبی‌شناسی بررسی شدند. ابتدا نمونه‌ها بر روی محیط‌های نوترینت آگار، ائوزین متیلن بلو (EMB) و ژلوز خون‌دار کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس در میان هر پلیت از کلنی‌های رشد کرده، کلنی‌هایی با مشخصات احتمالی سودوموناس آئروژینوزا به صورت تصادفی انتخاب و با استفاده از آزمایش‌های تشخیصی بررسی شدند. نمونه‌های دارای مشخصه‌های زیر به عنوان سودوموناس آئروژینوزا در نظر گرفته شدند: قدرت تولید رنگدانه در محیط نوترینت آگار، مشاهده در رنگ‌آمیزی گرم به شکل باسیل‌های میله‌ای گرم منفی و بدون اسپور، از نظر آزمایش کاتالاز و اکسیداز مثبت، آزمایش TSI به صورت مثبت و دارای قدرت رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد.

مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به طور معمول براساس یکی از عملکردهای زیر صورت می‌گیرد که سودوموناس آئروژینوزا هم از این قضیه مستثنا نیست: ۱- میکروارگانیسم آنزیمی تولید می‌کند که موجب تخریب داروی فعال می‌شود. ۲- میکروارگانیسم نفوذپذیری خود را نسبت به دارو عوض می‌کند. ۳- میکروارگانیسم گیرنده‌های خود را که برای دارو لازم است تغییر می‌دهد. ۴- میکروارگانیسم به مسیر متابولیک فرعی دیگری دست می‌یابد که واکنش مهار شده توسط دارو را جبران می‌کند.^(۵)

یکی از مهم‌ترین عملکردهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است.^(۶) بهترین روش طبقه‌بندی بتالاکتامازها براساس ساختار مولکولی و بر پایه توالی اسیدهای آمینه آن‌هاست. در حال حاضر چهار کلاس از این آنزیم‌ها (A تا D) شناسایی شده‌اند که در این طبقه‌بندی عملکرد آنزیم‌ها نیز مشخص است. گروه‌های A و C و D عملکردی بر پایه آمینواسید سرین دارند. در حالی که گروه B، متالوبتالاکتاماز (MBLs) خوانده می‌شوند و دلیل آن نیز نیاز آن‌ها به فلز روی است.^(۷) از جمله عوامل مهم در مقاومت دارویی این باکتری، وجود آنزیم متالوبتالاکتاماز (MBL) در این باکتری است که در مطالعه‌های بسیاری بررسی و انواع ژن‌ها و آلل‌های مختلف آن شناسایی شده‌اند.^(۸)

متالوبتالاکتامازها اولین بار به صورت رسمی در سال ۱۹۸۰ توسط آمبلر، از بتالاکتامازهای سرینی جداسازی شدند. متالوبتالاکتامازها برای فعالیت خود به یک عامل کمکی فلزی (معمولاً فلز روی) احتیاج دارند. این گروه از آنزیم‌ها توسط ترکیب‌هایی همچون اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) و سدیم مرکاپتواستیک اسید مهار می‌گردند و این در حالی است که توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازی نظیر سولباکتام، تازوباکتام و یا کلاوولانیک اسید مهار نمی‌شوند.^(۹)

در مطالعه‌های مختلف ژن‌های متعددی (به ویژه SIM, GIM, SPM, AIM, VIM, IMP) به عنوان

یا مساوی ۵ میلی‌متر در اطراف دیسک‌های ترکیبی با EDTA نسبت به دیسک تکی، به عنوان باکتری مولد متالوبتالاکتاماز گزارش شد. در مرحله بعد، DNA تمامی نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای تأیید شده، براساس دستور کار کیت شرکت سیناژن (ایران) استخراج شد. جهت تکثیر ۴ ژن مورد نظر پرایمرهای زیر استفاده شدند.^(۱۳و۱۲)

