

بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی ژن‌های کارباینماز در باکتری‌های گرم منفی مقاوم به کارباینم و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها

حمید سلگی^۱، حمزه غفارزاده^۲، فرشته شاهچراغی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آنتی‌بیوتیک‌های کارباینم اغلب به عنوان آخرین خط درمانی برای عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های گرم منفی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مهم‌ترین مکانیسم مقاومت به کارباینم‌ها تولید آنزیم‌های کارباینماز می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی باکتری‌های گرم منفی مولد کارباینماز در ایزوله‌های بالینی بود.

روش‌ها: در این مطالعه، ۱۳۴ ایزوله‌ی بالینی باکتری گرم منفی در سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ در دو بیمارستان شهر تهران جداسازی گردید. آزمایش‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن برای ۱۱ آنتی‌بیوتیک تعیین گردید. سپس، از دو آزمایش فنوتیپی Modified Hodge test (MHT) و Double-disk synergy test (DDST) جهت بررسی تولید ژن‌های کارباینمازها (*bla_{IMP-1}* و *bla_{OXA-48}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{GES}*, *bla_{SPM}*, *bla_{VIM1,II}*) استفاده گردید. ژن‌های مقاومت با استفاده از روش Polymerase chain reaction (PCR) مورد شناسایی قرار گرفتند.

یافته‌ها: ایزوله‌های جدا شده شامل ۵۲ ایزوله‌ی *Escherichia coli*، ۳۵ ایزوله‌ی *Klebsiella pneumoniae*، ۱۸ ایزوله‌ی *Acinetobacter baumannii*، ۱۹ ایزوله‌ی *Pseudomonas aeruginosa*، ۶ ایزوله‌ی *Citrobacter freundii*، ۲ ایزوله‌ی *Proteus mirabilis* و ۲ ایزوله‌ی *Enterobacter cloacae* بودند. در این باکتری‌ها، بیشترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های ارتاپنم، سفوتاکسیم، سفنازیدیم، آزترئونام، کاناماسین و آمیکاسین (۱۰۰ درصد) مشاهده گردید. آزمایش‌های فنوتیپی نشان داد که ۴۴ ایزوله، DDST مثبت و ۱۷ ایزوله، MHT مثبت بودند. نتایج PCR نشان داد که تنها ۴ سویه *Klebsiella pneumoniae*، *Escherichia coli*، *Citrobacter freundii* و *Acinetobacter baumannii* معادل ۲/۹ درصد از ایزوله‌های مورد بررسی، دارای ژن *bla_{IMP-1}* بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به وجود ژن *bla_{IMP-1}*، *Klebsiella pneumoniae*، *Escherichia coli*، *Citrobacter freundii* و *Acinetobacter baumannii* و امکان انتقال افقی این ژن‌ها به باکتری‌های دیگر و همچنین، با توجه به اهمیت این سویه‌ها در بیمارستان‌ها، شناسایی سریع این ژن‌ها می‌تواند نقش مهمی در کنترل و درمان این باکتری‌ها داشته باشد.

واژگان کلیدی: کارباینماز، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، باکتری‌های گرم منفی، Polymerase chain reaction

ارجاع: سلگی حمید، غفارزاده حمزه، شاهچراغی فرشته. بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی ژن‌های کارباینماز در باکتری‌های گرم منفی مقاوم به کارباینم و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۴۰۵): ۱۲۹۶-۱۲۹۰

مقدمه

باکتری‌های گرم منفی، شامل گروه بزرگی از باکتری‌ها می‌باشند که به طور وسیع در طبیعت پراکنده هستند و باعث ایجاد عفونت‌های خطرناکی مانند سیستیت، پیلونفریت، پنومونی، مننژیت، سپتی‌سمی و عفونت‌های مرتبط با وسایل پزشکی می‌شوند. معرفی کارباینم‌ها به عنوان نسل جدید داروهای بتالاکتام، پیشرفت‌های زیادی را در درمان

عفونت‌های شدید باکتری‌های گرم منفی که به دیگر داروهای بتالاکتام مقاوم بودند، به ارمغان آورده است (۳-۱). بتالاکتام‌های جدید که بیانگر مقاومت به کارباینم‌ها هستند، شامل کارباینمازها می‌باشند که به تازگی، شیوع آن‌ها در حال افزایش می‌باشد. آنزیم‌های کارباینماز، از مهم‌ترین عوامل ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در باکتری‌های گرم منفی به حساب می‌آیند (۵-۴).

