● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ نوزدهم، شمارهٔ ۴، ص ۳۵۳-۳۴۵، ۱۳۹۱

مقالهٔ پژوهشی

بررسی مولکولی ژن‌های PER و VEB در سودوموناس ائروژینوزا با مقاومت چندگانه در نمونه‌های بالینی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها در شهر اصفهان طی ۸۸-۱۳۸۷

حسین فاضلی[۱]، مهدی فتاحی بافقی*[۲]، جمشید فتری[۳]، رضا اکبری[۴]

خلاصه

مقدمه: در اثر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای بیمارستانی با مقاومت چندگانه (Multi Drug Resistance) به‌طور فزاینده‌ای در سراسر جهان افزایش یافته است. یکی از راه‌های مقاومت سودوموناس آئروژینوزا نسبت به بتالاکتام‌ها تولید آنزیم بتالاکتاماز می‌باشد که معضلات بسیاری را در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری ایجاد کرده است. از جمله این بتالاکتامازها، بتالاکتامازهای حاصل از ژن‌های PER و VEB می‌باشند. هدف از این مطالعه، بررسی مولکولی ژن‌های PER وVEB در پسودوموناس‌های با مقاومت چندگانه جدا شده از نمونه‌های بالینی در اصفهان می‌باشد.

روش: تعداد ۹۸ ایزوله از سودوموناس ائروژینوزا از نمونه‌های مختلف بالینی جداسازی و با تست‌های بیوشیمیایی شناسایی گردید، سپس حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های شناسایی شده به روش Kirby-Bauer تعیین گردید. فرایند PCR به منظور بررسی وجود ژن‌های PER,VEB بر روی نمونه‌ها انجام گرفت .

یافته‌ها: از ۹۸ سویه سودوموناس ائروژینوزا، ۷۳ نمونه (۷۳٪) با مقاومت چندگانه بودند که همه آنها به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، سفوتاکسیم و سفتازیدیم مقاوم بودند. میزان شیوع برای ژن‌های PER و VEB به‌ترتیب ۵ (۶/۸۴٪) و ۸ (۱۰/۹٪) بود.

نتیجه‌گیری: باتوجه به بالا بودن شیوع سودوموناس ائروژینوزاهای دارای مقاومت چندگانه در نمونه‌های بالینی مورد مطالعه در کشور، ضروری است اقداماتی در زمینه کاهش این پاتوژن‌های بیمارستانی صورت گیرد که از جمله آنها کنترل انتقال ژن‌های PER و VEB می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بتالاکتاماز، سودوموناس ائروژینوزا، ژن‌های PER، VEB

۱- استادیار میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ۲- دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی پزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران۳- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ۴- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، انستیتو پاستور

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** mehdifatahi371@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۳/۲۶ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۱/۲/۷ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۱/۲/۱۴

