



مقاله پژوهشی

بررسی مقایسه‌ای ژن‌های کارباپنمازهای تیپ‌های KPC، VIM، NDM و IMP در ایزوله‌های بالینی و محیطی سودوموناس آئروژینوزا با پروتکل یکسان در روش Real Time PCR

جعفر بابایی^۱، هاید مبین^{۲*}، امیرمهدی خامنه^۳

۱- گروه علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

۳- گروه پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۲/۰۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: تولید آنزیم‌های کارباپنمازی در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بالین، درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری را به چالش کشانده است و با توجه به زیستگاه طبیعی این باکتری در محیط‌های آبی و خاکی، این مطالعه در نظر داشت ژن‌های کارباپنمازی KPC، VIM، NDM و IMP را با پروتکل یکسان برای چهار ژن فوق با روش Real-time PCR در ایزوله‌های بالینی و محیطی مورد مقایسه قرار دهد.

مواد و روش‌ها: ایزوله‌های بالینی از دو بیمارستان تبریز و ایزوله‌های محیطی از آب رودخانه‌های نهند و اسپیران جدا شد. جهت تعیین هویت ژنوتیپی آن‌ها، از پرایمر یونیورسال 16s rRNA استفاده شد. با روش فنوتیپی دیسک دیفیوژن آگار و دیسک ترکیبی از نظر تولید کارباپنمازها مورد بررسی واقع شدند و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد نظر، مورد آزمون Real-time PCR واقع شدند.

نتایج: با روش فنوتیپی ۸۳/۳٪ ایزوله‌های بالینی و ۰٪ از ایزوله‌های محیطی مولد کارباپنمازها بودند. در حالی که با روش Real-time PCR هم ایزوله‌های بالینی و هم محیطی ژن‌های *bla*_{KPC}، *bla*_{IMP}، *bla*_{NDM-1} و *bla*_{VIM} را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که ژن‌های کارباپنمازی با یک پروتکل یکسان برای چهار ژن KPC، VIM، NDM و IMP قابل بررسی در ایزوله‌های بالینی و محیطی است و وجود ژن‌های فوق در ایزوله‌های محیطی علاوه بر ایزوله‌های بالینی اهمیت پخش این ارگانیسم را به عنوان Super bug را بیش از پیش روشن می‌سازد.

کلمات کلیدی: کارباپنمازها، پseudomonas آئروژینوزا، آب رودخانه، مقاومت ضد میکروبی

مقدمه

عفونت‌های تهدیدکننده زندگی بکار گرفته می‌شد (۲). امروزه مقاومت نسبت به کارباپنم‌ها در باکتری‌های گرم منفی غیر تخمیرکننده، آنتروباکتریاسه‌ها و یا باکتری‌های گرم مثبت، در سرتاسر دنیا در مطالعات متعدد گزارش شده است (۳). در بروز مقاومت نسبت به آن‌ها، تولید انواع کارباپنمازها مانند آنزیم‌های β -لاکتامازی کلاس A آمیلر (غالباً KPC)، متالو بتا لاکتامازها (MBLs) مثل تیپ‌های IMP، VIM و NDM و کلاس D (غالباً OXA-48) دخالت دارند (۴).

پseudomonas آئروژینوزا به عنوان یک عامل مهم در عفونت‌های بیمارستانی بخصوص در بیماران با نقص ایمنی هم دارای مقاومت

اولین آنتی‌بیوتیک از گروه کارباپنم‌ها بنام thienamycin محصول طبیعی *Streptomyces catteya* بوده است که سپس به دلیل ناپایداری آن، فرم سنتتیک یعنی ایمی پنم و به دنبال آن کارباپنم‌های دیگر نیز سنتز شدند (۱). این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل طیف گسترده فعالیت ضد میکربی آن‌ها از یک طرف و نیز مقاومت بیشتر آن‌ها به هیدرولیز آنزیم β -لاکتامازی آن‌ها به جای آنتی‌بیوتیک‌های گروه سفالوسپورین در درمان تجربی

*نویسنده مسئول: هاید مبین، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز،

Email: drhmobaiyen@iaut.ac.ir

https://orcid.org/0000-0003-2377-3387

ایران

Aubron و همکاران در سال ۲۰۰۵، در چندین رودخانه ایزوله‌های تولیدکننده کاربایتماز را گزارش نمودند (۱۴). با توجه به اهمیت عفونت‌های پسودومونایی و بروز مقاومت نسبت به کاربایتم‌ها لزوم دستیابی به تکنیکی که بتوان در مدت کوتاهی بروز این آنزیم‌ها را در ایزوله‌ها موردبررسی قرار داد در اولویت قرار دارد؛ بنابراین، این مطالعه در نظر داشت با استفاده از روش Real time PCR وجود ژن‌های کاربایتم‌سازی تیپ‌های مختلف را در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا بالینی و محیطی با برنامه یکسان برای چهار ژن عمده کاربایتم‌سازی موردبررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

