

فراوانی سویه‌های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز در *پسودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران سوختگی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۷/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۸/۲۹

چکیده

اکبر میرصالحیان*

فرخ اکبری نخجوانی، عباس بهادر
فرشته جبل عاملی، رضا بیگ‌وردی
حمیدرضا گلی

گروه میکروشناسی، دانشگاه علوم پزشکی
تهران، تهران، ایران.

زمینه و هدف: *پسودوموناس آئروژینوزا*، یک پاتوژن فرصت طلب و از عوامل اصلی ایجاد عفونت در بیماران دارای زخم‌های سوختگی می‌باشد. متالوبتالاکتامازها (MBLS) از مهمترین عوامل ایجاد مقاومت به داروهای کارباپنم در *پسودوموناس آئروژینوزا* است. این مطالعه ضمن بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی، به بررسی فراوانی متالوبتالاکتاماز (MBL) در بین ایزوله‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* به دو روش فنوتیپی (Etest MBL) و ژنوتیپی (PCR) می‌پردازد. **روش بررسی:** تعداد ۱۷۰ ایزوله *پسودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران سوختگی به روش بیوشیمیایی تعیین هویت، سپس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها به روش کایری بوئر تعیین گردید. سویه‌های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز به روش Etest MBL شناسایی شدند و برای تشخیص ژن blaVIM از روش PCR استفاده گردید. **یافته‌ها:** مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمپنم، کاربنی‌سیلین، آمیکاسین، تورامایسین، تیکارسیلین، پلی‌میکسین B، کلیستین سولفات (۱۰ μg) و کلیستین سولفات (۲۵ μg) به ترتیب ۷۴/۷٪، ۸۸/۲٪، ۸۴/۷٪، ۱۰٪، ۳۴/۱٪، ۲۸/۳٪ بود. از بین این ایزوله‌ها ۱۰ ایزوله (۱۱/۱٪) (از ۹۰ ایزوله مقاوم به ایمپنم) تولیدکننده آنزیم متالوبتالاکتاماز به روش Etest MBL بودند. تمام ۱۰ سویه نسبت به پلی‌میکسین B و کلیستین حساس بودند و نسبت به بقیه آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند. با انجام آزمون PCR تمام سویه‌هایی که توسط Etest MBL مثبت شدند توسط PCR تایید گردیدند و همگی حامل ژن blaVIM-1 بودند. **نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان‌دهنده افزایش روند مقاومت آنتی‌بیوتیکی *پسودوموناس آئروژینوزا* به سبب تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز می‌باشد. لذا با توجه به اهمیت بالینی این سویه‌های مقاوم در بیمارستان مورد مطالعه، شناسایی سریع ارگانیزم‌های تولیدکننده این آنزیم‌ها و به‌کارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت جهت جلوگیری از انتشار بیشتر این ارگانیزم‌ها ضروری است.

کلمات کلیدی: *پسودوموناس آئروژینوزا*، متالوبتالاکتاماز، VIM-1، VIM-2، PCR، مقاومت آنتی‌بیوتیکی.

* نویسنده مسئول: تهران خیابان پور سینا، ضلع شمالی
دانشگاه تهران، دانشکده پزشکی، گروه میکروشناسی
تلفن: ۸۹۵۵۸۱۰-۰۲۱
email: mirsaleh@sina.tums.ac.ir

مقدمه

جدی در بیماران سوختگی می‌باشد.^۳ کارباپنم‌ها از جمله ایمپنم و مروینم از مهمترین آنتی‌بیوتیک‌های ضد میکروبی هستند که برای درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های چند مقاومتی *پسودوموناس آئروژینوزا* استفاده می‌شوند.^۴ متالوبتالاکتاماز قادر به هیدرولیز طیف وسیعی از بتالاکتام‌ها از جمله پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها هستند، اما توانایی هیدرولیز مونوباکتام‌ها (آزترونام) را ندارند. متالوبتالاکتاماز بر اساس ساختار مولکولی به شش نوع تقسیم می‌شوند که عبارتند از: AIM، SPM، SIM، GIM، IMP VIM که از این بین نوع VIM در *پسودوموناس آئروژینوزا* بارزتر و چشمگیرتر می‌باشد.^{۴،۶} ژن‌های کد کننده متالوبتالاکتاماز غالباً بر روی اینتگرئون‌ها

پسودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) یکی از پاتوژن‌های مهم بیمارستانی می‌باشد به طوری که در سال‌های اخیر شاهد سویه‌های با مقاومت چندگانه (Multidrug-resistant) هستیم. درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری به سبب مقاومت بالایی که به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها دارد مشکل است. این باکتری به عنوان دومین عامل عفونت‌های سوختگی و سومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد.^{۱،۲} سوختگی مکان مناسبی برای تکثیر باکتری فراهم می‌کند و سبب بستری شدن طولانی‌مدت بیمار می‌گردد. عفونت ناشی از *پسودوموناس آئروژینوزا* یکی از مهمترین عوارض

فاصله ۱cm از هم جای گذاری شده و پس از انکوباسیون به مدت ۲۴-۱۸ ساعت قطر هاله‌ی عدم رشد حاصل از آنتی‌بیوگرام طبق دستورالعمل CLSI اندازه‌گیری شد.^{۱۱} آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده شامل دیسک‌های ایمپی‌پنم (۱۰µg)، کاربنی‌سیلین (۱۰۰µg)، آمیکاسین (۳۰۰µg)، توبرامایسین (۱۰µg)، تیکارسیلین (۷۵µg)، پلی‌میکسین (۳۰۰ B، کلیستین سولفات (۱۰µg) و کلیستین سولفات (۲۵µg) متعلق به شرکت MAST (انگلیس) بود. در این مطالعه از پسرودوموناس آئروژینوزی ATCC ۲۷۸۵۳ به عنوان سویه کنترل، استفاده گردید.

ردیابی فنوتیپی متالوبتالاکتامازها (MBLs):

برای جداسازی و شناسایی سویه‌های تولیدکننده MBL از نوارهای (Etest MBL (AB BioDisk, Solna, Sweden طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. این نوارها از دو نیمه تشکیل شده، در یک نیمه (IP) گرادسانی از غلظت‌های مختلف ایمپی‌پنم (۲۵۶-۴) و در نیمه دیگر (IPI) گرادسانی از غلظت‌های مختلف ایمپی‌پنم همراه با غلظت ثابتی از EDTA (۶۴-۱) قرار دارد. تفسیر Etest MBL به صورت کاهش سه رقت یا بیشتر، MIC ایمپی‌پنم در حضور EDTA یا اگر نسبت IP MIC به IPI بزرگ‌تر یا مساوی هشت شود نشان‌دهنده تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز می‌باشد. برای استخراج DNA و انجام آزمایش PCR از روش جوشاندن استفاده گردید. ابتدا ۳-۵ کلنی تازه از محیط کشت برداشته و در ۲۰۰µl آب مقطر تزریقی استریل به صورت سوسپانسیون در آورده و ۱۰ دقیقه در حرارت ۱۰۰°C جوشانده و سپس در دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند، آنگاه محلول رویی که حاوی DNA است برای PCR استفاده شد.^{۱۲}

در تکثیر ژن blaVIM از جفت پرایمرهای VIM-1L و VIM-1R و VIM-2L و VIM-2R استفاده شد.^{۱۳} از پسرودوموناس آئروژینوزا ۲۷۸۵۳ به عنوان کنترل منفی و یک سویه تولید کننده متالوبتالاکتاماز از تیپ VIM-1 و VIM-2 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام به روش کایری-بوئر بر روی ۱۷۰ ایزوله پسرودوموناس آئروژینوزا جدا شده از عفونت‌های سوختگی برای دیسک‌های آنتی‌بیوتیک ایمپی‌پنم، کاربنی‌سیلین، آمیکاسین، توبرامایسین، تیکارسیلین، پلی‌میکسین B، کلیستین سولفات (۱۰) و