۱- دانشجوی دکتری باکتری شناسی پزشکی، بخش میکروبی‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۲- کارشناس ارشد میکروبی‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات ساوه، ساوه، ایران

۳- استاد میکروبی‌شناسی، بخش میکروبی‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤؤل: فرشته شاهچراغی

Email: shahcheraghifereshteh@yahoo.com

بررسی قرار گرفت (۵). در این مطالعه، از سویه‌ی استاندارد *Escherichia coli* ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان سویه‌ی شاهد استفاده گردید.

شناسایی فنوتیپی کاربامپنازها: Double-disk synergy test (DDST): سویه‌های مقاوم به کاربامپنم، با روش DDST با استفاده از Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) به عنوان مهار کننده‌ی آنزیم‌های Metallo-beta-lactamase (MBL) به منظور بررسی تولید این آنزیم‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند. به این صورت که از دیسک‌های ایمینیم و ایمینیم به علاوه‌ی ۵ میکرولیتر EDTA ۰/۵ مولار استفاده گردید. دیسک‌ها در محیط Mueller-Hinton agar کشت داده شده با باکتری با کدورت ۰/۵ McFarland قرار داده شدند و پس از انکوباسیون، در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، قطر هاله‌ی عدم رشد اطراف دو دیسک اندازه‌گیری شد. افزایش هاله‌ی عدم رشد بیشتر یا مساوی ۷ میلی‌متر در حضور دیسک ایمینیم همراه با EDTA در مقایسه با دیسک ایمینیم تنها، به عنوان آزمایش مثبت برای وجود بتالاکتامازها تلقی می‌شود (۶-۷). از سویه‌ی *Klebsiella pneumoniae* AO-8053 به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید.

Modified Hodge test (MHT): ابتدا از سویه‌ی استاندارد *Escherichia coli* ATCC ۲۵۹۲۲ رقت ۰/۵ McFarland در ۳ میلی‌لیتر سالین تهیه گردید. سوسپانسیون مورد نظر، به میزان ۱:۱۰ رقیق گردید و سپس، به صورت یکنواخت بر روی محیط Mueller-Hinton کشت و یک دیسک ارتاپنم نیز در مرکز پلیت قرار داده شد. سپس، باکتری‌های مورد نظر به صورت یک خط مستقیم از کناره‌ی پلیت تا لبه‌ی دیسک کشت داده شد و در نهایت، پلیت به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. ایزوله‌ی MHT مثبت بعد از ۲۴-۱۸ ساعت به صورت یک هاله‌ی عدم رشد برگ شبدری از سویه‌ی استاندارد *Escherichia coli* ATCC ۲۵۹۲۲ مشخص می‌گردد. رشد سویه‌ی استاندارد *Escherichia coli* به سمت دیسک ارتاپنم به دلیل مهار اثر آنتی‌بیوتیک ارتاپنم، توسط باکتری‌های مولد کاربامپناز می‌باشد.

شناسایی ژنوتیپی کاربامپنازها: جهت استخراج DNA باکتری از روش جوشاندن (Boiling) استفاده گردید. ابتدا ۴-۳ کلنی باکتری از محیط کشت تازه برداشته شد و در ۲۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه داخل اپندورف حل گردید و پس از ورتکس کردن، سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در بندماری جوش قرار داده شد. در نهایت، اپندورف‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد و از محلول رویی آنها برای انجام Polymerase chain reaction (PCR) به صورت تک استفاده گردید.

