مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
بهار ۱۳۹۳؛۶(۱): ۴۰-۳۳

*Journal of North Khorasan University of Medical Sciences*
*Spring2014;6(1): 33-40*

**مقاله پژوهشی**

# الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های بالینی سودوموناس آئروجینوزای مولد متالوبتالاکتاماز و فاقد متالوبتالاکتاماز در مشهد

*مریم حسینی حسن آبادی[۱]، محبوبه نخعی مقدم[۲]*، منصور بیات[۳]، فاطمه کلالی نیا[۴]*

[۱]کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
[۲]استادیار میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست شناسی، مشهد، ایران
[۳]دانشیار قارچ شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، تهران، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده تخصصی دامپزشکی، ایران
[۴]استادیار بیوتکنولوژی دارویی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
***نویسنده مسئول:** استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
پست الکترونیک: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

**وصول:۹۲/۴/۱۹ اصلاح: ۹۲/۵/۲۷پذیرش:۹۲/۶/۱۶**

**چکیده**

**زمینه و هدف:** متالوبتالاکتامازهای وابسته به روی طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام، بخصوص کارباپنم ها را غیر فعال می کنند. یکی از علل مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری سودوموناس آئروجینوزا تولید این آنزیم هاست. هدف از انجام این تحقیق، جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری های سودوموناس آئروجینوزا در مشهد و مقایسه‌ی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های مولد متالوبتالاکتاماز و فاقد بتالاکتاماز در میان آن ها بود.

**مواد و روش کار:** در این تحقیق ۶۴ باکتری سودوموناس آئروجینوزا از نمونه های مختلف بیماران بستری در مشهد جدا و شناسایی شدند. شناسایی تأییدی باکتری ها با استفاده از واکنش زنجیره پلیمراز و پرایمر اختصاصی 16S rRNA انجام گرفت. باکتری های مولد متالوبتالاکتاماز با استفاده از دیسک ایمی پنم در مجاورت دیسک حاوی ایمی پنم و EDTA شناسایی شدند و آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار در آگار متد کربای بایر انجام شد.

**یافته ها:** از میان ۶۴ باکتری جدا شده، ۲۲ ایزوله (۳۴/۳۸٪) مولد متالوبتالاکتاماز بودند که ۸۱/۸٪ آنها مقاوم به ایمی پنم بودند. مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مروپنم، ایمی پنم، کاربنی سیلین و سفتازیدیم بطور معنی داری در میان باکتری های مولد متالوبتالاکتاماز بیشتر از انواع فاقد متالوبتالاکتاماز بود ($p<۰/۰۵$).

**نتیجه گیری:** بررسی حاضر نشان دهنده بالا بودن باکتری های مولد متالوبتالاکتاماز در ناحیه مورد بررسی و افزایش مقاومت به ایمی پنم در میان آن هاست. بنظر می رسد شیوع این باکتری ها در کشورمان رو به افزایش است که این امر ضرورت تدابیر بیشتر برای مدیریت تجویز آنتی بیوتیک و کنترل مقاومت را ایجاب می نماید.

**واژه های کلیدی:** سودوموناس آئروجینوزا، متالوبتالاکتاماز، مقاومت آنتی بیوتیکی، 16S rRNA

**مقدمه**

سودوموناس آئروجینوزا یک باسیل گرم منفی و هوازی است که می تواند در اغلب محیط ها مانند خاک، آب های سطحی، پساب و غیره رشد کند [۱]. سودوموناس آئروجینوزا عامل مولد عفونت های ریوی، ادرار، سوختگی، زخم و همچنین عفونت های خونی می باشد [۲]. یکی از مشخصات مهم آن مقاومت بالا نسبت به انواعی از آنتی بیوتیک هاست که از طریق ژن ها کد می شود [۳]. مقاومت اکتسابی را از طریق جهش در ژن های کروموزومی یا توسط انتقال افقی ژن مقاومت گسترش می دهد [۴]. پیدایش آنزیم های بتالاکتاماز در میان باکتری ها باعث پدیده مقاومت در بسیاری از آنها به ویژه باکتری

های ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی شده است [۵]. این آنزیم ها که بسیاری از آن ها بتالاکتاماز با طیف وسیع (ESBL[1]) نامیده می شوند، در طبقه بندی آمبلر به چهار گروه اصلی A تا D تقسیم می شوند. گروه B شامل متالوبتالاکتامازهای (MBLs[2]) وابسته به روی (Zn) هستند که قادر به هیدرولیز کاربا‌پنم ها هستند و در باکتری هایی مانند سودوموناس آئروجینوزا و سراشیا مارسنس گزارش شده اند [۶]. متالوبتالاکتامازها آنزیم هایی هستند که توسط کروموزوم ها و یا پلاسمیدها کد می شوند و روی طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام به خصوص کاربا‌پنم ها اثر می گذارند و باعث هیدرولیز آن ها می شوند [۷]، اما روی منوباکتام ها اثری ندارند [۸]. انتشار باکتری های سودوموناس آئروجینوزای مولد MBL تهدید بالینی بزرگی به حساب می آید، زیرا این باکتری ها انتخاب درمان ضد باکتریایی را بسیار محدود می کنند و نسبت به انواع فاقد MBL، باعث عفونت های خطرناکی می شوند که حیات شخص را تهدید می نمایند [۸]. این آنزیم ها در شریط آزمایشگاهی (in vitro) توسط شلاتورهای فلزی مانند EDTA (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید) و سدیم مرکاپتواستیک اسید مهار می گردند، اما توسط مهار کننده های ESBL مانند سولباکتام و کلاولانیک اسید مهار نمی شوند [۹].

پیدایش و کشف کاربا‌پنم ها پیشرفت بزرگی در زمینه درمان آنتی بیوتیکی ایجاد کرد. به دلیل فعالیت وسیع این دسته از آنتی بیوتیک ها و پایداری آن ها نسبت به بتالاکتامازها امروزه از آنها برای درمان عفونت های ناشی از باکتری های گرم منفی مقاوم به سفالوسپورین یا پنی سیلین استفاده می شود. کاربا‌پنم ها موفق ترین آنتی بیوتیک های بتالاکتامی هستند که تا حدودی از دسترس مقاومت باکتریایی در امان مانده اند، اما بتازگی مقاومت اکتسابی روزافزون نسبت به کاربا‌پنم ها مشکلات بالینی را به وجود آورده است [۱۰].

سودوموناس آئروجینوزا یکی از باکتری های شایع با مقاومت های آنتی بیوتیکی بالاست که بوفور از بیماران بستری در بیمارستان های مشهد جدا می شود و تا جایی که جستجو شد گزارشی در مورد مقاومت های ناشی از تولید متالوبتالاکتاماز در آنها در این ناحیه وجود نداشت. بر این اساس هدف از انجام این تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری های سودوموناس آئروجینوزا از نمونه های بالینی بیماران بستری در بیمارستان های مشهد، بررسی و مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها در دو گروه مولد متالوبتالاکتاماز و فاقد متالوبتالاکتاماز نسبت به آنتی بیوتیک ها بود.

**روش کار**

در این مطالعه توصیفی- مقطعی ۶۴ باکتری سودوموناس آئروجینوزا از نمونه های مختلف (ادرار، خون، تراشه، مایع صفاقی، ترشحات چشم، ریه، گوش حلق و سوختگی) بیماران بستری در بیمارستان های قائم و امام رضا (ع) شهر مشهد در سال ۱۳۹۱جمع آوری شدند. تمامی نمونه های بیماران که طبق دستور پزشک از نظر جداسازی باکتری به آزمایشگاه بیمارستانها ارسال می شدند، مورد آزمایش قرار گرفتند. شناسایی باکتریها با استفاده از آزمایش های افتراقی معمول مثل اکسیداز، کاتالاز، کشت در محیط TSI آگار، کشت در محیط ستریماید آگار، آزمایش های اندول، متیل رد، وگس پروسکایر، سیمون سیترات، رشد در دمای ۴۲°C و کشت در محیط SIM انجام گرفت [۱۱].