(bla_{IMP-1}-F: 5'-ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC-3', bla_{IMP-1}-R: 5'-ACAACCAGTTTTGCCTTACC-3'), (bla_{IMP-2}-F:5'-GTTTTATGTGTATGCTTCC-3', bla_{IMP-2}-R:5'-AGCCTGTTCCCATGTAC-3'), (bla_{SPM-1}-F:5'-GCGTTTTGTTTGTGCTC-3', bla_{SPM-1}-R:5'-TTGGGGATGTGAGACTAC-3'), (bla_{KHM-1}-F: 5'-AGTGGATTGACGCGCAGGGC-3', bla_{KHM-1}-R: 5'-TTCCAGCAGCGATGCGTCGC-3').

برای انجام واکنش PCR، اجزای زیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در داخل میکروتیوپ‌های ۰/۲ میلی‌لیتر تهیه گردید: یک میکرولیتر (10mM) dNTPs، یک میکرولیتر PCR buffer، ۲/۵ MgCl₂ (50mM)، ۰/۲۵ از آنزیم Tag DNA polymerase 10X، ۱ میکرولیتر از هر کدام پرایمرهای bla_{IMP-1}، bla_{IMP-2}، bla_{SPM-1}، bla_{KHM-1} (با غلظت 10pmol) و ۲ میکرولیتر از ماده ژنومی مورد مطالعه. سپس میکروتیوپ‌ها طبق برنامه زیر در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, Singapore) قرار داده شدند تا واکنش تکثیر DNA انجام شود. مرحله اولیه جداسازی دو رشته در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه حرارتی به شرح زیر انجام شد: مرحله باز شدن دو رشته در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر برای ژن‌های (bla_{IMP-2}): دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، bla_{KHM-1}: دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، bla_{IMP-1}: دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، bla_{SPM-1}: دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه)، مرحله طویل شدن رشته هدف در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و

از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 جهت تأیید این نمونه‌ها استفاده شد. سپس برای تمام نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای تأیید شده، آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش کِری-بائِر انجام شد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده عبارت بودند از: پیپراسیلین + تازوباکتام، ایمپنم، مروپنم، کلرامفنیکل، آمیکاسین، جنتامایسین، توبرامایسین، کلیستین، سفنازیدیم، سفوتاکسیم، سفپیم و سیپروفلوکسازین.

در مرحله بعد، برای تشخیص سویه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) از روش دیسک‌های ترکیبی استفاده شد که در این آزمایش تمامی سویه‌های مقاوم سودوموناس آئروژینوزا انتخاب و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. بر روی پلیت‌ها علاوه بر دیسک‌های سفنازیدیم، سفوتاکسیم و سفپیم به صورت تکی، دیسک‌های ترکیبی (سفنازیدیم + کلاوولانیک اسید، سفوتاکسیم + کلاوولانیک اسید و سفپیم + کلاوولانیک اسید) نیز قرار داده شدند و سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در پایان، قطر هاله اطراف دیسک‌های ترکیبی نسبت به دیسک‌های تکی بر مقیاس میلی‌متر مقایسه گردید. اگر قطر هاله دیسک ترکیبی نسبت به دیسک تکی ۵ میلی‌متر بیش‌تر بود، آن نمونه به عنوان مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در نظر گرفته شد.^(۱۱) در ادامه برای تشخیص فنوتیپی جدایه‌های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز، از روش DDST Double Disk Synergy Test طبق روش پیشنهادی انستیتو استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) استفاده شد که در این روش، ۴ میکرولیتر محلول EDTA ۰/۵ مولار (به عنوان مهارکننده آنزیم MBL)، به دیسک‌های حاوی ایمپنم اضافه شد. سپس دیسک‌های تکی حاوی ایمپنم به همراه دیسک‌های آماده شده با EDTA بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله عدم رشد، در این دیسک‌ها بررسی شد. افزایش قطر هاله به میزان بیش‌تر

