فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۳، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۱۶۱- ۱۷۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱۴ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۳۱

شناسایی ژن *متالوبتالاکتاماز blaSPM-1* در سویه‌های مقاوم به ایمی‌پنم *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران بستری بیمارستان‌های شهر اصفهان

منصور صدیقی: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، mansour_sedighi@yahoo.com
حاجیه قاسمیان صفایی: دانشیار میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، ghasemian@med.mui.ac.ir
حمید واعظ: دانشجوی دکتری میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، vaezhamid84@gmail.com
محسن موقوفه‌ای: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، mohsenmoghoofei@yahoo.com
شیما هادی فر: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، aseman.shima@yahoo.com
گلفام عریان: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، golfamoryanisis_universe@yahoo.com
جمشید فقری*: دانشیار میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، faghri@med.mui.ac.ir

چکیده

مقدمه: *سودوموناس آئروژینوزا* یک پاتوژن فرصت طلب است که باعث بروز مشکلات جدی به خصوص در افراد دچار نقص ایمنی می‌شود. به تازگی، مقاومت به واسطه آنزیم‌های *متالوبتالاکتاماز* (MBLs) در این باکتری باعث اختلال در درمان عفونت‌های ناشی از آن شده است. خانواده ژن‌های *متالوبتالاکتاماز* از جمله *blaSPM-1* باعث ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به ویژه کارباپنم‌ها (مانند ایمی‌پنم) شده و با شیوع بالایی در سراسر جهان گزارش شده‌اند. هدف از این مطالعه، تشخیص ژن *blaSPM-1* در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به ایمی‌پنم جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر اصفهان است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۲۵۲ نمونه از عفونت‌های مختلف بیمارستانی جدا شد. سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا با استفاده* از آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. برای تعیین الگوی مقاومت باکتری از روش دیسک دیفیوژن (کربی- بائر) استفاده شد. کم‌ترین غلظت مهار کنندگی (MIC) ایمی‌پنم در سویه‌های مقاوم به روش E-test بررسی شد. برای شناسایی MBL از روش دیسک ترکیبی استفاده شد. درنهایت، وجود ژن *متالوبتالاکتاماز blaSPM-1* با روش PCR بررسی شد.

نتایج: در کل، ۱۰۶ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شد. در این میان، ۶۲ (۵۸/۵ درصد) از سویه‌ها به ایمی‌پنم مقاومت نشان دادند. میزان MIC ایمی‌پنم در تمامی سویه‌های مقاوم به ایمی‌پنم بالاتر یا مساوی ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. ۲۶ (۴۸ درصد) از سویه‌های مقاوم به ایمی‌پنم تولید کننده MBL بودند. ژن *blaSPM-1* در هیچکدام از این سویه‌ها شناسایی نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میزان مقاومت به ایمی‌پنم ناشی از تولید MBL در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به طور چشمگیری افزایش یافته است. تشخیص سریع و کنترل عفونت اولیه بهترین استراتژی ضدمیکروبی برای مقابله با این ارگانیسم‌هاست. هیچ یک از سویه‌های تولید کننده MBL در این مطالعه حامل ژن *blaSPM-1* نبودند. بنابراین، ژن‌های دیگری خانواده MBLs باید بررسی شوند.

واژه‌های کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، ایمی‌پنم، *متالوبتالاکتاماز*، *blaSPM-1*

