مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۷، شماره ۶، بهمن و اسفند۱۴۰۱(شماره پی در پی ۱۵۵)

بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت متالوبتالاکتامازی در ایزوله‌های بالینی *اشریشیاکلی* و *کلبسیلاپنومونیه*

هدا میری[۱]، فاطمه نوربخش[۱*]، معصومه مهدوی اورتاکند[۲]

[۱]گروه میکروبیولوژی، واحد ورامین ـ پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران، [۲]گروه زیست شناسی، واحد ورامین ـ پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۰/۱۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از سفالوسپورین‌های طیف وسیع در درمان عفونت‌ها، باعث پیدایش دسته جدیدی از بتالاکتامازها به نام متالوبتالاکتاماز گردیده است، این آنزیم‌ها به بتالاکتامازهای کلاس B آمبلر تعلق دارند. متالوبتالاکتامازهای گروه A و B در انتروباکتریاسه‌ها مشکلاتی در درمان ایجاد می‌کنند. این مطالعه با هدف بررسی فنوتیپی سویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز *اشریشیاکلی* و *کلبسیلاپنومونیه* و هم‌چنین بررسی مولکولی ژن های SPM، VIM، SIM، IMP و GIM انجام شد.

روش بررسی: این یک مطالعه توصیفی- کمی می‌باشد که بر روی ۱۸۵ بیمار بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه بیمارستان میلاد تهران در تاریخ اسفندماه تا اردیبهشت ماه ۱۳۹۹-۱۳۹۸ انجام گرفت و ۴۵ سویه *اشریشیاکلی* و ۶۲ سویه *کلبسیلاپنومونیه* انتخاب شدند. جهت بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها از آزمون انتشار در آگار و هم‌چنین جهت بررسی فنوتیپی سویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز، از روش دیسک ترکیبی استفاده شد. بررسی مولکولی ژن‌های مولد متالوبتالاکتاماز به روش PCR انجام گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده آزمون فیشر تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلاپنومونیه* به ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول و سفپیم مشاهده شد. ۱۴/۵ درصد از سویه‌های *کلبسیلاپنومونیه* و ۱۵/۵ درصد از سویه‌های *اشریشیاکلی* در روش فنوتیپی، مولد آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند. هم‌چنین ۸۸/۹ درصد از سویه‌های *اشریشیاکلی* مورد بررسی حامل ژن SPM، ۴۰ درصد حامل ژن VIM، ۶۶/۷ درصد حامل ژن SIM و ۱۵/۶ درصد حامل ژن IMP بودند. در سویه‌های *کلبسیلاپنومونیه* فراوانی ژن‌های SPM، VIM، SIM، IMP و GIM به ترتیب ۵۴/۸، ۴۱/۹، ۵۸/۱، ۳/۲ و ۸/۱ درصد مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه درصد بالایی از ژن‌های مولد آنزیم متالوبتالاکتاماز در باکتری‌ها وجود داشتند، در حالی که ۱۴/۵ درصد از سویه‌های *کلبسیلاپنومونیه* و ۱۵/۵ درصد از سویه‌های *اشریشیاکلی* در روش فنوتیپی، مولد آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند، این مسئله بیانگر این مطلب است که ژن‌های مولد آنزیم‌ها در باکتری‌ها وجود دارند و در مقادیر بالایی بیان نمی‌شوند. این احتمال نیز وجود دارد که این ژن‌ها بیان می گردند، اما با روش‌های فنوتیپی معمول قابل بررسی نیستند، لذا تلاش‌هایی در جهت یافتن روش‌های فنوتیپی قابل اطمینان، ارزان و آسان برای بررسی فنوتیپی باید صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه*، *اشریشیاکلی*، مقاومت متالوبتالاکتامازی، دیسک ترکیبی، ژن‌های SPM، VIM، SIM، IMP و GIM، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)

***نویسنده مسئول: فاطمه نوربخش، ورامین،** دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین ـ پیشوا، گروه میکروبیولوژی

Email: niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

مقدمه

بتالاکتام‌ها از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که برای کنترل عفونت‌های ناشی از باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه از آن‌ها استفاده می‌شود. متأسفانه امروزه درمان این عفونت‌ها با مشکلات زیادی رو به رو شده است(۱). یکی از مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها، تولید بتالاکتامازهاست که این آنزیم‌ها می‌توانند بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مانند؛ پنی‌سیلین، سفالوسپورین و کارباپنم را غیرفعال سازند. این آنزیم‌ها از طریق هیدرولیز حلقه بتالاکتام، باعث غیرفعال شدن آنها می‌شوند(۲).

در حال حاضر بتالاکتامازها به چهار گروه A، B، C و D تقسیم‌بندی می‌شوند. بتالاکتامازهای A و C معمول‌ترین انواع هستند و مشابه گروه D دارای اسید آمینه سرین در سایت فعال خود می‌باشند(۳). گروه B شامل متالوبتالاکتامازها[1] است(۴). این آنزیم‌ها بر اساس همولوژی توالی اسیدهای آمینه، به بتالاکتامازهای کلاس B آمبلر[2] و بر اساس پروفایل‌های مهارکنندگی و سوبستراپشان به گروه سوم طبقه‌بندی بوش[3] تعلق دارند. متالوبتالاکتامازها در برخی گونه‌های باکتریایی به وسیله ژن‌هایی که قسمتی از کروموزوم[4] هستند یا به وسیله ژن‌های هترولوگ[5] که از طریق انتقال افقی ژن کسب شده اند، کد می‌شوند. متالوبتالاکتامازها در *سودوموناس آئروژینوزا* و گونه‌های *اسینتوباکتر* شایع بودند، اما اخیراً به میزان زیادی در اعضای انتروباکتریاسه ظهور کرده‌اند(۵).

متالوبتالاکتامازها بر اساس ساختار مولکولی به ۶ نوع تقسیم می‌شوند که عبارتند از؛ VIM، IMP، GIM، SPM، SIM و AIM. چندین روش مختلف برای تشخیص آزمایشگاهی سویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز وجود دارد. از جمله این روش‌ها، استفاده از بازدارنده‌هایی مانند اتیلن دی آمین‌تتراستیک اسید(EDTA) است که یک ماده غیر سمی بوده و به راحتی در دسترس می‌باشد(۸ـ۶).[10]

متالوبتالاکتامازها در جایگاه فعال دارای اتم روی می‌باشند. این آنزیم‌ها بر خلاف سرین بتالاکتامازها وابستگی کمی به مونوباکتام‌ها دارند و به وسیله کلاولانیک اسید، تازوباکتام و سولباکتام که بازدارنده‌های بتالاکتامازها هستند، مهار نمی‌شوند. در عوض آن‌ها در محیط آزمایشگاهی به وسیله بازدارنده های متالوبتالاکتامازها شامل؛ EDTA، سدیم مرکاپتواستیک اسید(SMA)، مرکاپتوپروپیونیک اسید(MPA) و دی پیکولینیک اسید(DPA) مهار می‌شوند(۱۰ و ۹).

متالوبتالاکتامازهای نوع IMP، GIM، VIM و SPM در *سودوموناس آئروژینوزا* شناسایی شده‌اند. نخستین کارباپنماز به نام IMP-1 در *سودوموناس آئروژینوزا* در طی سال‌های ۱۹۹۴ـ۱۹۹۲ در ژاپن کشف شد. ژن این آنزیم‌ها به وسیله پلاسمیدهای با

1-MBLs
2-Ambler
3-Bush
4-Resident MBLs
5-Acquired MBLs

وزن مولکولی بالا درون کاست‌های ژنی حاوی کلاس یک و سه اینتگرون‌ها حمل می‌گردند. در طی سال‌های ۲۰۰۰ به بعد آنزیم‌های IMP مختلفی مثل IMP-7، IMP-9، IMP-13، IMP-16 و IMP-18 در *سودوموناس آئروژینوزا* کشف شد. نوع دیگر متالوبتالاکتاماز VIM-1 بود که نخستین بار در سال ۱۹۹۷ در ایتالیا کشف شد. مشابه ژن IMP، ژن VIM-1 قسمتی از کاست ژنی درون In70 از اینتگرون کلاس یک می‌باشد. در طی سال‌های بعد،VIMهای دیگری مانند؛ VIM-2، VIM-3، VIM-4، VIM-5، VIM-7، VIM-8، VIM-11، VIM-13، VIM-15 و VIM-16 کشف گردیدند(۱۴-۱۱).