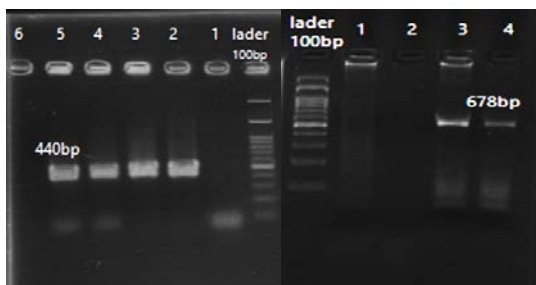
برای تأیید سویه‌های مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف به روش دیسک دیفیوژن نشان داد تمامی نمونه‌های مقاوم سودوموناس آئروژینوزا از لحاظ وجود ESBL، مثبت بودند. با شناسایی فنوتیپی نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتاماز به روش DDST از ۴۲ نمونه سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی، ۲۶ نمونه (۶۱/۹ درصد) به عنوان سویه‌های MBL شناسایی شدند (شکل شماره ۱).



شکل ۱- شناسایی فنوتیپی سویه‌های تولید کننده متالوبتالاکتاماز به روش DDST

(سمت راست: دیسک IMI و سمت چپ: دیسک IMI+EDTA)

با استفاده از واکنش PCR، از میان ۲۶ نمونه، ۵ نمونه (۱۹/۲۳ درصد) واجد ژن bla_{IMP-2} و ۴ نمونه (۱۵/۳۸ درصد) واجد ژن bla_{KHM-1} بودند. در ۱۷ نمونه هیچ یک از ژن‌های مورد مطالعه شناسایی نشدند و هیچ کدام از نمونه‌ها دو ژن از ژن‌های مورد مطالعه را به صورت همزمان نداشتند (شکل شماره ۲).



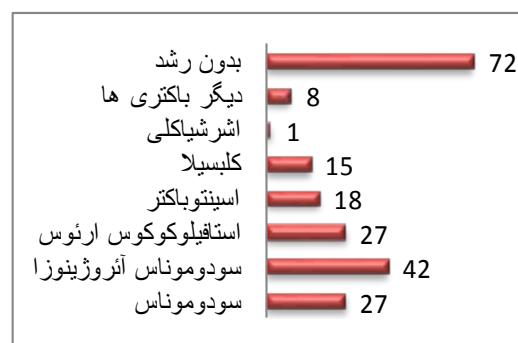
شکل ۲- نتایج حاصل از PCR

مرحله طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. محصول واکنش PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد ریخته و در داخل دستگاه الکتروفورز (Bio-Rad, Singapore) قرار داده شد. سپس به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و توسط دستگاه ترانس لومیناتور (ATP-Iran) مشاهده گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۶ و آزمون آماری مجذور کای تحلیل شدند.

* یافته‌ها:

از ۲۱۰ نمونه بالینی جمع‌آوری شده، ۹۳ نمونه (۴۴/۳ درصد) مربوط به زنان و ۱۱۷ نمونه (۵۵/۷ درصد) مربوط به مردان بود. ۴۲ نمونه (۲۰ درصد) با استفاده از روش فنوتیپی به عنوان سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شدند (نمودار شماره ۱).

نمودار ۱- فراوانی باکتری‌های جدا شده از بیماران مورد مطالعه با روش فنوتیپی



با استفاده از آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی، تمامی نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا (۱۰۰ درصد) به دیسک‌های زیر مقاوم بودند: پیراسیلین + تازوباکتام، ایمی‌پنم، مروپنم، آمیکاسین، سفزازیدیم، سفوتاکسیم، سیپروفلوکساسین، توپراماسین، جنتاماسین و سفپیم. تمام نمونه‌ها (۱۰۰ درصد) به کلیستین و ۵ نمونه (۱۱/۹ درصد) به کلرامفنیکل حساسیت نشان دادند. آزمایش حساسیت ضد میکروبی نسبت به دیسک‌های ترکیبی