تعداد زیادی از کاربامپنازها در سال‌های اخیر شناسایی شده‌اند که به ۳ گروه A (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) یا KPC و *Guiana extended-spectrum beta-lactamase* یا GES)، گروه B متالوبتالاکتامازها (*Verona integron-encoded beta-lactamase*) یا VIM، *Imipenemase* یا Sao Paulo metallo-beta-lactamases JIM یا *New Delhi Metallo-beta-lactamase* یا NDM، *German imipenemase* یا GIM) و گروه D بتالاکتامازها (*OXA48*) دسته‌بندی می‌شوند (۳).

این آنزیم‌ها، به طور عمده در باکتری‌های غیر تخمیری مانند *Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter baumannii* وجود دارند و همچنین، از *Enterobacteriaceae* نیز جدا می‌شوند. باکتری‌های تولید کننده‌ی متالوبتالاکتامازها، به دلیل اثر بر طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف و کاربامپنم‌ها (به استثنای مونوآکتام‌ها مانند آرترونام)، از مشکلات عمده در درمان بیماری‌های عفونی به شمار می‌روند. مطالعه بر روی این آنزیم‌ها و تشخیص زودهنگام آن‌ها در بین ایزوله‌های بالینی، برای کنترل و جلوگیری از گسترش آن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است.

این مطالعه، با هدف تعیین میزان مقاومت *Enterobacteriaceae* ها و باکتری‌های گرم منفی غیر تخمیری جدا شده از نمونه‌های بالینی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کاربامپنم و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین، بررسی ژن‌های کاربامپناز در میان باکتری‌های گرم منفی مقاوم به کاربامپنم از بیمارستان‌های امام حسین (ع) و لقمان حکیم انجام گرفت.

روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: در این مطالعه، تعداد ۱۳۴ ایزوله‌ی مقاوم به کاربامپنم در طی ماه‌های خرداد ۱۳۹۱ تا مهر ۱۳۹۲ از بیماران بستری شده و یا مراجعه کننده به بیمارستان‌های امام حسین (ع) و لقمان حکیم جمع‌آوری و با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی تشخیص داده شدند.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی: برای بررسی مقاومت سویه‌های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، از روش دیسک دیفیوژن Kirby-Bauer استفاده گردید. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، آرترونام، ارتاپنم، ایمینیم، مروپنم، آمیکاسین، کاناماسین، سیپروفلوکساسین، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول (کوآتریموکسازول) (تهیه شده از شرکت MAST، انگلیس) بر اساس راهنمای مؤسسه‌ی استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (Clinical & Laboratory Standards Institute یا CLSI) مورد

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR Polymerase chain reaction (PCR) برای شناسایی کاربپنمازها

| ژن | پرایمر | توالی نوکلئوتیدی (5'to3') | اندازه (bp) | رفرنس |
|----------------------|--------|---------------------------|-------------|-------|
| bla _{KPC} | KPC-F | CTTGCTGCCGCTGTGCTG | ۴۸۹ | ۱۷ |
| | KPC-R | GCAGGTTCCGGTTTTGTCTC | | |
| bla _{GES} | GES-F | ATGCGCTTCATTACGCAC | ۶۴۰ | ۱۸ |
| | GES-R | CTATTTGTCCGTGCTCAGG | | |
| bla _{NDM} | NDM-F | ACCGCCTGGACCGATGACCA | ۲۶۳ | ۱۹ |
| | NDM-R | GCCAAAGTTGGGCGCGGTTG | | |
| bla _{VIM1} | VIM-F | AGTGGTGAGTATCCGACA | ۲۶۱ | ۲۰ |
| | VIM-R | ATGAAAAGTGCCTGGAGAC | | |
| bla _{IMP} | IMP-F | ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC | ۵۸۵ | ۲۰ |
| | IMP-R | ACAACCAGTTTTGCCTTACC | | |
| bla _{SPM} | SPM-F | GCGTTTTGTTGTTGCTC | ۷۸۶ | ۲۰ |
| | SPM-R | TTGGGGATGTGAGACTAC | | |
| bla _{Oxa48} | OXA-F | TTGGTGGCATCGATTATCGG | ۷۴۳ | ۲۰ |
| | OXA-R | GAGCACTTCTTTTGTGATGGC | | |

جدا شده از مایع مغزی- نخاعی مشاهده گردید.