پس از کشت باکتریها در محیط لوریا برتانی (Biomark-B699) حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپی سیلین، DNA کروموزومی با روش کلروفرم استخراج شد [۱۲]. برای این منظور پس از سانتریفیوژ ۱/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی، به رسوب حاصل، ۲۰۰ میکرولیتر بافر متلاشی کننده (حاوی تریس، سدیم استات، EDTA و SDS) و ۶۶ میکرولیتر کلرور سدیم ۵ مولار اضافه شد. سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. مایع شفاف رویی به آرامی به لوله اپندروف سترون منتقل گردید. سپس هم حجم آن کلروفرم اضافه و مخلوط شد تا رنگ شیری حاصل شود. بعد از سانتریفیوژ، مایع شفاف رویی جدا و به منظور شستشو به آن اتانول ۱۰۰ درصد اضافه و به آرامی مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ

1- Extended spectrum beta-lactamase
2- Methallo-beta-lactamases

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای انجام PCR

| نام پرایمر | 16S rRNA |
|---|---|
| توالی Forward ($5'\rightarrow3'$) | CACCTGGACTGATACTGACACTGAG |
| توالی Reverse ($5'\rightarrow3'$) | CCTACGGCTACCTTGTTACGACTTC |
| طول محصول PCR | 780 bp |

جدول ۲: چرخه‌های تکثیری و زمان و دمای هر چرخه برای تکثیر ژن ۱۶S rRNA

| مراحل | درجه حرارت (°C) | زمان | تعداد چرخه |
|---|---|---|---|
| شروع | ۹۵ | ۵ دقیقه | ۱ |
| واسرشت | ۹۶ | ۳۰ ثانیه | |
| اتصال | ۵۸ | ۳۰ ثانیه | ۳۰ |
| طویل شدن | ۷۲ | ۳۰ ثانیه | |
| طویل شدن نهایی | ۷۲ | ۵ دقیقه | ۱ |

شد. DNA رسوب داده شده با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد و پس از خشک شدن در هوا در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید. نمونه‌ها برای استفاده بعدی در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند.

شناسایی تأییدی ایزوله ها بر اساس روش مولکولی با کمک تکنیک واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) [۱۳] و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ۱۶S rRNA سودوموناس آئروجینوزا انجام گرفت. پرایمرها با استفاده از نرم افزار AllelID نسخه ۶ و بر اساس توالی ژن ۱۶S rRNA که در سایت NCBI آمده است، طراحی شدند و ویژگی های آن ها در جدول ۱ آمده است.

مواد واکنش در حجم ۳۰ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراجی، ۳ µL بافر PCR 10X، ۱ µL از پرایمرها (۱۰ µM)، ۰/۵ µL مخلوط dNTPs (۱۰mM)، ۰/۲۵ µL آنزیم Taq DNA پلیمراز و ۱ µL کلرید منیزیم (۱۰mM) بود. جدول ۲ شرایط انجام PCR را بعد از بهینه سازی روش نشان می دهد.

بعد از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با Green viewer، محصولات نهایی تکثیر از نظر حضور قطعاتی با وزن مولکولی ۷۸۰ جفت باز در کنار مارکر استاندارد با باندهای ۱۰۰ جفت بازی مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت باندهای DNA با دستگاه ژل داک Gel)

(Documentation عکس برداری شد. از سودوموناس آئروجینوزا ATCC 9027 که از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران دریافت شده بود، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار در آگار مند Kirby Bauer و استانداردهای CLSI[1] انجام گرفت [۱۴]. برای این منظور از سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک فارلند و محیط مولر هینتون آگار (Merck- آلمان) استفاده شد. دیسک های آنتی بیوتیکی از شرکت Mast انگلستان تهیه شدند و عبارت بوند از: مروپنم (۱۰ میکروگرم)، کاربنی سیلین (میکروگرم ۱۰۰)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفتیزوکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم).