در مطالعه‌ای، فراوانی تولید متالوبتالاکتاماز در سودوموناس آئروژینوزا در شهرهای مختلف ایران ۳۲/۵ درصد ارزیابی شد که بیشترین فراوانی در اصفهان به میزان ۶۰ درصد بود و بالاترین میزان فراوانی ژن‌ها VIM و IMP به ترتیب ۱۹ و ۱۱ درصد بودند(۱۵). در پژوهش دیگری فراوانی تولید متالوبتالاکتاماز به روش فنوتیپی در اشریشیاکلی ۶۶/۷ درصد مشاهده شد و گسترش ژن‌های VIM، IMP و NDM به ترتیب؛ ۷۲، ۲۴ و ۴ درصد بود(۱۶). سویه اسینتوباکتر بومانی مقاوم به کاربانپنم‌ها تولید کننده متالوبتالاکتاماز دارای ژن VIM ۵۵/۷، GIM ۳۷، SIM ۲۸/۵، IMP ۱۱/۴، NDM ۴ درصد و اولین بار SPM ۵/۷ درصد در مراکش گزارش شد(۱۷).

به دلیل شیوع بالای عفونت‌های بیمارستانی باکتریایی که دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است و ضرورت تشخیص سریع این سویه‌ها و گزارش دقیق حضور این باکتری‌ها در بیمارستان‌ها می‌تواند باعث کنترل بهتر و مؤثرتر این سویه ها گردد، لذا هدف از این مطالعه بررسی فنوتیپی سویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز *اشریشیاکلی* و *کلبسیلاپنومونیه*و همچنین بررسی مولکولی ژن‌های مولد این آنزیم‌ها می‌باشد.

روش بررسی

این یک مطالعه توصیفی می‌باشد که بر روی ۱۸۵ بیمار بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه بیمارستان میلاد تهران از تاریخ اسفندماه تا اردیبهشت ماه ۱۳۹۹-۱۳۹۸ انجام گرفت، ۶۲ سویه *کلبسیلاپنومونیه* و ۴۵ سویه *اشریشیاکلی* از نمونه‌های ادرار بیماران جدا شد. ایزوله‌های جمع‌آوری شده با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی؛ SIM، MR، VP، TSI، سیترات و اکسیداز تعیین هویت گردید.

انجام تست تعیین حساسیت به روش دیسک دیفیوژن با آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین(۳۰ میکروگرم TE)، سفپیم(۳۰ میکروگرم FEP)، آمیکاسین(۳۰ میکروگرم AN)، سفوتاکسیم(۳۰ میکروگرم CTX)، سفتازیدیم(۳۰ میکروگرم CAZ)، کوتریموکسازول(۱/۲۵- ۲۳/۷۵ میکروگرمSXT)، مروپنم(۱۰ میکروگرم MEM)،

افلوکساسین(۵ میکروگرم OFX) بر روی نمونه‌های جدا شده انجام گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت پادتن طب تهیه شد و از سویه *اشریشیاکلی* استاندارد(ATCC 25922) به عنوان کنترل استفاده شد.

جهت تشخیص فنوتیپی سویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز، از دیسک مروپنم به تنهایی و دیسک مروپنم همراه با مهارکننده EDTA با غلظت نیم میلی‌مولار استفاده شد. در این مرحله سویه‌هایی که به آنتی‌بیوتیک مروپنم مقاوم بودند، جهت انجام تست دیسک ترکیبی[۱] انتخاب شدند. از سویه‌های مورد بررسی سوسپانسیون باکتری با کدورت نیم مک‌فارلند تهیه و در محیط مولر هینتون آگار، کشت متراکم داده شد. سپس، یک دیسک آنتی‌بیوتیک مروپنم ۱۰ میکروگرم و یک دیسک آنتی‌بیوتیک مروپنم همراه با EDTA به فاصله ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر قرار داده شد و پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شدند. چنانچه هاله عدم رشد اطراف دیسک مروپنم در ترکیب با EDTA بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر نسبت به دیسک مروپنم باشد، سویه مورد بررسی را می‌توان به عنوان مولد آنزیم متالوبتالاکتاماز در نظر گرفت.

استخراج DNA به روش ستونی بر حسب دستورالعمل کارخانه سازنده کیت(شرکت سیناژن) انجام شد. جهت بررسی ژن‌های مقاومت متالوبتالاکتامازی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی VIM، IMP، GIM، SPM و SIM انجام شد(۱۸). توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه، در جدول ۱ ارایه شده است.

پرایمرها از شرکت سیناژن تهیه شده و مطابق دستورالعمل شرکت آماده گردید. واکنش PCR به کمک کیت سیناژن انجام شد، در این مطالعه از مستر میکس 1x، DNA با غلظت ۱۰ تا ۱۰۰ نانوگرم، هر یک از پرایمرها ۰/۴ میلی‌مولار به همراه ۱۰ میکرولیتر آب مقطر با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر جهت انجام PCR استفاده شد. برنامه حرارتی بهینه شده جهت اجرای PCR در ۳۵ سیکل حرارتی شامل دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه به مدت ۵۵ ثانیه، دمای اتصال پرایمر ۵۸ درجه به مدت ۵۵ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سپس محصول PCR در ژل آگارز ۲ درصد با 6x Loading رنگ‌آمیزی و تحت اشعه UV عکس‌برداری گردید. از مارکر ۱۰۰bp برای شناسایی محصول PCR استفاده شد.[۱۰]

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون فیشر تجزیه و تحلیل شدند.

1-Combined Disk

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های مورد نظر

Primer	Nucleotide sequences	Size
VIM-F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390bp
VIM-R	CGA ATGCGCAGCACCAG	
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	188bp
IMP-R	CCA AACYACTASGTTATCT	
SPM-F	AAAATCTGGGTACGCAAACG	271bp
SPM-R	ACATTATCCGCTGGAACAGG	
SIM-F	TAC AAGGGATTCGGCATCG	570bp
SIM-R	TAATGGCCTGTTCCCATGTG	
GIM-F	TCG ACACACCTTGGTCTGAA	477bp
GIM-R	AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC	

یافته‌ها

کمترین مقاومت سویه‌های *اشریشیاکلی* مورد مطالعه نسبت به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین(۲۲/۲ درصد) و بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول(۷۷/۸ درصد) مشاهده شد(نمودار۱). از سوی دیگر، براساس انجام آزمون دیسک ترکیبی ۱۵/۵ درصد(۷ سویه) از سویه‌های *اشریشیاکلی*تولید کننده آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند(شکل۱).

هم‌چنین در این مطالعه بین سویه‌های مولد MBL و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین(p=۰/۰۳۷)، مروپنم(p=۰/۰۴۶) و افلوکساسین(p=۰/۰۱۱) ارتباط معنی‌داری مشاهده شد.

کمترین مقاومت سویه‌های *کلبسیلاپنومونیه* مورد مطالعه نسبت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول(۳۳/۹درصد) و بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفپیم(۷۲/۶ درصد) مشاهده شد(نمودار ۲).

بر اساس انجام آزمون دیسک ترکیبی، ۱۴/۵ درصد(۹ سویه) از سویه‌های *کلبسیلاپنومونیه* تولید کننده آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند(شکل۲).