در این مطالعه، ۱۰۲ ایزوله‌ی جدا شده از بیمارستان لقمان حکیم شامل ۴۱ ایزوله‌ی *Escherichia coli*، ۲۹ ایزوله‌ی *Acinetobacter baumannii*، ۱۵ ایزوله‌ی *Klebsiella pneumoniae*، ۱۱ ایزوله‌ی *Pseudomonas aeruginosa*، ۲ ایزوله‌ی *Citrobacter freundii*، ۲ ایزوله‌ی *Proteus mirabilis*، ۲ ایزوله‌ی *Enterobacter cloacae* و ۳۲ ایزوله‌ی جدا شده از بیمارستان امام حسین (ع) شامل ۱۱ ایزوله‌ی *Escherichia coli*، ۶ ایزوله‌ی *Acinetobacter baumannii*، ۳ ایزوله‌ی *Klebsiella pneumoniae*، ۸ ایزوله‌ی *Pseudomonas aeruginosa* و ۴ ایزوله‌ی *Citrobacter freundii* مورد بررسی قرار گرفتند.

روش PCR برای شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز در نمونه‌های مقاوم به کاربپنم که حداقل یکی از دو روش فنوتیپی MHT یا DDST مثبت گزارش گردید، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و شرایط موجود صورت پذیرفت (جدول‌های ۱ و ۲). پس از اتمام چرخه‌های دستگاه، ۳ میکرولیتر از آن بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز برده شد و نتایج آن به کمک دستگاه Gel documentation مورد ارزیابی قرار گرفت.

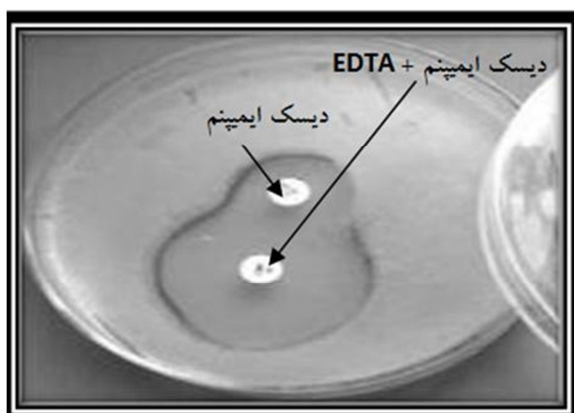
یافته‌ها

درصد فراوانی نسبی سویه‌های جدا شده از نمونه‌های مختلف در شکل ۱ آمده است. بیشترین موارد جدا شده از تراشه و کمترین موارد

جدول ۲. شرایط مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های کاربپنمازها