جامعه موردبررسی و نمونه‌ها

در این مطالعه سودوموناس‌های جدا شده از رودخانه‌های نهند و اسپیران در آذربایجان شرقی که با نمونه‌برداری از عمق ۳۰ cm آب با موقعیت‌های جغرافیایی مختلف (جدول ۱) (۱۶، ۱۵) با استفاده از روش فیلتر کردن و کشت در محیط اختصاصی Pseudomonas Agar جداسازی شده و وارد مطالعه شد. هم‌زمان

ذاتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های β -لاکتام و هم توانایی کسب مقاومت از طریق عناصر قابل انتقال را دارد؛ بنابراین، این باکتری در مواجهه با کاربایتم‌ها تحت تأثیر فشار انتخابی، توانایی تولید آنزیم‌های کاربایتم‌سازی را پیدا می‌کند (۵) انتقال روده‌ای ارگانیسم‌های تولیدکننده آنزیم کاربایتم‌از یک‌طرف (۶) و کسب ژن‌های مقاومت منجر به تولید Super bug‌ها و به چالش کشیده شدن درمان این عفونت‌ها شده است (۷). اولین آنزیم تیپ KPC در پسودوموناس آئروژینوزا در کلمبیا (۸)، تیپ VIM-1 در ایتالیا (۹) و تیپ Ges-5 در ترکیه (۱۰) گزارش شده است و تیپ NDM آنزیم هیدرولیز کننده بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله کاربایتم‌ها است (۱۱). اولین ایزوله NDM-1 در یک بیمار سوئدی ساکن در هندوستان گزارش شد که بعدها این تیپ آنزیم در افرادی که سفر به هندوستان نداشتند نیز دیده شده است (۱۲). در مطالعه Walsh و همکاران در آب‌های آشامیدنی و آب‌های جاری در سال ۲۰۱۱ در هندوستان (۱۲) و در مطالعه Zurfluh و همکاران در سال ۲۰۱۳، در آب‌های ۵۸ رودخانه و ۱۸ دریاچه سوئیس (۱۳) و در مطالعه

جدول ۱- موقعیت جغرافیایی ایزوله‌های محیطی موردبررسی (۲۶)

ردیف	کد نمونه	موقعیت جغرافیایی	ردیف	کد نمونه	موقعیت جغرافیایی
۱	N1	۴۷° ۴۴' ۳۰/۴۶"E ۲۴° ۵۱' ۶۱/۳۸" N	۱۰	N10	۴۹° ۴۲' ۳۸/۴۶"E ۲۷° ۶۹' ۱۲/۳۸" N
۲	N2	۴۷° ۴۹' ۰۵/۴۶"E ۳۸° ۲۴' ۶۴/۹۹" N	۱۱	N11	۴۴° ۱۶' ۷۶/۴۶"E ۳۸° ۱۴' ۱۲/۴۷" N
۳	N3	۴۶° ۴۷' ۷۵/۰۳"E ۳۸° ۲۴' ۷۴/۵۶" N	۱۲	S1	۴۶° ۱۶' ۴۸/۲۲"E ۳۸° ۱۱' ۵۰/۹۱" N
۴	N4	۴۶° ۴۸' ۰۷/۳۸"E ۳۸° ۲۴' ۹۰/۸۷" N	۱۳	S2	۴۶° ۱۶' ۴۸/۲۲"E ۳۸° ۱۱' ۵۰/۹۱" N
۵	N5	۴۶° ۴۸' ۲۰/۷۵"E ۳۸° ۲۵' ۰۵/۲۲" N	۱۴	S7	۴۶° ۱۶' ۱۱/۸۲"E ۳۸° ۱۳' ۱۸/۴۹" N
۶	N6	۴۶° ۴۸' ۳۰/۰۲"E ۳۸° ۲۵' ۲۶/۷۵" N	۱۵	S12	۴۶° ۱۶' ۵۲/۵۷"E ۳۸° ۱۴' ۳۲/۳" N
۷	N7	۳۲° ۳۳' ۴۸/۴۶"E ۳۸° ۲۵' ۹۴/۲۴" N	۱۶	NAN7	۴۶° ۴۸' ۳۳/۳۲"E ۳۸° ۲۵' ۹۴/۴۲" N
۸	N8	۵۴° ۲۴' ۴۸/۴۶"E ۳۸° ۲۶' ۸۶/۵۸" N	۱۷	N2*	۴۶° ۴۷' ۴۹/۰۵"E ۳۸° ۲۴' ۶۴/۹۹" N
۹	N9	۴۶° ۴۸' ۴۸/۴۰"E ۳۸° ۲۷' ۰۷/۵۳" N	۱۸	N12	۴۶° ۱۶' ۵۲/۵۷"E ۳۸° ۱۴' ۳۲/۳" N

N؛ ایزوله‌های آب رودخانه نهند، S؛ ایزوله‌های آب رودخانه اسپیران، شماره ۱ الی ۱۲؛ ایستگاه‌هایی که نمونه‌برداری از آنجا انجام یافته است. از برخی از ایستگاه‌ها دو ایزوله متفاوت از نظر پیگمان جداسازی شده بود.

