

## جداسازی و بررسی خصوصیات فتوتیپی و مولکولی ژنهای متالوبتالاکتاماز گونه‌های

### سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان ولیعصر زنجان

معصومه دوستی<sup>۱</sup>، علی رمضانی<sup>۲</sup>، مهدی حاج اجاق فقیهی<sup>۳</sup>

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز بهداشت استان زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران. (مؤلف مسئول)، تلفن ثابت: ۰۲۴۱-۴۲۷۳۶۳۹

ramazania@zums.ac.ir

۳. کارشناس ارشد باکتریولوژی، بیمارستان ولی عصر، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

#### چکیده

**زمینه و هدف:** عفونت توسط سودوموناس آئروژینوزا در تمام جهان گسترش یافته است و گزارشات مکرر انتشار متالوبتالاکتامازها نشان از سرعت رو به رشد آن دارد. هدف از این مطالعه تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی و تشخیص ژنهای متالوبتالاکتاماز (MBLs) از نوع IMP و VIM در سودوموناس آئروژینوزای ایزوله شده از انواع نمونه‌های بالینی استان زنجان می باشد.

**روش بررسی:** تعداد ۷۰ ایزوله‌ی سودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه، پس از انجام آزمایشات میکروبی و بیوشیمیائی تعیین هویت شدند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های تأیید شده به روش کایربی‌بوئر تعیین گردید. سپس سویه‌های تولید کننده‌ی متالوبتالاکتاماز به روش فتوتیپی (DDST) شناسائی شدند. از نظر ژنوتیپی ژن‌های متالوبتالاکتاماز VIM، IMP<sub>1</sub> و IMP در سویه‌های فوق باروش PCR بررسی گردیدند و ایزوله‌های MBL مثبت از نظر وجود ژن حمل کننده‌ی اینتگرون کلاس ۱ (INI<sub>1</sub>) مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته ها:** از ۷۰ سویه‌ی یافت شده سودوموناس آئروژینوزا به روش فتوتیپی بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌ها به ترتیب: مروپنم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، ایمپنم، جنتامایسین، پپراسیلین و سیپروفلوکساسین بود. در آزمون DDS مشخص گردید که از ۴۴ ایزوله مقاوم به ایمپنم تنها ۳۶ ایزوله تولید کننده‌ی آنزیم متالوبتالاکتاماز هستند. با انجام آزمون PCR ۳۳ سویه‌ی تولید کننده‌ی MBLs فتوتیپ مثبت، تأیید شدند که ۲۳ ایزوله حاوی ژن VIM (۵۲/۲٪) و ۱۰ ایزوله حاوی ژن IMP (۲۲/۳٪) بودند که ۸ سویه از آن، از نوع IMP<sub>1</sub> (۱۸/۲٪) بودند. همچنین مشخص گردید که از ۴۴ سویه‌ی مقاوم به ایمپنم تنها ۳۱ ایزوله (۷۰/۵٪) دارای کلاس ۱ اینتگرون بودند.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان می دهد که مقاومت آنتی بیوتیکی به سبب تولید آنزیم متالوبتالاکتامازها روند رو به رشدی در منطقه مورد مطالعه داشته و در میان سویه‌های تولید کننده MBLs، فراوانی ژن‌های VIM بیشتر از IMP گزارش شد.

**واژگان کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، ژن‌های متالوبتالاکتاماز، اینتگرون کلاس ۱، PCR

وصول مقاله: ۹۱/۱/۱۵ اصلاحیه نهایی: ۹۱/۸/۶ پذیرش: ۹۲/۱/۱۸

#### مقدمه

بیمارستانی، متحرک و هوازی اجباری است که گاهی منجر به ایجاد عفونت‌های کشنده در میزبان خود می شود و از مهمترین عوامل ایجاد عفونت‌های ثانویه اکتسابی از

سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) یک پاتوژن گرم منفی فرصت طلب