هم‌چنین در این مطالعه بین سویه‌های مولد MBL و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین(p=۰/۰۲۷) و افلوکساسین(p=۰/۰۰۱) ارتباط معنی‌داری مشاهده شد.

در مطالعه حاضر ۸۸/۹ درصد از سویه‌های *اشریشیا کلی* و ۵۴/۸ درصد از سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* حامل ژن *SPM*، ۴۰ درصد از سویه‌های *اشریشیاکلی* و ۴۱/۹ درصد از سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* حامل ژن *VIM* بودند(شکل۳a,b، نمودار۳).

هم‌چنین با بررسی آنالیز آماری مشخص شد که بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، آمیکاسین، افلوکساسین، مروپنم و ژن *VIM* در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* ارتباط معنی‌داری وجود دارد(p=۰/۰۰۱). ۶۶/۷ درصد از سویه‌های

اشریشیاکلی و ۵۸/۱ درصد از سویه‌های *کلبسیلا* پنومونیه حامل ژن *SIM* بودند(شکل۳d، نمودار۳) و بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و ژن *SIM* در سویه‌های *کلبسیلا* پنومونیه ارتباط معنی‌داری وجود دارد(p=۰/۰۰۱).

۱۵/۶ درصد از سویه‌های *اشریشیاکلی* و ۳/۲ درصد از سویه‌های *کلبسیلا* پنومونیه حامل ژن *IPM* بودند(شکل۳c، نمودار۳). بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول و ژن *IPM* در سویه‌های *کلبسیلا* پنومونیه و آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، مروپنم و ژن *IPM* در سویه‌های *اشریشیاکلی* ارتباط معنی‌داری وجود دارد(p=۰/۰۰۱).

۸/۱ درصد از سویه‌های *کلبسیلا* پنومونیه حامل ژن *GIM* بودند(شکل۳e، نمودار۳) و هم‌چنین هیچ یک از سویه‌های *اشریشیاکلی* حامل این ژن نبودند.

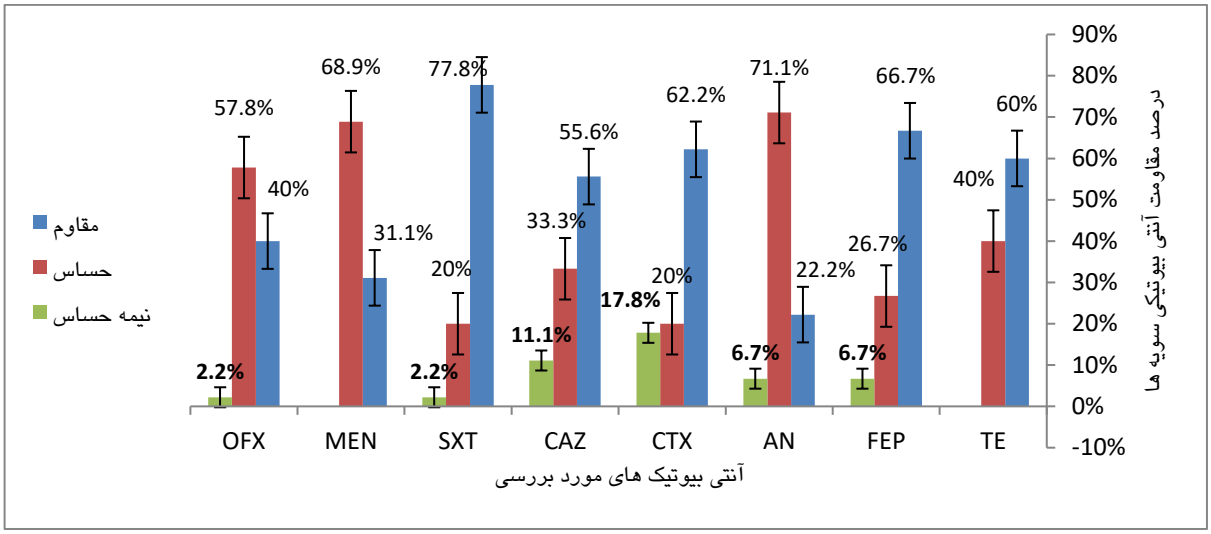
بیشترین هم‌زمانی ژنی در سویه‌های *اشریشیا کلی* مورد مطالعه مربوط به ژن‌های *SPM* و *SIM* (۶۰ درصد) و کمترین هم‌زمانی ژنی مربوط به ژن‌های *VIM* و *IMP*(۲/۲۲ درصد) بود(نمودار ۴).

بیشترین هم‌زمانی ژنی در سویه‌های *کلبسیلا* پنومونیه مورد مطالعه نیز مربوط به ژن‌های *SPM* و *SIM*(۳۷/۰۹ درصد) و کمترین هم‌زمانی ژنی مربوط به ژن‌های *SPM* و *IMP*(۱/۶۱ درصد) بود(نمودار۴).

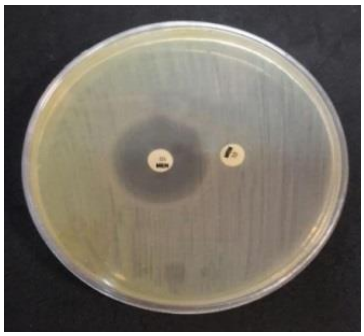
با بررسی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *اشریشیاکلی* مشخص گردید که در سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین، آمیکاسین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، کوتریموکسازول، مروپنم، افلوکساسین و سفپیم بیشترین فراوانی مربوط به ژن *SPM* و در رتبه‌های بعدی ژن‌های *SIM*،*VIM* و *IMP* بود(نمودار ۵).

با بررسی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *کلبسیلا*پنومونیه مشخص گردید که در سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و آمیکاسین بیشترین فراوانی مربوط به ژن *VIM*، در سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفتازیدیم و افلوکساسین، بیشترین فراوانی مربوط به ژن *SPM*، در سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول و مروپنم بیشترین فراوانی مربوط به ژن‌های *SPM* و *VIM* و در سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک سفپیم بیشترین فراوانی مربوط به ژن‌های *SPM* و *SIM* بود(نمودار ۶).

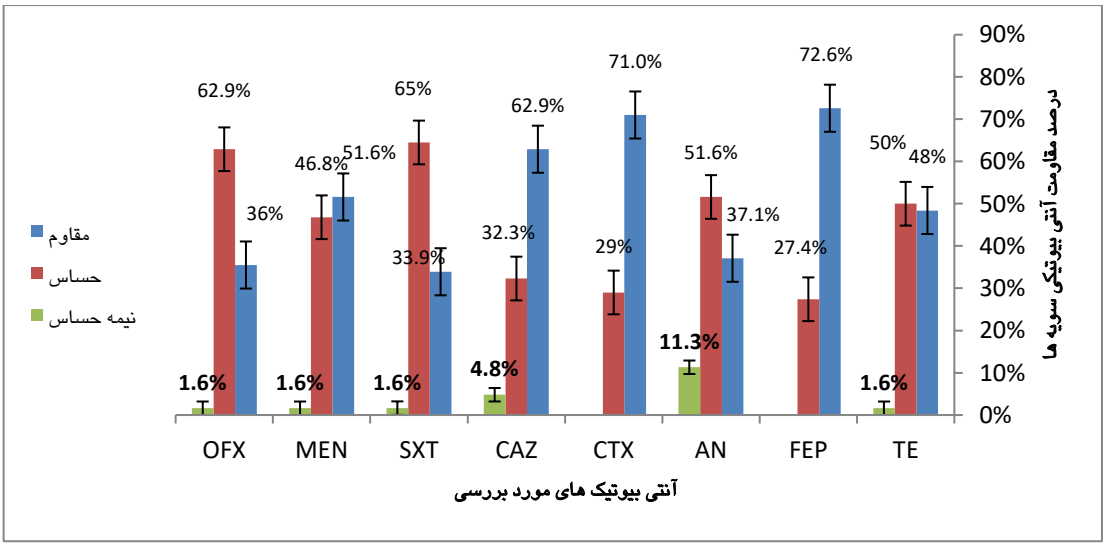
با بررسی‌های آماری انجام شده، ارتباط معنی‌داری بین بررسی فنوتیپی سویه‌های مولد MBL به روش دیسک ترکیبی و ژن‌های *VIM*، *SPM*، *SIM* و *GIM* در سویه‌های *کلبسیلا* پنومونیه(p=۰/۰۰۲۵) و ژن‌های *VIM*، *IMP*، *SIM* و *SPM* در سویه‌های *اشریشیا کلی*(p=۰/۰۰۰۱) مشاهده شد.