تنها همراه با مروپنم EDTA استفاده شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۳۵، افزایش قطر هاله عدم رشد به میزان $\geq 7\text{mm}$ بین هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها با همان آنتی‌بیوتیک حاوی EDTA در ایزوله مورد مطالعه به عنوان تولیدکننده متالوبتا لاکتاماز در نظر گرفته شد (۱۸).

استخراج DNA

در این مطالعه استخراج DNA ایزوله‌ها با استفاده از کیت استخراج Favergen DNA محصول کشور تایوان طبق پروتکل مربوطه انجام شد و DNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانو دراپ (شرکت Thermo) تعیین غلظت شدند و کیفیت نمونه‌ها از نظر آلودگی پروتئینی با در نظر گرفتن میزان جذب نوری در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ بررسی شد و میزان جذب نوری برابر ۱/۸ الی ۲ شرایط عدم آلودگی با پروتئین در نظر گرفته شد.

طراحی پرایمرها

با استفاده از نرم‌افزار Primer3 plus ویراست ۴ توالی پرایمر Forward و پرایمر Reverse طبق جدول ۲ طراحی گردید و توسط شرکت تکاپو زیست سنتز شد.

نیز از سودوموناس‌های جدا شده از نمونه‌های خون، مایع پلور، ترشحات تراشه و زخم بیماران بستری در بیمارستان امام رضا (ع) و سینای تبریز به صورت تصادفی انتخاب شدند.

کشت و جداسازی

تمامی ایزوله‌ها با روش بیوشیمیایی روتین مورد شناسایی واقع شدند و سپس با بررسی ژن 16SrRNA با روش PCR با استفاده از پرایمرهای یونیورسال مورد تعیین هویت قطعی واقع شدند و ایزوله‌های خالص شده و تأیید شده از نظر جنس پسودوموناس در محیط کشت Tryptic Soy Broth, TSB حاوی ۲۰٪ گلیسرول در فریز °C ۷۰- جهت انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند.

بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها

با روش دیسک دیفیوژن آگار و بر اساس استاندارد (Clinical and laboratory standards institute, CLSI) میکربی ارزیابی شد (۱۷). دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در این مطالعه از دیسک‌های ساخت شرکت (Bio Maxima) لهستان تهیه شد و شامل سفنازیدیم (30µg)، سفتریاکسون (30µg)، سفالکسین (30µg)، سفوتاکسیم (30µg)، سیفکسیم (5µg)، ایمپنم (10µg)، مروپنم (10µg)، پپراسلین/تازوباکتام

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده در آزمون Real time PCR

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی (5'-3')	اندازه محصول (Bp)
<i>bla</i> _{VIM} - F <i>bla</i> _{VIM} - R	CGTGCTATACGGTGGTTGTG GCGATTTTGTGTGCTTTGA	۲۱۱
<i>bla</i> _{IMP} - F <i>bla</i> _{IMP} - R	TTGTAGCATTGCTGCCTCAG CGCGCTCTACAAACCAAGTA	۲۱۸
<i>bla</i> _{NDM-1} - F <i>bla</i> _{NDM-1} - R	GATTGCGACTTATGCCAATG TCGATCCCAACGGTGATATT	۱۸۹
<i>bla</i> _{KPC} - F <i>bla</i> _{KPC} - R	CAGCTCATTCAAGGG CTTTC GGCGGCGTTATCACTGTATT	۱۹۶

انجام واکنش Real Time PCR

با استفاده از DNA استخراج شده و Master mix تجاری (شامل سایبرگرین، تک پلی مرز، dNTP، Mgcl2 و بافر) (Wizbio Solution) و با استفاده از دستگاه Rotor gene طبق برنامه زیر انجام شد:

ژن‌های مورد بررسی *bla*_{VIM}، *bla*_{IMP}، *bla*_{NDM-1} و *bla*_{KPC} بود و برنامه دمایی برای تمام ژن‌ها بر اساس پایداری طراحی شده یکسان انتخاب شد به این ترتیب که دمای دناتوراسیون اولیه C

(100µg/10 µg)، کلیستین (10µg)، جنتامایسین (10µg)، آمیکاسین (30µg)، سیپروفلوکساسین (5µg) و افلوکساسین (5µg) بود. از سویه استاندارد *Escherichia coli* ATCC25922 برای ارزیابی کیفیت دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده و صحت روش انجام تست به عنوان سویه کنترل استفاده شد.

بررسی فنوتیپی تولید متالوبتا لاکتاماز

برای شناسایی فنوتیپی ایزوله‌های مولد آنزیم‌های کارباپنمازی از دیسک ایمپنم تنها همراه با ایمپنم EDTA و نیز مروپنم

مورد تأیید واقع شدند و با استفاده از پرایمر یونیورسال ۱۶SrRNA سودوموناس در حد مولکولی با روش PCR مورد تأیید واقع شدند. ۵/۵٪ از ایزوله‌های بالینی از زخم و ۲۸٪ از ترشحات تراشه جمع‌آوری شده بود.