به ویژه اینتگرون کلاس یک یافت می‌شود که ماهیت سیار بودن این عناصر ژنتیکی، مقدمات انتشار هر چه بیشتر این آنزیم‌ها را در بخش‌های مختلف بیمارستان فراهم می‌سازد. برای اولین بار ژن VIM در سال ۱۹۹۹ در ایتالیا جدا و گزارش گردید. علاوه بر پسرودوموناس آئروژینوزا این ژن‌ها در باکتری‌هایی نظیر/شیرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و آسیتوباکتر بومانی نیز دیده می‌شوند.^{۷،۸} متالوبتالاکتامازها به مهارکننده‌های بتالاکتامازها مثل سولباکتام، تازوباکتام و کلانولانیک اسید مقاوم هستند و از آنجایی که این دسته از آنزیم‌ها برای فعالیت خود نیاز به یک کوفکتور فلزی (اغلب Zn) دارند، توسط عوامل شلاته کننده مثل EDTA و ترکیبات تیول مهار می‌شوند.^۹ به طور خلاصه مشکلاتی که متالوبتالاکتامازها به وجود می‌آورند عبارتند از:

۱- متالوبتالاکتامازها نه تنها سبب مقاومت به کارباپنم‌ها می‌شوند بلکه سبب ایجاد مقاومت به آمینوگلیکوزیدها نیز می‌شوند ۲- ژن‌های کد کننده این آنزیم‌ها بر روی عناصر متحرک (پلاسمید) قرار دارند که به راحتی می‌توانند به سایر باکتری‌ها منتقل شوند ۳- نبود مهار کننده دارویی موثر باعث محدودیت مصرف کارباپنم‌ها گردیده است ۴- افزایش انتقال این ژن‌ها از پسرودوموناس آئروژینوزا به اعضای خانواده انتروباکتریاسیه سبب توسعه این گونه از مقاومت‌ها در سایر باکتری‌ها گردیده است.^{۱۰،۱۱}

این تحقیق با هدف تعیین میزان مقاومت سویه‌های پسرودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و تعیین فراوانی ایزوله‌های تولید کننده متالوبتالاکتاماز در سویه‌های مقاوم به ایمپی‌پنم انجام گرفت.

روش بررسی

تعداد ۱۷۰ ایزوله پسرودوموناس آئروژینوزا از ۱۷۰ بیمار مبتلا به سوختگی بستری در بیمارستان شهید مطهری تهران ایزوله گردید. سپس ایزوله‌های جمع‌آوری شده با آزمایش‌های بیوشیمیایی در آزمایشگاه میکروپشناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران مورد تایید قرار گرفت. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده به روش انتشار در دیسک (کایری-بوئر) ارزیابی شد. در این روش ابتدا، سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه شد سپس به صورت چمنی بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مربوطه بر روی محیط مورد نظر به

جدول-۱: جفت پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن VIM

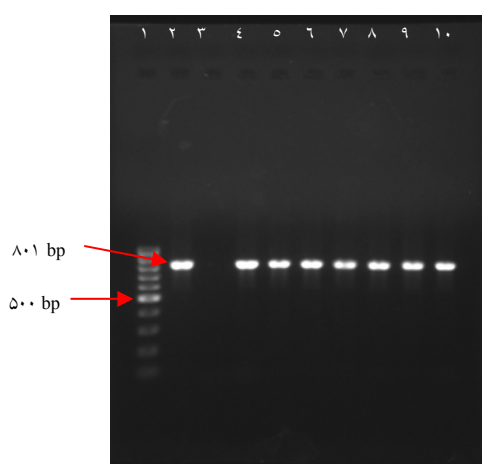
ژن	ردیف پرایمر (5' to 3')	اندازه محصول (bp)	رفرانس	کمپانی
VIM-1L VIM-1R	F- ATGTTAAAAGTTATTAGTAGT R- CTACTCGGCGACTGAGCGAT	۸۰۱	۱۳	TAG Copenhagen Denmark
VIM-2L VIM-2R	F- ATGTTCAAACCTTTTGAGTAAG R- CTACTCAACGACTGAGCGAT	۸۰۱	۱۳	TAG Copenhagen Denmark