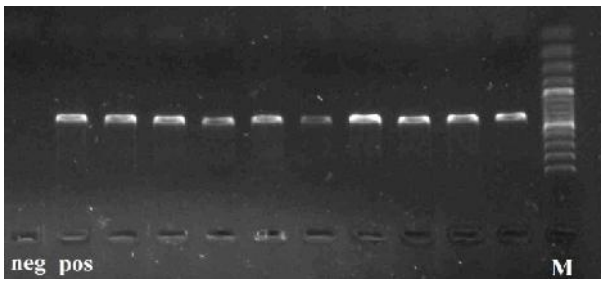
برای تعیین باکتری های مولد متالوبتالاکتاماز، از سوسپانسیون میکروبی استاندارد کشت یکنواخت در محیط مولر هینتون آگار تهیه شد. سپس دو عدد دیسک ایمی پنم ۱۰ میکروگرم با فاصله ۳ سانتی متر روی محیط قرار گرفتند. یکی از دیسک ها با ۱۰ میکرولیتر EDTA ۰/۵ مولار آغشته شد و پلیت ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای $37^{o}C$ گرمخانه قرار گرفتند. در نهایت قطر هاله عدم رشد دیسک ها با یکدیگر مقایسه شدند و نمونه هایی که هاله عدم رشد دیسک ایمی پنم + EDTA آن ها ۷ ≥ میلی متر بیشتر از دیسک ایمی پنم بود، به عنوان متالوبتالاکتاماز در نظر گرفته شدند [۱۵].

برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۶) و برای آنالیز میزان مقاومت آنتی بیوتیکی بین ایزوله های مولد متالوبتالاکتاماز و فاقد متالوبتالاکتاماز از آزمون Chi square استفاده شد و نتایج با p value کم تر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی دار[2] در نظر گرفته شد.

**یافته ها**

در مجموع ۶۴ باکتری سودوموناس آئروجینوزا از نمونه های بیماران جدا شد که همگی با روش PCR و با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن ۱۶S rRNA تأیید شدند (شکل ۱).

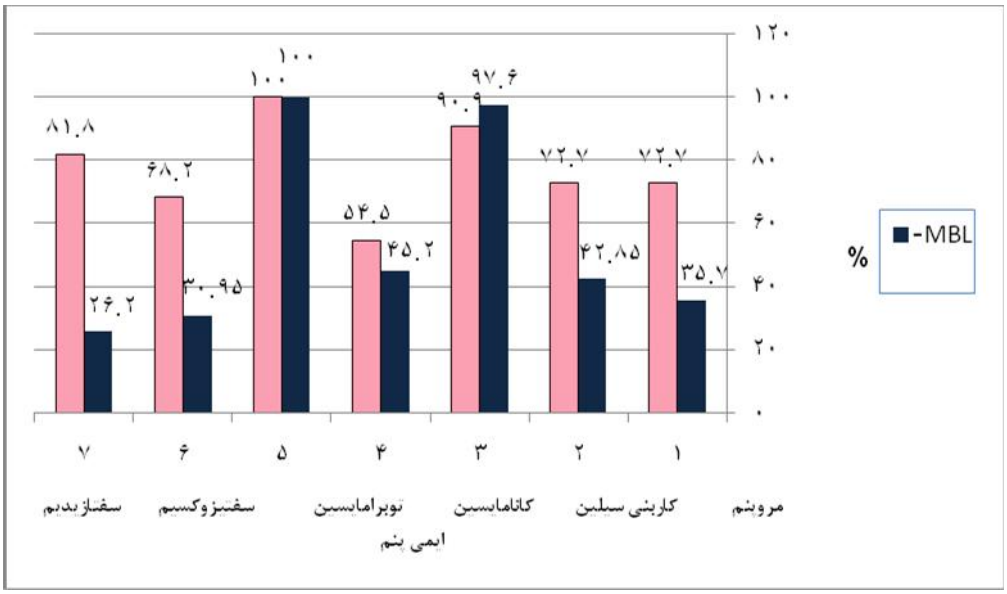
تمامی باکتری های جدا شده نسبت به سفتیزوکسیم مقاوم بودند. کم ترین میزان مقاومت نسبت به توبرامایسین (۳۴/۴٪) و بیشترین مقاومت بعد از سفتیزوکسیم نسبت به کانامایسین (۹۵/۳٪) بود. از میان ۶۴ ایزوله بالینی سودوموناس آئروجینوزا، ۲۲ باکتری (۳۴/۳۸٪) مولد متالوبتالاکتاماز بودند که در میان آن ها به ترتیب تعداد ۱۶، ۲۰، ۱۲، ۱۵، ۱۶ و ۱۸ ایزوله، مقاوم به آنتی بیوتیک های مروپنم، کانامایسین، توبرامایسین، سفتازیدیم، کاربنی سیلین و ایمی پنم بودند. میزان مقاومت آنتی بیوتیکی برای دو گروه مولد بتالاکتاماز و فاقد متالوبتالاکتاماز در نمودار ۱ مقایسه شده است. همانطوری که در نمودار مشخص است بجز آنتی بیوتیک های سفتیزوکسیم و کانامایسین، میزان مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها در باکتری های مولد متالوبتالاکتاماز بیشتر بود که تفاوت برای مروپنم، کاربنی سیلین، سفتازیدیم و ایمی پنم معنی دار بود ($p < ۰/۰۵$).




شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR ژن ۱۶S rRNA بر روی ژل آگاروز؛ (M) مارکر استاندارد ۱۰۰ جفت بازی، neg کنترل منفی، pos کنترل مثبت.

1- Clinical and Laboratory Standards Institute

2- Significant




نمودار ۱: درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های سودوموناس آئروجینوزای مولد متالوبتالاکتاماز و فاقد متالوبتالاکتاماز

**بحث**

در تحقیق حاضر از ۶۴ باکتری سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از نمونه های بیماران بستری که همگی با استفاده از ژن 16S rRNA شناسایی شدند، ۲۲ ایزوله (۳۴/۳۸٪) قادر به تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند که میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مروپنم، کاربنی سیلین، سفتازیدیم و ایمی پنم بطور معنی داری در میان باکتری های مولد متالوبتالاکتاماز بیشتر از انواع فاقد متالوبتالاکتاماز بود ($p<0/05$). با مقایسه انجام شده با سایر گزارشات به نظر می رسد میزان شیوع ایزوله های سودوموناس آئروجینوزای مولد متالوبتالاکتاماز در کشورمان رو به افزایش است. در بررسی سال ۱۳۸۶ بر روی ۱۲۰ ایزوله سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از بخش سوختگی بیمارستان شفای شهر کرمان، هیچ سویه ی مولد متالوبتالاکتاماز مشاهده نگردید [۱۶]. اما در بررسی دیگری که در سال ۱۳۸۸ در کرمان انجام شد از میان ۷۶ ایزوله سودوموناس آئروجینوزا، یک مورد که از عفونت سوختگی جدا شده بود، به ایمی پنم مقاوم و به عنوان مولد متالوبتالاکتاماز شناخته شد که به نظر می رسد این گزارش نشان دهنده شروع گزارش های مقاومت به کارباپنم ها در این منطقه بود [۱۷]. در بررسی که توسط فاطمه میهنی و همکارانش در سال ۱۳۸۶ بر روی باکتری های سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از بخش سوختگی بیمارستان طالقانی شهر اهواز انجام گرفت، از بین ۱۰۰ نمونه بالینی جدا شده، ۴۲ باکتری مقاوم به ایمی پنم و ۸ نمونه (۸٪) به عنوان مولد متالوبتالاکتاماز معرفی شدند [۱۸]. شیوع سودوموناس آئروجینوزای مولد متالوبتالاکتاماز در تحقیق حاضر بیشتر از میزان ارائه شده در شهر اهواز است که می تواند مربوط به اختلاف در زمان انجام تحقیق و ناحیه جغرافیایی باشد.