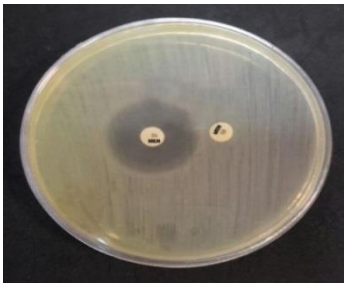
نمودار ۱: درصد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی در *اشریشیاکلی*



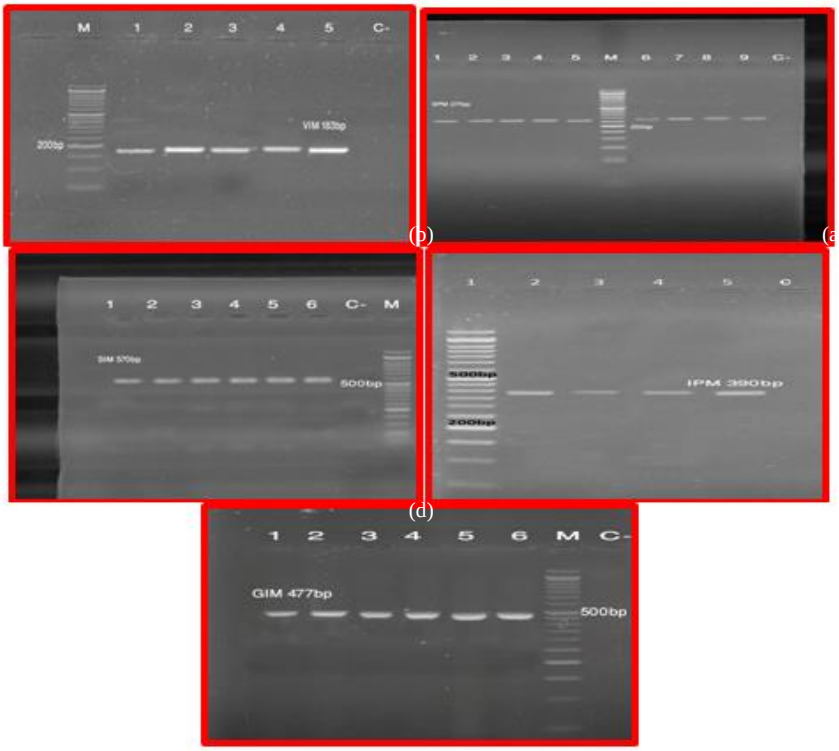
شکل ۱: شناسایی سویه های *اشریشیاکلی* مولد MBL



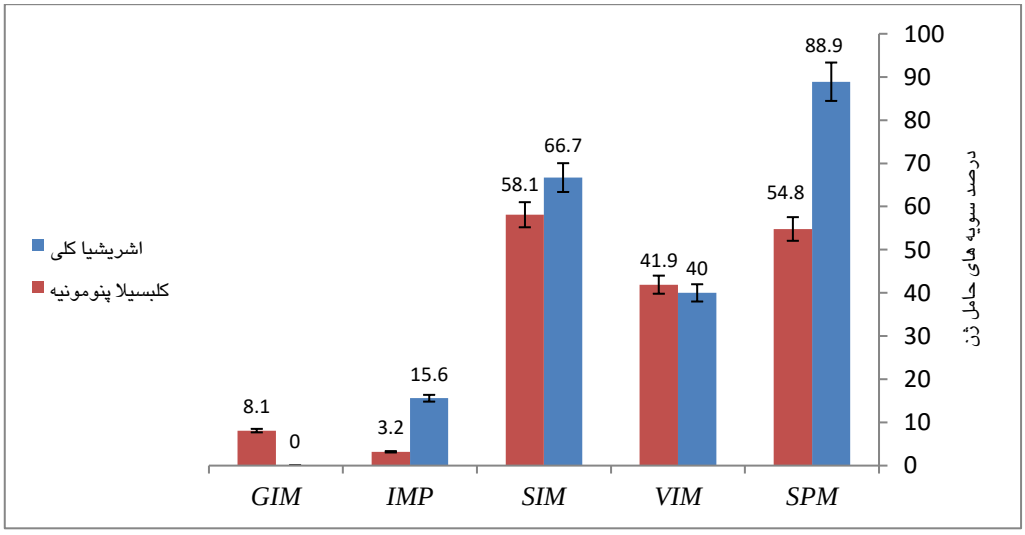
نمودار ۲: درصد فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *کلبسیلا پنومونیه*



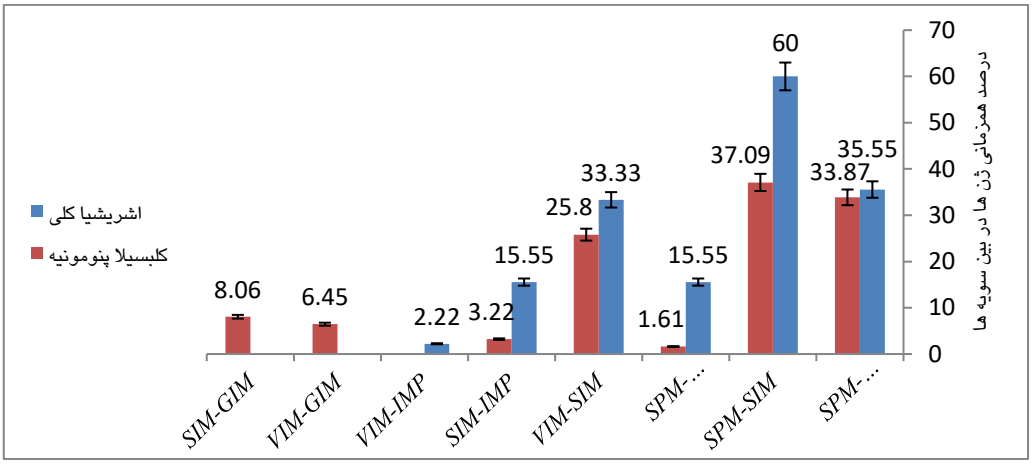
شکل۲: شناسایی سویه‌های *کلبسیلاپنومونیه* مولد MBL



