مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۴۰۵/هفته‌ی اول دی ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۱۹

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

حمید سلگی[۱]، حمزه غفارزاده[۲]، فرشته شاهچراغی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم اغلب به عنوان آخرین خط درمانی برای عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های گرم منفی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مهم‌ترین مکانیسم مقاومت به کارباپنم‌ها تولید آنزیم‌های کارباپنماز می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی باکتری‌های گرم منفی مولد کارباپنماز 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 کارباپنمازها ($bla_{VIM,II}$، bla_{SPM}، bla_{GES}، bla_{NDM}، bla_{KPC}، bla_{OXA-48} و bla_{IMP-1}) استفاده گردید. در نهایت، 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، سفتازیدیم، آزترئونام، کانامایسین 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} در 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: کارباپنماز، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، باکتری‌های گرم منفی، Polymerase chain reaction

ارجاع: سلگی حمید، غفارزاده حمزه، شاهچراغی فرشته. **بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی ژن‌های کارباپنماز در باکتری‌های گرم منفی مقاوم به کاربابپنم 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، منتژیت، سپتی‌سمی و عفونت‌های مرتبط با وسایل پزشکی می‌شوند. معرفی کاربابپنم‌ها 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). بتالاکتامازهای جدید که بیانگر مقاومت به کارباپنم‌ها هستند، شامل کارباپنمازها می‌باشند که به تازگی، شیوع آن‌ها در حال افزایش می‌باشد. آنزیم‌های کارباپنماز، 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 میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲- کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات ساوه، ساوه، ایران
۳- استاد میکروب‌شناسی، بخش میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: فرشته شاهچراغی
Email: shahcheraghifereshteh@yahoo.com

تعداد زیادی از کارباپنمازها در سال‌های اخیر شناسایی شده‌اند که به ۳ گروه A (Klebsiella pneumoniae carbapenemase یا KPC و Guiana extended-spectrum β-lactamase یا GES)، گروه B متالوبتالاکتامازها (Verona integron-encoded β-lactamase یا VIM، Imipenemase یا IMP، Sao Paulo metallo-β-lactamases یا SPM، New Delhi Metallo-beta-lactamase یا NDM و German imipenemase یا GIM) و گروه D بتالاکتامازها (OXA_{48}) دسته‌بندی می‌شوند (۳).

این آنزیم‌ها، به طور عمده در باکتری‌های غیر تخمیری مانند Acinetobacter baumannii و Pseudomonas aeruginosa وجود دارند و همچنین، از Enterobacteriaceaeها نیز جدا می‌شوند. باکتری‌های تولید کننده‌ی متالوبتالاکتامازها، به دلیل اثر بر طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف و کارباپنم‌ها (به استثنای مونوباکتام‌ها مانند آزترئونام)، 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 Enterobacteriaceaeها و باکتری‌های گرم منفی غیر تخمیری جدا شده از نمونه‌های بالینی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین، بررسی ژن‌های کارباپنماز در میان باکتری‌های گرم منفی مقاوم به کارباپنم از بیمارستان‌های امام حسین (ع) و لقمان حکیم انجام گرفت.

روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: در این مطالعه، تعداد ۱۳٤ ایزوله‌ی مقاوم به کارباپنم 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، آزترونام، ارتاپنم، ایمیپنم، مروپنم، آمیکاسین، کانامایسین، سیپروفلوکساسین، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول (کوتریموکسازول) (تهیه شده از شرکت MAST، انگلیس) بر اساس راهنمای مؤسسه‌ی استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (Clinical & Laboratory Standards Institute یا CLSI) مورد بررسی قرار گرفت (۵). در این مطالعه، از سویه‌ی استاندارد Escherichia coli ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان سویه‌ی شاهد استفاده گردید.

شناسایی فنوتیپی کارباپنمازها: Double-disk synergy test (DDST): سویه‌های مقاوم به کارباپنم، 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 ایمیپنم و ایمیپنم 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 ایمیپنم همراه با EDTA در مقایسه با دیسک ایمیپنم تنها، به عنوان آزمایش مثبت برای وجود بتالاکتامازها تلقی می‌شد (۷-٦). 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 ۲٤-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. ایزوله‌ی MHT مثبت بعد از ۲٤-۱۸ 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 کارباپنماز می‌باشد.