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

شایع‌ترین گونه از جنس *سودوموناس* در عفونت‌های انسانی، *سودوموناس آئروژینوزا*[1] است که باسیلی گرم منفی، بدون اسپور و متحرک می‌باشد. این باکتری بر روی پوست و دستگاه گوارشی افراد سالم، در مایعات و سطوح مختلف به ویژه سطوح حمام، دستشویی، دستگاه‌های تنفسی، دیالیز و محلول‌های ضدعفونی وجود دارد. این باکتری به آنتی بیوتیک‌های مختلف مقاومت ذاتی دارد و در طول درمان می‌تواند به سویه‌های مقاوم‌تری تبدیل شود. این باکتری عامل مهم عفونت‌هایی از جمله پنومونی، عفونت‌های بعد از عمل جراحی، عفونت‌های ادراری، عفونت گوش، عفونت اولیه پوستی، عفونت چشمی، باکتریمی و اندوکاردیت است (۱). مصرف کلینیکی آنتی‌بیوتیک‌ها باعث شده است که سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* بیمارستانی که دارای مقاومت چندگانه نسبت به آنتی بیوتیک‌ها (MDR)[2] هستند به طور فزاینده‌ای در سراسر جهان انتشار یابند (۲). نفوذپذیری کم پروتئین‌های غشای خارجی مانند OprD، تغییر در سیستم‌های تراوشی، تولید بتالاکتاماز AmpC و تولید آنزیم‌های *متاوبتالاکتاماز* از عوامل اصلی مقاومت ذاتی این باکتری نسب به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (۳ و ۴). طبق تقسیم‌بندی آمبلر[3] *بتالاکتاماز*ها به ۴ دسته A تا D تقسیم می‌شوند که نوع A، C و D *سرین بتالاکتاماز* هستند درحالی که نوع B *متالوبتالاکتاماز* است (۵). *متالوبتالاکتامازها* در جایگاه فعال خود دارای روی (Zn) می‌باشند و توسط شلاته کننده‌های فلزی مانند دی آمینو تترا استیک اسید (EDTA)[4] مهار می‌شوند ولی توسط مهارکننده‌های بتالاکتاماز مثل سولباکتام، تازوباکتام و کلاولانیک اسید مهار نمی‌شوند (۵ و ۶). کاربا‌پنم‌ها مانند ایمی پنم و مروپنم از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های ضد باکتریایی هستند که از آن‌ها برای درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های چند مقاومتی *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده می‌شود (۷ و ۸). آنزیم‌های *متالوبتالاکتاماز* قادر به هیدرولیز طیف وسیعی از بتالاکتام‌ها از جمله کاربا‌پنم‌ها هستند، اما توانایی هیدرولیز مونوباکتام‌ها مانند آزترونام را ندارند. *متالوبتالاکتاماز* بر اساس ساختار مولکولی به ۶ نوع تقسیم می‌شود که عبارتند از: VIM، IMP، GIM، SPM، SIM و AIM (۷ و ۹). چند روش مختلف برای تشخیص آزمایشگاهی سویه‌های مولد *متالوبتالاکتاماز* (MBL)[5] وجود دارد. از جمله این روش ها، استفاده از بازدارنده‌هایی مانند EDTA است که یک ماده غیر سمی بوده و به راحتی در دسترس است. دیسک‌های حاوی EDTA تا ۱۶ هفته در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری هستند (۱۰). این مطالعه برای تعیین میزان مقاومت سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از نمونه‌های کلینیکی نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف و بررسی وجود آنزیم *متالوبتالاکتاماز SPM-1* در باکتری‌های ایزوله شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های بزرگ شهر اصفهان انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی،۲۵۲ نمونه در طی یک سال از بیماران بستری در بیمارستان‌های بزرگ شهر اصفهان (بیمارستان‌های الزهرا، شریعتی، سوانح و سوختگی امام موسی کاظم، سیدالشهدا، امین، عیسی بن مریم، فیض، آیت ا... کاشانی و کلینیک خانواده) جداسازی شد. این نمونه‌ها شامل خون، خلط، ادرار، زخم، سوختگی، چشم، گوش، کاتتر و پریتوئن بودند. سپس، با