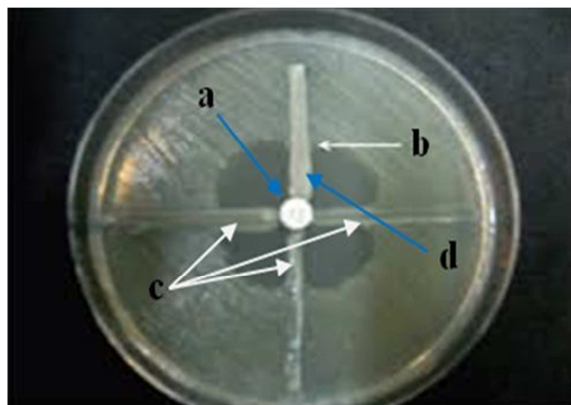
| ژن | تعداد چرخه | مرحله‌ی دناتوراسیون اولیه | مرحله‌ی دناتوراسیون | مرحله‌ی اتصال | مرحله‌ی گسترش | مرحله‌ی گسترش نهایی |
|----------------------|------------|---------------------------|---------------------|---------------|---------------|---------------------|
| bla _{KPC} | ۳۰ | درجه ۹۴ | درجه ۹۴ | درجه ۶۰ | درجه ۷۲ | درجه ۷۲ |
| | | ۵ دقیقه | ۱ دقیقه | ۴۰ ثانیه | ۴۵ ثانیه | ۳ دقیقه |
| bla _{GES} | ۳۰ | درجه ۹۵ | درجه ۹۵ | درجه ۶۰ | درجه ۷۲ | درجه ۷۲ |
| | | ۲ دقیقه | ۲ دقیقه | ۳۰ ثانیه | ۱ دقیقه | ۵ دقیقه |
| bla _{NDM} | ۳۵ | درجه ۹۵ | درجه ۹۵ | درجه ۵۹ | درجه ۷۲ | درجه ۷۲ |
| | | ۲ دقیقه | ۲ دقیقه | ۳۰ ثانیه | ۱ دقیقه | ۱۰ دقیقه |
| bla _{VIM1} | ۳۰ | درجه ۹۵ | درجه ۹۵ | درجه ۵۸ | درجه ۷۲ | درجه ۷۲ |
| | | ۲ دقیقه | ۱ دقیقه | ۴۵ ثانیه | ۱ دقیقه | ۱۰ دقیقه |
| bla _{IMP} | ۳۰ | درجه ۹۵ | درجه ۹۵ | درجه ۵۸ | درجه ۷۲ | درجه ۷۲ |
| | | ۲ دقیقه | ۱ دقیقه | ۳۵ ثانیه | ۱ دقیقه | ۱۰ دقیقه |
| bla _{SPM} | ۴۰ | درجه ۹۴ | درجه ۹۴ | درجه ۵۵ | درجه ۷۲ | درجه ۷۲ |
| | | ۲ دقیقه | ۱ دقیقه | ۴۵ ثانیه | ۱ دقیقه | ۷ دقیقه |
| bla _{Oxa48} | ۳۵ | درجه ۹۵ | درجه ۹۵ | درجه ۵۶ | درجه ۷۲ | درجه ۷۲ |
| | | ۲ دقیقه | ۱ دقیقه | ۴۵ ثانیه | ۱ دقیقه | ۷ دقیقه |

Acinetobacter baumannii از ایزوله‌های مورد بررسی دارای ژن bla_{IMP-1} بودند.



شکل ۲. نتیجه مثبت آزمایش (DDST) Double-disk synergy test

ایزوله‌های *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* از بیمارستان لقمان حکیم و به ترتیب از نمونه‌ی تراشه و ادرار جدا گردیدند و ایزوله‌های *Acinetobacter baumannii* و *Citrobacter freundii* از بیمارستان امام حسین (ع) به ترتیب از نمونه‌های تراشه و ادرار بیماران بستری شده جداسازی شدند؛ در حالی که تمامی سویه‌ها، فاقد ژن‌های bla_{GES}، bla_{SPM}، bla_{VIMI,II}، bla_{OXA-48} و bla_{KPC}، bla_{NDM} بودند. همچنین، نتایج حاصل از توالی‌یابی نیز صحت وجود ژن bla_{IMP-1} در این ۴ سویه را تأیید کرد.

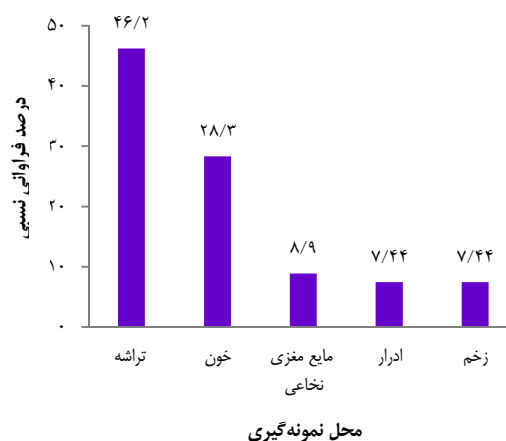


شکل ۳. روش MHT به همراه نمونه‌های مجهول و شاهد مثبت

a: دیسک ارتاپنم، b: سویه‌ی استاندارد *Escherichia coli* ATCC ۲۵۹۲۲ حساس به کاربپنماز، c: نمونه‌ی مجهول، d: شاهد مثبت (*Klebsiella pneumoniae* AO-8053)

بحث

در این مطالعه، از ۳۲ سویه‌ی جدا شده‌ی مربوط به بیمارستان امام



شکل ۱. درصد توزیع فراوانی نسبی نمونه‌های بالینی ایزوله شده بر حسب محل نمونه‌گیری

نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام نشان داد که بیشترین میزان مقاومت، مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های ارتاپنم، سفوتاکسیم، سفنازیدیم، آزرثونام، آمیکاسین و کاناماسین (۱۰۰ درصد) و کمترین میزان مقاومت مربوط به ایمپینم ۸۸ درصد بود (جدول ۳).

