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]، هایده 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 دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۲/۰۲

چکیده

زمینه و هدف: تولید آنزیم‌های کارباپنمازی در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده 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 ازنظر تولید کارباپنمازها موردبررسی واقع شدند و با استفاده از پرایمر های اختصاصی برای ژن‌های موردنظر، مورد آزمون Real- time PCR واقع شدند.

نتایج: با روش فنوتیپی ۸۳/۳٪ ایزوله‌های بالینی و ۰٪ از ایزوله‌های محیطی مولد کارباپنمازها بودند. درحالی‌که با روش Real- time PCR هم ایزوله‌های بالینی و هم محیطی ژن‌های bla_{NDM-1}، bla_{IMP}، bla_{KPC} 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 قابل‌بررسی در ایزوله‌های بالینی و محیطی است و وجود ژن‌های فوق در ایزوله‌های محیطی علاوه بر ایزوله‌های بالینی اهمیت پخش این ارگانیسم را به‌عنوان Super bug را بیش‌ازپیش روشن می‌سازد.

کلمات کلیدی: کارباپنمازها، *پسودوموناس آئروژینوزا*، آب رودخانه، مقاومت ضد میکروبی

مقدمه

اولین آنتی‌بیوتیک از گروه کارباپنم‌ها بنام thienamycin محصول طبیعی *Streptomyces catteya* بوده است که سپس به دلیل ناپایداری آن، فرم سنتیک یعنی ایمی پنم و به‌دنبال آن کارباپنم‌های دیگر نیز سنتز شدند (۱). این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل طیف گسترده فعالیت ضد میکربی آن‌ها ازیک‌طرف و نیز مقاومت بیشتر آن‌ها به هیدرولیز آنزیم β- لاکتامازی آن‌ها به‌جای آنتی‌بیوتیک‌های گروه سفالوسپورین در درمان تجربی 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 گزارش‌شده است (۳). در بروز مقاومت نسبت به آن‌ها، تولید انواع کارباپنمازها مانند آنزیم‌های β- لاکتامازی کلاس A آمبلر (غالباً KPC)، متالو بتا لاکتامازها (MBLs) مثل تیپ‌های IMP، VIM و NDM و کلاس D (غالباً OXA-48) دخالت دارند (۴).

پسودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان یک عامل مهم در عفونت‌های بیمارستانی بخصوص در بیماران با نقص ایمنی هم دارای مقاومت

*نویسنده مسئول: **هایده مبین**، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
Email: drhmobaiyen@iaut.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-2377-3387

ذاتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های β- لاکتام و هم توانایی کسب مقاومت از طریق عناصر قابل‌انتقال را دارد؛ بنابراین، این باکتری در مواجه با کارباپنم‌ها تحت تأثیر فشار انتخابی، توانایی تولید آنزیم‌های کارباپنمازی را پیدا می‌کند (۵) انتقال روده‌ای ارگانیسم‌های تولیدکننده آنزیم کارباپنماز ازیک‌طرف (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) گزارش‌شده است و تیپ NDM آنزیم هیدرولیز کننده بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله کارباپنم‌ها 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 سویس (۱۳) و در مطالعه Aubron و همکاران در سال ۲۰۰۵، در چندین رودخانه ایزوله‌های تولیدکننده کارباپنماز را گزارش نمودند (۱۴). با توجه به اهمیت عفونت‌های پسودوموناییی و بروز مقاومت نسبت به کارباپنم‌ها 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 کارباپنمازی تیپ‌های مختلف را در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا بالینی و محیطی با برنامه یکسان برای چهار ژن عمده کارباپنمازی موردبررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

جامعه موردبررسی و نمونه‌ها

در این مطالعه سودوموناس‌های جداشده از رودخانه‌های نهند و اسپیران در آذربایجان شرقی که با نمونه‌برداری از عمق ۳۰cm 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

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 ازآنجا انجام‌یافته است. از برخی از ایستگاه‌ها دو ایزوله متفاوت ازنظر پیگمان جداسازی شده بود.

نیز از سودوموناس‌های جداشده از نمونه‌های خون، مایع پلور، ترشحات تراشه و زخم بیماران بستری در بیمارستان امام رضا (ع) و سینای تبریز به‌صورت 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 خالص‌شده و تائید شده ازنظر جنس پسودوموناس در محیط کشت Tryptic Soy Broth, TSB حاوی ۲۰٪ گلیسرول در فریز ۷۰Cº – 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) مقاومت ضد میکربی ارزیابی شد (۱۷). دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورداستفاده در این مطالعه از دیسک‌های ساخت شرکت (Bio Maxima) لهستان تهیه شد و شامل سفتازیدیم (30µg)، سفتریاکسون (30µg)، سفالکسین (30µg)، سفوتاکسیم (30µg)، سیفکسیم (5µg)، ایمی پنم (10µg)، مروپنم (10µg)، پیپراسلین/تازوباکتام (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 مورداستفاده و صحت روش انجام تست به‌عنوان سویه کنترل استفاده شد.