مقدمه

شایع‌ترین گونه از جنس سودوموناس در عفونت‌های انسانی، سودوموناس آئروژینوزا است که باسیلی گرم منفی، بدون اسپور و متحرک می‌باشد. این باکتری بر روی پوست مرطوب و در روده افراد سالم و در مایعات و سطوح مختلف به‌ویژه سطوح مرطوب حمام، دستشویی، تجهیزات تنفسی، دیالیز و حتی محلول‌های ضدعفونی وجود دارد. این باکتری به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت ذاتی دارد و می‌تواند در طول درمان به سویه‌های مقاوم‌تری تبدیل شود و عامل مهم عفونت‌هایی از جمله پنومونی، عفونت‌های بعد از عمل جراحی، عفونت‌های ادراری، عفونت گوش، عفونت اولیه پوستی، عفونت‌های چشمی، باکتریمی و اندوکاردیت می‌باشد (۱). این باکتری یک عامل بیماری‌زای فرصت‌طلب است که به‌ویژه عامل عفونت‌های کشنده در افراد مبتلا به ضعف ایمنی از جمله بیماران مبتلا به ایدز، مبتلایان به نقص ژنتیکی سیستیک فیبروزیس، بیماران مبتلا به سرطان، بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه و بیماران دچار سوختگی به‌شمار می‌آید (۲،۳). در اثر مصرف کلینیکی آنتی‌بیوتیک‌ها سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای بیمارستانی با مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌طور فزاینده‌ای در سراسر جهان افزایش یافته است (۴). نفوذپذیری کم پروتئین‌های غشای خارجی (OMPs)، تولید بتالاکتاماز (AmpC کروموزومی و تغییر در سیستم‌های تراوشی efflux pumps) از عوامل اصلی مقاومت ذاتی این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. یکی از راه‌های مقاومت سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام تولید آنزیم بتالاکتاماز می‌باشد که معضلات بسیاری را در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری ایجاد کرده است. متأسفانه مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل وجود مکانیسم‌های ذاتی مانند AmpC و اکتساب ژن‌های آنزیم بتالاکتامازی در سودوموناس آئروژینوزا همواره در حال افزایش است (۵،۶). بتالاکتامازها طبق تقسیم‌بندی Amblera به چهار دسته A تا D تقسیم می‌شوند که نوع A، C و D سرین بتالاکتاماز هستند در حالی که نوع B متالوبتالاکتاماز است (۷). بتالاکتاماز PER1 برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ در یک بیمار ترکیه‌ای بستری در یکی از بیمارستان‌های فرانسه گزارش شد. آنزیم PER1 تنها در ۲۰-۱۸٪ اسیدهای آمینه با TEM و SHV شباهت دارد و قادر به هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌باشد و فعالیت آن نیز توسط کلاولانیک اسید مهار می‌شود (۸،۹). این آنزیم به دلیل فعالیت ESBL زیادی که روی بتالاکتام‌های ضدسودوموناسی دارد، اهمیت کلینیکی قابل‌توجهی داشته و در اروپا و آسیا انتشار یافته‌است (۱۳-۸). اخیراً در ایتالیا سویه سودوموناسی مولد pER1 یافت شده‌است که دارای ژن VIM2 که یک کرباپنماز است نیز می‌باشد و در نتیجه این ارگانیسم به کلیه آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است (۱۴). این آنزیم عامل مقاومت بالا نسبت به سفتازیدیم، سفوتاکسیم و آزترونام است و با اینکه برای اولین بار در یک نوزاد ویتنامی در فرانسه روی پلاسمید و اینتگرون انتروباکتریاسه گزارش شد، اما شیوع و فراوانی آن در سودوموناس ائروژینوزا بیشتر است. این آنزیم از تایلند، کویت، چین و هند نیز گزارش شده و به نظرمی‌رسد منشأ آن از جنوب آسیا است (۱۷-۱۵). از آنجا که در ایران بررسی بر روی نمونه‌های سوختگی و زخم صورت پذیرفته است و بر روی نمونه‌های دیگر بالینی انجام نشده‌است و به‌دلیل عدم بررسی این ژن‌ها در اصفهان و نداشتن اطلاعات کافی از شیوع آن، در این مطالعه به بررسی ژن‌های PER و VEB در سودوموناموس ائروژینوزاهای جدا شده از بیماران سوختگی، عفونت زخم، عفونت ادراری،سپتی سمی، مایع مفصل، مایع نخاع، پلور، ریه و مدفوع، پرداختیم.

روش بررسی

تعداد ۹۸ ایزوله از سودوموناس ائروژینوزا از نمونه‌های مختلف بالینی (سوختگی، عفونت زخم، عفونت ادراری، سپتی سمی، مایع مفصل، مایع نخاع، پلور، ریه و مدفوع) از بیمارستان‌های شهر اصفهان (الزهرا، شهید صدوقی، امام موسی کاظم، نور و آیت‌ا... کاشانی) به‌دست آمد. ابتدا ایزوله‌ها بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز مثبت، پیگمان در محیط پیوسین آگار، رشد در محیط ستریماید، تست OF هوازی مثبت و بی‌هوازی منفی، کشت در محیط‌های افتراقی TSI، SIM، سیترات و کلیگر آیرون آگار (KIA) تشخیص داده شدند. در ادامه حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های شناسایی شده به روش انتشار در آگار (Kirby-Bauer) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، جنتامایسین، سیپروفلوکسازین، پیپراسیلین، سفتازیدیم، سفپیم، سفوتاکسیم، ایمیپنم و سفتیزوکسیم تعیین گردید و برای تفسیر از جدول CLSI استفاده شد. هم‌چنین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در اطراف دیسک‌ها بر اساس سه بار تکرار انجام و میانگین آن‌ها مورد محاسبه قرار گرفت.