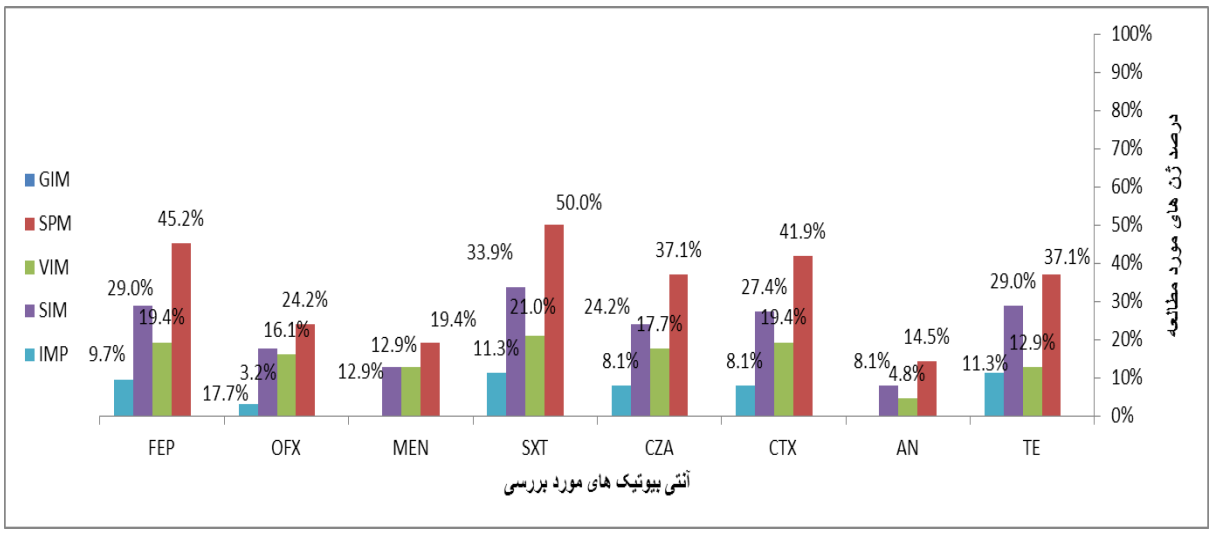
شکل۳:تصویر ژل الکتروفورزa) ژن SPMبه طول ۲۷۱bp، b) ژن VIM به طول ۱۸۳bp،c) ژن SIM به طول ۵۷۰bp،d)ژن IPM به طول ۳۹۰bp،e)ژن GIMبه طول ۴۷۷bp،M: سایز مارکر ۵۰۰bp،c: نمونه کنترل منفی



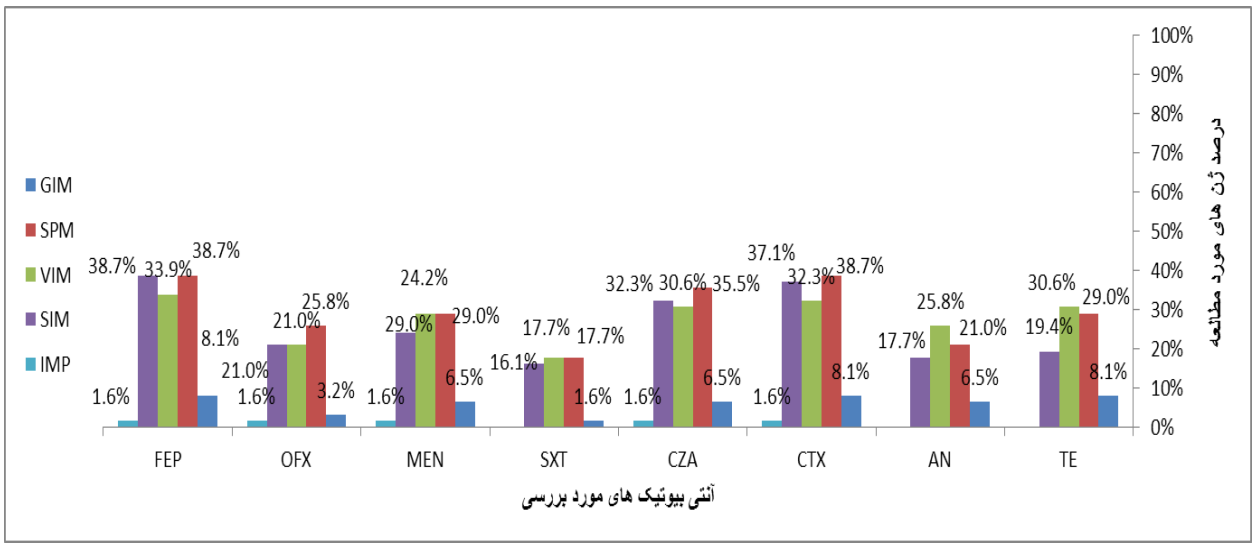
نمودار ۳: بررسی فراوانی ژن‌های مورد مطالعه در سویه‌های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه*



نمودار ۴: همزمانی ژن‌های مورد بررسی در سویه‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه*



نمودار ۵: ژن‌های مورد مطالعه در سویه‌های *اشریشیاکلی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک



نمودار ۶: ژن‌های مورد مطالعه در سویه‌های *کلبسیلا* پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک

بحث

متالوبتالاکتامازها طیف وسیعی از بتالاکتام‌ها (آنتی‌بیوتیک‌های ضد دیواره سلولی) از جمله سفالوسپورین‌ها(نسل سوم و پنجم)، کارباپنم‌ها و پنی‌سیلین‌ها را هیدرولیز می کنند(۸). لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت متالوبتالاکتاماز در ایزوله‌های بالینی *اشریشیاکلی* و *کلبسیلاپنومونیه* بود.

در این مطالعه ابتدا به روش فنوتیپی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها بررسی شد، سپس به روش دیسک ترکیبی فعالیت متالوبتالاکتامازی به روش فنوتیپی تعیین گردید و فراوانی وجود ژن‌های کد کننده آنزیم‌های متالوبتالاکتامازی به روش PCR بررسی شد

متالوبتالاکتاماز ها همچنین باعث ایجاد مقاومت در برابرآمینوگلیکوزیدها می‌شوند، اما توانایی هیدرولیز مونوباکتام‌ها مثل آزترونام را ندارند(۱۹). باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه به علت دارا بودن ماهیت سیار ژنتیکی، می‌توانند باعث انتشار این آنزیم شده و انواع ژن‌ها و ترانسپوزون‌های وارد شده در این باکتری‌ها، سویه‌های مقاوم را ایجاد می‌نمایند(۲۰). ژن‌های رمز کننده متالوبتالاکتاماز روی اینتگرون، روی پلاسمیدی که قادر است آن را انتقال دهد قرار گرفته و در ارتباط با عناصر ژن‌های حرکتی بوده و گاه می‌توانند قسمتی از یک کروموزوم باشند(۲۲ و ۲۱). برای تشخیص و جداسازی متالوبتالاکتامازهاها، چندین روش فنوتیپی در دسترس است. اما هیچ پروتکل استانداردی به وسیله مؤسسه استانداردسازی آزمایشگاه بالینی(CLSI) پیشنهاد نشده، ولی برای تأیید آن در حال حاضر، PCR به عنوان یک روش حساس و قابل اطمینان به کار می‌رود(۲۴ و ۲۳).

در مطالعه حاضر میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، سفپیم، آمیکاسین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، کوتریموکسازول، مروپنم، افلوکساسین برای باکتری *اشریشیاکلی* مورد مطالعه به ترتیب؛۶۰، ۶۶/۷، ۲۲/۲، ۶۲/۲، ۵۵/۶، ۷۷/۸، ۳۱/۱، ۴۰ درصد و برای باکتری *کلبسیلاپنومونیه* به ترتیب؛ ۴۸، ۷۲/۶، ۳۷/۱، ۷۱، ۶۲/۹، ۳۳/۹، ۵۱/۶ و ۳۶ درصد بود. با توجه به نتایج به دست آمده بیشترین میزان مقاومت در سویه‌های *اشریشیاکلی* مربوط به آنتی بیوتیک کوتریموکسازول و در سویه‌های *کلبسیلاپنومونیه* مربوط به سفپیم بود.

در مطالعه بهادری و همکاران، مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از ادرار و مدفوع به ۶ نوع آنتی‌بیوتیک شامل؛ جنتامایسین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، تریمتوپریم ـ سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین و نیتروفورانتوئین بررسی شد و نتایج نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تریمتوپریم ـ سولفامتوکسازول و جنتامایسین

بـــود(۲۵). اربـــاب ســـلیمانی و همکـــاران مقاومـــت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* مرتبط با عفونـت ادراری را نســبت بـــه ۶ آنتی‌بیوتیـــک آمپی‌ســـیلین، کوتریموکســـازول، سیپروفلوکساســـین، جنتامایســـین، نیتروفورانتوئین و آمیکاسین بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد بیشترین مقاومت آنتـی بیـوتیکی نسـبت بـه آمپی‌سیلین با ۷۲ درصد بود(۲۶).