بیمارستان در بیماران دچار سوختگی و ICU است (۱). سودوموناس آئروژینوزا جزء عوامل ایجاد سیستمیک فیروزیس بوده و می‌تواند ایجاد سرطان و بیماری‌های دیگر نماید (۴-۲). درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری به علت مقاومت بالایی که به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها دارد مشکل است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند با منشاء کروموزومی و یا اکتسابی با منشاء پلاسمیدی باشد که در این حالت به سهولت می‌تواند بین سویه‌ها و گونه‌های مختلف حتی بین جنس‌های مرتبط باکتری‌ها منتقل شود. اخیراً سویه‌هایی با مقاومت چندگانه (Multidrug-resistant) در آن دیده شده‌اند. کارباپنم‌ها (دارای دو حلقه بتالاکتام و کارباپنم) از جمله ای‌می‌پنم (IPM) و مروپنم (MEM) از مهمترین آنتی‌بیوتیک‌های ضد میکروبی هستند که برای درمان سویه‌های مقاوم سودوموناس آئروژینوزا استفاده می‌شود (۵).

متالوبتالاکتام‌ها طیف وسیعی از بتالاکتام‌ها (آنتی بیوتیک‌های ضد دیواره سلولی) از جمله سفالوسپورین‌ها (نسل سوم و پنجم) کارباپنم‌ها و پنی‌سیلین‌ها را هیدرولیز می‌کنند (۶-۱). همچنین باعث ایجاد مقاومت در آمینوگلیکوزیدها می‌شوند، اما توانایی هیدرولیز مونوباکتام‌ها (فقط دارای یک حلقه بتالاکتام) مثل آزتروم را ندارد (۱).

MBLS ها برای انجام فعالیت‌های کاتالیتیکی خود نیاز به کوفاکتور فلزی روی دارند که توسط EDTA و ترکیبات تیول مهار می‌شود (۳). کارباپنمازهای کلاس B از متالوبتالاکتام‌ها طراحی شده‌اند، که براساس ساختار مولکولی به ۶ نوع تقسیم می‌شوند: AIM، SPM، GIM، SIM، IMP و UIM، که متداولترین آنها IMP و VIM هستند (۸ و ۷).

سودوموناس آئروژینوزا به علت دارا بودن ماهیت سیار ژنتیکی، می‌تواند باعث انتشار این آنزیم شده و انواع ژن و ترانسپوزون‌ها را وارد خود نموده و ایجاد سویه‌های مقاوم

نماید (۶). ژن‌های رمزکننده MBL روی اینتگرون کلاس ۱، روی پلاسمیدی که قادر است آنرا انتقال دهد قرار گرفته و در ارتباط با عناصر ژن‌های حرکتی (ترانسپوزون و اینتگرون) بوده و گاه می‌توانند قسمتی از یک کروموزوم باشند (۸ و ۷). برای تشخیص و ایزوله MBLs چندین روش فتوتیپی در دسترس است، اما هیچ پروتکل استاندارد توسط مؤسسه استانداردسازی آزمایشگاه بالینی (CLSI) پیشنهاد نشده ولی برای تأیید آن در حال حاضر PCR به عنوان یک روش حساس و قابل اطمینان بکار می‌رود. از PCR برای تشخیص سودوموناس آئروژینوزا و بررسی شیوع آن استفاده می‌شود (۱۰ و ۹).

هدف از این تحقیق مقایسه‌ی روش فتوتیپی و ژنوتیپی تشخیص سودوموناس آئروژینوزا و بررسی خصوصیات مولکولی ژن‌های اصلی ایجادکننده مقاومت در آنزیم متالوبتالاکتاماز (bla<sub>IMP</sub>, bla<sub>IMP-1</sub>, bla<sub>VIM</sub>) و ارتباط آن‌ها با ژن اینتگرون کلاس ۱ در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای بالینی و نزدیک شدن به اطلاعات اپیدمیولوژی برای دانستن توزیع مقاومت این باکتری در بیمارستان‌ها و کمک به تشخیص سریع مکانیسم‌های مقاومت است که به کمک PCR، درصد و فراوانی ژن‌های مقاومت ذکر شده در یکی از بیمارستان‌های زنجان به دست آمد.

