

Detection of blaIMP, blaVIM and OprD Genes among Pseudomonas aeruginosa Isolated from Burn Patients

Mehrzaad Sadredinamin¹,
Ali Hashemi²,
Hossein Goudarzi³,
Samira Tarashi¹,
Neda Yousefi Nojookambari⁴,
Elahe Taki¹

¹ MSc in Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ MSc Student in Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received November 30, 2014 Accepted April 11, 2016)

Abstract

Background and purpose: The prevalence of antibiotic resistant *P. aeruginosa* strains became a major problem in treatment of burn patients. The aim of this study was to determine the frequency of bla_{IMP}, bla_{VIM} and oprD genes among *P. aeruginosa* isolated from hospitalized burn patients in Tehran Shahid Motahari Hospital, Iran.

Materials and methods: This descriptive study was performed on *P. aeruginosa* strains isolated from hospitalized burn patients in Shahid Motahari Hospital. Antibiotic resistance phenotypic pattern was evaluated by Kirby Bauer disk diffusion method. The phenotypic investigation of metallo-beta-lactamase (MBL) producers was evaluated by Combined Diffusion Tests Disk (CDDT) method. The prevalence of bla_{IMP-1}, bla_{VIM-1} and oprD genes was investigated by PCR and sequencing methods.

Results: From 100 *P. aeruginosa* strains, 95 isolates were resistant to imipenem and meropenem which 81 were MBL producing strains. Among all isolates, 13 carried bla_{IMP-1} gene, whereas all of strains were negative for bla_{VIM-1} gene. In this study we detected two insertion sequence (IS) including ISPpu21 and ISPa1328 among PCR products that were larger than expected.

Conclusion: The *P. aeruginosa* infections could be prevented and controlled by identification of drug resistance patterns and beta-lactamases.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, metallo-beta-lactamase, bla_{IMP-1}, bla_{VIM-1}, OprD

تشخیص ژن های *blaIMP*، *blaVIM* و *OprD* در سویه های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران سوختگی

مهرزاد صدرالدین امین^۱

علی هاشمی^۲

حسین گودرزی^۳

سمیرا تراشی^۱

ندا یوسفی نوجو کامبری^۴

الهه تاکی^۱

چکیده

سابقه و هدف: شیوع جدایه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به آنتی بیوتیک، درمان بیماران سوختگی را با مشکل مواجه کرده است. لذا هدف از این مطالعه، تشخیص ژن های *blaIMP*، *blaVIM* و *OprD* در سویه های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران سوختگی بوده است.

مواد و روش ها: در مطالعه توصیفی حاضر که در فاصله سال های ۹۳ تا ۹۴ روی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی بستری در بیمارستان سوانح سوختگی شهید مطهری شهر تهران انجام شد، تست های حساسیت ضد میکروبی با استفاده از روش های دیسک دیفیوژن انجام گردید و برای شناسایی سویه های تولید کننده متالوبتالاکتاماز از روش دیسک ترکیبی استفاده شد. فراوانی ژن های *blaIMP-1*، *blaVIM-1* و *OprD* با استفاده از روش PCR و sequencing مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: از ۱۱۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا، ۹۵ سویه مقاوم به ایمی پنم و مروپنم بودند که در این میان، ۸۱ سویه تولید کننده متالوبتالاکتاماز بودند. ۱۳ سویه سودوموناس آئروژینوزا دارای ژن *blaIMP-1* بودند ولی هیچ یک از ایزوله ها ژن *blaVIM-1* را نداشتند. سویه های واجد قطعه های بزرگ تر در ژن *OprD* دارای توالی الحاقی ISPpu21 و ISPa1328 بودند.

استنتاج: می توان با شناسایی الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی و بتالاکتامازها از انتشار سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک جلوگیری کرد.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، متالوبتالاکتاماز، *blaIMP-1*، *blaVIM-1*، *OprD*

مقدمه

از سودوموناس آئروژینوزا به دلیل وجود مقاومت های ذاتی و اکتسابی، مشکلات فراوانی را برای بیماران ایجاد کرده است. از کاربایتم ها برای درمان سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک ها استفاده می شود ولی اخیراً سویه های مقاوم به کاربایتم در سرتاسر جهان گسترش یافته اند (۴،۳).