در مطالعه حاضر جهت غربـالگری سـویه‌های مولـد متالوبتالاکتامـاز، از روش دیسـک ترکیبـی بـا استفاده از EDTA_*IMP* انجام شد. با بررسی‌های انجـام شده مشـخص گردیـد کـه ۱۵/۵ درصـد از سـویه‌های *اشریشـــیاکلی* و۱۴/۵ درصـــد از ســـویه‌های *کلبسیلاپنومونیه* تولید کننده این آنزیم بودند. دانگونیکو و همکـــاران بـــا روش دیســـک ترکیبـــی فعالیـــت متالوبتالاکتامـازی انتروباکتریاسـه‌های جـدا شـده از آزمایشـگاه سـلامت کنگـو را ۱۶/۶ درصـد گـزارش کردند(۲۷). پانچال و همکـاران بـا مقایسـه روش‌هـای فنوتیپی برای تشخیص باکتری‌هـای گـرم منفـی دارای متالوبتالاکتاماز پژوهش‌هـایی انجـام دادنـد و بـه ایـن نتیجـه رسـیدند کـه بـا اسـتفاده از روش دیسـک ترکیبـــی(CD) میـــزان تولیـــد متالوبتالاکتامـــاز در *اشریشـــیاکلی* ۲۵ درصـــد، *کلبســـیلا* ۱۸/۷۵ درصـــد، *سودوموناس* ۴۶ درصـد، *اسـینتوباکتر بومـانی*۳۳/۳۳ درصـد بـود. هم‌چنـین آنهـا بـا روش سینرژیسـم دو دیسـک(DDST) نیـز میـزان متالوبتالاکتامـاز را بـرای باکتری‌های *اشریشیاکلی* ۶۳/۳۳درصد، *کلبسیلا* ۵۳/۳۳ درصـــــد، *ســـــودوموناس* ۷۰ درصـــــد و *اسینتوباکتربومانی*۵۶/۶۷ درصد به دست آوردند(۲۸). گروور و همکاران، بر روی باکتری‌هـای *اشریشـیاکلی* تولید کننده کارباپنمازها و متالوبتالاکتامازها جدا شده از بیماران بستری در یکی از بیمارستان‌های دهلی نـو پژوهش‌هـایی انجـام دادنـد. آنهـا بـا روش دیسـک دیفیـوژن، مقاومـت نسـبت بـه آنتی‌بیوتیک‌هـای مروپنم(۱۰درصد) و ایمی پنم(۱۰درصد) را بـه دسـت آوردند. سپس بـا اسـتفاده از روش DDST سـویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز را ۳ درصد تشخیص دادنـد(۲۹). چاوهـــان بـــرای تشـــخیص *کلبســـیلاپنومونیه* و *اشریشیاکلی* تولید کننده کارباپنماز و متالوبتالاکتامـاز از تست‌های فنوتیپی متفاوت اسـتفاده کردنـد. در ایـن مطالعه با بررسی به روش دیسک ترکیبـی، سـویه‌های *اشریشیاکلی* مولـد متالوبتالاکتامـاز، ۵۸/۴۴ درصـد و سویه‌های *کلبسـیلا پنومونیـه* مولـد ایـن آنـزیم ۵۲/۹۴ درصـد گـزارش شـدند(۳۰). در مطالعـه کلانتـر و همکـاران از میـان ۳۸ سـویه *کلبسـیلاپنومونیه*، ۱۶۹ ســـویه *اشریشـــیاکلی* و ۶۹ ســـویه *ســـودوموناس آئروژینوزا*، فقط ۲ سویه از باکتری *کلبسیلاپنومونیه* و یک سویه *سودوموناس آئروژینوزا* بـا روش فنـوتیپی تولید کننده آنزیم متالوبتالاکتاماز شناسایی شـدند. در ایـن مطالعـه آنـزیم متالوبتالاکتامـاز در هـیچ یـک از سـویه‌های *اشریشـیاکلی* مشـاهده نشـد(۳۱). مقایسـه پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد میـزان مقاومـت متالوبتالاکتامازی در کشورهای مختلف بسیار متفاوت

است، از آنجایی که این ژن‌ها به راحتی در بین باکتری‌ها قابل انتقال می‌باشند، فراوانی بالای مقاومت متالوبتالاکتامازی نشان‌دهنده سهولت انتشار ژن در بین باکتری در مراکز درمانی با آلودگی بالاتر مشاهده می‌گردد.

در مطالعه کلهاپور با روش‌های DDST میزان متالوبتالاکتاماز و KPC باسیل‌های گرم منفی جدا شده از ۵۰ بیمار بستری در بیمارستان بررسی شد، در روش DDST میزان تولید آنزیم‌هایKPC، ۷۸/۱۸ درصد و متالوبتالاکتاماز، ۱/۸۱ درصد مشاهده شد(۳۲). در این مطالعه برای بررسی فعالیت متالوبتالاکتامازی از روش دیسک ترکیبی استفاده شد، ولی در مطالعه کلهاپور از روش سینرژیسم دو دیسک استفاده شد که روش انجام آزمایش با یکدیگر متفاوت است.

در مطالعه حاضر ۸۸/۹ درصد از سویه‌های *اشریشیاکلی* مورد بررسی حامل ژن *SPM*، ۴۰ درصد حامل ژن *VIM*، ۶۶/۷ درصد حامل ژن *SIM*، ۱۵/۶ درصد حامل ژن *IMP* بودند. هم‌چنین این مقادیر برای سویه‌های *کلبسیلا* پنومونیه برای ژن‌های *SPM*، *VIM*، *SIM*، *IMP* و *GIM* به ترتیب ۵۴/۸، ۴۱/۹، ۵۸/۱، ۳/۲ و ۸/۱ درصد به دست آمد.

در مطالعه لی و همکاران، سویه‌های باکتری گرم منفی مقاوم به ایمی پنم از نمونه‌های بیمارستانی در کشور تایوان از نظر ژن‌های bla_{IMP}، bla_{SPM}، bla_{VIM}، bla_{SIM} مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص شد که ژن‌های $bla_{VIM2\text{-}3\text{-}11}$ با ۳۸درصد و ژن bla_{IMP} با ۱۲درصد دارای بیشترین فراوانی بودند. هم‌چنین ژن‌های bla_{SPM} و bla_{SIM} در هیچ یک از سویه‌های مورد بررسی مشاهده نشد. در این مطالعه ۴۷/۳ درصد سویه‌ها، مولد متالوبتالاکتاماز گزارش شدند(۳۳). یونگ و همکاران، یک ژن جدید با نام *blaNDM* شناسایی کردند که در ۱۴ سویه *کلبسیلاپنومونیه* باعث ایجاد متالوبتالاکتاماز می‌شد. سویه جدا شده از بیمار که در این مطالعه گزارش شده است، فاقد سایر ژن‌های متالوبتالاکتاماز بود. این ژن جدید با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک شناسایی شد(۳۴). در مطالعه جیاکوپی و همکاران فراوانی ژن *VIM*-1 به عنوان یک ژن تولید کننده متالوبتالاکتاماز در سویه‌های *کلبسیلاپنومونیه* در نمونه‌های بیمارستانی در کشور یونان مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه هفتاد جدایه از سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* بررسی شدند و همه آنها(۱۰۰ درصد) واجد ژن *VIM*-1 بودند(۳۵). در مطالعه پیرانو و همکاران در سال ۲۰۱۴، بر روی ۴۰۷ سویه *اشریشیا کلی*، مشخص شد تنها ۱۱۶ سویه حامل ژن‌های *VIM*، *NDM* و *IMP* بودند که از این میان ۴۴ سویه حامل ژن *NDM*، ۳۸ سویه حامل ژن *VIM* و ۳۴ سویه حامل ژن *IMP* گزارش شدند(۳۶). در مطالعه آقایی و همکاران تعداد ۶۹ جدایه دارای ژن‌های*IMP*، *VIM*، *NDM*، *OXA*-48 و *KPC* بودند. فراوان‌ترین ژن جداشده، *VIM* با ۶۶/۶۶ درصد و کمترین آن *KPC* و *NDM* با ۲۴/۷ درصد گزارش شد.