آزمون‌های بیوشیمیایی پایه و بر اساس اصول مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی سی ال اس آی (CLSI)[۶] باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* تعیین هویت شد. شناسایی اولیه بر اساس آزمون‌های اکسیداز، کاتالاز، VP،MR، تخمیر انواع قندها، آزمون سیترات، اندول، TSI، رشد در ۴۲ درجه سانتی‌گراد، رنگ، تولید رنگدانه، بررسی حرکت روی محیط SIM و تولید بوی خاص بود (۱۱). برای انجام آزمایش‌های بعدی این باکتری در محیط مایع BHI و در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۲). الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها با روش استاندارد دیسک دیفیوژن (کربی- بائر)[۷] بر روی محیط مولر هینتون آگار طبق دستورالعمل CLSI انجام شد (۱۳). در این روش ابتدا، سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه شد. سپس، به شکل چمنی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مربوطه بر روی محیط مورد نظر به فاصله ۲ سانتی‌متر از هم جای گذاری شده و پس از انکوباسیون به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد حاصل از آنتی‌بیوگرام اندازه‌گیری شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی استفاده شده در این پژوهش شامل: ایمی پنم (IMI)، مروپنم (MEM)، سفوتاکسیم (CTX)، آمیکاسین (AM)، سفتازیدیم (CAZ)، سفپیم (FEP)، آزترونام (AZT)، سیپروفلوکسازین (CIP) و جنتامایسین (GM) بودند که از شرکت ماست (MAST) [۸]خریداری شدند (۱۴). سپس، کم‌ترین غلظت مهارکنندگی [۹](MIC) سویه‌های غیرحساس به ایمی‌پنم با استفاده از روش نوار E-tese ایمی‌پنم که از شرکت بیومریوکس [۱۰] تهیه شده بود و بر طبق اصول CLSI اندازه‌گیری شد. در ضمن برای کنترل کیفی آزمایش‌ها از جمله آنتی بیوگرام و MIC از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 استفاده شد (۱۵).

برای تعیین سویه‌های مولد *متالوبتالاکتاماز* از روش IMP-EDTA استفاده شد. ابتدا سویه‌های مقاوم به ایمی‌پنم طبق توصیه CLSI بر روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار تلقیح شدند (۱۶). به این شکل که یک عدد دیسک ایمی پنم (۱۰ میکروگرم) و یک عدد دیسک ایمی پنم (۱۰ میکروگرم) حاوی ۷۵۰ میکروگرم EDTA با فاصله مناسب در سطح پلیت قرار داده شد. افزایش قطر هاله عدم رشد به میزان بیشتر یا مساوی ۷ میلی‌متر در اطراف دیسک ایمی پنم حاوی EDTA نسبت به دیسک ایمی پنم به تنهایی نشان دهنده تولید *متالوبتالاکتاماز* است. در این روش، محلول نیم مولار EDTA تهیه و اسیدیته محلول به وسیله سدیم هیدروکسید NaOH در ۸ تنظیم شد. سپس، ۷۵۰ میکروگرم از محلول EDTA روی دیسک ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم) تلقیح شد تا دیسک IPM-EDTA به دست آمد (۱۷). برای استخراج DNA و انجام آزمایش PCR از روش جوشاندن استفاده شد. ابتدا ۳ تا ۵ کلونی تازه از محیط کشت برداشته و در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به شکل سوسپانسیون در آورده و ۱۰ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. سپس، در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. آن‌گاه محلول رویی که حاوی DNA است برای PCR استفاده شد (۱۸). برنامه PCR در ۳۰ سیکل تکثیر در دستگاه ترموسایکلر به قرار زیر انجام شد:

مرحله اولیه جداسازی دو رشته در ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم باز شدن دو رشته[۱۱] در ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، مرحله سوم اتصال پرایمرها[۱۲] در ۵۶ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله چهارم طویل شدن رشته

هدف[13] در ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله آخر طویل شدن نهایی[14] در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه (۱۹). از سویه *سودوموناس آئروژینوزا* ۱۶ مولد SPM-1 به عنوان کنترل مثبت در آزمایش PCR استفاده شد (۲۰). در این آزمایش از یک جفت پرایمر اختصاصی مربوط به ژن *blaSPM-1* استفاده شد (۱۹) (جدول ۱).