جدول ۳. درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های مورد بررسی در این مطالعه

| ایزوله‌های مقاوم تعداد (درصد) | آنتی‌بیوتیک |
|----------------------------------|---------------------------|
| ۱۳۴ (۱۰۰) | سفنازیدیم |
| ۱۳۳ (۹۹/۲) | سفپیم |
| ۱۳۴ (۱۰۰) | سفوتاکسیم |
| ۱۱۸ (۸۸/۰) | ایمپینم |
| ۱۲۵ (۹۳/۲) | مروپنم |
| ۱۳۴ (۱۰۰) | ارتاپنم |
| ۱۲۵ (۹۳/۲) | تریمتوپریم/سولفامتوکسازول |
| ۱۳۱ (۹۷/۷) | سپروفلوکساسین |
| ۱۳۴ (۱۰۰) | آزرثونام |
| ۱۳۴ (۱۰۰) | آمیکاسین |
| ۱۳۴ (۱۰۰) | کاناماسین |

آزمایش‌های DDST و MHT بر روی تمام سویه‌های مقاوم به ارتاپنم انجام گرفت و به ترتیب تنها در ۴۴ و ۱۷ سویه جواب مثبت مشاهده گردید (شکل‌های ۲ و ۳).

نتایج روش PCR

نتایج PCR نشان داد که تنها ۴ سویه‌ی *Klebsiella pneumoniae* و *Citrobacter freundii*، *Escherichia coli*

مروپنم، ۱۱ نمونه (۳/۰ درصد) مقاوم به ارتپنم و ۴ نمونه (۱/۱ درصد) مقاوم به ایمپنم بودند (۱۶). در مطالعه‌ی حاضر، ۸۸ درصد سویه‌های *Enterobacteriaceae*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter baumannii* به ایمپنم مقاوم بودند که این امر، نشان دهنده‌ی افزایش مقاومت دارویی در سال‌های اخیر نسبت به کاربپنم‌ها می‌باشد.

در مطالعه‌ی عزیمسی و همکاران بر روی ۲۸ ایزوله‌ی *Klebsiella pneumoniae* مقاوم به ایمپنم، با استفاده از روش‌های MHT و CarbaNP test مشخص شد که تمام ایزوله‌ها، از لحاظ فنوتیپی مثبت می‌باشند. در این مطالعه، ۱ ایزوله‌ی VIM-4 و ۲۷ ایزوله‌ی OXA-48 مثبت با استفاده از روش مولکولی گزارش گردید، اما در مطالعه‌ی حاضر فقط ژن *bla_{IMP-1}* مشاهده شد (۱۷).

نتیجه‌گیری نهایی این که MHT و DDST روش‌هایی آسان برای شناسایی باکتری‌های مولد کاربپنماز در *Enterobacteriaceae*‌ها و باکتری‌های غیر تخمیری مانند *Pseudomonas* و *Acinetobacter* می‌باشند. بنابراین، با توجه به نتایج به دست آمده، پیشنهاد می‌شود که برای تمامی سویه‌های ایزوله شده که با روش دیسک دیفیوژن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کاربپنم مقاوم یا نیمه‌حساس هستند، باید از نظر تولید آنزیم‌های کاربپنماز هم‌زمان از چندین آزمایش فنوتیپی استفاده گردد. همچنین، با توجه به اهمیت سویه‌های مولد کاربپنماز در بیمارستان‌ها، شناسایی سریع این ژن‌ها می‌تواند نقش مهمی در کنترل و درمان این باکتری‌ها داشته باشد. در نهایت، پیشنهاد می‌شود که برای شناسایی و تأیید ژن‌های کاربپنماز، از آزمایش‌های مولکولی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله، از تمامی کارکنان آزمایشگاه میکروبی‌شناسی بیمارستان‌های لقمان حکیم و امام حسین (ع) تهران جهت جمع‌آوری نمونه‌ها و همچنین، بخش میکروبی‌شناسی انستیتو پاستور ایران سپاسگزاری می‌گردد.