بررسی فنوتیپی تولید متالوبتا لاکتاماز

برای شناسایی فنوتیپی ایزوله‌های مولد آنزیم‌های کارباپنمازی از دیسک ایمی پنم تنها همراه با ایمی پنم/EDTA و نیز مروپنم تنها همراه با مروپنم /EDTA استفاده شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ ˚C، افزایش قطر هاله عدم رشد به میزان ≥۷mm بین هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها با همان آنتی‌بیوتیک حاوی EDTA در ایزوله موردمطالعه به‌عنوان 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 استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانو دراپ (شرکت Thermo) تعیین غلظت شدند و کیفیت نمونه‌ها ازنظر آلودگی پروتئینی با در نظر گرفتن میزان جذب نوری در طول‌موج 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.

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورداستفاده در آزمون Real time PCR

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی ('5-'3)	اندازه محصول (Bp)
bla VIM – F *bla* VIM – R	CGTGCTATACGGTGGTTGTG GCGATTTTTGTGTGCTTTGA	۲۱۱
bla IMP – F *bla* IMP – R	TTGTAGCATTGCTGCCTCAG CGCGCTCTACAAACCAAGTA	۲۱۸
bla NDM-1 – F *bla* NDM-1 – R	GATTGCGACTTATGCCAATG TCGATCCCAACGGTGATATT	۱۸۹
bla KPC – F *bla* KPC – R	CAGCTCATTCAAGGG CTTTC GGCGGCGTTATCACTGTATT	۱۹۶

انجام واکنش Real Time PCR

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

ژن‌های موردبررسی *bla* VIM، *bla* IMP، *bla* NDM-1 و bla *KPC* بود و برنامه دمایی برای تمام ژن‌ها بر اساس پایداری طراحی‌شده یکسان انتخاب شد به‌این‌ترتیب که دمای دناتوراسیون اولیه C

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

جهت تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS version16 استفاده شد و در مقایسه داده‌های حاصل برای ایزوله‌های بالینی و محیطی از آزمون T student استفاده شد و در سطح اطمینان ۹۵٪ و Pvalue ≤ ۰/۰۵ 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* مورد تائید واقع شدند و با استفاده از پرایمر یونیورسال SrRNA۱۶ سودوموناس در حد مولکولی با روش PCR مورد تائید واقع شدند. ۵۵/۵٪ از ایزوله‌های بالینی از زخم و ۲۸٪ از ترشحات تراشه جمع‌آوری‌شده بود.

نتایج بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها

تمام ایزوله‌های محیطی در آزمون دیسک دیفیوژن آگار نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های موردبررسی از گروه کاربایپنم‌ها، سفالوسپورین‌های نسل سوم، آمینوگلیکوزیدها، کلیسیتین و پیپیراسیلین/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.