جدول ۱- توالی پرایمر اختصاصی ژن *blaSPM-1* مورد استفاده در آزمایش PCR

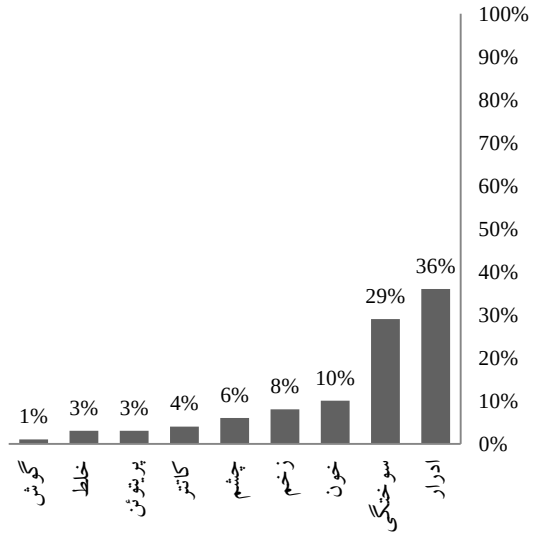
ژن	توالی پرایمر	اندازه
blaSPM-1-F *blaSPM-1*-R	´-CCT ACA ATC TAA CGG CGA CC-3´5 ´-TCG CCG TGT CCA GGT ATA AC-3´5	bp831

نتایج

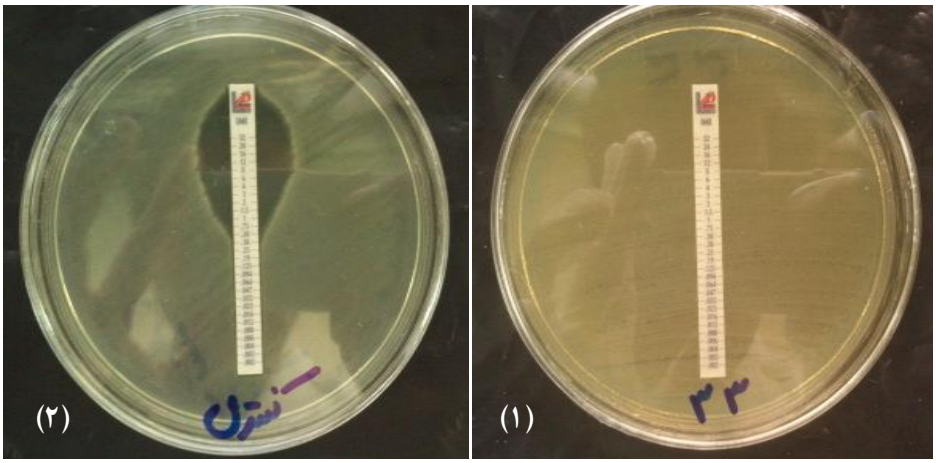
از ۲۵۲ بیمار که از هرکدام ۱ نمونه گرفته شده بود، ۱۰۶ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* ایزوله شد. این نمونه‌ها مربوط به ۷۲ مورد بیماران مرد و ۳۴ مورد زن با میانگین سنی ۴۶ سال بود (جدول ۲). از ۱۰۶ سویه *سودوموناس آئروژینوزای* جمع آوری و تأیید شده به روش‌های بیوشیمیایی در این مطالعه، ۳۸ سویه مربوط به نمونه‌های ادرار، ۳۱ سویه سوختگی، ۱۱ سویه خون، ۹ سویه زخم، ۶ سویه چشم، ۴ سویه کاتتر، ۳ سویه پریتوئن، ۳ سویه خلط و ۱ سویه مربوط به گوش بود (شکل ۱). کم‌ترین مقاومت مربوط به آمیکاسین ۴۶ (۴۳/۴ درصد) و بیش‌ترین مقاومت مربوط به سفپیم و سفوتاکسیم ۱۰۶ (۱۰۰ درصد) بود. میزان مقاومت به سیپروفلوکسازین ۸۲ (۷۷/۴ درصد)، ایمی‌پنم ۶۲ (۵۸/۵ درصد)، مروپنم ۶۲ (۵۸/۵ درصد)، سفتازیدیم ۹۵ (۸۹/۶ درصد)، جنتامایسین ۷۰ (۶۶ درصد) و آزترونام ۱۰۲ (۹۶/۲ درصد) بود (جدول ۲). سپس، میزان MIC ایمی‌پنم با استفاده از روش فنوتیپی نوار E-test اندازه‌گیری شد که در این روش تمامی ۶۲ سویه *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به ایمی‌پنم دارای MIC بیشتر یا مساوی ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند (شکل ۲). سپس، سویه مقاوم به ایمی‌پنم به منظور تولید آنزیم *متالوبتالاکتاماز* به روش کمباین- دیسک[15] ارزیابی شد که ۲۶ (۴۸درصد) سویه از آن‌ها MBL مثبت بود (شکل ۳). آزمایش PCR روی سویه‌های MBL مثبت انجام شد که در نهایت، هیچکدام از آن‌ها دارای ژن *blaSPM-1* نبودند (شکل ۴).