در سال ۲۰۰۵ در ترکیه از میان ۱۲۰ ایزوله سودوموناس آئروجینوزای جمع آوری شده از بیماران مبتلا به عفونت

های سوختگی، ۳۰/۸ درصد آن ها به ایمی پنم مقاوم بودند، که از میان انواع مقاوم به ایمی پنم ۲۱ ایزوله (۵۶/۸٪) مولد متالوبتالاکتاماز بودند [۱۹]. در بررسی که در سال ۲۰۰۸ در هند انجام شد، ۲/۸ درصد از ایزوله های سودوموناس آئروجینوزای مولد متالوبتالاکتاماز بودند [۲۰]. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۳ در کشور ژاپن صورت گرفت، نشان داده شد که بیماران آلوده با سودوموناس آئروجینوزای مولد متالوبتالاکتاماز برای درمان، آنتی بیوتیک های مختلفی دریافت می کنند و مرگ و میر ناشی از عفونت توسط این باکتری ها، بیشتر از انواع فاقد این آنزیم می باشد [۲۱]. در سال ۲۰۰۹، لی[1] و همکاران شیوع باکتری های مولد متالوبتالاکتاماز را در کشور کره جنوبی بررسی نمودند که ۱۰/۸ درصد از ۴۱۵ باکتری جدا شده قادر به تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند [۲۲]. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۲ بر روی ۵۶ ایزوله بالینی سودوموناس آئروجینوزای مقاوم به ایمی پنم در برزیل انجام شد، ۱۳ باکتری (۲۳/۲٪) دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند [۲۳]. مقایسه بررسی حاضر با بسیاری از مطالعات انجام شده در سایر کشورها نشان دهنده بالا بودن تعداد ایزوله های سودوموناس آئروجینوزای مولد متالوبتالاکتاماز و مقاومت به ایمی پنم در شهر مشهد و شاید در کشورمان است. در مطالعه ای که در سال ۱۳۹۲ بر روی ۷۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروجینوزا در زنجان انجام شد، از این تعداد ۴۴ باکتری (۶۲/۸٪) مقاوم به ایمی پنم بودند که از میان آن ها، ۴۱ ایزوله (۵۸/۶٪) آنزیم متالوبتالاکتاماز داشتند [۲۴]. با توجه به مطالعات اخیر بنظر می رسد که شیوع باکتری های مولد MBL در کشورمان رو به افزایش است. از طرفی مقایسه مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های مولد متالوبتالاکتاماز و فاقد متالوبتالاکتاماز در تحقیق حاضر نشان می دهد که مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام در ایزوله های مولد متالوبتالاکتاماز نسبت به ایزوله های فاقد این آنزیم بیشتر است، این امر تأکیدی بر تاثیر آنزیم متالوبتالاکتاماز بر روی آنتی بیوتیک های بتالاکتام است.

در مقالات گزارش هایی از مقاومت بیشتر سویه های مولد بتالاکتاماز طیف وسیع (ESBLs) نسبت به آنتی بیوتیک های غیر بتالاکتام مثل آمینوگلیکوزیدها و کینولون ها در مقایسه با سویه های فاقد بتالاکتاماز وجود دارد [۲۵، ۲۶]. در تحقیق حاضر مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آمینوگلیکوزیدهایی مثل کانامایسین و توبرامایسین در دو گروه مولد متالوبتالاکتاماز و فاقد متالوبتالاکتاماز تغییر چندانی نشان نمی دهد، این نتیجه می تواند نشان دهنده ی عدم انتقال همزمان ژن تولید متالوبتالاکتاماز و ژن مقاومت به آمینوگلیکوزیدها باشد.

مهم ترین محدودیت های این تحقیق عبارت یودند از محدودیت زمان و هزینه که خود باعث شد نتوانیم تعداد بیشتری از ایزوله ها را مورد بررسی قرار دهیم.