نتایج بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها

تمام ایزوله‌های محیطی در آزمون دیسک دیفیوژن آگار نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های موردبررسی از گروه کاربانه‌ها، سفالوسپورین‌های نسل سوم، آمینوگلیکوزیدها، کلیستین و پیپراسیلین/تازوباکتام ۱۰۰٪ حساس بودند درحالی‌که ایزوله‌های بالینی طبق جدول ۳، میزان مقاومت بالایی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بکار رفته نشان دادند. در مقایسه مقاومت دارویی این ایزوله‌های بالینی و محیطی به مقدار P برابر با ۰/۰۰۰ تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده شد.

۹۵° به مدت ۵ دقیقه، دانتوراسیون در دمای C ۹۵° به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال C ۶۲° به مدت ۶۰ ثانیه، دمای طویل شدن C ۷۲° به مدت ۳۰ ثانیه در ۴۵ چرخه، دمای طویل شدن نهایی C ۷۲° به مدت ۲ دقیقه و یک چرخه و دمای ذوب C ۹۵° - C ۴۵° یک چرخه انجام شد.

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 استفاده شد و در مقایسه داده‌های حاصل برای ایزوله‌های بالینی و محیطی از آزمون T student استفاده شد و در سطح اطمینان ۹۵٪ و $P \text{value} \leq 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. منحنی‌های ژن‌ها در آزمون Real Time PCR با استفاده از نرم‌افزار REST نرمالیزه و آنالیز شد.

نتایج کشت و جداسازی

در این مطالعه، ۱۸ ایزوله بالینی و ۱۸ ایزوله محیطی با روش‌های بیوشیمیایی روتین به‌عنوان سودوموناس آئروژینوزا

جدول ۳- فراوانی نسبی واکنش ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها جدا شده از بیمارستان امام رضا (ع) و سینای تبریز

نوع واکنش	مقاوم		بینابینی		حساس		جمع کل
نوع آنتی بیوتیک	تعداد/ درصد						
ایمی پنم	۱۵	۸۳/۲	-	-	۳	۱۵/۸	۱۸ (۱۰۰)
مرو پنم	۱۵	۸۳/۲	-	-	۳	۱۵/۸	
جنتامایسین	۱۶	۸۸/۸	-	-	۲	۱۱/۲	
سفالکسین	۱۶	۸۸/۸	۱	۵/۶	۱	۵/۶	
اوفلوکساسین	۱۷	۹۴/۵	۱	۵/۵	-	-	
سفتریاکسون	۱۸	۱۰۰	-	-	-	-	
سیپروفلوکساسین	۱۶	۸۸/۸	۲	۱۱/۲	-	-	
سفتوتاکسیم	۱۸	۱۰۰	-	-	-	-	
سفیکسیم	۱۸	۱۰۰	-	-	-	-	
سفتازیدیم	۱۷	۹۴/۵	-	-	۱	۵/۵	
آمیکاسین	۱۳	۷۲/۲	۲	۱۱	۳	۱۶/۸	
کلیستین	۶	۳۳/۳	-	-	۱۲	۶۶/۷	
پیپراسیلین/تازوباکتام	۹	۵۰	-	-	۹	۵۰	

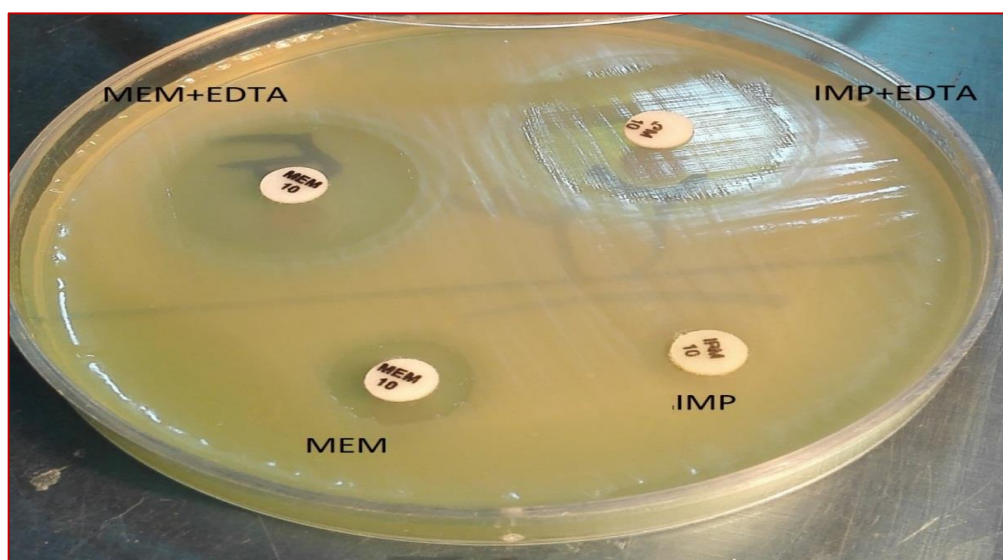
نتایج تست غربالی دیسک ترکیبی از نظر تولید کارباپنمازها