سودوموناس آئروژینوزا به عنوان عامل عفونت هایی از قبیل سپتی سمی، پنومونی، عفونت های دستگاه ادراری، اندوکاردیت، عفونت های پوستی، عفونت های گوش، عفونت های چشمی و عفونت ثانویه در بین بیماران سوختگی می باشد (۱،۲). درمان عفونت های ناشی

E-mail: hg0d100@yahoo.com

مؤلف مسئول: حسین گودرزی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی

۱. کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. استاد، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۱۰/۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱/۲۳

یکی از مکانیسم‌های مقاومت به کاربایتم‌ها در سویه‌های پسدوموناس آئروژینوزا موتاسیون و وجود عناصر الحاقی در پروتئین غشای خارجی (OprD) می‌باشد که نتیجه آن کاهش بیان یا غیر فعال شدن این پورین است (۴). از دیگر مکانیسم‌های مقاومت، متالوبتالاکتامازها شامل blaIMP و blaVIM می‌باشند که روی عناصر ژنتیکی متحرک قرار دارند و به راحتی بین باکتری‌ها منتقل می‌شوند (۵،۶). لذا هدف از این مطالعه، تشخیص ژن‌های blaVIM، blaIMP و OprD در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی بوده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی، در بین سال‌های ۹۳ تا ۹۴ روی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان سوانح سوختگی شهید مطهری شهر تهران انجام گردید.

شناسایی باکتری‌ها

برای نمونه‌گیری، ابتدا محل زخم بیماران با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد، سپس به وسیله یک سواب استریل نمونه‌گیری به عمل آمد و سواب‌ها داخل محیط انتقالی استوارت قرار گرفته و روی محیط‌های سیتیماید آگار و مک‌کانکی آگار کشت داده شدند. از روش‌های بیوشیمیایی شامل تست اکسیداز، تخمیر قند، سیترات، تست OF، تست حرکت، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، تست متیل‌رد و ووگس-پروسکوئر (VP-MR) برای تشخیص ایزوله‌ها استفاده شد (۲).

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی فنوتیپی سویه‌های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز

حساسیت ۱۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا بر اساس روش دیسک دیفیوژن و طبق دستورالعمل‌های CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) برای آنتی‌بیوتیک‌های مختلف انجام گردید (۷). در این مطالعه از روش دیسک ترکیبی با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های

ایمی‌پنم و مروپنم به تنهایی و در ترکیب با EDTA جهت شناسایی سویه‌های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز استفاده گردید. بر این اساس، سویه‌هایی که تفاوت قطر هاله رشدشان هنگام استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در ترکیب با EDTA مساوی یا بیش‌تر از ۷ میلی‌متر از آنتی‌بیوتیک به تنهایی باشند، مثبت در نظر گرفته می‌شوند (۸). سوش استاندارد سودوموناس آئروژینوزا PA83(KM359726) به عنوان سویه کنترل در نظر گرفته شد.

استخراج DNA و انجام روش PCR برای شناسایی ژن‌های *oprD*، *blaVIM-1*، *blaIMP-1*

استخراج DNA با استفاده از پروتکل کیت (GeNet Bio Company, Korea, Cat. No. K-3000) صورت گرفت. شناسایی ژن‌های *blaVIM-1*، *blaIMP-1* و *oprD* با استفاده از روش PCR و پرایمرهای ذکر شده در جدول شماره ۱ انجام شد (۸-۱۰).

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده در روش PCR

دمای آنیلینگ (°C)	سایز محصول (bp)	ژن هدف	توالی (5' to 3')
۵۴	۳۹۰	VIM1-F	GATGGTGTGGTTCGCATA
		VIM1-R	CGAATGCGCAGCACCAG
۴۷	۵۷۸	IMP1-F	GAAGCGTTTATGTCATAC
		IMP1-R	GTAAGTTTCAAGAGTGATGC
۵۰	۱۳۳۹	OprDF1	ATGAAAGTGATGAAAGTGAG
		OprDR1	CAGGATCGACAGCGGATAGT

برای انجام PCR، از Master Mix 2x شرکت سیناکلون (CAT. NO.: PR901638) که شامل ۰/۴ میلی‌مول از هر dNTP، ۳ میلی‌مول از MgCl₂، ۰/۰۸ واحد از آنزیم Taq پلیمرراز بود، استفاده شد. برنامه PCR شامل ۳۶ سیکل در دستگاه ترموسایکلر تحت شرایط موجود در جدول شماره ۲ تنظیم شد.