حسین (ع) ۹۶/۸ درصد و از ۱۰۲ سویه‌ی جدا شده‌ی مربوط به بیمارستان لقمان حکیم، ۸۶/۲ درصد به همه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مقاوم بودند. مقایسه‌ی نتایج به دست آمده در این مطالعه با مطالعات قبلی، نشان از افزایش میزان مقاومت این باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از سوش‌های جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان می‌باشد (۱۳-۸).

در بین کاربپنمازها، آنزیم‌های متالوبتالاکتامازها شیوع بیشتری در سراسر جهان دارند (۱۵-۴). بنابراین، شناسایی آزمایشگاهی این آنزیم‌ها، می‌تواند نقش بسیار مهمی در درمان بیماران عفونی با باکتری‌های مولد این آنزیم‌ها داشته باشد. روش MHT و DDST، دو روش فنوتیپی برای شناسایی کاربپنمازها می‌باشند که هر دو روش، به آسانی در آزمایشگاه قابل استفاده می‌باشند. از مزیت‌های مهم دیگر روش MHT، می‌توان به شناسایی آنزیم‌های گروه A و گروه B متالوبتالاکتامازها و همچنین امکان آزمایش چندین سویه بر روی یک پلیت اشاره نمود.

از بین سویه‌های مقاوم به کاربپنم‌ها، ۴۴ سویه و ۱۷ سویه به ترتیب DDST نسبت به مهار کننده‌ی EDTA و MHT مثبت بودند که نشان می‌داد این سویه‌ها، از نظر فنوتیپی دارای آنزیم کاربپنماز می‌باشند. در بقیه‌ی سویه‌ها، نتایج MHT و DDST منفی بود که نشان دهنده‌ی آن است که مقاومت نسبت به کاربپنم‌ها در این سویه‌ها، به علت مکانیسم‌های دیگری نظیر Efflux pomp و تغییر در نفوذ پذیری غشا می‌باشد.

در مطالعه‌ی حاضر، نتایج PCR نشان داد که تنها ۴ سویه‌ی *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae* و *Citrobacter freundii* که حداقل توسط یکی از دو روش فنوتیپی MHT و DDST از لحاظ وجود ژن‌های کاربپنماز مورد تأیید قرار گرفته بودند، دارای ژن *bla_{IMP-1}* بودند؛ در حالی که سایر ژن‌های کاربپنماز در هیچ کدام از ایزوله‌ها یافت نگردید. در مطالعه‌ی شاهچراغی و همکاران در بیمارستان‌های تهران بر روی *Enterobacteriaceae*‌ها، تعداد ۲۳ نمونه (۶/۳ درصد) مقاوم به

References

- Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 13.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 969-76.
- Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med* 2012; 18(5): 263-72.
- Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13(1): 42-51.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A9. 9th ed. Wayne PA; CLSI: 2006.
- Saito R, Koyano S, Dorin M, Higurashi Y, Misawa Y, Nagano N, et al. Evaluation of a simple phenotypic method for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Microbiol Methods* 2015; 108: 45-8.