یک جدایه نیز حاوی تمامی ژن‌های *IMP*، *VIM*، *NDM*، *OXA-48* و *KPC* بود(۳۷). جمال و همکاران در کشور کویت نشان دادند ۷۸ درصد سویه‌های مورد بررسی حامل ژن *VIM*هستند(۳۸). در پژوهش‌های جین و همکاران نیز متالوبتالاکتامازهای *VIM* و *IMP* با فراوانی بالایی در آسیا به خصوص منطقه خاورمیانه جداسازی و گزارش شدند(۳۹). رنجبرنیا و همکاران در مطالعه‌ای بر روی عفونت‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به متالوبتالاکتامازها در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه، میزان فراوانی *blaVIM-1* را حدود ۳۰ درصد گزارش کردند(۴۰). دیاکوز و همکاران سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مولد *VIM* را از ۳۷ درصد بیماران با سابقه مصرف بیش از سه کلاس مختلف آنتی‌بیوتیکی جدا کردند که نشان می‌داد ضرورت تبیین یک دستورالعمل مشخص برای مصرف و تجویز آنتی‌بیوتیک برای بیماران و استراتژی جهت کنترل انتشار سویه‌های مقاوم به دارو در بین بیماران ضروری است(۴۱).

تفاوت نتایج حاصل از مقالات فوق‌الذکر به زمان، مکان، سویه‌های مورد بررسی و طرز انجام آزمایش مربوط است. حتی ممکن است به علت نوع آنتی‌بیوتیک‌های رایج و مصرفی در جامعه، این نتایج متفاوت در زمان‌های مختلف به دست آید. سویه‌های مورد بررسی در این مقاله فقط مربوط به عفونت ادراری می‌شدند، در حالی که ممکن است در مقاله‌های دیگر انواع مختلفی از نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفته باشند.

در این مطالعه وجود ژن‌ها در باکتری‌ها به روش PCR انجام شد که نشان دهنده بیان ژن‌ها نمی‌باشد، لذا پیشنهاد می‌گردد برای اطمینان، بیان ژن‌ها به روش real time PCR بررسی گردد و در صورت عدم تطابق نتایج روش های فنوتیپی و مولکولی، تلاش‌هایی جهت ابداع بررسی فنوتیپی قابل اطمینان، آسان و ارزان صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش معمول دیسک دیفیوژن نمی‌تواند مقاومت کارباپنمازی و متالوبتالاکتامازی را مشخص نماید. از این رو در این تحقیق از روش دیسک ترکیبی جهت تعیین متالوبتالاکتاماز در باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلاپنومونیه* استفاده گردید. در این تحقیق با روش PCR میزان فراوانی ژن‌ها مختلف کد کننده آنزیم متالوبتالاکتاماز تعیین شد، که بعضی از ژن‌ها مانند *SPM*، *VIM* در هر دو باکتری و *SIM* در کلبسیلا پنومونیه فراوانی بالایی را نشان دادند. نتایج مولکولی با فنوتیپی هم‌خوانی ندارد این مسئله بیانگر این مطلب است که ژن‌های مولد آنزیم‌ها در باکتری‌ها وجود دارند و در مقادیر بالایی بیان نمی‌گردند. این احتمال نیز وجود دارد که این ژن‌ها بیان می‌گردند، اما با روش‌های فنوتیپی معمول قابل بررسی نیستند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بر گرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی با کد اخلاق IR.IAU.VARAMIN.REC.1397.024 از دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین می‌باشد، که با حمایت مالی و معنوی این دانشگاه انجام شد. بدین وسیله نویسندگان از همکاری صمیمانه امید حسینی، کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه شهید بهشتی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1.Fazeli H, Hoseini M, Mohammadi P. Frequency and antibiotic susceptibility of ESBL-producing *Escherichia coli* in clinical samples isolated from Alzahra Hospital in Esfehan, Iran. Sharkord J Med Sci 2008; 10: 58-64.

2.Sastry AS, Bhat S. Essentials of medical microbiology: Jaypee Brothers Medical Publishers Pvt. 3rd ed. Limited: Third edition,New Delhi – London; 2018: 61-4.

3.Rodriguez-Avial C, Rodriguez-Avial I, Hernandez E, Picazo JJ. Increasing prevalence of fosfomycin resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* urinary isolates (2005-2009-2011). Revista espanola de quimioterapia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia 2013; 26(1): 43.

4.Szilágyi E, Füzi M, Damjanova I, Böröcz K, Szőnyi K, Tóth A, et al. Investigation of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreaks in Hungary between 2005 and 2008. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2010; 57(1): 43-53.

5.Bora A, Sanjana R, Kumar Jha B, Mahaseth SN, Pokharel K. Incidence of metallo-beta-lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli* and Klebsiella pneumoniae in central Nepal. BMC Research Notes 2014; 7: 557.

6.Sedighi M, Hasanzadeh A, Safiri S, Syedi N, Mostafaei S, Faghri J. Detection of blaSPM-1 Metallo-β-Lactamase Gene in Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in Isfahan Hospitals. Journal of Archives in Military Medicine 2015; 23(4): 57.

7.Huang YT, Chang SC, Lauderdale TL, Yang AJ, Wang JT. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-β-lactamase genes in Taiwan. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2007; 59(2): 211-6.

8.Pitout JD, Gregson DB, Poirel L ,McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-β-lactamases in a large centralized laboratory. Journal of Clinical Microbiology 2005; 43(7): 3129-35.

9.Marchiaro P, Ballerini V, Spalding T, Cera G, Mussi MA, Moran-Barrio J, et al. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2008; 62(2): 336-44.

10.Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM, Santucci P, Meunier C, De Pauw E, et al. Biochemical Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 Metallo-β-Lactamase IMP-1 Produced by Escherichia coli. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1999; 43(4): 902-6.

11.Hall BG, Salipante SJ, Barlow M. The metallo-β-lactamases fall into two distinct phylogenetic groups. Journal of Molecular Evolution 2003; 57(3): 249-54.

12.Strateva T ,Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa–a* phenomenon of bacterial resistance. Journal of Medical Mmicrobiology 2009; 58(9): 1133-48.

13.Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, et al. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-β-lactamase-producing pseudomonas aeruginosa. Clinical Infectious Diseases 2003; 37(1): 26-32.

14.Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, et al. blaVIM-2 cassette-containing novel integrons in metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and Pseudomonas putida isolates disseminated in a Korean hospital. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002; 46(4): 1053-8.

15.Vaez H, Khademi F, Salehi-Abargouei A, Sahebkar A. Metallo-beta-Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Iran: a systematic review and meta-analysis. Infez Med 2018; 26(3): 216-25.

16.Bahramian A, Khoshnood S, Hashemi N, Moradi M, Karimi-Yazdi MM, Jalallou N, et al. Identification of metallo-β-lactamases and AmpC production among *Escherichia coli* strains isolated from hemodialysis patients with urinary tract infection. Molecular Biology Reports 2021; 48 (12): 7883–92.

17.Massik A, Hibaoui1 L, Moussa B, Yahyaoui1 G, Oumokhta B, Mahmoud M. First report of SPM metallo-β-lactamases producing Acinetobacter baumannii isolates in Morocco. Iranian Journal of Microbiology 2022; 14(4): 438-44.

18.Adwan GH, Bourinee H, Othman S. Prevalence of metallo-β-lactamases producing *escherich-ia coli* isolated from north of palestine. Journal of Microbiology and Antimicrobial Agents 2016; 2(1): 9-15.

19.Rodrigues ACS, Chang MR, Nóbrega GD, Rodrigues MS, Carvalho NCP, Gomes BG, et al. Metallo-β-lactamase and genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units in Campo Grande, MS, Brazil. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2011; 15(3): 195-9.