با استفاده از دیسک ایمی پنم (IMP) و ایمی پنم EDTA / (IMP/EDTA) و نیز با استفاده از آنتی بیوتیک مروپنم (MEM) و مروپنم EDTA / (MEM/EDTA) توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز ایزوله‌های مورد بررسی واقع شدند و وجود تفاوت قطر هاله مهار رشد بیش از ۷ میلی‌متر در مقایسه دیسک تنها با همان دیسک آنتی بیوتیک حاوی EDTA با هر یک از آنتی بیوتیک‌ها، سبب انتخاب ایزوله فوق به عنوان مولد کارباپنماز در نظر گرفته شد که از ۱۸ ایزوله بالینی ۱۵ ایزوله (۸۳/۲٪) از نظر تولید آنزیم کارباپنماز مثبت بودند در حالی که هیچ یک از

ایزوله‌های محیط واکنش مثبت را نشان ندادند. شکل ۱ تولید آنزیم کارباپنمازی را در تست غربالی دریکی از ایزوله‌های بالینی نشان می‌دهد.

نتایج تکثیر ژن‌های کارباپنماز در روش Real Time PCR

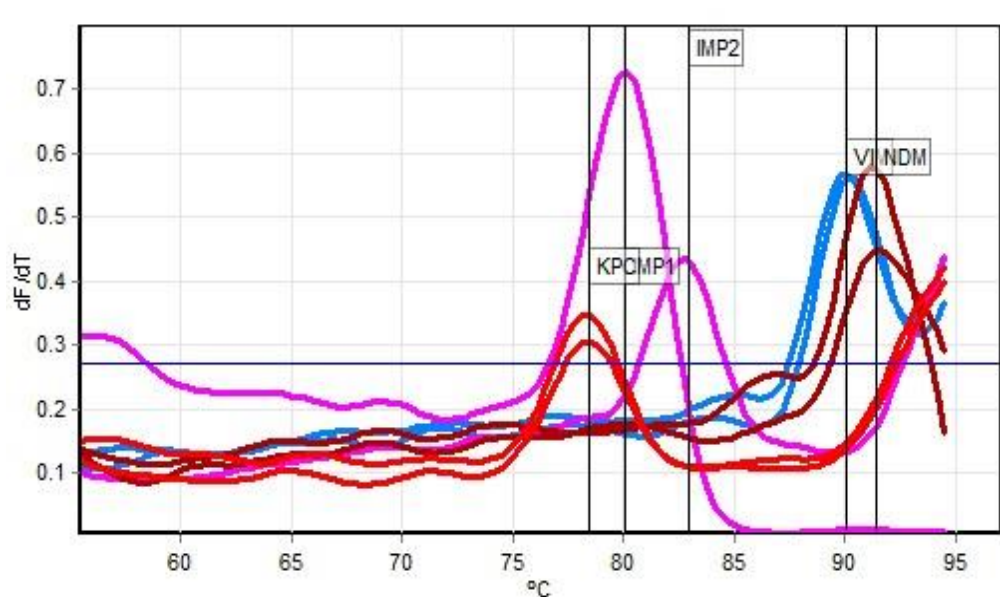
در بررسی ژن‌های کارباپنمازی در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا چهار تیپ NDM، IMP، KPC و VIM در ایزوله‌های بالینی و محیطی از روش Real Time PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده توسط محقق استفاده شد. جدول ۴ فراوانی هریک از ژن‌ها در ایزوله‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد و نمودار ۱ گراف حاصل در دستگاه را نشان می‌دهد.



شکل ۱- نمونه‌ای از تست تأییدی فنوتیپی جهت شناسایی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مولد MBL
افزایش قطر هاله عدم رشد در کنار دیسک IMP+EDTA و MEM+EDTA

جدول ۴- مقایسه ژن‌ها در ایزوله‌های مورد مطالعه

p-value	نمونه‌های آب‌های محیطی		نمونه‌های بالینی		ژن‌های متالوبتالاکتاماز و کارباپنماز
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
۰/۰۰۷	۱	۵/۵۵	۸	۴۴/۴	<i>bla</i> VIM
۰/۲۶۱	۲	۱۱	۶	۳۳/۳	<i>bla</i> IMP
۰/۰۰۰	۱	۵/۵۵	۱۲	۶۶/۶	<i>bla</i> NDM-1
۰/۷۶۱	۳	۱۶/۸	۵	۲۷/۷	<i>bla</i> KPC
۰/۰۰۵	۱۱	۶۱/۱	۳	۱۶/۶	فاقد ژن
---	۱۸	۱۰۰	۱۸	۱۰۰	جمع کل



نمودار ۱- ژن‌های *VIM*, *IMP*, *NDM-1*, *KPC* و *16sRNA* ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا: رنگ آبی ژن *VIM*، رنگ قهوه‌ای ژن *NDM-1*، رنگ بنفش تیره ژن *IMP* و رنگ نارنجی ژن *KPC*