است.^(۱۷) این میزان مقاومت در مقایسه با کشورهای اروپایی و آمریکای شمالی، بالاتر ولی در مقایسه با آمریکای جنوبی، آفریقا و کشورهای همسایه مانند هند و پاکستان مشابه بود.^(۱۸-۲۳)

در مطالعه حاضر تمامی نمونه‌ها به آنتی بیوتیک کلیستین حساسیت نشان دادند که در سایر مطالعه‌ها نیز نتایج مشابهی دیده می‌شود.^(۲۱)

به منظور شناسایی اولیه سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای دارای ژن‌های متالوبتالاکتاماز، از روش‌های فنوتیپی متفاوتی استفاده می‌شود. در مطالعه بشیر و همکاران در سال ۲۰۱۱ از روش‌های DDST، MIC imipenem plus EDTA combination و E-Test استفاده گردید.^(۲۳) در تحقیق حاضر شناسایی فنوتیپی نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای تولید کننده ژن‌های متالوبتالاکتاماز با روش DDST (Double Disk Synergy Test) انجام و از EDTA به عنوان یک بازدارنده متالوبتالاکتامازی استفاده شد. این روش ساده و به راحتی قابل تفسیر است و مشکلات سایر بازدارنده‌های متالوبتالاکتامازی مانند سمی بودن ۲- مرکاپتوپروپیونیک اسید، گران قیمت بودن و تغییرپذیر بودن E-Test را ندارد.^(۲۴)

حضور ژن‌های متالوبتالاکتاماز در مطالعه‌های مختلف در سراسر جهان بررسی شده است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ در برزیل انجام شد، ۳۰ درصد نمونه‌ها ژن‌های MBL (۸۱ درصد bla_{SPM-1} و ۱۹ درصد $vim-2$) را داشتند.^(۱۰) در مطالعه دیگری در شهر اراک (۱۳۹۱) بر روی نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا، حضور ژن‌های bla_{IMP-2} و bla_{SPM-1} منفی گزارش شد.^(۱۶) در مطالعه دیگری که رضانی و همکاران در سال ۱۳۹۲ در شهر زنجان بر روی نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا انجام دادند، ۲۴ درصد از نمونه‌ها تنها ژن bla_{IMP-1} را با خود حمل می‌کردند.^(۲۵) در مطالعه‌ای که اخیراً سرهنگی و همکاران در شیراز انجام داده‌اند حضور ژن‌های یافت شده در مطالعه حاضر، منفی گزارش شده است.^(۲۶) لذا به

شکل سمت چپ: bla_{KHM-1} (۱) شاهد منفی (۲) شاهد مثبت (۳،۴،۵) نمونه مثبت، طول محصول PCR ژن bla_{KHM-1} . ۴۴۰ bp شکل سمت راست: ژن bla_{IMP-2} (۱) نمونه منفی (۲) شاهد منفی (۳) شاهد مثبت (۴) نمونه مثبت، طول محصول PCR ژن bla_{IMP-2} ، ۶۷۸ bp

*بحث و نتیجه گیری:

در مطالعه حاضر، روش مولکولی PCR نشان داد که از ۲۶ نمونه تولید کننده متالوبتالاکتاماز به روش فنوتیپی، ۹ نمونه حامل ژن‌های bla_{KHM-1} و bla_{IMP-2} بودند و ژن‌های bla_{SPM-1} و bla_{IMP-1} شناسایی نشدند. در مطالعه‌ای در ژاپن نیز تعداد سویه‌های شناسایی شده به روش DDST با تعداد نمونه‌های مثبت در روش PCR برابر نبودند.^(۱۴) با توجه به این که در مطالعه حاضر ۱۶ نمونه سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به داروهای گروه کارباپنم، به عنوان متالوبتالاکتاماز شناسایی نشدند؛ این گونه می‌توان استنباط کرد که عملکردهای اختصاصی دیگری مثل تغییر در پورین پروتئین‌های دیواره و پمپ‌های افلاکس در این امر دخیل بوده‌اند. لذا پیشنهاد می‌شود عملکردهای متفاوت مقاومت در نمونه‌های مراکز درمانی به طور دقیق‌تری بررسی شود.