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

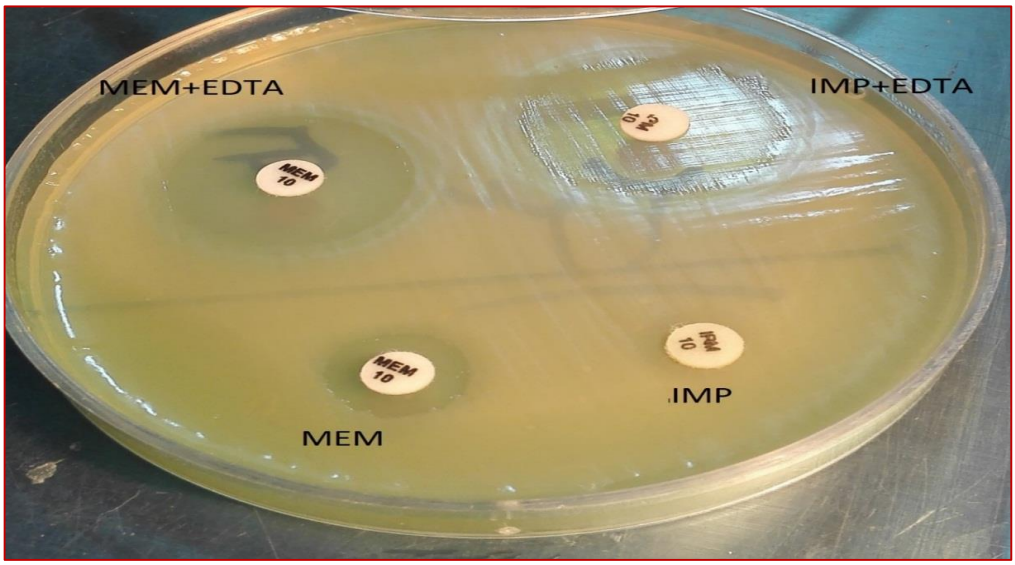
نوع واکنش / نوع آنتی‌بیوتیک	مقاوم		بینابینی		حساس		جمع کل
	تعداد/ درصد						
ایمی پنم	۱۵	۸۳/۲	-	-	۳	۱۵/۸	۱۸ (۱۰۰)
مرو پنم	۱۵	۸۳/۲	-	-	۳	۱۵/۸	
جنتامایسین	۱۶	۸۸/۸	-	-	۲	۱۱/۲	
سفالکسین	۱۶	۸۸/۸	۱	۵/۶	۱	۵/۶	
اوفلوکساسین	۱۷	۹۴/۵	۱	۵/۵	-	-	
سفتریاکسون	۱۸	۱۰۰	-	-	-	-	
سیپروفلوکساسین	۱۶	۸۸/۸	۲	۱۱/۲	-	-	
سفوتاکسیم	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 ازنظر تولید کارباپنمازها

با استفاده از دیسک ایمی پنم (IMP) و ایمی پنم EDTA / (IMP/EDTA) و نیز با استفاده از آنتی‌بیوتیک مروپنم (MEM) و مروپنم /EDTA (MEM/EDTA) توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز ایزوله‌های موردبررسی واقع شدند و وجود تفاوت قطر هاله مهار رشد بیش از ۷ میلی‌متر در مقایسه دیسک تنها با همان دیسک آنتی‌بیوتیک حاوی EDTA با هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها، سبب انتخاب ایزوله فوق به‌عنوان مولد کارباپنماز در نظر گرفته شد که از ۱۸ ایزوله بالینی ۱۵ ایزوله (۸۳/۲٪) ازنظر تولید آنزیم کارباپنماز مثبت بودند درحالی‌که هیچ‌یک 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:

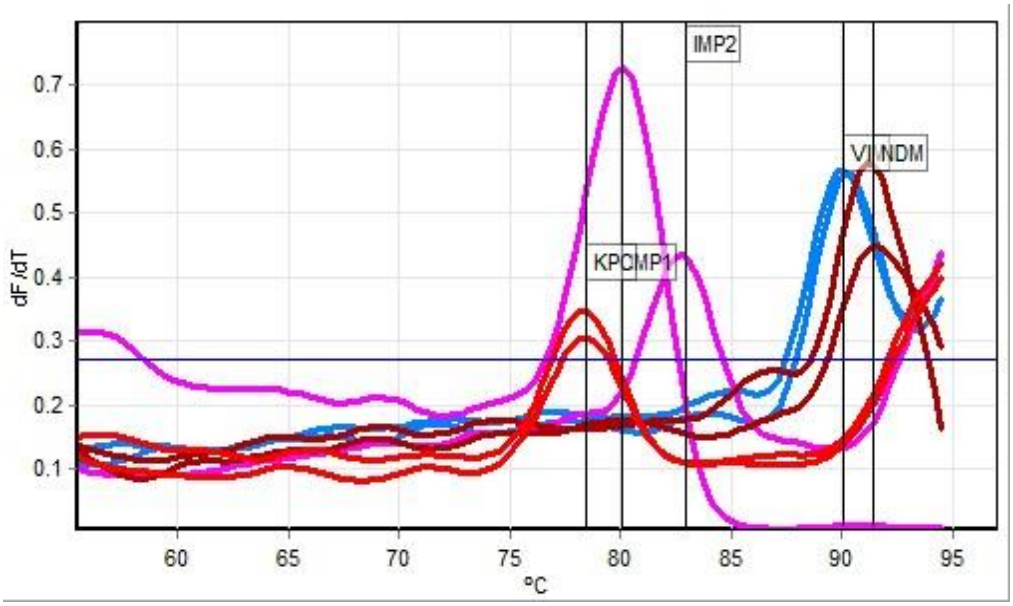
در بررسی ژن‌های کارباپنمازی در ایزوله‌های پسودوموناس آئروجینوزا چهار تیپ NDM، IMP، KPC و VIM در ایزوله‌های بالینی و محیطی از روش Real Time PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده توسط محقق استفاده شد. جدول ۴ فراوانی هریک از ژن‌ها در ایزوله‌های موردمطالعه نشان می‌دهد و نمودار ۱ گراف حاصل در دستگاه را نشان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