جدول ۲- فراوانی افراد مورد مطالعه

جنس	مرد	زن
تعداد	۷۲	۳۴
فراوانی	۶۸ درصد	۳۲ درصد

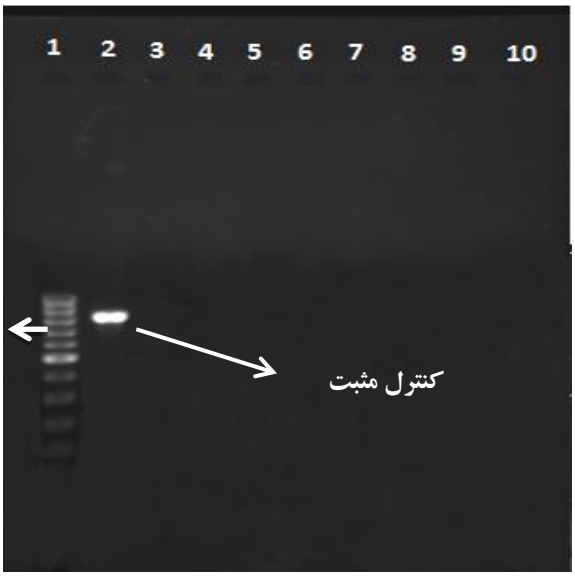


شکل ۱- نمودار درصد فراوانی ایزوله‌های جدا شده از بیماران بستری



شکل ۲- اندازه‌گیری میزان MIC در ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم (۱) و مقایسه آن با سویه کنترل (۲) به روش E test-IMP

شکل ۳- تشخیص سویه‌های *متالوبتالاکتاماز* مثبت به روش IPM-EDTA



شکل ۴- آزمایش PCR برای ژن *blaSPM-1*

لاین ۱: ladder 100bp DNA؛ لاین ۳-۶: محصول PCR نمونه‌ها؛ لاین ۲: کنترل مثبت؛ لاین ۷: کنترل منفی (*P. aeruginosa* ATCC27853)

بحث و نتیجه‌گیری

متالوبتالاکتامازها به علت ایجاد مقاومت به کاربا‌پنم‌ها که از مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده علیه عفونت‌های *سودوموناس آئروژینوزا* هستند، بسیار مهم می‌باشند (۲۱). کاربا‌پنم‌ها مانند: ایمیپنم، مروپنم، بیاپنم و ارتاپنم کلاس مهمی از داروهای بتالاکتام هستند که در برابر *بتالاکتامازها* مقاوم هستند، در نتیجه بروز مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در *سودوموناس آئروژینوزا* که نقش مهمی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی دارد، یک تهدید جدی در درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری به حساب می‌آید(۲۲).