شناسایی ژنوتیپی کارباپنمازها: جهت استخراج DNA باکتری از روش جوشاندن (Boilling) استفاده گردید. ابتدا ٤-۳ 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 بنداری جوش قرار داده شد. در نهایت، اپندورف‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد و از محلول رویی آنها برای انجام Polymerase chain reaction (PCR) به صورت تک استفاده گردید.

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

ژن	پرایمر	توالی نوکلئوتیدی(5′to3′)	اندازه (bp)	رفرنس
bla_{KPC}	KPC-F KPC-R	CTTGCTGCCGCTGTGCTG GCAGGTTCCGGTTTTGTCTC	۴۸۹	۱۷
bla_{GES}	GES-F GES-R	ATGCGCTTCATTCACGCAC CTATTTGTCCGTGCTCAGG	۶۴۰	۱۸
bla_{NDM}	NDM-F NDM-R	ACCGCCTGGACCGATGACCA GCCAAAGTTGGGCGCGGTTG	۲۶۳	۱۹
bla_{VIM1}	VIM-F VIM-R	AGTGGTGAGTATCCGACA ATGAAAGTGCGTGGAGAC	۲۶۱	۲۰
bla_{IMP}	IMP-F IMP-R	ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC ACAACCAGTTTTGCCTTACC	۵۸۵	۲۰
bla_{SPM}	SPM-F SPM-R	*GCGTTTTGTTTGTTGCTC* TTGGGGATGTGAGACTAC	۷۸۶	۲۰
bla_{oxa48}	OXA-F OXA-R	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	۷۴۳	۲۰

روش PCR برای شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز در نمونه‌های مقاوم به کارباپنم 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.

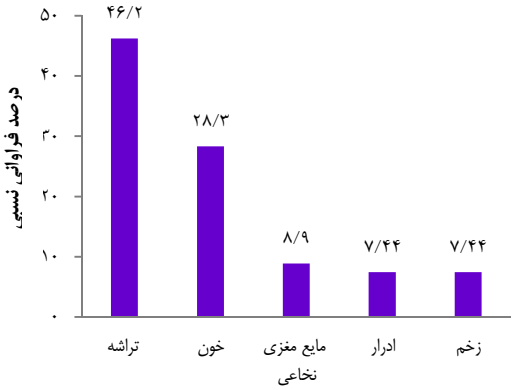
یافته‌ها

درصد فراوانی نسبی سویه‌های جدا شده از نمونه‌های مختلف در شکل ۱ آمده است. بیشترین موارد جدا شده از تراشه و کمترین موارد جدا شده از مایع مغزی- نخاعی مشاهده گردید.

در این مطالعه، ۱۰۲ ایزوله‌ی جدا شده از بیمارستان لقمان حکیم شامل ٤١ ایزوله‌ی Escherichia coli، ۲۹ ایزوله‌ی Klebsiella pneumoniae، ۱۵ ایزوله‌ی Acinetobacter baumannii، 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، ٦ ایزوله‌ی Klebsiella pneumoniae، ۳ ایزوله‌ی Acinetobacter baumannii، ۸ ایزوله‌ی Pseudomonas aeruginosa و ٤ ایزوله‌ی Citrobacter freundii مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۲. شرایط مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های کارباپنمازها