7. Mochon AB, Garner OB, Hindler JA, Krogstad P, Ward KW, Lewinski MA, et al. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae*: case report and laboratory detection strategies. *J Clin Microbiol* 2011; 49(4): 1667-70.
8. Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(1): 582.
9. Shahcheraghi F, Abbasalipour M, Feizabadi M, Ebrahimipour G, Akbari N. Isolation and genetic characterization of metallo-beta-lactamase and carbapenemase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. *Iran J Microbiol* 2011; 3(2): 68-74.
10. Shahcheraghi F, Nobari S, Rahmati GF, Nasiri S, Owlia P, Nikbin VS, et al. First report of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Iran. *Microb Drug Resist* 2013; 19(1): 30-6.
11. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(1): 71-8.
12. Yousefi S, Farajnia S, Nahaei MR, Akhi MT, Ghotaslou R, Soroush MH, et al. Detection of metallo-beta-lactamase-encoding genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in northwest of Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68(3): 322-5.
13. Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, Rasoolinejad M, Sadeghifard N, Aligholi M, et al. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of blaOXA genes among *Acinetobacter* spp. Isolated from patients at Tehran hospitals. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61(4): 274-8.
14. Pena I, Picazo JJ, Rodriguez-Avial C, Rodriguez-Avial I. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 43(5): 460-4.
15. Tangden T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med* 2015; 277(5): 501-12.
16. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP, Carey RB, Stocker S, Lonsway D, et al. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(8): 1209-13.
17. Azimi L, Nordmann P, Lari AR, Bonnin RA. First report of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Iran. *GMS Hyg Infect Control* 2014; 9(1): Doc07.

Evaluation of Phenotypic and Genotypic Carbapenemase Genes in Gram-Negative Bacteria Resistant to Carbapenem and Determining their Antibiotic Resistance

Hamid Solgi¹, Hamzeh Ghafarzadeh², Fereshteh Shahcheraghi³

Original Article

Abstract

Background: Carbapenem antibiotics are often used as the last line of treatment for infections caused by resistant Gram-negative bacteria (GNB). The most important mechanism of resistance to carbapenems is production of carbapenemase. The prevalence of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria is on the rise worldwide, posing a major public health threat. The aim of this study was to determine the antibiotic resistance patterns and to detect carbapenemase producing Gram-negative bacteria in clinical isolates.

Methods: In this study, a total of 134 clinical isolates of Gram-negative bacteria were collected in Tehran city, Iran, during 2012-2013. Antimicrobial susceptibility testing was performed and resistance genes were characterized using polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing. The modified Hodge test (MHT) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) double-disk diffusion test (DDST) were performed for the screening carbapenemases.

Findings: The number and frequency of isolated bacteria were as *Escherichia coli* 57 (42.5%), *Klebsiella pneumoniae* 26 (19.4%), *Acinetobacter* spp 21 (15.6%), *Pseudomonas aeruginosa* 17 (12.6%), *Citrobacter* spp 8 (5.9%), *Proteus* spp 3 (2.2%), and *Enterobacter* spp 2 (1.4%). These organisms showed the highest resistance to ertapenem, cefotaxime, aztreonam, ceftazidime, amikacin and kanamycin (100%). Confirmatory tests showed that 44 isolates (32.8%) were DDST positive and 17 isolates (12.6%) were MHT positive. Most of MHT-positive (41.17%) and DDST-positive (39.13%) isolates were *Acinetobacter* spp. The PCR based screening revealed the presence of the bla_{IMP-1} gene in 4 isolates.

Conclusion: Owing to the presentation of bla_{IMP-1} gene in *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Acinetobacter* and *Escherichia coli* and feasibility of horizontal gene transfer among bacteria, changing in antibiotic prescription policies is required. Due to the importance of Metallo beta lactamase producing strains in hospital, early identification could play an effective role in prevention and treatment of these isolates.

Keywords: Carbapenemas, Antibiotic resistance, Gram negative bacteria, Polymerase chain reaction (PCR)

Citation: Solgi H, Ghafarzadeh H, Shahcheraghi F. Evaluation of Phenotypic and Genotypic Carbapenemase Genes in Gram-Negative Bacteria Resistant to Carbapenem and Determining their Antibiotic Resistance. J Isfahan Med Sch 2017; 34(405): 1290-6.

1- PhD Student, Department of Medical Bacteriology, Division of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

2- Department of Microbiology, Saveh Research and Science Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

3- Professor, Department of Microbiology, Division of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Corresponding Author: Fereshteh Shahcheraghi, Email: shahcheraghifereshteh@yahoo.com