در یک بررسی که در سال ۲۰۰۵ توسط ماگالاس[۱۶] و همکاران در برزیل انجام شد، ۴۸ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* جمع آوری شد که ۲۴ نمونه مقاوم به ایمی‌پنم بودند. در این میان ۱۵ نمونه تولیدکننده آنزیم *متالوبتالاکتاماز* بوده و تمامی ایزوله‌های تولیدکننده آنزیم حامل ژن *blaSPM-1* بودند (۲۳). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ توسط فرانکو[۱۷] و همکاران بر روی ایزوله‌های خونی *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد فراوانی سویه‌های مقاوم به ایمی‌پنم ۳۴ درصد گزارش شد. ۷۷ درصد نمونه‌ها تولیدکننده آنزیم *متالوبتالاکتاماز* بوده که از این میان ۸۱ درصد دارای ژن *blaSPM-1* بودند (۲۴). در مطالعه صادقی[۱۸] و همکاران در سال ۲۰۱۲ در استان مرکزی که بر روی ۱۰۸ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد هیچ کدام از سویه‌ها ژن *blaSPM-1* را نشان ندادند (۲۵). در مطالعه دیگری توسط یوسفی[۱۹] و همکاران در سال ۲۰۱۰ در شمال غربی کشور از ۱۰۴ ایزوله، ۳۹ ایزوله در آزمون فنوتیپی دارای آنزیم *متالوبتالاکتاماز* بودند اما هیچکدام از آن‌ها در آزمایش PCR ژن *blaSPM-1* را نداشتند (۲۶). در بررسی شاهچراغی[۲۰] و همکاران که در سال ۲۰۰۹ در بیمارستان امام خمینی تهران بر روی ۲۴۳ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد، از ۲۸ نمونه مقاوم به ایمی‌پنم ۲۲ نمونه آنزیم *متالوبتالاکتاماز* تولید کردند، اما با روش PCR هیچ‌کدام از آن‌ها ژن *blaSPM-1* را نشان ندادند (۲۷). در این مطالعه نیز از ۲۶ سویه که دارای آنزیم *متالوبتالاکتاماز* بودند هیچ‌کدام ژن *blaSPM-1* را نداشتند. بنابراین، این مطالعه به همراه مطالعات گذشته و مقایسه آن با کشورهای خارجی گویای آن است که با وجود افزایش و انتشار سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* دارای مقاومت چندگانه به ویژه مقاوم به ایمی‌پنم و دارای آنزیم *متالوبتالاکتاماز* در ایران، سویه‌های دارای ژن *متالوبتالاکتامازی blaSPM-1* هنوز در این کشور ظهور نکرده است. این مطلب نشان دهنده وجود ژن‌های دیگر خانواده *متالوبتالاکتامازها* در این سویه‌های مقاوم است. بنابراین، با توجه به اهمیت سویه‌های دارای مقاومت چندگانه و انتشار آن‌ها در بیمارستان، کوشش برای یافتن سایر ژن‌های *متالوبتالاکتامازی* باید انجام شود. البته سایر مکانیسم‌های مقاومت از جمله ایفلاکس پمپ ها، نقص و فقدان پروتئین‌های غشای خارجی از جمله OprD و تولید کارباپنمازهای کلاس D(OXA-23,OXA-40,OXA-48,OXA-58) نیز در ایجاد مقاومت به کاربا‌پنم‌ها و ایجاد سویه‌های دارای مقاومت چندگانه دخیل می‌باشند که در آزمایشگاه برای تعیین سویه‌های مقاوم و تشخیص صحیح روش درمانی بسیار مهم است (۲۸).

از آنجا که *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب در محیط‌های بیمارستانی مطرح است، برنامه ریزی دقیق و هدفمند برای جلوگیری از

انتشار باکتری و تجویز صحیح آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط سویه‌های با مقاومت چندگانه می‌تواند از پیدایش چنین سویه‌هایی جلوگیری کند. تشخیص باکتری‌های دارای آنزیم‌های *متالوبتالاکتاماز*، گزارش دقیق و سریع این آنزیم‌ها و شناسایی ژن‌های مولد آن‌ها به منظور نظارت بهتر در ردیابی مقاومت چندگانه می‌تواند گسترش عفونت‌های بیمارستانی را کاهش دهد.

تشکر و قدردانی

از سرکار خانم سعادت پیروزی کارشناس علوم آزمایشگاهی که نویسندگان را در انجام این طرح یاری فرمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Fazeli H., Fatahi Bafghi M., Faghri M., Akbari R. Molecular Study of PER and VEB Genes is Multidrug Resistant *Pseudomonas aeroginosa* Isolated from Clinical Specimens in Isfahan/Iran and their Antibiotic Resistance Patterns. *Kerman University of Medical Sciences Journal* 2010; 19 (4): 345- 53.

(2) Chanawong A., M'zali FH., Heritage J., Lulitanond A., Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β- lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 48: 839- 52.