جدول-۲: شرایط Setup واکنش PCR برای شناسایی ژن blaVIM-1 در پseudomonas آئروژینوزا

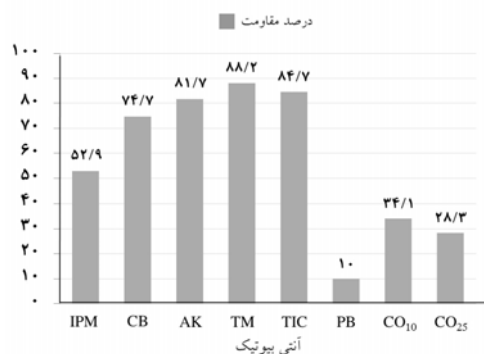
زمان (s)	درجه حرارت (°C)	شرح
۳۰۰	۹۵	First Denaturation
۶۰	۹۵	Denaturation (Loop: ۳۰)
۴۵	۵۲	Annealing
۴۵	۷۲	Extension
۳۰۰	۷۲	Extension Final

جدول-۳: شرایط Setup واکنش PCR برای شناسایی ژن blaVIM-2 در پseudomonas آئروژینوزا

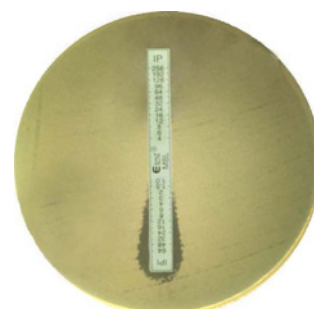
زمان (s)	درجه حرارت (°C)	شرح
۳۰۰	۹۵	First Denaturation
۴۵	۹۵	Denaturation (Loop: ۳۰)
۴۵	۵۸	Annealing
۴۵	۷۲	Extension
۳۰۰	۷۲	Extension Final



شکل-۲: نتیجه آزمون PCR ژن blaVIM-1 (طول محصول: PCR ۸۰۱ bp). ۱- DNA Ladder، ۲- Positive Control، ۳- Negative Control، ۴- نمونه ۱۰-۴



نمودار-۱: درصد مقاومت سویه‌های پseudomonas آئروژینوزای جدا شده از عفونت‌های سوختگی جدا شده از بیمارستان شهید مطهری تهران

شکل-۱: نوار Etest MBL برای بررسی سویه‌های تولیدکننده آنزیم متالوبتالاکتاماز. کاهش MIC در حضور EDTA نشان‌دهنده تولید MBL می‌باشد که در این شکل MIC ایمی پنم از ۲۵۶ > به ۴ μg/ml کاهش پیدا کرده است.^{۱۴}

شکل-۲: نتیجه آزمون PCR ژن blaVIM-1 (طول محصول: PCR ۸۰۱ bp). ۱- DNA Ladder، ۲- Positive Control، ۳- Negative Control، ۴- نمونه ۱۰-۴

کلستین سولفات (۲۵) از قرار زیر است: ۵۲/۹٪ سویه‌ها به ایمی پنم، ۷۴/۷٪ به کاربنی سیلین، ۸۱/۷٪ به آمیکاسین، ۸۸/۲٪ به تویرامایسین، ۸۴/۷٪ به تیکارسیلین، ۱۰٪ به پلی میکسین B، ۳۴/۱٪ به کلستین سولفات (۱۰ μg)، ۲۸/۳٪ به کلستین سولفات (۲۵ μg) مقاوم بودند که در نمودار ۱ نشان داده شده است. از ۱۷۰ ایزوله پseudomonas آئروژینوزا، ۹۰ ایزوله (۵۲/۹٪) به ایمی پنم مقاوم بودند که از این تعداد ایزوله ۱۰ ایزوله (۱۱/۱٪) تولید

حساسیت این باکتری ضروری است. استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص فلوروکینولون‌ها و کارباپنم‌ها از عوامل خطر برای مقاوم شدن این باکتری نسبت به این داروها محسوب می‌شود.^{۱۹}

با انجام آزمون Etest MBL، فقط ۱۰ ایزوله (۱۱/۱٪) تولید MBL را نشان دادند و این ۱۰ ایزوله به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها به جز کلیستین و پلی‌میکسین B مقاوم بودند هر ۱۰ ایزوله از نظر وجود ژن blaVIM-1 توسط PCR مثبت شدند و هیچ اختلافی بین روش فنوتیپی و ژنوتیپی در این مطالعه مشاهده نشد. در سال ۲۰۰۴، Luzzaro در ایتالیا با انجام آزمایشات Etest MBL و PCR روی ۵۰۶ سویه پseudomonas آئروژینوزا نشان داد که چهار سویه (۰/۷٪) تولیدکننده متالوبتالاکتاماز حامل ژن VIM هستند.^{۱۴}