سویه *Pseudomonas aeroginosa ATCC 27853* جهت کنترل روش آنتی‌بیوگرام مورد استفاده قرارگرفت. سپس نمونه‌ها در محیط تریپتیکیس سوی براث (TSB) حاوی ۱۰٪ گلیسرول در ۲۰°C- نگهداری تا در ادامه جهت فرایندهای مولکولی مورد استفاده قرارگیرند.

داده‌ها به‌صورت تعداد (درصد) گزارش گردیده است و آنالیز آماری با آزمون کای دو (Chi-square) انجام گردید و P<۰/۰۵ ملاک معنی‌داری محسوب می‌گردید.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده شد. دو تا سه کلنی تازه باکتری در ۵۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر تزریقی به‌صورت سوسپانسیون درآمد و ۱۰ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. سپس در دور ۱۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی، که حاوی DNA باکتری بود برای انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت.

پرایمرهای مورد استفاده

توالی‌های پرایمرهای زیر مورد استفاده قرار گرفت (۲۰-۱۸):

PER-1 : 5-ATG AAT GTC ATT ATA AAA GCT-3

PER-1:rev : 5-TTA ATT TGG GCT TAG GG-3

VEB-F: 5-CGA CTT CCA TTT CCC GAT GC-3

VEB-B : 5- GGA CTC TGC AAC AAA TAC GC-3

تکثیر PCR

واکنش PCR شامل ۰/۵ µMol از هر پرایمر، 1x از بافر Taq DNA reaction buffer ، ۲/۵ mm از $MgCl_2$ ، ۰/۲ mm از مخلوط dnTP ، ۱/۵u از Taq Polymerase 1 و ۸ul از DNA الگو بود و در پایان کار حجم واکنش با آب‌مقطر به ۵۰ µl رسانده شد.

مراحل PCR به شرح زیر می‌باشد:

برای ژن VEB در ابتدا، Denaturation ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه و در ادامه ۳۰ بار سیکل تکثیر که شامل سیکل Denaturation ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه و در ادامه مراحل Annealling ۵۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه و مرحله Extension ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه و برای کامل شدن سیکل تکثیر در مرحله Extension نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه صورت می‌گیرد. برای ژن PER در Denaturation اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه، Denaturation ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه و در ادامه مراحل Annealing ۴۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه و مرحله Extension ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه و برای کامل شدن سیکل تکثیر

در مرحله Extension نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بـرای ۵ دقیقه صورت می‌گیرد. الکتروفورز نمونه‌ها در ژل ۱٪ اگارز انجام شد (۲۱) و از مارکر bp ۱۰۰ جهت تأیید وزن ملکولی محصولات تکثیر شده، استفاده گردید.

نتایج

در این بررسی تعداد ۹۸ ایزولـه بـاکتری سـودوموناس ائروژینوزا از پنج بیمارستان در شهر اصفهان جداسازی و بـا آزمایش‌های بیوشیمیایی، شناسایی گردید. بیشترین نمونه‌ها مربوط به سوختگی و کمترین به‌ترتیب مربوط بـه بافـت، مفصل، ریه و ترشح مغز بـود (جـدول ۱). از نظـر الگـوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه، بیشترین مقاومت، در نمونه‌های سـوختگی وجـود داشـت. از ۹۸ ایزولـه، ۷۳ ایزوله (۷۳٪) به بیش از سـه آنتـی‌بیوتیـک مقـاوم بودنـد (multi-drug resistance). تمام نمونه‌های جدا شده از سوختگی به ایمیپنم مقاوم بودند و در نمونه‌های دیگر به جز سوختگی نیز رو به افزایش است. بیشترین مقدار مقاومت بـه‌ترتیـب مربوط به سفوتاکسیم (۹۴٪)، سـفپیم (۹۳٪)، سفتیزوکـسیم (۸۵/۷٪) و سـفتازیدیم (۷۷/۶٪) بـود، در صـورتی کـه بیشترین حساسیت مربوط به آمیکاسین بود (جـدول ۲). در این بررسی از ۹۸ ایزوله ۷۳ نمونه مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، سفوتاکسیم و سفتازیدیم بودند که برای انجـام PCR برای شناسایی ژن‌هـای RER و VEB مـورد اسـتفاده قـرار گرفتند. برای ژن‌های PER و VEB به‌ترتیـب ۵ (۶/۸۴٪) و ۸ (۱۰/۹٪) (شکل ۱ و ۲) ایزوله مثبت بودند.