مشکل اساسی که در ارتباط با متالوبتالاکتامازها وجود دارد، الگوی مقاومت با طیف گسترده و بی‌رقیب در آن‌هاست. به علاوه، در بسیاری از موارد ژن‌های متالوبتالاکتاماز ممکن است بر روی پلاسمیدهایی قرار گرفته باشند که ژن‌های کدکننده شاخص‌های مقاومت آنتی بیوتیکی دارند. با توجه به بررسی‌های انجام شده، سویه‌های دارای ژن‌های متالوبتالاکتاماز معمولاً به بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلونئوروکینولون‌ها مقاوم هستند، ولی به پلی‌میکسین و کلیستین حساسیت نشان می‌دهند.^(۱۵) در تحقیق حاضر نسبت به تحقیق مشابه در گذشته، میزان مقاومت به ایمی‌پنم، سفتازیدیم و آمیکاسین افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است.^(۱۶)

همچنین مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف در مطالعه حاضر نسبت به مطالعه‌های قبلی بیش‌تر بوده

3. Yousefi S, Nahaei M, Farajnia S, Ghojzadeh M, Akhi M, Sharifi Y, et al. Class 1 integron and Imipenem resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence and antibiotic susceptibility. *Iran J Microbiol* 2010 Sep; 2 (3): 115-21.
4. Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad S. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. *Burns* 2006 May; 32 (3): 343-7.
5. Brooks G, Carroll K, Butel J. Jawetz, Melnick & Adelberge's Medical microbiology. 25th ed: London: Mc Graw-Hill; 2010. 253-6.
6. Akpaka PE, Legal B, Padman J. Molecular detection and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase genes prevalent in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *E coli* from Trinidad and Tobago. *West Indian Med J* 2010 Dec; 59 (6): 591-6.
7. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 Mar; 54 (3): 969-76.
8. Shahcheraghi F, Shakibaie MR, Noveiri H. Molecular identification of ESBL genes bla_{GES-1}, bla_{VEB-1}, bla_{CTX-M} bla_{OXA-1}, bla_{OXA-4}, bla_{OXA-10} and bla_{PER-1} in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients by PCR, RFLP and sequencing techniques. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation* 2010 Jan 20; 4 (1): 138-42.
9. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cantón R, Cauda R, Docquier JD, et al. Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents* 2007 Apr; 29 (4): 380-8.

نظر می‌رسد ژن‌های bla_{KHM-1} و bla_{IMP-2} برای اولین بار در شیراز شناسایی شده‌اند. شناسایی این دو ژن متالوبتالاکتاماز جدید، با شیوع پایین در شیراز نشان می‌دهد که سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای تولید کننده bla_{KHM-1} و bla_{IMP-2} در این ناحیه در حال گسترش است. به نظر می‌رسد چنین ژن‌هایی احتمالاً در جنوب غرب کشور وجود داشته، اما تا زمان مطالعه حاضر ناشناخته بوده‌اند. احتمال دارد این ژن‌های متالوبتالاکتاماز، از طریق سایر باکتری‌ها به سودوموناس آئروژینوزا یا از دیگر شهرها یا کشورها (گردش‌گران) به این ناحیه منتقل شده باشند. برای تعیین واریانت‌ها و تأیید نهایی آن‌ها باید توالی‌یابی انجام شود.

با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر و اهمیت تولید آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز و نقش آن در شکست درمان، تشخیص سریع این سویه‌ها در بیمارستان‌ها به ویژه در مراکز سوختگی می‌تواند باعث کنترل مؤثرتر انتشار این سویه‌ها شود. در نتیجه کارکنان پزشکی می‌توانند یک الگوی درمانی مناسب را انتخاب کنند که باعث کاهش هزینه‌های درمانی و خطرات جدی از جمله مرگ در این گروه از بیماران می‌شود.