شکل ۱- نمونه‌ای از تست تائیدی 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 موردمطالعه

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



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

بحث

مصرف کارباپنم‌ها برای درمان عفونت‌های ناشی از *سودو موناس آئروژینوزا* به‌عنوان یک باکتری با توانایی کسب مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مورداستفاده در درمان، از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است (۵). جداسازی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به کارباپنم‌ها به دلیل تولید کارباپنمازها دائماً در حال گسترش است. به‌طوری‌که در کره در سال ۲۰۰۳، ۱۷/۳٪ از ایزوله‌ها تولید حداقل یک نوع متابتالاکتاماز (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 کارباپنمازی از کشورهای مختلف گزارش‌شده 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 ایمی پنم و مروپنم حامل ژن *bla* NDM-1(۱۸) در ایران در سال ۲۰۱۳، ۵۷/۹ از ایزوله‌ها تولیدکننده کارباپنمازها و غالباً دارای ژن *bla* IMP (۲۲)، ارسال 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* VIM-2 و *bla* GES-5 (۱۰) گزارش‌شده 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 جداشده از رودخانه‌های نهند و اسپیران دارای هر ۴ ژن موردبررسی بودند علیرغم اینکه در آزمون دیسک دیفیوژن آگار ازنظر مقاومت به کارباپنم‌ها و در آزمون دیسک ترکیبی ازنظر تولید کارباپنمازها 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 کارباپنماز تیپ *bla* VIM در ایزوله کلبسیلا پنمونیه جداشده 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 گزارش‌شده بودند (۱۲). این امر نشان می‌دهد که این ژن‌ها به‌راحتی به روش‌های مختلف اخذشده و در شرایطی که فشار انتخابی برای باکتری فراهم شود کارآیی این آنتی‌بیوتیک‌ها را زیر سؤال خواهد برد.

در ایـزولـه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از نمونه‌هـای

بالینی بیش از ۸۰٪ ایزوله‌ها توانایی تولید آنزیم کارباپنمازی 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 به‌سرعت هر چهار ژن قابل‌ردیابی می‌باشند و این مطالعه نتایج مطالعه Monterio و همکاران را که از روش Multiplex Real Time PCR در بررسی ژن‌های کارباپنمازی در آنتروباکتریاسه‌ها استفاده کرده بودند (۲۵) را تائید 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 کارباپنمازی 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 Real Time PCR ارزیابی دوره‌ای از بیمارستان‌های شهر تبریز می‌بایست انجام شود و نظارت دقیق برای مصرف کارباپنم‌ها 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 میکروب‌شناسی 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 نگاه‌داشتن تمامی اطلاعات بیماران و با اخذ کد اخلاقی به شماره IR.IAU.TABRIZ.REC.1397.113 انجام شد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارض منافعی 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
7. Podhi S. New Delhi metalo-beta-lactamase: a weapon for the newly emerging drug resistace 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 Pseudimonas aeruginosa isolates producing a KPC-type c arbapenem hydrolyzing beta lactamase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2007; 51(4)*:*1553-1555.
9. Lauretti L, Riccro ML, Mazzariol A, Cornaghia G, Amicosante G, Fantana R. et al.Clonind and characterization of bla $_{VIM}$, a new integrin-bprne metallic-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, Müesh-Inderbinen M, Stephan R. Characteristics of extended-spectrum- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates from rivers and lakes in Switzerland. Applied Enviromental 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. Internationa Organization for Standardization, Iso 19458:2006. Water quality-sampling for microbiological analysis. Iso 2006
16. Institue of Standards and Industerial Research of Iran. ISIRI; 4208, 1st revision. Water quality-sampling for microbiological examination of water-code of practice, Islamic Pepublic of Iran, 2007
17. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M-100, Wayen, PA, Clinical Laboratory Standards Institues, 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 metalo-β- lactamase-producing Pseudomonas spp. And Acintobacter 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) metalo-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 rsistance 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 J[1], Mobaiyen H[2*], khamaneh AM[3]

1. Department of Basic Science, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Department of Microbiology, Tabriz Branch, Islamic Azad Uniersity, 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 enviromemtal 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 idententification 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 Uniersity, Tabriz, Iran
Email: drhmobaiyen@iaut.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-2377-3387