(3) Rossolini GM., Mantegoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection journal* 2005; 11: 17- 32.

(4) Zavascki AP., Carvalhaes CG., Picao RC., Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2010; 8 (1): 71- 93.

(5) 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. *Clinical Microbiology and Infection journal* 2008; 14 (8): 755- 9.

(6) Laupland KB., Parkins MD., Church DL., Gregson DB., Louie TJ., Conly JM., et al. Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallobeta- lactamase (MBL)- producing strains. *Journal of Infectious Diseases*s 2005; 192 (9): 1606-12.

(7) Fazeli H., Moslehi Tkantph g., Ayrajyan G., Salehi M. Drug resistance pattern and identi.fication of bla- VIM MBL genes in P. aeruginosa strains isolated from burn patients in the hospital Svanhv Imam Musa Kazim (AS), Isfahan (1378-88). *Iranian Journal of Medical Microbiology* 1388; 4 (3): 1- 8.

(8) Shahcheraghi F., Nikbin VS. MBL enzymes and determination of resistance to antibiotics ceftazidime and imipenem-resistant *P. aeruginosa* strains isolated from clinical samples of Imam Khomeini Hospital and Children's Medical Center in 1384. *Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine Association of the Infectious disease specialists* 1386; 12 (36): 19- 22.

(9) Huang YT., Chang SC., Lauderdale TL., Yang AJ., Wang JT. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-beta-lactamase genes in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 2007; 59 (2): 211- 6.

(10) 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. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43 (7): 3129- 35.

(11) Tramper- Stranders GA., van der Ent CK., Wolfs TF. Detection of Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 2005; 4 (2): 37-43.

(12) Shahcheraghi F., Nikbin VS., Shvrj F. Molecular study of Beta-Lactamase PER, VEB, SHV and TEM strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from wound infections in two hospitals of Tehran by PCR. *Journal of Medical Microbiology* 1386; 1 (4): 21- 7.

(13) Forbes BA., Sahm DF., Weissfeld AS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th ed. *Missouri: Mosby Company* 2002; 389- 91.

(14) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial susceptibility Testing: Document M10-S15. USA: *Wayne, PA*; CLSI; 2005.

(15) Lee K., Yum J H., Shin HB., Rossolini GM., Chong Y. Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo-ß-Lactamase- Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas spp*. and *Acinetobacter spp*. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40 (10): 3798- 801.

(16) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for antoimicrobil disk susceptibility test (M2-T4). 4th ed. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998.

(17) Sacha P., Wieczorek P., Hauschild T., Zórawski M., Olszańska D., Tryniszewska E. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*: a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* 2008; 46 (2): 137- 42.

(18) Rodríguez-Baño J., Navarro MD., Romero L., Martínez-Martínez L., Muniain MA., Perea EJ., et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli in nonhospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42 (3): 1089- 94.

(19) Renata Gomes Franco M., Hehl Caiaffa-Filho H., Nascimento Burattini M., Rossi F. Metallo- beta- lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian university hospital. *Clinical Science* 2010; 65 (9): 825- 9.

(20) Crespo MP., Woodford N., Sinclair A., Kaufmann ME., Turton J., Glover J., et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42 (11): 5094-101.

(21) Cornaglia G., Mazzariol A., Lauretti L., Rossolini GM., Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 31 (5): 1119- 25.

(22) Luzzaro F., Endimiani A., Docquier JD., Mugnaioli C., Bonsignori M., Amicosante G., et al. Prevalence and characterization of Metallo-β-lactamases in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 2004; 48: 131- 5.

(23) Magalhães V., Kelly Lins A., Magalhães M. Metallo- β- lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 2005; 36: 123- 5.

(24) Renata Gomes Franco M., Hehl Caiaffa-Filho H., Nascimento Burattini M., Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian university hospital. *Clinical Science* 2010; 65 (9): 825- 9.

(25) Sadeghi A., Rahimi B., Shojapour M. Molecular detection of metallo-β-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 Journal of Microbiology Research* 2012; 6 (12): 2965- 69.