ژن	تعداد چرخه	مرحله‌ی دناتوراسیون اولیه	مرحله‌ی دناتوراسیون	مرحله‌ی اتصال	مرحله‌ی گسترش	مرحله‌ی گسترش نهایی
bla_{KPC}	۳۰	۹۴ درجه ۵ دقیقه	۹۴ درجه ۱ دقیقه	۶۰ درجه ۴۰ ثانیه	۷۲ درجه ۴۵ ثانیه	۷۲ درجه ۳ دقیقه
bla_{GES}	۳۰	۹۵ درجه ۲ دقیقه	۹۵ درجه ۲ دقیقه	۶۰ درجه ۳۰ ثانیه	۷۲ درجه ۱ دقیقه	۷۲ درجه ۵ دقیقه
bla_{NDM}	۳۵	۹۵ درجه ۲ دقیقه	۹۵درجه ۳۰ ثانیه	۵۹ درجه ۳۰ ثانیه	۷۲ درجه ۱ دقیقه	۷۲ درجه ۱۰ دقیقه
bla_{VIM1}	۳۰	۹۵ درجه ۲ دقیقه	۹۵درجه ۱دقیقه	۵۸ درجه ۴۵ ثانیه	۷۲ درجه ۱ دقیقه	۷۲ درجه ۱۰ دقیقه
bla_{IMP}	۳۰	۹۵ درجه ۲ دقیقه	۹۵ درجه ۱ دقیقه	۵۸ درجه ۳۵ ثانیه	۷۲ درجه ۱ دقیقه	۷۲ درجه ۱۰ دقیقه
bla_{SPM}	۴۰	۹۴ درجه ۲ دقیقه	۹۴ درجه ۱ دقیقه	۵۵ درجه ۴۵ ثانیه	۷۲ درجه ۱ دقیقه	۷۲ درجه ۷ دقیقه
bla_{oxa48}	۳۵	۹۵ درجه ۲ دقیقه	۹۵ درجه ۱ دقیقه	۵۶ درجه ۴۵ ثانیه	۷۲ درجه ۱ دقیقه	۷۲ درجه ۷ دقیقه



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، سفتازیدیم، آزترئونام، آمیکاسین و کانامایسین (۱۰۰ درصد) و کمترین میزان مقاومت مربوط به ایمیپنم ۸۸ درصد بود (جدول ۳).

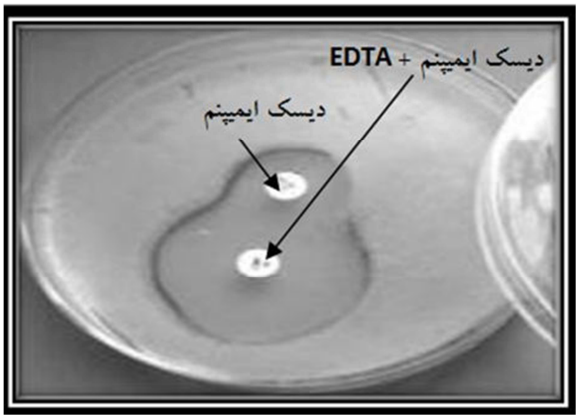
جدول ۳. درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های مورد بررسی در این مطالعه

آنتی‌بیوتیک	ایزوله‌های مقاوم تعداد (درصد)
سفتازیدیم	۱۳۴ (۱۰۰)
سفپیم	۱۳۳ (۹۹/۲)
سفوتاکسیم	۱۳۴ (۱۰۰)
ایمیپنم	۱۱۸ (۸۸/۰)
مروپنم	۱۲۵ (۹۳/۲)
ارتاپنم	۱۳۴ (۱۰۰)
تریمتوپریم/سولفامتوکسازول	۱۲۵ (۹۳/۲)
سیپروفلوکساسین	۱۳۱ (۹۷/۷)
آزترئونام	۱۳۴ (۱۰۰)
آمیکاسین	۱۳۴ (۱۰۰)
کانامایسین	۱۳۴ (۱۰۰)

آزمایش‌های DDST و MHT بر روی تمام سویه‌های مقاوم به ارتاپنم انجام گرفت و به ترتیب تنها در ٤٤ و ۱۷ سویه جواب مثبت مشاهده گردید (شکل‌های ۲ و ۳).