### مواد و روش‌ها

مطالعه از نوع توصیفی بود که در طی یک سال (دی ماه سال ۱۳۸۹ تا دی ماه ۱۳۹۰) ۳۰۰ نمونه مختلف بالینی مانند ادرار، خون، زخم و ترشحات ریه از بخش‌های مراقبت‌های ویژه و سایر بخش‌های بیمارستان ولیعصر زنجان جمع‌آوری و نمونه‌ها جهت جداسازی سودوموناس آئروژینوزا به بخش میکروب‌شناسی آزمایشگاه انتقال و مورد شناسایی قرار گرفتند که از آن‌ها، تعدادی سوش به روش بیوشیمیایی و میکروبی به عنوان سودوموناس آئروژینوزا معرفی شدند. تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن (کایری‌بوئر) و بر اساس استانداردهای CLSI ارزیابی

مهارکننده‌های متالوبتالاکتاماز به کمک  $\text{FeCl}_2$ ، EDTA،  $\text{CuCl}_2$ ، ترکیبات تیول مانند مرکاپتواسستیک اسید، ۲ مرکاپتو پروپیلونیک اسید یا مرکاپتواتانول مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. سوسپانسیون رقیق شده از باکتری با رقت (۱۰۰) کلنی در میلی‌لیتر) با سوآپ روی محیط مولر هینتون پخش شد (طبق سفارش CLSI). سپس دیسک حاوی مهارکننده‌ی متالوبتالاکتاماز که در اینجا از ۴-۶ میکرولیتر EDTA با غلظت ۰/۵ مولار در لیتر استفاده شده به فاصله ۲۰ میلی‌متر مرکز به مرکز دیسک IPM با غلظت ۱۰ میکروگرم قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت انکوبه در ۳۷ درجه مشاهده‌ی هاله‌ی عدم رشد در اطراف دیسک ایمنی‌پنم نزدیک EDTA نشان دهنده‌ی تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز در باکتری و خنثی شدن آن توسط EDTA می‌باشد (۱۱) (شکل ۱).



شکل ۱. آزمون DDST در حضور دیسک حاوی EDTA و دیسک IPM

برای انجام PCR، ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix، که حاوی ۲/۵ میلی مولار  $\text{MgCl}_2$ ، ۲/۵ میلی مولار dNTPs، ۵ واحد آنزیم Tag پلیمرز به همراه ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکو مول) و DNA الگو با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر آماده نموده و با دستگاه PCR (i-cycler, Bio-Rad, USA) ژن هدف تکثیر شد. در تکثیر ژن‌ها با PCR ابتدا نمونه‌های تأیید شده‌ی سودوموناس آئروژینوزا با تست فنوتیپی DDS، جهت تکثیر ژن‌های MBL از جفت پرایمرهای اختصاصی که در جدول ۱ آورده شده است، استفاده گردید. از سویه‌های تولیدکننده‌ی ژن‌های VIM و IMP

شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده که از شرکت بادتن طب تهیه شده بودند بدین قرارند: سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، ایمنی‌پنم (۶ میکروگرم)، پیراسیلین (۱۰۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، بودند که به فاصله ۲/۴ سانتیمتر از یکدیگر (مرکز تا مرکز دیسک دیگر) روی محیط مورد نظر جاگذاری شده و بعد از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید. از سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

جهت تأیید فنوتیپی MBLs، جداسازی و شناسایی سویه‌های تولیدکننده‌ی متالوبتالاکتاماز از تست DDST (double-disk synergy test) استفاده شد که در آن

برای استخراج DNA و انجام آزمایش PCR از روش جوشاندن (Boiling) استفاده گردید. بدین صورت که ابتدا چند کلنی تازه از محیط کشت حاوی سودوموناس آئروژینوزای خالص را در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه یا آب مقطر استریل به شکل سوسپانسیون درآورده و به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد جوشانده و سپس با دور  $10000 \times g$  به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول روئی که حاوی DNA باکتری است برای PCR استفاده شد و رسوب کنار گذاشته شد (۱۲).

جهت تأیید درجه خلوص DNA در نمونه‌های استخراج شده از دستگاه بیوفوتومتر (Bio-Rad, USA) استفاده شد.

بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شده و باندها پس از رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید مشاهده شدند. در جدول ۲، شرایط *setup* واکنش *PCR* برای شناسایی ژن‌ها در سودوموناس آئروژینوزا ارائه شده است.

(*Acinetobacter baumannii* AC54/97 و *P. aeruginosa* COL-1) اخذ شده از انستیتو پاستور ایران استفاده شد (۱۳). سپس نمونه‌ها در کنار مارکر ۱۰۰ bp

جدول ۱: پروتکل مورد استفاده در *PCR* ژنهای *blaIMP*، *blaVIM*، *blaIMP1* و *INT1*

| ژن هدف         | پرایمر                                     | اندازه محصول bp | توالی پرایمر (۵'→۳')                                                 | رفرانس |
|----------------|--------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------|--------|
| <i>blaIMP</i>  | IMP-S<br>IMP-AS                            | ۴۴۶             | 5'-AAA GAT ACT GAA AAG TTA GT-3'<br>5'-TCY CCA AYT TCA CTR TGA CT-3' | ۴      |
| <i>blaIMP1</i> | IMP-F<br>IMP-R                             | ۵۸۷             | 5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3'<br>5'-AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3'             | ۷      |
| <i>blaVIM</i>  | VIM-S<br>VIM-AS                            | ۳۹۱             | 5'-CCGATGGTGTGTTGGTCGCAT-3'<br>5'-GAATGCGLAGCACCAGGAT-3'             | ۴      |
| <i>INT1</i>    | INT <sub>1</sub> -F<br>INT <sub>1</sub> -R | ۹۲۳             | 5'-GTTTCGGTCAAGGTTCTG-3'<br>5'-GCCAACTTTCAGCACATG-3'                 | ۷      |

جدول ۲: شرایط *Setup* واکنش *PCR* برای شناسایی ژنهای *blaIMP*، *blaVIM*، *blaIMP1* و *INT1* در سودوموناس آئروژینوزا

| ژن هدف (Target gene) | دنا تورا سیون اولیه (First Denaturation) | ۳۰ سیکل (Loop : 30)          |                                |                         | توسعه واکنش انتهایی (Extention final) |
|----------------------|------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
|                      |                                          | دنا تورا سیون (Denaturation) | دما ی اتصال پرایمر (Annealing) | توسعه واکنش (Extention) |                                       |
| <i>blaVIM</i>        | ۹۵ °C<br>۵ دقیقه                         | ۹۵ °C<br>۱ دقیقه             | ۵۸ °C<br>۱ دقیقه               | ۷۲ °C<br>۱ دقیقه        | ۷۲ °C<br>۷ دقیقه                      |
| <i>blaIMP</i>        | ۹۵ °C<br>۵ دقیقه                         | ۹۵ °C<br>۱ دقیقه             | ۵۴ °C<br>۴۰ ثانیه              | ۷۲ °C<br>۱ دقیقه        | ۷۲ °C<br>۱۰ دقیقه                     |
| <i>blaIMP1</i>       | ۹۴ °C<br>۵ دقیقه                         | ۹۴ °C<br>۱ دقیقه             | ۵۷ °C<br>۴۰ ثانیه              | ۷۲ °C<br>۴۵ ثانیه       | ۷۲ °C<br>۷ دقیقه                      |
| <i>INT1</i>          | ۹۴ °C<br>۵ دقیقه                         | ۹۴ °C<br>۱ دقیقه             | ۵۲ °C<br>۱ دقیقه               | ۷۲ °C<br>۲ دقیقه        | ۷۲ °C<br>۷ دقیقه                      |

### یافته ها

با رجوع به جدول ۳ مشاهده می‌شود که بیشترین تعداد سویه‌های جدا شده از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و با کمک آزمون‌های آمار توصیفی تجزیه و تحلیل شد.

آنها ثابت شده بود، توسط PCR با جفت پرایمرهای IMPAS و IMPS و جفت پرایمرهای VIMS و VIMAS تأیید گردیدند (شکل های ۲، ۳ و ۴).