در مطالعه انجام شده توسط Shahcheraghi در سال ۱۳۸۶ بر روی ۳۵۰ سویه پseudomonas آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران غیر سوختگی در بیمارستان‌های امام خمینی و مرکز طبی کودکان نشان داد که ۳٪ از سویه‌ها، تولیدکننده آنزیم متالوبتالاکتاماز هستند.^{۲۰} در سال ۲۰۰۷، Khosravi در اهواز با انجام آزمایش Etest MBL و PCR روی ۱۰۰ سویه پseudomonas آئروژینوزا نشان داد که هشت سویه (۱۹/۵٪) از ۴۱ سویه مقاوم به ایمی‌پنم تولیدکننده متالوبتالاکتاماز هستند و هر هشت سویه حامل ژن VIM می‌باشند.^{۱۷} در سال ۲۰۰۷، Behzadian Nejad در دانشگاه تربیت مدرس با انجام آزمایش Etest MBL و PCR روی ۱۲۶ سویه پseudomonas آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران غیر سوختگی در بیمارستان بقیه‌الله و شریعتی نشان دادند که هشت سویه (۱۱٪) از ۷۰ سویه مقاوم به ایمی‌پنم تولیدکننده متالوبتالاکتاماز هستند و هر هشت سویه حامل ژن VIM بودند.^{۲۱}

در سال ۲۰۰۸، شاه‌چراغی با انجام آزمایش روی ۲۴۳ سویه پseudomonas آئروژینوزای جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران غیر سوختگی در بیمارستان امام خمینی تهران نشان داد که ۱۵ سویه تولیدکننده متالوبتالاکتاماز هستند و هر ۱۵ سویه حامل ژن VIM-1 بودند.^{۲۲} استفاده از نوارهای E-test با توجه به نتایج این تحقیق و نتایج Behzadian Nejad، Khosravi و Luzzaro به دلیل حساسیت و ویژگی بالا و عدم اختلاف بین روش Etest MBL و PCR توصیه می‌شود.^{۱۷، ۲۱، ۲۲} به نظر می‌رسد ژن VIM در ایران از شیوع بالایی در سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا برخوردار است.^{۱۷، ۲۱، ۲۲} نتایج این

آنزیم متالوبتالاکتاماز را نشان دادند (شکل ۱). بر روی تمامی سویه‌های مقاوم به ایمی‌پنم PCR انجام گرفت و همان ۱۰ سویه‌ای که توسط Etest MBL مثبت شده بودند، توسط PCR با جفت پرایمرهای VIM-1R و VIM-1L مثبت شدند.

بحث

درمان عفونت‌های ناشی از پseudomonas آئروژینوزا، به دلیل تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز با مشکل روبروست و در حدود ۴۵٪ مرگ و میر در بیماران سوخته ناشی از عفونت می‌باشد.^{۱۵، ۱۶} کارباپنم‌ها از جمله ایمی‌پنم و مروپنم از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های ضد میکروبی هستند که برای درمان عفونت‌های سوختگی ناشی از پseudomonas آئروژینوزا استفاده می‌شوند. متالوبتالاکتامازها به عنوان یکی از مهمترین مکانیسم‌های دخیل در ایجاد مقاومت به این ترکیبات دارویی می‌باشند.^۴

بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیکی انجام شده در سراسر جهان اثبات شده است که میزان شیوع الگوهای مختلف مقاومت دارویی و به ویژه ژن‌های کدکننده متالوبتالاکتاماز در سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا از یک کشور تا کشور دیگر، از یک منطقه جغرافیایی تا منطقه جغرافیایی دیگر و حتی مابین بیمارستان‌های مختلف یک ناحیه جغرافیایی می‌تواند متفاوت باشد. لذا با توجه به اهمیت بالینی ارگانیزم‌های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز شناسایی آنها در بیمارستان‌های مختلف جهت اهداف درمانی و کنترل انتشار هر چه بیشتر آنها در بیمارستان‌ها ضروری است.^۷ اهمیت تحقیق حاضر بررسی این سویه‌ها در بیماران سوختگی است که تاکنون در کشور انجام نگرفته است. در این تحقیق شاهد افزایش چشمگیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی هستیم، به طوری که میزان مقاومت به ایمی‌پنم در مطالعه Khosravi و Japoni در ایران در بیماران سوختگی به ترتیب ۳۲/۹٪ و ۴۱٪ و در این تحقیق ۵۲/۹٪ بوده است.^{۱۷، ۱۸} به نظر می‌رسد مصرف بی‌رویه و تجویز نابه‌جای آنتی‌بیوتیک از دلایل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. پseudomonas آئروژینوزا به سبب ماهیت ژنتیکی، پذیرنده انواع ژن‌ها از قبیل پلاسمید و ترانسپوزون‌ها می‌باشد و به همین سبب می‌تواند سریعاً نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شود. بنابراین با توجه به قابلیت بالای این ارگانیزم در کسب مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، نظارت مستمر بر تغییرات

تورامایسین، تیکارسیلین، آمیکاسین و کاربنیسیلین بود و توصیه می‌شود از مصرف این چهار آنتی‌بیوتیک خودداری شود. همچنین شناسایی باکتری‌های تولیدکننده MBL، گزارش دقیق و سریع چنین آنزیم‌هایی به منظور نظارت هر چه بهتر و دقیق‌تر در ردیابی مقاومت‌های چندگانه و همچنین انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب و جلوگیری از شیوع چنین آنزیم‌هایی می‌تواند از گسترش عفونت‌های بیمارستانی جلوگیری نماید. در ضمن لازم است اقدامات پیشگیرانه‌ای در جهت کاهش شیوع این ژن‌ها از طریق تغییر پروتکل‌های درمانی و اصلاح آنها به عمل آید.

تحقیق نشان داد VIM-1 ژن غالب در سویه‌های پseudomonas آئروژینوزای جدا شده از بیماران سوختگی بستری در بیمارستان شهید مطهری تهران می‌باشد.

خوشبختانه میزان شیوع ژن VIM در ایران در مقایسه با سایر کشورها از جمله کره جنوبی، ژاپن و فرانسه کمتر بوده^{۲۳-۲۵} و احتمالاً سایر مکانیسم‌های مقاومت از جمله ایفلاکس پمپ‌ها، نقص و فقدان پروتئین‌های غشاء خارجی از جمله OprD و کارباپنمازهای کلاس D (OXA-23, OXA-40, OXA-48, OXA-58) در ایجاد مقاومت به کارباپنم‌ها دخیل می‌باشند.^{۲۶} در این تحقیق بیشترین میزان مقاومت نسبت

References

- Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, Jabalameli F, Goli H, Kalantari N. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns* 2010;36(1):70-4.
- Aoki S, Hirakata Y, Kondoh A, Gotoh N, Yanagihara K, Miyazaki Y, et al. Virulence of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(5):1876-8.
- Altöparlak U, Aktas F, Celebi D, Ozkurt Z, Akcay MN. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. *Burns* 2005;31(6):707-10.
- Huang YT, Chang SC, Lauderdale TL, Yang AJ, Wang JT. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-beta-lactamase genes in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;59(2):211-6.
- 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 metallo-beta-lactamase (MBL)-producing strains. *J Infect Dis* 2005;192(9):1606-12.
- 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. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(8):755-9.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;18(2):306-25.
- Samuelsen O, Buarø L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(4):827-30.
- Tan J, Pitout JD, Guttman DS. New and sensitive assay for determining *Pseudomonas aeruginosa* metallo-beta-lactamase resistance to imipenem. *J Clin Microbiol* 2008;46(5):1870-2.
- Walsh T. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2007;13(1):113.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial susceptibility Testing: Document M10-S15. USA: Wayne, PA; CLSI, 2005.
- 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. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):1089-94.
- Fiett J, Baraniak A, Mrówka A, Fleischer M, Drulis-Kawa Z, Naumiuk Ł, et al. Molecular epidemiology of acquired-metallo-beta-lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(3):880-6.
- Luzzaro F, Endimiani A, Docquier JD, Mugnaioli C, Bonisgnori M, Amicosante G, et al. Prevalence and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48(2):131-5.
- Sacha P, Wiecek P, Hauschild T, Zórawski M, Olszańska D, Tryniszewska E. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*: a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46(2):137-42.
- Ullah F, Malik SA, Ahmed J. Antimicrobial susceptibility and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the North West of Pakistan. *Burns* 2009;35(7):1020-5.
- Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60(1):125-8.
- Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad S. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. *Burns* 2006;32(3):343-7.
- Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2005;11 Suppl 4:17-32.
- Shahcheraghi F, Nikbin V. Metallo-β-Lactamase and Resistance rate of *P.aeruginosa* isolates to ceftazidim and imipenem. *Iran J Inf & Trop Dis* 2007;36:19-22. [Persian]
- Rezaei Yazdi H, Behzadian Nejad G, Najar Peerayeh Sh, Mostafaei M. Prevalence and detection of metallo-β-lactamase (MBL)-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from clinical isolates in Iran. *Ann Microbiol* 2007;57(2):293-6.
- Shahcheraghi F, Nikbin VS, Shooraj F, Bagheri A, Shafiee M, Arabestani MR. PCR Detection of VIM-1, VIM-2 and IMP-1