* سپاس‌گزاری:

از همکاری آقای دکتر امیر امامی و خانم‌ها زردشت و پیرنیه قدردانی می‌شود.

* مراجع:

1. Japoni A, Farshad S, Alborzi A. *Pseudomonas aeruginosa*: burn infection, treatment and antibacterial resistance. *Iran Red Crescent Med J* 2009 Apr; 11 (3): 244-53.
2. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Identification and genetic characterization of metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* in Tehran, Iran. *New Microbiol* 2010 Jul; 33 (3): 243-8.

10. Franco M, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (Sao Paulo)* 2010 Mar; 65 (9): 825-9.
11. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 2008 Jan; 14 Suppl 1: 90-103.
12. 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 Dec; 41 (12): 5407-13.
13. Teo J, Ngan G, Balm M, Jureen R, Krishnan P, Lin R. Molecular characterization of NDM-1 producing Enterobacteriaceae isolates in Singapore hospitals. *Western Pac Surveill Response J* 2012 Mar 29; 3 (1): 19-24.
14. Ohara M, Kouda S, Onodera M, Fujiue Y, Sasaki M, Kohara T, et al. Molecular characterization of Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Hiroshima, Japan. *Microbiol Immunol* 2007 Mar; 51 (3): 271-7.
15. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005 Apr; 18 (2): 306-25.
16. Sadeghi A, Rahimi B, Shojapour M. Molecular detection of metallo-beta-lactamase genes blaVIM-1, blaVIM-2, blaIMP-1, blaIMP-2 and blaSPM-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in Markazi province by Duplex-PCR. *African J Microbiology Research* 2012 Mar 30; 6 (12): 2965-9.
17. 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 Jan; 60 (1): 125-8.
18. Bosnjak Z, Bedenic B, Mazzariol A, Jarza-Davila N, Suto S, Kalenić S. VIM-2 β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Zagreb, Croatia. *Scand J Infect Dis* 2010 Mar; 42 (3): 193-7.
19. Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, Louie TJ, Krulicki W, Livermore DM, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new blaIMP allele, bla(IMP-7). *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Jan; 46 (1): 255-8.
20. Furtado GH, Gales AC, Perdiz LB, Santos AF, Medeiros EA. Prevalence and clinical outcomes of episodes of ventilator-associated pneumonia caused by SPM-1-producing and non-producing imipenem - resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011 Oct; 44 (5): 604-6.
21. Hammami S, Gautier V, Ghazzi R, Da Costa A, Ben-Redjeb S, Arlet G. Diversity in VIM-2-encoding class 1 integrons and occasional blaSHV2a carriage in isolates of a persistent, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone from Tunis. *Clin Microbiol Infect* 2010 Feb; 16 (2): 189-93.
22. Nagaveni S, Rajeshwari H, Oli AK, Patil SA, Chandrakanth RK. Widespread emergence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from CSF samples. *Indian J Microbiol* 2011 Jan; 51 (1): 2-7.
23. Bashir D, Thokar MA, Fomda BA, Bashir G, Zahoor D, Ahmad S. The Detection of metallo-beta-lactamase (MBL) producing *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary care

hospital in Kashmir. African J Microbiology Research 2011 Jan 18; 5 (2): 164-72.

24. Pitout JD, Revathi G, Chow BL, Kabera B, Kariuki S, Nordmann P, et al. Metallo-beta - lactamase - producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. Clin Microbiol Infect 2008 Aug; 14 (8): 755-9.

25. Doosti M, Ramazani A, Garshasbi M. Identification and characterization of metallo-beta-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in University Hospital from Zanzan Province, Iran. Iran Biomed J 2013 Jul; 17 (3): 129-33.

26. Sarhangi M, Motamedifar M, Sarvari J. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing bla_{IMP1}, bla_{VIM2}, bla_{SIM1}, bla_{SPM1} in Shiraz, Iran. Jundishapur J Microbiol 2013 Sep; 6 (7): 1-5. [In Persian]