**نتیجه گیری**

نتایج تحقیق نشان دهنده آنست که شیوع سویه های مولد متالوبتالاکتاماز سودوموناس آئروجینوزا در کشورمان رو به افزایش است که خود نشان دهنده افزایش مقاومت های آنتی بیوتیکی در این باکتری است. این امر ضرورت تدابیر بیشتر در مورد مدیریت تجویز آنتی بیوتیک ها و کنترل مقاومت در این باکتریها را ایجاب می نماید. از طرفی نتایج حاکی از آن است که در دو گروه متالوبتالاکتاماز و فاقد متالوبتالاکتاماز اختلاف معنی داری در میزان مقاومت نسبت به توبرامایسین و کانامایسین وجود ندارد.

**تشکر و قدردانی**

این پژوهش در دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام شده است که بدین وسیله از تمامی مسئولین این دانشگاه سپاسگزاری و قدردانی می شود.

1- Lee

**References**

1. Iglewski BH, Pseudomonas, In: Baron's Medical Microbiology, Baron S “et al”, eds, 4th ed, University of Texas Medical Branch, Texas, 1996.
2. Prithiviraj B, Bais H, Weir T, “et al”, Down regulation of virulence factors of Pseudomonas aeruginosa by salicylic acid attenuates its virulence on Arabidopsis thaliana and Caenorhabditis elegans, Infect Immun 2005; 73: 5319–5328.
3. Poole K, Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria, Clin Microbiol Infect 2004**;** 10: 12–26.
4. Cornelis P, Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology, 1st ed, Caister Academic Press, 2008.
5. Paterson LD, Resistance in Gram-negative Bacteria: Enterobacteriaceae, Am J Med 2006; 119: 20-8.
6. Jacoby AG, Munoz-Price LS, Mechanisms of disease the new β-lactamase, N Engl J Med 2005; 325: 380-91.
7. Helfand MS, Bonomo RA, Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended- spectrum β-lactamases and metallo-β-lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens, Curr Opin Pharm 2005; 5: 452–458.
8. Seok Y, Bae K, Jeong SH, Kim SH, Lee H, Lee K, Dissemination of IMP-6 metallo-β-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa sequence type 235 in Korea, J Antimicrob Chemother 2011; 66: 2791-2796.
9. Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V, Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo- β- lactamase production in clinical isolates, Indian J Med Res 2005; 121: 780-783.
10.Dugal S, Fernandes A, Carbapenem hydrolysing metallo-beta-lactamase: a review, Int J Curr Pharm Res 2011; 3: 9-16
11.Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Bailey and Scott’s diagnostic Microbiology, 11th edition, Mosby, USA, 2002.
12.Chen WP, Kuo TT, A simple and rapid method for the preparation of Gram negative bacteria genomic DNA, Nucleic Acids Res 1993; 21: 2260-2260.
13.Eisentein BI, The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis, N Eng1 J Med 2007; 322: 178-183.
14.National Committee for Clinical Laboratory Standards, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 12th informational supplement, M100-S12, National Committee for Clinical Laboratory standards, Wayne: Pa. 2002.
15.Chacko B, Varaiya A, Dedhia B, Imipenem resistant metallo-β-lactamse producing Pseudomonas aeruginosa, Indian J Med Microbiol 2008; 26: 398-407.
16.Shakibaie MR, Shahcheraghi F, Hashemi A, Adeli NS, Detection of TEM, SHV and PER type extended-spectrum β-lactamase genes among clinical strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients at Shafa-Hospital, Kerman, Iran, Iranian J Med Sci 2008; 11: 49-54.
17.Kalantar D, Mansouri S, Razavi M, Emergence of imipenem resistance and presence of metallo-β- lactamases enzymes in multi drug resistance gram negative bacilli with multi drug resistance isolated from clinical samples in Kerman, 2007-2008, J Kerman Univ Med Sci. 2010; 17: 208.
18.Mihani F, Khosravi A, Isolation of Pseudomonas aeruginosa strains producing metallo-beta lactamases from infection in burned patients and identification of $bla_{IMP}$ and $bla_{VIM}$ genes by PCR, Iranian J Med Microbiol 2007; 1: 31-33[Persian]
19.Altoparlak U, Aktas F, Celebi D, Ozkurt Z, Akcay N M, Prevalence of metallo-β-lactamases among Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates, Burns 2007; 31:707-710.
20.Varaiya A, Kulkarni N, Kulkarni M, Bhalekar P, Dogra J, Incidence of metallo-beta lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in ICU patients, Indian J Med Res 2008; 127: 398-402.
21.Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, “et al”, Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-β-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa, Clin Infect Dis. 2003; 37: 26-32.
22.Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH, Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase producing strains of Pseudomonas and