- Metallo-beta-lactamases in clinically multi-drug resistant *P. aeruginosa* isolated in Tehran, Iran. *Int J Infect Dis* 2008;12:118.
23. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003;41(12):5407-13.
 24. Lee K, Park AJ, Kim MY, Lee HJ, Cho JH, Kang JO, et al. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. in Korea: high prevalence of isolates with VIM-2 type and emergence of isolates with IMP-1 type. *Yonsei Med J* 2009;50(3):335-9.
 25. 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. *J Clin Microbiol* 2005;43(7):3129-35.
 26. 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.

Prevalence of MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients

Received: September 29, 2010 Accepted: November 20, 2010

Abstract

Akbar Mirsalehian PhD.*
Farrokhakbari Nakhjavani PhD.
Abbas Bahador PhD.
Fereshteh Jabal ameli MSc.
Reza Bigverdi MSc.
Hamidreza Goli MSc.

Department of Microbiology,
Tehran University of Medical
Sciences, Tehran, Iran.

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is an important opportunistic pathogen causes clinical infections among burn patients. Metallo- β -lactamases (MBLs) are important mechanisms of Carbapenem (drug of choice) resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates. The aims of this study were to determine the antibiotic susceptibility pattern and to detect the prevalence of MBLs among *Pseudomonas aeruginosa* isolates using two phenotypic and genotypic methods.

Methods: Initially, the antibiotic resistance patterns of 170 clinical strains isolated from burn patients in Motahari Hospital in Tehran, Iran were determined by Kirby-Bauer disc diffusion method. All of the clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to Imipenem were screened for production of MBL by E test with Imipenem / Imipenem plus EDTA (E test MBL). PCR assay was performed for detection of blaVIM genes.

Results: Based on the study results, the percentage of resistance was as below: Imipenem (10 μ g) 52.9%, Amikacin (30 μ g) 81.7%, Carbenicilin (100 μ g) 74.7%, Polymixine B (300 unit) 10%, Ticarcilin (75 μ g) 84.7%, Tobramycin (10 μ g) 88.2%, Colisitin (10 μ g) 34.1, Colisitin (25 μ g) 28.3%. Of 90 Carbapenem resistant isolates, 10(11/1%) isolates were positive by E test, all were sensitive to Colisitin and Polymixine B. All of the Imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates were examined by PCR for the presence of the blaVIM genes. All MBL-producing isolates carried blaVIM-1 genes.

Conclusion: Considering the high prevalence and clinical importance of MBL-producing isolates, rapid identification of them and use of the appropriate infection control measures are necessary to prevent further spread of infections by these organisms.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, metallo- β -lactamases, VIM-1, VIM-2, PCR, drug resistance.

*Corresponding author: Poursina ST.,
Tehran University of Medical Sciences
School of Medicin, Tehran, Iran.
Tel: +98-21- 88955810
email: mirsaleh@sina.tums.ac.ir