جدول ۱. *فراوانی نسبی مقاومت به ژن‌های PER و VEB در نمونه‌های مقاوم به سفپیم، سفتازیدیم و سفوتاکسیم در سودوموناس ائروژینوزا*

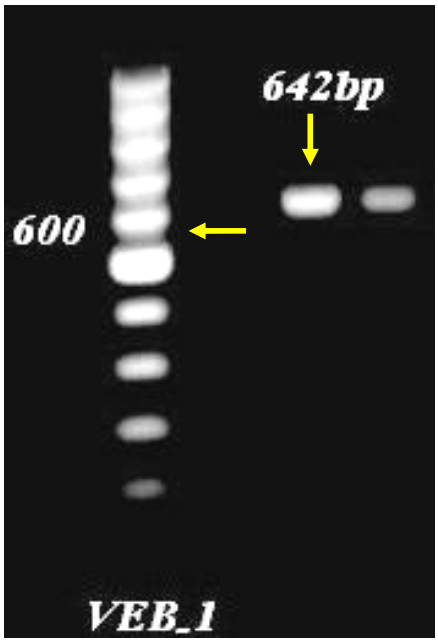
نوع نمونه	تعداد نمونه	درصد ژن VEB	درصد ژن PER
سوختگی	۳۴	(۵/۹) ۲	(۵/۹) ۲
ادرار	۱۴	(۱۴/۳) ۲	(۷/۱) ۱
سپتی سمی	۲	(۵۰) ۱	۰
مجاری تنفسی	۱	۰	۰
مایع مغزی –نخاعی (CSF)	۱	۰	۰
تراشه	۶	۰	۰
زخم	۷	(۱۴/۳) ۱	(۱۴/۳) ۱
حفره شکم	۳	(۳۳) ۱	(۳۳) ۱
برونش	۲	۰	۰
بافت	۱	۰	۰
مفصل	۱	(۱۰۰) ۱	۰
مدفوع	۱	۰	۰
جمع	۷۳	(۱۱) ۸	(۶/۹) ۵

chi-square (df =۱۶) = ۲۱۸/۴ ؛P=۰/۰۰۰۱ :n=۷۳

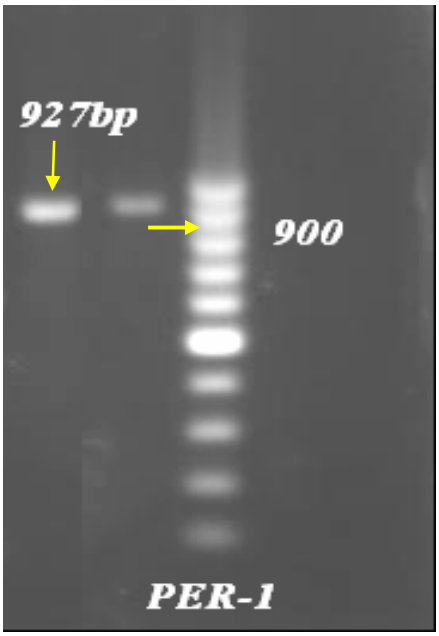
جدول ۲. *الگوی مقاومت ایزوله‌های سودوموناس ائروژینوزای جداشده از نمونه‌های بالینی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها*