۲۳ (۵۲/۳٪) ایزوله از ایزوله های مقاوم به ایمی پنم حامل ژن VIM و ۱۰ (۲۲/۸٪) ایزوله حامل ژن IMP (۴۹۹ bp) بودند که ۸ ایزوله از آن (۱۸/۲٪) از نوع IMP<sub>۱</sub> (۳۸۷bp) بودند.

روی ۴۴ سویه ی مقاوم به ایمی پنم PCR با جفت پرایمرهای INT<sub>۱</sub>F و INT<sub>۱</sub>R انجام شد و مشاهده گردید که ۳۱ عدد از نمونه های حاوی ژن متالوبتالاکتاماز، شامل اینتگرون کلاس ۱ بودند. از ۳۳ نمونه دارای ژن های VIM و IMP تنها ۵ نمونه به طور مشترک دارای هر دو ژن بودند و ۴ نمونه از این ها روی اینتگرون کلاس ۱ واقع شده بودند.

ویژه (ICU)، مربوط به ترشحات ریه بوده که در آن تعداد و درصد نمونه های بالینی بیماران نیز نشان داده شده است.

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام به روش کایری بوئر بر روی ۷۰ نمونه ایزوله سودوموناس آیروزینوزا بدین قرار بود:

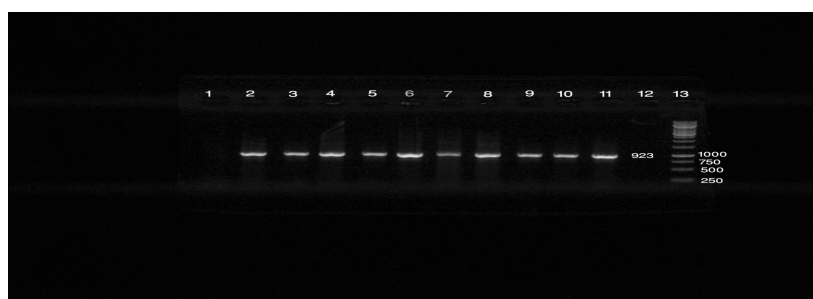
۹۸/۶٪ از سویه ها به مروپنم، ۹۱/۷٪ به سفوتاکسیم، ۷۸/۹٪ به سفتازیدیم، ۶۳/۸٪ به ایمی پنم، ۵۵/۱٪ به جنتامایسین و ۴۰/۹٪ به سیپروفلوکساسین و ۴۴/۹٪ به پپراسیلین مقاوم بودند که در جدول شماره ۴ نشان داده شده است.

درآزمون کایری بوئر مشاهده شد که ۴۴ ایزوله از ۷۰ ایزوله (۶۳/۸٪) مقاوم به ایمی پنم هستند. در آزمون DDST تعداد ۳۶ نمونه تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز را نشان دادند.

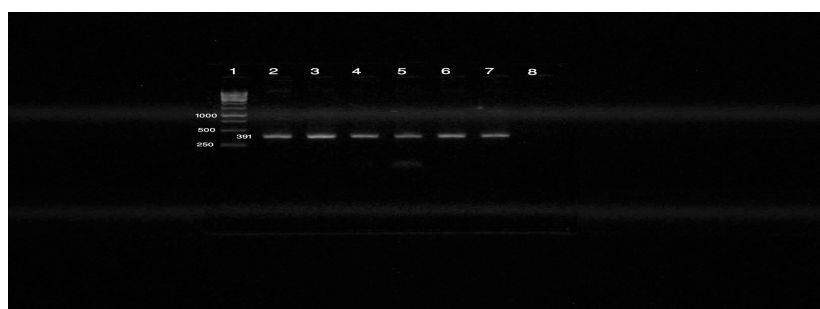
PCR بر روی تمام ایزوله های مقاوم به ایمی پنم (۴۴ ایزوله) انجام گرفت و ۳۳ ایزوله از سویه هایی که توسط DDST و از نظر فنوتیپی مثبت شده بودند و وجود متالوبتالاکتاماز در

جدول ۳: انواع، تعداد و درصد ایزوله های جدا شده از بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه (ICU)

