BRIEF REPORT

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

Mehrzad Sadredinamin[1],
Ali Hashemi[2],
Hossein Goudarzi[3],
Samira Tarashi[1],
Neda Yousefi Nojookambari[4],
Elahe Taki[1]

[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

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(138): 181-186 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۳۸ تیر سال ۱۳۹۵ (۱۸۶-۱۸۱)

تشخیص ژن های *bla*IMP، *bla*VIM 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 نوجوکامبری[۴]
الهه تاکی[۱]

چکیده

سابقه و هدف: شیوع جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به آنتی‌بیوتیک، درمان بیماران سوختگی را با مشکل مواجه کرده است. لذا هدف از این مطالعه، تشخیص ژن‌های *bla*IMP، *bla*VIM و OprD در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران سوختگی بوده است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه توصیفی حاضر که در فاصله سال‌های ۹۳ تا ۹۴ روی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده ازبیماران سوختگی بستری دربیمارستان سوانح سوختگی شهیدمطهری شهرتهران انجام شد، تست‌های‌حساسیت ضدمیکروبی با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن انجام گردید و برای شناسایی سویه‌های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز از روش دیسک ترکیبی استفاده شد. فراوانی ژن‌های bla_{IMP-1}، bla_{VIM-1} و OprD با استفاده از روش PCR و sequencing مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از ۱۰۰ایزوله سودوموناس آئروژینوزا ، ۹۵ سویه مقاوم به ایمی پنم و مروپنم بودند که در این میان، ۸۱ سویه تولیدکننده متالوبتالاکتاماز بودند. ۱۳ سویه سودوموناس آئروژینوزا دارای ژن bla_{IMP-1}بودند ولی هیچ‌یک از ایزوله‌ها ژن bla_{VIM-1}را نداشتند. سویه‌های واجد قطعه‌های بزرگ‌تر در ژن OprD دارای توالی الحاقی ISPpu21 و ISPa1328 بودند.

استنتاج: می‌توان با شناسایی الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بتالاکتامازها از انتشار سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جلوگیری کرد.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، متالوبتالاکتاماز، *bla*IMP-1, *bla*VIM-1, OprD

مقدمه

پسودوموناس آئروژینوزا به عنوان عامل عفونت‌هایی از قبیل سپتی سمی، پنومونی، عفونت‌های دستگاه ادراری، اندوکاردیت، عفونت‌های پوستی، عفونت‌های گوش، عفونت‌های چشمی و عفونت ثانویه در بین بیماران سوختگی می‌باشد(۱،۲). درمان عفونت‌های ناشی از پسودوموناس آئروژینوزا به دلیل وجود مقاومت‌های ذاتی و اکتسابی، مشکلات فراوانی را برای بیماران ایجاد کرده است. از کاربا‌پنم‌ها برای درمان سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود ولی اخیراً سویه‌های مقاوم به کاربا‌پنم در سرتاسر جهان گسترش یافته‌اند(۴،۳).

مولف مسئول: حسین گودرزی- تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی E-mail: hg0d100@yahoo.com
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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

یکی از مکانیسم‌های مقاومت به کاربا‌پنم‌ها در سویه‌های پسودوموناس 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 *bla*IMP و *bla*VIM می‌باشند که روی عناصر ژنتیکی متحرک قرار دارند و به راحتی بین باکتری‌ها منتقل می‌شوند(۵،۶). لذا هدف از این مطالعه، تشخیص ژن‌های *bla*IMP، *bla*VIM و OprD در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی بوده است.

مواد و روش ها

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 باکتری ها

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 سیتریماید 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 آنتی بیوتیکی و شناسایی فنوتیپی سویه های تولید کننده 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 blaIMP-1 ، blaVIM-1 و oprD

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

جدول شماره ۱: پرایمر های مورد استفاده در روش PCR

ژن هدف	توالی (5´ to 3´)	سایز محصول (bp)	دمای Annealing (°C)
VIM1-F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	۳۹۰	۵۴
VIM1-R	CGAATGCGCAGCACCAG		
IMP1-F	GAAGGCGTTTATGTTCATAC	۵۷۸	۴۷
IMP1-R	GTAAGTTTCAAGAGTGATGC		
OprDF1	ATGAAAGTGATGAAGTGGAG	۱۳۲۹	۵۰
OprDR1	CAGGATCGACAGCGGATAGT		

برای انجام PCR، از Master Mix 2x شرکت سیناکلون (CAT. NO.: PR901638) که شامل ۰/۴ میلی مول از هر dNTP، ۳ میلی مول از MgCl2، ۰/۰۸ واحد از آنزیم Taq پلیمراز 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	
مراحل	IMP VIM	oprD	IMP VIM	oprD
واسرشت اولیه	۹۴	۹۴	۵ دقیقه	۵ دقیقه
واسرشت شدن	۹۴	۹۴	۴۵ ثانیه	۴۵ ثانیه
اتصال پرایمرها	۵۴	۶۰	۴۵ ثانیه	۴۵ ثانیه
طویل سازی	۷۲	۷۲	۱ دقیقه	۱ دقیقه
طویل سازی پایانی	۷۲	۷۲	۵ دقیقه	۵ دقیقه
تعداد سیکل	۳۶	۳۶	--------	

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

از سویه سودوموناس آئروژینوزا با شماره KP780165 ثبت شده در NCBI به عنوان کنترل ژن *bla*IMP-1 ، سودوموناس آئروژینوزا با شماره KT313641 ثبت شده در NCBI به عنوان کنترل ژن*bla*VIM-1 و سودوموناس آئروژینوزا PAO1 به‌عنوان‌کنترل ژن oprD استفاده گردید.