الگوی مقاومت	آنتی‌بیوتیک سفپیم	امیکاسین	جنتامایسین	سیپروفلوکسازین	سفوتاکسیم	پیپراسیلین	سفتازیدیم	ایمیپنم	سفتیزوکسیم
مقاوم	(۹۳)۹۱	(۴۰/۸)۴۰	(۵۰) ۴۹	(۴۱/۸) ۴۱	(۹۴/۹) ۹۴	(۶۶) ۶۵	(۷۷/۶) ۷۶	(۵۴) ۵۳	(۸۵/۷) ۸۴
مقاومت متوسط	(۳) ۳	(۲) ۲	(۱) ۱	(۹) ۹	(۲) ۲	(۰) ۰	(۱۱) ۱۱	(۵) ۵	(۸) ۸
حساس	(۴) ۴	(۵۷)۵۶	(۴۸/۹) ۴۸	(۴۸/۹) ۴۸	(۲) ۲	(۳۳/۶) ۳۳	(۱۱) ۱۱	(۴۰/۸) ۴۰	(۶) ۶

chi-square (df =۱۶) = ۲۱۸/۴ ؛P=۰/۰۰۰۱ داده‌ها به‌صورت تعداد(درصد) گزارش شده‌است.



شکل ۱. *ژل الکتروفورز محصول PCR ژن VEB در باکتری سودوموناس آئروژینوزا* (طول محصول PCR ۶۴۲bp می‌باشد)



شکل ۲. *ژل الکتروفورز محصول PCR ژن PER در باکتری سودوموناس آئروژینوزا* (طول محصول PCR ۹۲۷bp می‌باشد)

بحث

تمام نمونه‌های جدا شده از بیماران سوختگی به بیش از سه آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند (multi-drug resistance) در حالی که در مطالعه میرصالحیان و همکاران بر روی بیماران سوختگی مقاومت چندگانه در ۸۷/۰۵٪ نمونه‌ها گزارش شده است (۲۱). در مطالعه‌ای که ژاپنی در سال ۲۰۰۳ در ایران بر روی سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران سوختگی انجام داده، درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، ایمی‌پنم، سفتازیدیم و سفپیم به‌ترتیب ۲۷/۱٪، ۶۷/۱٪، ۱۴/۳٪، ۱۵/۷٪ و ۲/۹٪ گزارش شده است (۲۲). در حالی که در مطالعه میرصالحیان و همکاران بر روی بیماران سوختگی مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ترتیب ۸۳٪، ۶۳٪، ۸۵٪ و ۸۸٪ بوده‌است (۲۴). از طرف دیگر در مطالعه شاهچراغی و همکاران، مقاومت نسبت به سفتازیدیم، سیپروفلوکسازین و ایمی پنم در سویه‌های جدا شده از نمونه‌های زخم به ترتیب ۲۴٪، ۱۹٪ و ۵٪ بوده است (۱۸). در صورتی که مقاومت نسبت به این سه آنتی‌بیوتیک مطالعه حاضر به‌ترتیب ۹۱٪، ۱۰۰٪، ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ می‌باشد که نشان افزایش مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. هم‌چنین مطالعه حاضر نشان داد که از آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم دیگر نمی‌توان به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک انتخابی برای درمان سودوموناس آئروژینوزا استفاده کرد زیرا مقاومت نسبت به آن در این باکتری رو به گسترش است. این افزایش میزان مقاومت نشان می‌دهد که نیاز است پی‌گیری‌های مکرری از الگوی مقاومت پسودوموناس آئروژینوزا به‌عمل آید تا بتوان پروتکل درمانی مناسب‌تری را برای بیماران تهیه نمود. در یک بررسی بر روی نمونه‌های بالینی در شهر کرمانشاه در سال ۸۱-۸۰ میزان مقاومت به جنتامیسین، سفتازیدیم، امیکاسین، سیپروفلوکسازین و ایمی‌پنم به‌ترتیب ۵۲٪، ۵۰٪، ۳۸٪، ۳۸٪ و ۱۰٪ گزارش گردید که افزایش قابل ملاحظه‌ای را در میزان مقاومت نشان می‌دهد (۲۳). بتالاکتامازهای PER و