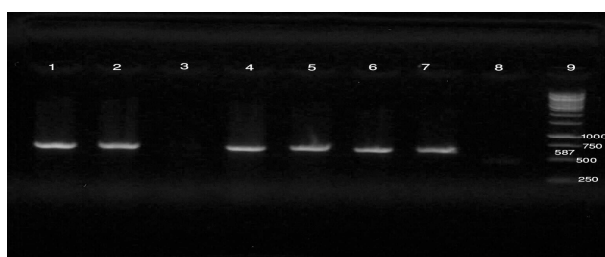
| نوع نمونه  | تعداد سوشهای ایزوله شده | تعداد |
|------------|-------------------------|-------|
| ترشحات ریه | ۷۷/۱٪                   | ۵۴    |
| ادرار      | ۱۰٪                     | ۷     |
| مدفوع      | ۵/۷٪                    | ۴     |
| زخم        | ۲/۸٪                    | ۲     |
| خلط        | ۲/۸٪                    | ۲     |
| چشم        | ۱/۴٪                    | ۱     |



شکل ۲: نتیجه آزمون PCR ژن INT<sub>۱</sub> (طول محصول: ۹۲۳ bp). ۱- Negative Control  
۲- Posetiv Control ۳-۱۱ نمونه ۱۲- نمونه E.coli ۱۳- DNA Lader



شکل ۳: نتیجه آزمون PCR ژن *bla VIM* (طول محصول: ۳۹۱ bp). ۱- DNA Lader  
۲- Posetiv Control ۳- نمونه منفی ۸- Negative Control



شکل ۴: نتیجه آزمون PCR ژن *bla IMP1* (طول محصول: ۵۸۷ bp). ۱- Posetiv Control  
۲- ۶-۵-۴-۷ نمونه مثبت ۳- نمونه منفی ۸- Negative Control ۹- DNA Lader

جدول ۴: درصد حساسیت و مقاومت سویه های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های بیماران بستری در بیمارستان ولیعصر زنجان.

| آنتی بیوتیک<br><i>Antibiotic</i> | مقاوم<br><i>Resistant</i> | نیمه حساس<br><i>Intermediate</i> | حساس<br><i>susceptible</i> |
|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| ایمی پنم                         | ۶۳/۸٪                     | ۰٪                               | ۳۶/۲٪                      |
| پیراسیلین                        | ۴۴/۹٪                     | ۴/۳٪                             | ۵۰/۷٪                      |
| سیپروفلوکساسین                   | ۴۰/۶٪                     | ۱/۴٪                             | ۵۸٪                        |
| جنتامایسین                       | ۵۵/۱٪                     | ۲/۹٪                             | ۴۲٪                        |
| مروپنم                           | ۹۸/۶٪                     | ۰٪                               | ۱/۴٪                       |
| سفتازیدیم                        | ۷۸/۹٪                     | ۳/۵٪                             | ۱۷/۵٪                      |
| سفوتاکسیم                        | ۹۱/۷٪                     | ۰٪                               | ۸/۳٪                       |

## بحث

شمار می آیند. با توجه به اهمیت بالینی ارگانسیم های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز و ایجاد مقاومت در درمان عفونت های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا کنترل انتشار آن ضروری است.

متالوبتالاکتامازها به عنوان یکی از مهمترین مکانسیم های دخیل در ایجاد مقاومت به ترکیبات دارویی مانند کارباپنم ها از جمله ایمی پنم و مروپنم که از مهمترین آنتی بیوتیک های ضد میکروبی در درمان سودوموناس آئروژینوزا هستند، به

E.test روی ۳۵۰ ایزوله‌ی سودوموناس آيروژینوزا دریافت که ۱۵ ایزوله (۳٪) حامل ژن‌های متالوبتالاکتاماز هستند (۱۳).