تعیین توالی

محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت بایونیر کره‌جنوبی فرستاده شد. برای آنالیز نتایج تعیین توالی از نرم‌افزار Chromas 1.45 و blast در NCBI استفاده گردید.

یافته ها و بحث

پسودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک عامل عفونت بیمارستانی با مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا در بین بیماران مبتلا به سوختگی مطرح است(۱۱،۹). نتایج حاصل از روش دیسک دیفیوژن روی ۱۰۰ سویه پسودوموناس آئروژینوزا نشان داد که ۹۵ درصد سویه‌ها به کاربانپم‌ها از جمله ایمی پنم و مروپنم مقاوم بودند. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به قرار زیر است: ۹۵ درصد از سویه‌ها به ایمی پنم، ۹۵ درصد به مروپنم، ۹۴ درصد به دری پنم، ۷۵ درصد به سفتازیدیم، ۹۱ درصد به آمیکاسین، ۹۸ درصد به تیکارسیلین، ۹۰ درصد به پیپراسیلین، ۸۲ درصد به پیپراسیلین/ تازوباکتام، ۹۴ درصد به سیپروفلوکساسین، ۹۳ درصد به سفپیم، ۹۰ درصد به آزترئونام، ۹۵ درصد به جنتامایسین و ۰ درصد به کلیستین مقاوم بودند. در دو مطالعه انجام شده توسط فلاح و همکاران و شاهچراقی و همکاران، علی‌رغم وجود مقاومت نسبت به بتالاکتام‌ها (شامل سفالوسپورین‌های نسل سوم و کاربانپم‌ها)، آنتی‌بیوتیک کلیستین با ۱۰۰ درصد حساسیت به عنوان موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها شناسایی شدند(۱۲،۸). تولید متالوبتالاکتاماز به عنوان یکی از مکانیسم‌های مقاومت به کاربانپم‌ها در بین سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا مطرح است(۱۴،۱۳). درمطالعه حاضر۸۵/۲ درصد از سویه‌ها تولیدکننده متالوبتالاکتاماز بودند. در مطالعه فلاح و همکاران و حاکمی و همکاران به ترتیب ۵۸/۲ درصد و ۱۷/۳ درصد از سویه‌ها دارای متالوبتالاکتاماز بودند(۱۴،۸). بر اساس نتایج PCR مشخص شد ۱۶ درصد از سویه‌ها واجد ژن *bla*IMP-1 بودند در حالی که هیچ‌یک از سویه‌ها واجد ژن *bla*VIM-1 نبودند. نتایج مربوط به ژن *bla*VIM-1 مشابه نتایج فلاح و همکاران(۸) و حاکمی و همکاران (۱۴) بود، درحالی که شیوع ژن *bla*IMP-1 در این دو مطالعه کم‌تر 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 قطعه‌های ISPpu21 و ISPa1328 مسئول ایجاد قطعه‌های بزرگ‌تر در ژن OprD هستند. در مطالعه حاضر متالوبتالاکتامازها و عناصر الحاقی باعث مقاومت ایزوله‌ها به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها شده‌اند ولی بسیاری از مکانیسم‌های دیگر از قبیل پمپ‌های ترشحی نیز باعث مقاومت در بین ایزوله‌ها می‌شوند که همین امر باعث به وجود آمدن سویه‌های با مقاومت چند داروئی شده است. مرگ و میر به علت عفونت ناشی از باکتری‌ها به عنوان یک مشکل جدی در سرتاسر جهان باقی مانده است(۱۵). در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که شیوع ایزوله‌های سودوموناس‌آئروژینوزای مقاوم به‌آنتی‌بیوتیک دربخش‌های سوختگی بسیار بالا می‌باشند و متاسفانه این سویه‌ها با کسب عناصر ژنتیکی مقاوم از قبیل اینتگرون‌ها به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند و قادرند این عناصر مقاومتی را به دیگر باکتری‌ها منتقل کنند. علاوه بر این به علت‌جهش و وجود تراسپوزون در پورین‌ها ازجمله *oprD*، باکتری‌ها به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند.

سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل اجرای طرح تحقیقاتی مصوب

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

در معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد ثبت ۱۳۲۰۲می‌باشد.

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, Erfanimanesh 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, Erfanimanesh 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

New Microbiol 2010; 33(3): 243-248.

13. Fallah F, Taherpour A, Vala MH, Hashemi A. Global Spread of New Delhi mettallo-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 ß-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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]