(26) Yousefi S., Farajnia S., Nahaei MR., Akhi MT., Ghotaslou R., Soroush MH., et al. Detection of metallo- β- lactamase–encoding genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in northwest of Iran. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2010; 68: 322- 5

(27) Shahcheraghi F., Nikbin VS., Shvrj F., Shafii M. Check MBL genes blaIMP-1, blaVIM-1 and *blaSPM-1* in *P. aeruginosa* strains isolated from Tehran Imam Khomeini Hospital. *Journal of Shahid Beheshti University of Medical Sciences* 1388; 14 (2): 67- 72.

(28) Rodríguez-Martínez JM., Poirel L., Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53 (11): 4783- 8.

---

[1]- *Pseudomonas aeruginosa*
[2]- *multi-drug resistance*
[3]- Ambler
[4]- Ethylene diamine tetra acetic acid
[5]- Metallo-Beta-Lactamase
[6]- *Clinical and Laboratory Standards Institute*
[7]- Kirby-Bauer
[8]- Manufacturer of Antibiotic Susceptibility Test
[9]- Minimum Inhibitory Concentration
[10]- bioMérieux
[11]- Denaturing Step
[12]- Annealing Step
[13]- Extension Step
[14]- Final Extension Step
[15]- Combined Disk
[16]- Magalhaes
[17]- Franco
[18]. Sadeghi
[19]- Yousefi
[20]- Shahcheraghi

Detection of *blaSPM-1 metallo-β-lactamase* gene in Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in Isfahan hospitals

Mansour Sedighi
M.Sc Student of Microbilogy, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, mansour_sedighi@yahoo.com
Hajieh Ghasemian safaie
Professor of Microbilogy, Isfahan Univercity of Medical Sciences, Iran, ghasemian@med.mui.ac.ir
Hamid Vaez
Ph.D Student of Microbilogy, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, vaezhamid84@gmail.com
Mohsen Moghoofeie
M.Sc Student of Microbilogy, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, mohsenmoghoofei@yahoo.com
Shima Hadifar
M.Sc student of Microbilogy, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, aseman.shima@yahoo.com
Golfam Oryan
M.Sc Student of Microbilogy, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, golfamoryanisis_universe@yahoo.com
Jamshid Faghri *
Associate Professor of Microbilogy, Isfahan Univercity of Medical Sciences, Iran, faghri@med.mui.ac.ir

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic human pathogen which causes serious problems especially in people who have immunodeficiency. Recently, *metallo-β-lactamase* (MBLs) resistance in this bacterium has led some difficulties in treating bacterial infections. MBL gene family, including *blaSPM-1* caused resistance to beta-lactam antibiotics especially carbapenem (eg, imipenem) and have been reported with high prevalence worldwide. The aim of this study is detection of *metallo-β-lactamase* gene *blaSPM-1* in Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in Isfahan hospitals.

Materials and methods: In this study, 252 samples were isolated from various nosocomial infections. These isolates were identified as *Pseudomonas aeruginosa* by using biochemical tests. Disk diffusion method (Kirby-Bauer) was used to determine the bacterial drug resistance pattern. All imipenem-resistant isolates were screened for the presence of MBLs by using the Combine disk (IMP-EDTA). The minimal inhibitory concentration (MIC) of imipenem was determined by E-test on Mueller-Hinton agar. To detect *blaSPM-1* gene, the isolates were subjected to polymerase chain reaction (PCR).

Results: In total, 106 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were collected. Of all isolates, 62 (58.5 %) were found to be imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. MIC levels in all strains of imipenem-resistant were MIC≥32μg/ml. Twenty-six (48 %) of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates were MBL positive. None of the isolates carried *blaSPM-1* gene by PCR assay.

Discussion and conclusion: Results of this study demonstrate that the rate of imipenem resistance due to MBL is increased dramatically. Early detection and infection-control practices are the best antimicrobial strategies for this organism. None of MBL-producing isolates in this study carry *blaSPM-1* gene; therefore another gene in MBLs family should be investigated.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Imipenem, *Metallo-β-lactamase*, *BlaSPM-1*

* Corresponding author
Received: January 4, 2014 / **Accepted:** May 21, 2014