بحث

مصرف کاربپنم‌ها برای درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان یک باکتری با توانایی کسب مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مورد استفاده در درمان، از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است (۵). جداسازی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کاربپنم‌ها به دلیل تولید کاربپنمازها دائماً در حال گسترش است. به‌طوری‌که در کره در سال ۲۰۰۳، ۱۷/۳٪ از ایزوله‌ها تولید حداقل یک نوع متابولاکتاماز (۱۹)، در یونان در طی سال‌های ۲۰۰۷ الی ۲۰۱۰ به میزان ۳۳٪ و در سال ۲۰۱۱ به میزان ۵۰٪ (۲۰) تولید کرده بودند. انواع مختلفی از آنزیم‌های کاربپنمازی از کشورهای مختلف گزارش شده است به‌طوری‌که، دو ایزوله در بیمارستان Kasr Al Aini در مصر در سال ۲۰۱۲ (دارای ژن‌های *bla* NDM-1 و *bla* VIM-2) (۲۱)، در هندوستان در سال ۲۰۱۳، ۴ ایزوله حساس به کلیسیتین و مقاوم به ایمپینم و مروپنم حامل ژن *bla* NDM-1 (۱۸) در ایران در سال ۲۰۱۳، ۵۷/۹٪ از ایزوله‌ها تولیدکننده کاربپنمازها و غالباً دارای ژن *bla* IMP (۲۲)، ارسال در ۲۰۱۷ در اصفهان، ایران در ۱۴/۶٪ ایزوله‌های بالینی *bla* VIM و در ۳۱/۳٪ ایزوله‌ها *bla* IMP (۲۳)، در چین در سال ۲۰۱۴ در ۴۵/۸۳٪ تولیدکننده *bla* VIM-2 و ۸/۳٪ تولیدکننده *bla* KPC-2 (۲۴) و در ترکیه در سال ۲۰۱۷، حضور هم‌زمان *bla* VIM-1، *bla* IMP و *bla* KPC-2 گزارش شده است. لذا این مطالعه با دو هدف (۱) تعیین وجود ژن‌های مقاومت بخصوص در ایزوله‌های محیطی (۲) بررسی تکنیک Real time PCR به‌عنوان تکنیکی دقیق و سریع با استفاده از برنامه دمایی یکسان برای چهار ژن به‌منظور تشخیص ژن‌های مسئول مقاومت بررسی را آغاز نمود. نتایج نشان داد که نمونه‌های محیطی جدا شده از رودخانه‌های نهند و اسپیران دارای هر ۴ ژن مورد بررسی بودند علیرغم اینکه در آزمون دیسک دیفیوژن اگر از نظر مقاومت به کاربپنم‌ها و در آزمون دیسک ترکیبی از نظر تولید کاربپنمازها منفی بودند و نشان‌دهنده کسب ژن‌ها در شرایط محیطی خود بوده‌اند و این امر دارا بودن پتانسیل Super bug شدن این باکتری را به‌وضوح نشان می‌دهد. در مطالعات قبلی نیز تولید کاربپنماز تیپ *bla* VIM در ایزوله کلبسیلا پنمونیه جدا شده از آب رودخانه‌های سوئیس در مطالعه Zurfluh و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۱۳) و در مطالعه Walsh و همکاران در سال ۲۰۱۱ در هندوستان تیپ *bla* NDM-1 گزارش شده بودند (۱۲). این امر نشان می‌دهد که این ژن‌ها به‌راحتی به روش‌های مختلف اخذ شده و در شرایطی که فشار انتخابی برای باکتری فراهم شود کارایی این آنتی‌بیوتیک‌ها را زیر سؤال خواهد برد.

در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های

مصرف کاربپنم‌ها برای درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان یک باکتری با توانایی کسب مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مورد استفاده در درمان، از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است (۵). جداسازی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کاربپنم‌ها به دلیل تولید کاربپنمازها دائماً در حال گسترش است. به‌طوری‌که در کره در سال ۲۰۰۳، ۱۷/۳٪ از ایزوله‌ها تولید حداقل یک نوع متابولاکتاماز (۱۹)، در یونان در طی سال‌های ۲۰۰۷ الی ۲۰۱۰ به میزان ۳۳٪ و در سال ۲۰۱۱ به میزان ۵۰٪ (۲۰) تولید کرده بودند. انواع مختلفی از آنزیم‌های کاربپنمازی از کشورهای مختلف گزارش شده است به‌طوری‌که، دو ایزوله در بیمارستان Kasr Al Aini در مصر در سال ۲۰۱۲ (دارای ژن‌های *bla* NDM-1 و *bla* VIM-2) (۲۱)، در هندوستان در سال ۲۰۱۳، ۴ ایزوله حساس به کلیسیتین و مقاوم به ایمپینم و مروپنم حامل ژن *bla* NDM-1 (۱۸) در ایران در سال ۲۰۱۳، ۵۷/۹٪ از ایزوله‌ها تولیدکننده کاربپنمازها و غالباً دارای ژن *bla* IMP (۲۲)، ارسال در ۲۰۱۷ در اصفهان، ایران در ۱۴/۶٪ ایزوله‌های بالینی *bla* VIM و در ۳۱/۳٪ ایزوله‌ها *bla* IMP (۲۳)، در چین در سال ۲۰۱۴ در ۴۵/۸۳٪ تولیدکننده *bla* VIM-2 و ۸/۳٪ تولیدکننده *bla* KPC-2 (۲۴) و در ترکیه در سال ۲۰۱۷، حضور هم‌زمان *bla* VIM-1، *bla* IMP و *bla* KPC-2 گزارش شده است. لذا این مطالعه با دو هدف (۱) تعیین وجود ژن‌های مقاومت بخصوص در ایزوله‌های محیطی (۲) بررسی تکنیک Real time PCR به‌عنوان تکنیکی دقیق و سریع با استفاده از برنامه دمایی یکسان برای چهار ژن به‌منظور تشخیص ژن‌های مسئول مقاومت بررسی را آغاز نمود. نتایج نشان داد که نمونه‌های محیطی جدا شده از رودخانه‌های نهند و اسپیران دارای هر ۴ ژن مورد بررسی بودند علیرغم اینکه در آزمون دیسک دیفیوژن اگر از نظر مقاومت به کاربپنم‌ها و در آزمون دیسک ترکیبی از نظر تولید کاربپنمازها منفی بودند و نشان‌دهنده کسب ژن‌ها در شرایط محیطی خود بوده‌اند و این امر دارا بودن پتانسیل Super bug شدن این باکتری را به‌وضوح نشان می‌دهد. در مطالعات قبلی نیز تولید کاربپنماز تیپ *bla* VIM در ایزوله کلبسیلا پنمونیه جدا شده از آب رودخانه‌های سوئیس در مطالعه Zurfluh و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۱۳) و در مطالعه Walsh و همکاران در سال ۲۰۱۱ در هندوستان تیپ *bla* NDM-1 گزارش شده بودند (۱۲). این امر نشان می‌دهد که این ژن‌ها به‌راحتی به روش‌های مختلف اخذ شده و در شرایطی که فشار انتخابی برای باکتری فراهم شود کارایی این آنتی‌بیوتیک‌ها را زیر سؤال خواهد برد.