در سال ۲۰۰۸ در کشور پرتغال از ۴۰ ایزوله‌ی مثبت در DDS تنها ۲۶ ایزوله (۱۹/۴٪) با PCR تأیید شدند که همه از نوع VIM بودند (۱۷). یوسفی در سال ۲۰۱۰ بر روی ایزوله‌های جدا شده از شمال غرب ایران آزمون DDS انجام داد که از ۱۳۹ سویه تنها (۳۷/۵٪) دارای MBLs بودند. از این تعداد ۲۴ ایزوله (۲۳/۱٪) با PCR مثبت شدند که از آن ۱۸ ایزوله دارای ژن VIM و ۶ ایزوله دارای ژن IMP بودند (۱۱). در این مطالعه حضور اینتگرون کلاس ۱ در ۳۱ (۷۰/۵٪) سویه از سویه‌های مقاوم به ایمنی پنم توسط PCR تأیید شد و مشخص گردید که ۱۸ ایزوله از ۳۳ سویه‌ای که حامل ژن‌های متالوبتالاکتاماز VIM و IMP بودند (۱۱ ایزوله VIM و ۹ ایزوله IMP) توسط کلاس ۱ اینتگرون حمل می‌شوند.

در مطالعه‌ای که توسط Cheng در چین در سال ۲۰۰۸ انجام گرفت مشاهده شد که ژن اینتگرون کلاس ۱ در ۴۳/۵٪ از سویه‌های VIM و در یک ایزوله IMP مثبت وجود دارد (۷). در سال ۲۰۱۰ یوسفی روی ایزوله‌های شمال غرب ایران نشان داد که ۹۲/۵٪ از ایزوله‌های مقاوم به ایمنی پنم توسط اینتگرون کلاس ۱ حمل می‌شوند (۱۱).

### نتیجه گیری

نتایج کلی تحقیق نشان از افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی دارد. این مطالعه برای اولین بار بیشترین تعداد سویه‌های سودوموناس تولید کننده‌ی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز از نوع IMP را در ایران گزارش نمود و وجود همزمان ژن‌های IMP از نوع IMP-1 و VIM بر روی اینتگرون کلاس ۱ مشاهده گردید.

با توجه به اهمیت بالینی ارگانسیم‌های تولید کننده‌ی متالوبتالاکتاماز همچنین گزارش دقیق و سریع آنزیم‌های تولید کننده MBL، ایجاد مقاومت‌های چندگانه به داروها

در این مطالعه، فراوانی درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های تولید کننده‌ی متالوبتالاکتاماز بر روی نمونه‌های بالینی بیمارستان ولی عصر زنجان انجام گرفت که نتیجه تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی و میزان مقاومت به ایمنی پنم ۴۴ ایزوله (۶۳/۸٪) بود که در مقایسه با گزارش Japoni و Khosravi به ترتیب ۳۲/۹٪ و ۴۱٪ روند رو به رشدی داشته که تجویز گسترده و نابجای آنتی‌بیوتیک‌ها خصوصاً فلوروکینولون‌ها و کارباپنم‌ها سبب افزایش نمونه‌های مقاوم می‌شود (۱۴ و ۵).

ضمن بررسی الگوی مقاومت، مشاهده شد که ۲۹/۵٪ از ایزوله‌های مقاوم به ایمنی پنم نسبت به سیپروفلوکساسین یا پیراسیلین حساس هستند و این دو دارو مؤثرترین آنتی‌بیوتیک در درمان سودوموناس آيروژینوزا بوده و میزان مقاومت به آن‌ها از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها کمتر است.

نتیجه آزمون فنوتیپی تشخیص متالوبتالاکتامازها که در این تحقیق از روش DDST استفاده شد، مشاهده گردید که از ۴۴ سویه مقاوم به ایمنی پنم تنها ۳۶ ایزوله دارای MBLs بودند که از این تعداد ۳۳ ایزوله با روش PCR تأیید گردیدند و از آن ۲۳ (۵۲/۳٪) ایزوله دارای ژن VIM و ۱۰ سویه (۲۲/۷٪) دارای ژن IMP بودند. ۸ مورد (۱۸/۲٪) از IMPها از نوع IMP<sub>1</sub> بودند. Luzzaro در ایتالیا از ۵۰۶ ایزوله سودوموناس آيروژینوزا ۰/۷٪ محصول MBL گزارش نمود که تمام آن‌ها حامل ژن VIM بودند (۱۵). در ژاپن Yatsuyanagi بر روی ۴۲ ایزوله‌ی تولید کننده MBL که از آزمون DDS جدا شده بودند PCR انجام داد که نتیجه آن وجود ۸ سویه‌ی حامل ژن VIM و ۲۴ سویه حامل ژن IMP بودند (۱۶).