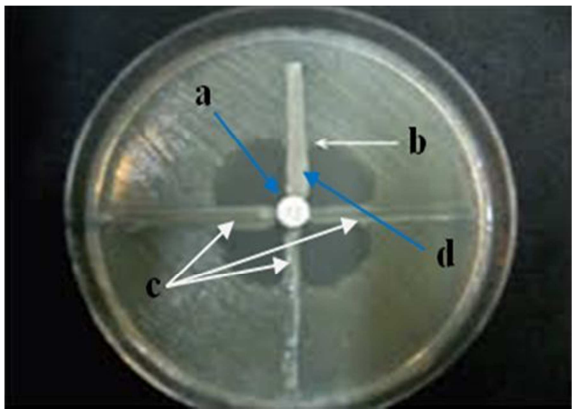
نتایج روش PCR

نتایج PCR نشان داد که تنها ٤ سویه‌ی Klebsiella pneumoniae، Escherichia coli، Citrobacter freundii و Acinetobacter baumannii از ایزوله‌های مورد بررسی دارای ژن bla_{IMP-1} بودند.



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

ایزوله‌های Klebsiella pneumonia و Escherichia coli 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 $bla_{VIMI,II}$، bla_{SPM}، bla_{GES}، bla_{NDM}، bla_{KPC} و bla_{OXA-48} بودند. همچنین، نتایج حاصل از توالی‌یابی نیز صحت وجود ژن bla_{IMP-1} در این ٤ 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 کارباپنماز، c: نمونه‌ی مجهول، d: شاهد مثبت (Klebsiella pneumoniae AO-8053)

بحث

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

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 کاربا‌پنمازها، آنزیم‌های متالوبتالاکتامازها شیوع بیشتری در سراسر جهان دارند (۱۵-٤). 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 کاربا‌پنمازها 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 کاربا‌پنم‌ها، ٤٤ 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 کاربا‌پنماز می‌باشند. در بقیه‌ی سویه‌ها، نتایج MHT و DDST منفی بود که نشان دهنده‌ی آن است که مقاومت نسبت به کاربا‌پنم‌ها 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 ٤ سویه‌ی Escherichia coli، Klebsiella pneumoniae، Citrobacter freundii و Acinetobacter baumannii، که حداقل توسط یکی از دو روش فنوتیپی MHT و DDST از لحاظ وجود ژن‌های کاربا‌پنماز مورد تأیید قرار گرفته بودند، دارای ژن bla_{IMP-1} بودند؛ در حالی که سایر ژن‌های کاربا‌پنماز در هیچ کدام از ایزوله‌ها یافت نگردید.

در مطالعه‌ی شاهچراغی و همکاران در بیمارستان‌های تهران بر روی Enterobacteriaceaeها، تعداد ۲۳ نمونه (٦/۳ درصد) مقاوم به مروپنم، ۱۱ نمونه (۳/۰ درصد) مقاوم به ارتاپنم و ٤ نمونه (۱/۱ درصد) مقاوم به ایمی‌پنم بودند (۱٦). در مطالعه‌ی حاضر، ۸۸ درصد سویه‌های Enterobacteriaceae، Pseudomonas aeruginosa و Acinetobacter baumannii به ایمیپنم مقاوم بودند که این امر، نشان دهنده‌ی افزایش مقاومت دارویی در سال‌های اخیر نسبت به کاربا‌پنم‌ها می‌باشد.

در مطالعه‌ی عزیمی و همکاران بر روی ۲۸ ایزوله‌ی Klebsiella pneumonia مقاوم به ایمیپنم، 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 کاربا‌پنماز در Enterobacteriaceaeها 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 کاربا‌پنم مقاوم یا نیمه‌حساس هستند، باید از نظر تولید آنزیم‌های کاربا‌پنماز هم‌زمان از چندین آزمایش فنوتیپی استفاده گردد. همچنین، با توجه به اهمیت سویه‌های مولد کاربا‌پنماز 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 کاربا‌پنماز، از آزمایش‌های مولکولی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

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

References

1. 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.
2. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(3): 969-76.
3. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! Trends Mol Med 2012; 18(5): 263-72.
4. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol 2015; 13(1): 42-51.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A9. 9th ed. Wayne PA; CLSI: 2006.
6. 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 carbapenamase 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.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 34, No. 405, 1st Week, January 2017

Received: 02.05.2016

Accepted: 09.09.2016

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

Hamid Solgi[1], Hamzeh Ghafarzadeh[2], Fereshteh Shahcheraghi[3]

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 pneumonia 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 kanamaycin (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 producting 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