Acinetobacter species, Clin Microbiol Infect 2009; 7 (2): 88-91.
23.Polloto M, Casella T, Oliveria M, Rubio F, Nogueira M, Almeida M. Detection of P, areruginosa harboring $bla_{CTX-M-2}$, $bla_{GES-1}$ and $bla_{GES-5}$, $bla_{IMP-1}$ and $bla_{SPM-1}$ causing infectious in Brazilian tertiary- care hospital, BMC Infect Dis 2012; 12:176.
24.Doosti M, Ramazani A, Grashasbi M, Identification and characterization of Metallo- - lactamases producing Pseudomonas aeruginosa clinical isolates in university Hospital from Zanjan Province, Iran, Iran Biomed J 2013; 17 (3): 129-133.
25.Umadevi S, Kandhakumari G, Joseph NM, Kumar S, Easow JM, Stephen S, “et al”, Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of ESBL producing Gram negative bacilli, JCDR (Journal of Clinical and Diagnostic Research) 2011; 5: 236-239.
26.Garcia-Fulgueiras V, Bado I, Mota MI, Robino L, Cordeiro NF, Varela A,” et al”, Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay, J Antimicrob Chemother 2 011; 66: 1725-1729.

***Original Article***

# Antibiotic resistance pattern of metallo-beta-lactamase producing and non-producing clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in Mashhad

*Hosseini Hasanabady M[1], Nakhaei Moghaddam M[2], Bayat M[3], KalaliniaF[4]*

[1]M.Sc. of Microbiology, Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2]Assistant Professor of Microbiology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
[3]Associate professor of Mycology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Specialized Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran,
[4]Assistant Professor of Pharmaceutical Biotechnology, Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

***Corresponding Author:** Mahboobeh Nakhaei Moghaddam, PhD
Assistant Professor of Microbiology ,Department of Biology, Faculty of Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, P.O. Box: 91735-413, Mashhad, Iran
Email: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

**Submitted:**10 July 2013
**Revised:**18 Aug 2013
**Accepted:** 7 Sep 2013

***Abstract***

***Background & objectives***: Zinc-dependent beta-lactamases *inactivate a wide range of beta-lactam drugs, especially the carbapenem. One of the causes of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa is production of these enzymes. The aim of the present study was to identify clinical isolates of P. aeruginosa in Mashhad based on biochemical and molecular methods and to compare the antibiotic resistance pattern between methallo-beta-lactamase (MBL)-producing isolates and non-producers.*

***Material & Methods:*** *In this study, 64 clinical isolates of P. aeruginosa were collected and identified from various samples of patients in 2012. Confirmatory identification of bacteria was performed using polymerase chain reaction and specific 16S rRNA primers. MBL-producers were identified by using imipenem disk adjacent to a disk containing imipenem and EDTA. Antibiotic susceptibility assay was performed by agar diffusion method based on standard Kirby-Bauer method.*

***Results****: Out of 64 bacterial isolates, 22 (34.38%) were MBL-producers which 81.8% were resistance to imipenem. Among MBL-producers, resistance to meropenem, imipenem, ceftazidime, and carbenicillin were significantly higher than non-MBL-producing bacteria ($p < 0.05$).*

***Conclusions:*** *This study shows the high number of MBL-producing Pseudomonas aeruginosa in studied community and increased resistance to imipenem among them. It appears the prevalence of MBL-producing strains to be increasing in our country which emphasize the need for further strategies on antibiotic prescribing management and control of antibiotic resistance.*

***Key words:*** *Pseudomonas aeruginosa, Methallo-beta-lactamase, Antibiotic resistance, 16S rRNA*