خسروی از اهواز در سال ۲۰۰۷ با انجام PCR و E.test روی ۱۰۰ ایزوله‌ی سودوموناس آيروژینوزا نشان داد که ۸ سویه (۱۹/۵۱٪) از ۴۱ سویه مقاوم به ایمنی پنم تولید کننده متالوبتالاکتاماز و حامل ژن VIM بودند (۵).

رضایی از تهران بیان نمود که ۶۱/۴۳٪ از ایزوله‌ها حامل ژن VIM هستند (۱۱). در سال ۱۳۸۶ شاهچراغی با انجام آزمون

PCR، درصد و فراوانی ژن‌های مقاومت ذکر شده در یکی از بیمارستان‌های زنجان به دست آمد.

### تشکر و قدردانی

در پایان لازم است از همکاران بخش میکروب شناسی بیمارستان حضرت ولی عصر (عج) و همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشکده داروسازی زنجان که با همکاری خود ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تشکر و قدردانی نمایم.

در درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا، معضل جدی رو به پیشرفتی است که کنترل انتشار آن ضروری بوده و جهت جایگزینی آنتی بیوتیک‌های مناسب در جهت کاهش شیوع این ژن‌ها، خصوصاً در سال‌های اخیر که مقاومت میکروبی در اکثر گونه‌های باکتری‌ها رو به تزايد است، الزاماً به آنتی بیوتیک‌های جدید و مناسب نیاز خواهد بود.

همچنین نزدیک شدن به اطلاعات اپیدمیولوژی برای دانستن توزیع مقاومت این باکتری در بیمارستان‌ها و کمک به تشخیص سریع مکانیسم‌های مقاومت که با بهره‌گیری از

### Reference

1. Rodrigues AC, Chang MR, Nobrega GD, Rodrigues MS, Carvalho NC, Gomes BG, and et al. Metallo-beta-lactamase and genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units in Campo Grande, MS, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2011 ;15:195-9.
2. Woods D E & Iglewski B. HToxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. *Reviews of Infectious Disease* 1983; 5:714-22.
3. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2000; 2:1051-1060.
4. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005;352: 1992-2001.
5. Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60:125-8.
6. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005 ;43:3129-35.
7. Cheng X, Wang P, Wang Y, Zhang H, Tao C, Yang W, and et al. Identification and distribution of the clinical isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-beta-lactamase and/or class 1 integron genes. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2008;28:235-8.
8. Bahar MA, Jamali S, Samadikuchaksaraei A. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains carry metallo-beta-lactamase gene bla(VIM) in a level I Iranian burn hospital. *Burns* 2010;36:826-30.
9. Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of exotoxin A gene using PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:3739-3745.
10. De Vos D, Lim Jr A, Pirnay JP, Struelens M, Vandenvelde C, Duinslaeger L, and et al. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, oprI and oprL. *J Clin Microbiol* 1997;35:1295-1299.

11. Yousefi S, Farajnia S, Nahaei MR, Akhi MT, Ghotaslou R, Soroush MH, and et al. Detection of metallo-beta-lactamase-encoding genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in northwest of Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68:322-5.
12. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, and et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:1089-94.
13. 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;33:243-8.
14. 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;32:343-7.
15. Luzzaro F, Endimiani A, Docquier JD, Mugnaioli C, Bonsignori M, Amicosante G, and et al. Prevalence and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48:131-5.
16. Yatsuyanagi J, Saito S, Harata S, Suzuki N, Ito Y, Amano K, and et al. Class 1 integron containing metallo-beta-lactamase gene blaVIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:626-8.
17. Pena A, Donato AM, Alves AF, Leitaó R, Cardoso OM. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamase VIM-2 in a central hospital from Portugal. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27:1269-71.
18. Rezaei YH, Behzadian NG, Peerayeh SN, Mostsfaei M. Prevalence and detection of metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from clinical isolates in Iran. *Ann Microbiol* 2007;57:293-6.