در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های

Real Time PCR ارزیابی دوره‌ای از بیمارستان‌های شهر تبریز می‌بایست انجام شود و نظارت دقیق برای مصرف کاربپنم‌ها وجود داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از تمامی همکاران آزمایشگاه تبریز به دلیل در اختیار قرار دادن مطالعات مولکولی این تحقیق و نیز از همکاران آزمایشگاه میکروبی‌شناسی بیمارستان امام رضا (ع) و بیمارستان سینا به دلیل همکاری در تهیه نمونه‌های بالینی و خانم مهسا علیایی به دلیل ارائه ی ایزوله های محیطی نهایت تشکر را دارد.

این مطالعه با کسب رضایت از بیماران و با شرط محرمانه نگاه داشتن تمامی اطلاعات بیماران و با اخذ کد اخلاقی به شماره IR.IAU.TABRIZ.REC.1397.113 انجام شد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نکردند.

References

1. Norby SR. Carbapenems. Antimicrobial Therapy II. 1995; 79(4):745
2. Norby SR. Carbapenems in serious infections: a risk-benefit assessment. Drug safety. 2000;23(3):191-4
3. Krisztina M, Papp-Wallace, Endimiani A, Magdalena A, Taracila A, Robert A. Bonomo. Carbapenems: Past, Present, and Future. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011;55(11): 4943-4960
4. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Pseudomonas spp. Journal of Clinical Microbiology. 2012; 50(11): 3773-3776
5. Meletis G, Exindari M, Vavatsi N, Sofianou D, Diza E. Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. Hippokratia. 2012; 16 (4): 303-307.
6. Viau R, Frank KM, Jacobs MR, Wilson B, Kaye K, Donskey CJ. et al. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods. Clinical Microbiology Reviews. 2016; 29 (1):1-27

بالینی بیش از ۸۰٪ ایزوله‌ها توانایی تولید آنزیم کاربپنمازی داشتند که در بررسی ژن‌ها هر چهار ژن مشخص موردبررسی در ایزوله‌ها مشاهده شد و یک ایزوله جداشده از مایع پلور بیمار مرد ۵۹ ساله بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان امام رضا (ع) دارای هر چهار ژن بود و با استفاده از برنامه تنظیمی در روش Real Time PCR به سرعت هر چهار ژن قابل‌ردیابی می‌باشند و این مطالعه نتایج مطالعه Monterio و همکاران را که از روش Multiplex Real Time PCR در بررسی ژن‌های کاربپنمازی در آنتروباکتریاسه‌ها استفاده کرده بودند (۲۵) را تأیید کرد. درحالی‌که در روش کنونی زمان بکار گرفته‌شده کوتاه‌تر از روش Multiplex است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که ایزوله‌های محیطی به‌عنوان مخزن حفظ ژن‌های کاربپنمازی در شهر تبریز باید موردبررسی و مطالعه و کنترل بیشتر قرار گیرد و جهت بررسی سریع ایزوله‌های بالینی مولد این آنزیم با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده محقق برای ژن‌های مختلف برای روش