20.Adwani G, Bourinee H, Oth-Man S. Prevalence of metallo-β-lactamases producing *Escherichia coli* isolated from North of Palestine. Journal of Microbiology and Antimicrobial Agents 2016; 2(1): 9-15.

21.Cheng X, Wang P, Wang Y, Zhang H, Tao C, Yang W, et al. Identification and distribution of the clinical isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-β-lactamase and/or class 1 integron genes. Journal of Huazhong University of Science and Technology 2008; 28(3): 235-8.

22.BaharMA, Jamali S, Samadikuchaksaraei A. Imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa strains carry metallo-β-lactamase gene blaVIM in a level I Iranian burn hospital. Burns 2010; 36(6): 826-30.

23.Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. Applied and Environmental Microbiology 1994; 60(10): 3739-45.

24.De Vos D, Lim A, Pirnay JP, Struelens M, Vandenvelde C, Duinslaeger L, et al. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, oprI and oprL. Journal of Clinical Microbiology 1997; 35(6): 1295-9.

25.Bahadori M, Motamedifar M, Alinejad M, Nazari Z. Comparison of antibiotic resistance and frequency of virulence genes in urinary and fecal escherichia coli in patients with urinary tract infection. Armaghane Danesh 2018; 23(3): 378-89.

26.Arbab Soleimani N, Amini Z, Tajbakhsh E. The study of attachment factor and biofilm formation of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patient with urinary tract infection of Semnan Province. Pajoohande 2014; 18(6): 332-6.

27.Dangui Nieko NPM, Morabandza CJ, Kaya-Ongoto MD, Kinavouidi DJK, Judel Mikia H, Kangoula-Dia-Kikouidi-Kia-Louzala F, Niama FR. Phenotypic and genotypic characterization of metallo-beta-lactamase and extended-spectrum beta-lactamase among enterobacteria isolated at national public health laboratory of brazzaville. Advances in Microbiology 2022; 12(6): 363-77.

28.Panchal CA, Oza SS, Mehta SJ. Comparison of four phenotypic methodsfor detection of metallo-β-lactamase-producing Gram-negative bacteria in rural teaching hospital. Journal of Laboratory Physicians 2017; 9(2): 81.

29.Grover SS, Doda A, Gupta N, Gandhoke I, Batra J, Hans C, et al. New delhi metallo-β-lactamase-type carbapenemases producing escherichia coli isolates from hospitalized patients: a pilot study. The Indian Journal of Medical Research 2017; 146(1): 105.

30.Chauhan K, Pandey A, Asthana AK, Madan M. Evaluation of phenotypic tests for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase and metallo-beta-lactamase in clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella species. Indian Journal of Pathology and Microbiology 2015; 58(1): 31.

31.Kalantar D, Mansori S, Razavi M. Emergence of imipenem resistance and presence of metallo--lactamases enzymes in multi drug resistant gram-negative bacilli isolated from clinical samples in Kerman, 2007-2008. Journal of Kerman University of Medical Sciences 2010; 17(3): 208-14.

32.Kolhapure RM, Kumar A, Rajkumar H. Coexpression of ESBL, Amp C and MBL in gram negative bacilli. Int J Res Med Sci 2015; 3(10): 2698-703.

33.Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Chen YH. Molecular characterisation of the metallo-β-lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. International Journal of Antimicrobial Agents 2008; 32(6): 475-80.

34.Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-β-lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009;53(12):5046-54.

35.Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, Vlahaki A, Miriagou V, Kontou S, et al. VIM-1 metallo-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41(8): 3893-6.

36.Peirano G, Bradford PA, Kazmierczak KM, Badal RE, Hackel M, Hoban DJ, et al. Global incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* ST131. Emerging Infectious Diseases 2014; 20(11): 1928.

37.Aghaei SS, Keykha M, Karami M, Rahdar HA, Javadi A, Takei E, et al. Evaluation and identification of carbapenem resistant *klebsiella pneumoniae* isolated from hospitalized patients in qom city (Iran). Qom Univ Med Sci J 2019; 13(4): 39-47.

38.Jamal W, Rotimi VO, Albert MJ, Khodakhast F, Nordmann P, Poirel L. High prevalence of VIM-4 and NDM-1 metallo-β-lactamase among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Journal of Medical Microbiology 2013; 62(8): 1239-44.

39.Jean SS, Hsueh PR. High burden of antimicrobial resistance in Asia. International Journal of Antimicrobial Agents 2011; 37(4): 291-5.

40.Rajabnia R, Asgharpour F, Shahandashti EF, Moulana Z. Nosocomial emerging of (VIM1) carbapenemase-producingisolates of *Klebsiella pneumoniae* in North of Iran. Iranian Journal of Microbiology 2015; 7(2): 88.

41.Daikos GL, Vryonis E, Psichogiou M, Tzouvelekis LS, Liatis S, Petrikkos P, et al. Risk factors for bloodstream infection with *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1 metallo-β-lactamase. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2010; 65(4): 784-8.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Phenotypic and Genotypic Investigation of Metallobetallactamase Resistance in Clinical Isolates of *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae*

Miri H[1], Nourbakhsh F[1*], Mahdavi Ortakand M[2]

[1]Department of Microbiology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran, [2]Department of Biology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

Received: 27 Feb 2022 Accepted: 17 Des 2022

Abstract:

Background & aim: The use of broad-spectrum cephalosporins in the treatment of infections has led to the emergence of a new class of beta-lactamases called metallobetalactamase, these enzymes belong to Ambler's class B beta-lactamases. Group A and B metallobetalactamases in Enterobacteriaceae cause problems in treatment. The present study was conducted with the aim of phenotypic investigation of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* metallobetalactamase producing strains, as well as molecular investigation of SPM, VIM, SIM, IMP and GIM genes.

Methods: The present descriptive-quantitative study was conducted on 185 patients hospitalized in the special care units of Milad Hospital in Tehran from March to May 2018-2019, and 45 strains of *Escherichia coli* and 62 strains of *Klebsiella pneumoniae* were selected. In order to check the antibiotic resistance of the strains, diffusion test in agar was used and also to check the phenotypic of the metallobetalactamase producing strains, the combined disc method was used. Molecular investigation of metallobetalactamase producing genes was done by PCR method. The collected data were analyzed using Fisher's test.

Results: In the present study, the highest antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains was observed to cotrimoxazole and cefepime antibiotics, respectively. 14.5% of Klebsiella pneumoniae strains and 15.5% of *Escherichia coli* strains produced metallobetalactamase enzyme in the phenotypic method. Also, 88.9% of the studied *Escherichia coli* strains carried the SPM gene, 40% carried the VIM gene, 66.7% carried the SIM gene, and 15.6% carried the IMP gene. SPM, VIM, SIM, IMP and GIM genes were found to be 54.8, 41.9, 58.1, 3.2 and 8.1% in *Klebsiella pneumoniae* strains, respectively.

Conclusion: In the present study, there was a high percentage of genes producing metallobetalactamase enzyme in bacteria, while 14.5% of *Klebsiella pneumoniae* strains and 15.5% of Escherichia coli strains were producing metallobetalactamase enzyme in the phenotypic method. that genes producing enzymes exist in bacteria and are not expressed in high amounts. There waS also the possibility that these genes were expressed, but could not be checked with the usual phenotypic methods, so efforts should be made to find reliable, cheap and easy phenotypic methods for phenotypic examination.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, Metallobetallactamase resistance, Combined disc, SPM, VIM, SIM, IMP and GIM genes, Polymerase chain reaction (PCR)

***Corresponding author: Nourbakhsh F,** Department of Microbiology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

Email: niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

Please cite this article as follows: Miri H, Nourbakhsh F, Mahdavi Ortakand M. Phenotypic and Genotypic Investigation of Metallobetallactamase Resistance in Clinical Isolates of *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae*. Armaghane-danesh 2022; 27(6): 798- 816.