VEB در سودوموناس ائروژینوزا بیشتر کروموزومی هستند. بتالاکتاماز نوع PER-1 یک بتالاکتاماز از کلاس A با طیف وسیع و عامل مقاومت به سفتازیدیم و سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف در سودوموناس آئروژینوزا است (۲۸)، اما ایزوله‌های PER-1 منفی هم به‌شدت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مقاوم هستند. بتالاکتاماز PER و VEB در سودوموناس ائروژینوزا بیشتر کروموزومی هستند. بتالاکتاماز نوع PER شباهت امینو اسیدی کمی با SHV و TEM داشته و برای اولین بار نیز در سودوموناس ائروژینوزا گزارش شده و به‌طور کامل در این باکتری شناسایی شده است (۸،۹). در مطالعه‌ای که در لهستان انجام شده نیز این آنزیم در تمام سویه‌های مولد ESBL مشاهده شده است (۲،۹). فراوانی این آنزیم در این مطالعه نسبت به مطالعات انجام گرفته در سایر کشورها از قبیل ترکیه و بلژیک و ایتالیا کمتر است (۲۶-۲۵). تعدادی از ژن‌های بتالاکتامازی که توسط بخش باکتری‌شناسی مؤسسه انستیتو پاستور ایران در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه‌های زخم، مورد بررسی مولکولی قرار گرفته‌اند، بدین شرح می‌باشد: TEM، SHV، VEB و PER که درصد هر دو ژن PER و VEB ۱۱٪ گزارش شده‌است (۱۸). در بررسی دیگر توسط میر صالحیان و همکاران، بر روی نمونه‌های سوختگی درصد ژن‌های PER و VEB به‌ترتیب ۲۵/۵٪ و ۳۱/۴٪ گزارش شده است (۲۱). در مطالعه حاضر ۵ (۶/۸۴٪) نمونه از نظر ژن PER و ۸ (۱۰/۹٪) نمونه از نظر ژن VEB مثبت بودند.

نتیجه‌گیری

به‌دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نمونه‌های بالینی به‌ویژه نمونه‌های سوختگی، پزشکان باید در انتخاب آنتی‌بیوتیک مؤثر دقت لازم را داشته باشند و بدون انجام آزمایش‌های آنتی‌بیوگرام از تجویز آنتی‌بیوتیک جداً پرهیز نمایند.

References

1. Patrick RM. Medical bacteriology, 5th ed., Translated by: Bahador A, Bahador F. Tehran, Khosravi & Dibaj publisher, pp269-77 [In Persian].
2. Estahbanati Hk, Kashani PP, Ghanaaatpisheh F. frequency of *pseudomonas aeroginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns* 2002: 28(4): 340-8.
3. Shahcheraghi F, Feizabadi MM, Yamin V, Abiri R, Abedian Z. Serovar determination, drug resistance patterns and plasmid profiles of *pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients at two hospitals of Tehran (Iran). *Burns* 2003; 29(6): 547-51.
4. Chanawong AM, Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV- 12, SHV-5, SHV- 2a and VEB–1 extended- spectrum β-iactamases in Gram–negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48(6): 839-52.
5. Rossolini GM, Mantegoli E. Treatment and control of severe infections caused by multi-resistant *pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol infect* 2005; 11(Suppl 4): 17-32.
6. Navon- venezia S, Ben- Ami R, Carmeli Y. update on *pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr Opin infect Dis* 2005; 18(4): 306-13.
7. Howard C, Van Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffaerd PM. Identification and minisequencing- based discrimination of SHV β- Lactamases in nisocomial infection- associated Klebsiella pneumonia in Brisbane, Australia.

Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(3): 659-64.

8. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(5): 962-9.
9. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended spectrum β-lactamase from Pseudomonas aeruginosa and comparison with class A β-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(1): 104-14.
10. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, et al. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended spectrum beta-lactamase in northern Italy. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6): 2523-9.
11. Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, e al. High prevalence of PER-1 extended spectrum beta-lactamase producing *Acinetobacter*. spp. In Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(5): 1749-51.
12. Bouthors AT, Dagoneau-Blanchard N, Naas T, Nordmann P, Jarilier V, Sougakoff W. Role of residues 104, 164, 166, 238 and 240 in the substrate perofile of PER-1 beta-lactamase hydrolyzing third-generation cephalosporins. *Biochem J* 1998; 330(Pt 3): 1443-9.
13. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in Pseudomonas aeruginosa: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(8): 2385-92.
14. Docquier JD, Luzzaro F, Amicosante G, Toniolo A, Rossolini. GM. Multitidurag-resistant Pseudomonas aeruginosa producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamas and VIM-2 metallo-beta-lactamase. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(5): 910-11.
15. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4): 657–86.
16. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a movel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an Escherichia coli integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(3): 573-81.
17. Aubert D, Girlich D, Naas T, Nagarajan S, Nordmann P. Functional and structural characterization of the genetic and structural characterization of the fenetic encironment of an extended-spectrum β-lactamase bla_{VEB} gene from a Pseudomonas aeruginosa isolate obtained in India. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(9): 3284-90.
18. Shah cheraqy F, Sadat Nicbin V, Shorge F. Molecular analysis Btalaktamaz·hay PER, VEB, SHV and TEM in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from wound specimens in two hospitals in Tehran by PCR. *Journal of Microbiology* 2006; 1(4): 21-7 [Persian].
19. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, AmicosanteG, Perilli M. Spread of blaCTX-M-type and blaPER-2 b-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(5): 975–8.
20. Lee S, Park YJ, Kim M, Lee HK, Han K, Kang CS, et al. Prevalence of Ambler class A and D b-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(1): 122–7.

21. 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 b-lactamase - producing Pseudomonasaeruginosa strains isolated from burn patients. *BURNS* 2010; 36: 70-4.

22. 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.

23. Mohajeri P. Determine the sensitivity and antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from different Clinical Specimens in Patients referred to medical training centers in Kermanshah (1380-1381) the 7th year of recovery. *J Kermanshah Univ Med Sci* 2004; [Persian].

24. Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, Jabalameli F, Goli H. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase among strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Tehran University Medical Journal* 2008; 66(5): 333-7 [Persian].

25. Kolayli F, Gacar G, Karadenizli A, Sanic A, Vahaboglu H. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter spp. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 249(2) 241-5.

26. Claeys G, Verschraegen G, de Beare T, Vaneechoutte M. PER-1 β-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45(6): 924-5.

27. Endimiani A, Luzzaro F, Pini B, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo AQ. Pseudomonas aeruginosa bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to expression of the PER-1 extended-spectrum β-lactamase. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 52-61.

Molecular Study of PER and VEB Genes is Multidrug Resistant *Pseudomonas aeroginosa* Isolated From Clinical Specimens in Isfahan/Iran and their Antibiotic Resistance Patterns

Fazeli H., Ph.D.[1], Fatahi Bafghi M., M.Sc.*[2], Faghri M., M.D.[3], Akbari R, M.Sc.[4]

1. Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. Ph.D. Student of Bacteriology, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4. Postgraduate of Microbiology, Pasteur Institute, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: mehdifatahi371@gmail.com

(Received: 16 June 2010 Accepted: 3 May 2012)

Abstract

Background & Aims: Duo to clinical use of antibiotics, *pseudomonas aeruginosa* strains with multiple drugs resistance have significantly increased throughout the world. Betalactamase production is one of the Mechanisms involved in resistance to *pseudomonas aeruginosa* resulting in many problems in the treatment of infections caused by this bacterium. The aim of this study was molecular analysis of PER and VEB genes in Pseudomonas with multiple resistance isolated from clinical samples in Isfahan/Iran.

Methods: In whole, 98 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from various clinical specimens were identified by biochemical tests and the antibiotic susceptibility of the identified strains were determined using Kirby-Bauer method. PCR was performed on the samples to evaluate the presence or absence of PER and VEB genes.

Results: Among 98 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, 73 samples (73%) were multiple drugs resistant and all of them were cefotaxime, cefepime and ceftazidime resistant. Prevalence of PER and VEB genes were respectively 5 (6.84%) and 8 (10.9%).

Conclusion: Considering high prevalence of multi-drug resistant *Pseudomonas aeroginosa,* it is essential to reduce these pathogens in hospitals through controlling PER and VEB genes transfer.

Keywords: Beta-lactamase, *Pseudomonas aeruginosa*, PER, VEB

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2012; 19(4): 345-353