7. Podhi S. New Delhi metallo-beta-lactamase: a weapon for the newly emerging drug resistance bacteria, Indian Med Sd. 2011; 65(8):317-20.
8. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lepez JA, Quinn JP. First identification of Pseudomonas aeruginosa isolates producing a KPC-type carbapenem hydrolyzing beta lactamase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2007; 51(4):1553-1555.
9. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fantana R. et al. Clonind and characterization of bla_{VIM}, a new integrin-bprne metallo-beta-lactamase gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1999; 43(7): 1584-90.
10. Malkoçoglu G, Aktas E, Bayraktar B, Otlu B, Bulut ME. VIM-1, VIM-2, Ges-5 carbapenemase among Pseudomonas aeruginosa isolates at a tertiary hospital in Istanbul, Turkey. Microb Drug Resist. 2017; 23(3): 328-334.
11. Khan AU, Lubne M, Zarrilli R. Structure, Genetics and world wide spread of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM): a threat to public health. BMC Microbiology. 2017; 17 (1):101

12. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Tolemen A. Dissemination of NDM-1 health: an environmental point prevalence study. *Lancet infect Dis*.2011;11(5): 355-62
13. Zurfluh K, Höchler H, Muesh-Inderbinnen M, Stephan R. Characteristics of extended-spectrum- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates from rivers and lakes in Switzerland. *Applied Environmental Microbiology*.2013;79(90): 3021-6.
14. Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P. Carbapenemase- producing Enterobacteriaceae, US Rivers. *Emerg infect Dis*. 2005; 11(2): 260-264.
15. International Organization for Standardization, Iso 19458:2006. Water quality-sampling for microbiological analysis. Iso 2006
16. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. ISIRI; 4208, 1st revision. Water quality-sampling for microbiological examination of water-code of practice, Islamic Republic of Iran, 2007
17. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M-100, Wayne, PA, Clinical Laboratory Standards Institutes, 2006.
18. Khajuria A, Piagnosraharaj AK, Kumar M, Grover N. Emergence of NDM-1 in the clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2013; 7(7):1328-1331.
19. Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chang V. VIM- and IMP -type metallo- β - lactamase-producing *Pseudomonas* spp. And *Acinetobacter* spp. In Korean Hospitals. *Emerging infectious Disease*.2003; 9(7): 864-871.
20. Liakopoulos A, Mavroidi A, katsifas EA, Theodosiou A, karagouni AD, Miriagou V, et al. Carbapenemase- producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. *BMC infectious disease*.2013;13 (1):505.
21. Zafer MM, Amin M, Mahallawy HEL, Ashour MS El-Din, Agamy MAL. First report of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Egypt. *International Journal of Infectious Disease*.2014; 29: 80-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.07.008>
22. Fallah F, Shams Borhan R, Hashemi A. Detection of bla(IMP) and bla (VIM) metallo- β -lactamases genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Int J Burn Trauma*. 2013;3(2):122-124.
23. Khorvash F, Yazdani M, Shabani S, Soudi A. *Pseudomonas aeruginosa*-producing metallo- β -lactamases (VIM, IMP, SME and AIM) in clinical isolates of intensive care units, a university hospital in Isfahan, Iran. *Advanced Biomedical Research*, 2017; 6: 147. DOI: 10.4103/2277-9175.219412
24. Liu Y, Deng Q, Yu Y, Cao X, Xu Q, Wan L. Analysis of the resistance mechanism and homology of carbapenems-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Zhonghua Shoo Shang Za Zhi*.2014; 30(1): 15-20.
25. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother*.2012; 67(4):906-909.



Original Article

A Comparative Study of KPC-, VIM-, NDM- and IMP-Type Carbapenemase Genes in Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Using Similar Protocol in Real-Time PCR Method

Babaei J¹, Mobaiyen H^{2*}, khamaneh AM³

1. Department of Basic Science, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

2. Department of Microbiology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

3. Department of Molecular Medicine, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran

Received: 11 Jan 2020

Accepted: 21 Apr 2020

Abstract

Background & Objective: Production of Carbapenemase enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinic, has challenged the treatment of these infections and due to its natural habitat in soil and aquatic environments. This study aimed to compare carbapenemase resistance genes (VIM, KPC, NDM and IMP) using similar protocol for the four above-mentioned genes in clinical and environmental isolates by Real-Time PCR.

Materials & Methods: The clinical isolates were isolated from two Tabriz Hospitals and environmental isolates from Nahnad and Spiran rivers. For their genotypic identification we used universal primer of 16s rRNA. They were investigated for Carbapenemase production via phenotypic disk agar diffusion and combined disk methods and then Real-Time PCR was conducted using specific primers for the above-mentioned genes.

Results: By phenotypic methods, 83.3 percent of clinical and 0% of environmental isolates were Carbapenemase producers. However, both clinical and environmental isolates showed *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC} and *bla*_{VIM} genes by Real-Time PCR.

Conclusion: This study showed that the carbapenemase enzymes' genes in clinical and environmental isolates were checked for four KPC, VIM, NDM and IMP genes by similar protocol and the presence of above genes in environmental isolates. Furthermore, clinical ones revealed the possibility of bacteria spreading as a superbug increasingly.

Keywords: Carbapenemases, *Pseudomonas aeruginosa*, River Water, Antimicrobial resistance

*Corresponding Author: Mobaiyen Haedeh, Department of Microbiology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

Email: drhmobaiyen@iaut.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0003-2377-3387>