جدول شماره ۲: شرایط لازم برای انجام PCR

فاکتور	دما (°C)	زمان
مرحله		
واش‌رشت اولیه	۹۴	۵ دقیقه
واش‌رشت شدن	۹۴	۴۵ ثانیه
اتصال پرایمرها	۵۴	۴۵ ثانیه
طول‌سازی	۷۲	۱ دقیقه
طول‌سازی پایانی	۷۲	۵ دقیقه
تعداد سیکل	۳۶	-----

از سویه سودوموناس آئروژینوزا با شماره KP780165 ثبت شده در NCBI به عنوان کنترل ژن blaIMP-1، سودوموناس آئروژینوزا با شماره KT313641 ثبت شده در NCBI به عنوان کنترل ژن blaVIM-1 و سودوموناس آئروژینوزا PAO1 به عنوان کنترل ژن oprD استفاده گردید.

تعیین توالی

محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت بایونیر کره جنوبی فرستاده شد. برای آنالیز نتایج تعیین توالی از نرم افزار Chromas 1.45 و blast در NCBI استفاده گردید.

یافته ها و بحث

پسودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک عامل عفونت بیمارستانی با مقاومت آنتی بیوتیکی بالا در بین بیماران مبتلا به سوختگی مطرح است (۹، ۱۱). نتایج حاصل از روش دیسک دیفیوژن روی ۱۰۰ سویه پسودوموناس آئروژینوزا نشان داد که ۹۵ درصد سویه ها به کارباپنم ها از جمله ایمی پنم و مروپنم مقاوم بودند. مقاومت به آنتی بیوتیک ها به قرار زیر است: ۹۵ درصد از سویه ها به ایمی پنم، ۹۵ درصد به مروپنم، ۹۴ درصد به دری پنم، ۷۵ درصد به سفنازیدیم، ۹۱ درصد به آمیکاسین، ۹۸ درصد به تیکارسیلین، ۹۰ درصد به پیراسیلین، ۸۲ درصد به پیراسیلین / تازوباکتام، ۹۴ درصد به سیپروفلوکساسین، ۹۳ درصد به سفپیم، ۹۰ درصد به آزترونام، ۹۵ درصد به جنتامايسين و ۰ درصد به کلیستین مقاوم بودند. در دو مطالعه انجام شده توسط فلاح و همکاران و شاهچراقی و همکاران، علی رغم وجود مقاومت نسبت به بتالاکتام ها (شامل سفالوسپورین های نسل سوم و کارباپنم ها)، آنتی بیوتیک کلیستین با ۱۰۰ درصد حساسیت به عنوان موثرترین آنتی بیوتیک ها شناسایی شدند (۱۲، ۸). تولید متالوبتالاکتاماز به عنوان یکی از مکانیسم های مقاومت به کارباپنم ها در بین سویه های پسودوموناس آئروژینوزا مطرح است (۱۳، ۱۴). در مطالعه حاضر ۸۵/۲ درصد از سویه ها تولید کننده متالوبتالاکتاماز بودند. در مطالعه فلاح و

همکاران و حاکمی و همکاران به ترتیب ۵۸/۲ درصد و ۱۷/۳ درصد از سویه ها دارای متالوبتالاکتاماز بودند (۱۴، ۸). بر اساس نتایج PCR مشخص شد ۱۶ درصد از سویه ها واجد ژن blaIMP-1 بودند در حالی که هیچ یک از سویه ها واجد ژن blaVIM-1 نبودند. نتایج مربوط به ژن blaVIM-1 مشابه نتایج فلاح و همکاران (۸) و حاکمی و همکاران (۱۴) بود، در حالی که شیوع ژن blaIMP-1 در این دو مطالعه کم تر از مطالعه حاضر بوده است. در مورد پورین OprD از میان ۱۰۰ سویه پسودوموناس آئروژینوزا، ۲۲ ایزوله دارای محصول سنگین تر از حد انتظار بودند و ۹ سویه فاقد این پورین بودند. از این رو محصولات PCR تعیین توالی شدند و توسط سایت <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin> با سویه پسودوموناس آئروژینوزا PAO1 مقایسه شدند و مشخص شد قطعه های ISPpu21 و ISPa1328 مسئول ایجاد قطعه های بزرگ تر در ژن OprD هستند. در مطالعه حاضر متالوبتالاکتامازها و عناصر الحاقی باعث مقاومت ایزوله ها به بسیاری از آنتی بیوتیک ها شده اند ولی بسیاری از مکانیسم های دیگر از قبیل پمپ های ترشحی نیز باعث مقاومت در بین ایزوله ها می شوند که همین امر باعث به وجود آمدن سویه های با مقاومت چند دارویی شده است. مرگ و میر به علت عفونت ناشی از باکتری ها به عنوان یک مشکل جدی در سرتاسر جهان باقی مانده است (۱۵). در پایان می توان نتیجه گیری کرد که شیوع ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به آنتی بیوتیک در بخش های سوختگی بسیار بالا می باشند و متاسفانه این سویه ها با کسب عناصر ژنتیکی مقاوم از قبیل اینتگرون ها به بسیاری از آنتی بیوتیک ها مقاوم شده اند و قادرند این عناصر مقاومتی را به دیگر باکتری ها منتقل کنند. علاوه بر این به علت جهش و وجود تراسپوزون در پورین ها از جمله *oprD* باکتری ها به بسیاری از آنتی بیوتیک ها مقاوم شده اند.

سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل اجرای طرح تحقیقاتی مصوب

پزشکی شهید بهشتی با کد ثبت ۱۳۲۰۲ می باشد.

در معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم

References

1. Li H, Luo Y-F, Williams BJ, Blackwell TS, Xie C-M. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol* 2012; 302(2): 63-68.
2. Jafari M, Fallah F, Borhan RS, Navidinia M, Karimi A, Tabatabaei SR, et al. The first report of CMY, aac (6')-Ib and 16S rRNA methylase genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Iran. *Arch Pediatr Infect Dis* 2013; 1(3): 109-112.
3. Roodsari MR, Fallah F, Taherpour A, Vala MH, Hashemi A. Carbapenem-resistant bacteria and laboratory detection methods. *Arch Pediatr Infect Dis* 2013; 1(4): 188-191.
4. Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodríguez C, Roman E, Tubau F, Macia MD, et al. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and-susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Aents Chemother* 2012; 56(4): 1703-1713.
5. Hashemi A, Fallah F, Taherpour A, Goudarzi H, Tarashi S, Erfanimesh S, et al. Detection of Metallo-beta-Lactamases, Extended-spectrum Beta-lactamases (ESBLs), Outer Membrane Porins among *Klebsiella Pneumoniae* Strains Isolated from Hospitalized Patients in Tehran. *J Zanjan Univ Med Sci* 2015; 23(98-and 3): 89-102.
6. Fallah F, Taherpour A, Borhan RS, Hashemi A, Habibi M, Sajadi Nia R. Evaluation of *Zataria MultiFlora Boiss* and *Carum copticum* antibacterial activity on IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Burns Fire Disasters*. 2013; 26(4): 193-198.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-second informational supplement. Wayne, Pennsylvania, USA: CLSI; 2015.
8. Fallah F, Borhan R, Hashemi A. Detection of bla (IMP) and bla (VIM) metallo-beta-lactamases genes among *Pseudomonas extended-spectrum ss-lactamase* and metallo-ss-lactamase in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *Ann Burns Fire Disasters* 2012; 25(2): 78-81.
9. Fallah F, Noori M, Hashemi A, Goudarzi H, Karimi A, Erfanimesh S, et al. Prevalence of bla NDM, bla PER, bla VEB, bla IMP, and bla VIM Genes among *Acinetobacter baumannii* Isolated from Two Hospitals of Tehran, Iran. *Scientifica (cairo)* 2014; 2014: 245162.
10. Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, Bilocq F, Vanderkelen A, Zizi M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure. *Environ Microbiol* 2002; 4(12): 898-911.
11. Noori M, Karimi A, Fallah F, Hashemi A, Alimehr S, Goudarzi H, et al. High Prevalence of Metallo-beta-lactamase Producing *Acinetobacter baumannii* Isolated From Two Hospitals of Tehran, Iran. *Arch Pediatr Infect Dis* 2014; 2(3): e15439.
12. 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(3): 243-248.
13. Fallah F, Taherpour A, Vala MH, Hashemi A. Global Spread of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). Archives of Clinical Infectious Diseases 2012; 6(4): 171-177.
 14. Hakemi Vala M, Hallajzadeh M, Hashemi A, Goudarzi H, Tarhani M, Sattarzadeh Tabrizi M, et al. Detection of Ambler class A, B and D β -lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from burn patients. Ann Burns Fire Disasters 2014; 27(1): 8-13.
 15. Ghazi M, Isadyar M, Gachkar L, Mahmoudi S, Goudarzi H, Eslami G, et al. Serum levels of mannose-binding lectin and the risk of infection in pediatric oncology patients with chemotherapy. J Pediatr Hematol Oncol 2012; 34(2): 128-130.