● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ودوم، شمارهٔ ۶، ص ۶۳۸-۶۲۹، ۱۳۹۴

مقالهٔ پژوهشی

بررسی فراوانی ژن‌های کارباپنماز در ایزوله‌های سیتروباکتر فروندی و سیتروباکتر کوسری جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان امام رضای (ع) کرمانشاه

علیشا اکیا[۱]، سمیه جعفری[۲*]، کمال احمدی[۳]، اعظم الهی[۳]

خلاصه

مقدمه: مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به مقاومت میکروارگانیسم‌های خانواده انتروباکتریاسه به آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص نسبت به کارباپنم‌ها شده است. هدف از انجام مطالعه حاضر، شناسایی ژن‌های کارباپنماز در ایزوله‌های بالینی سیتروباکتر فروندی و سیتروباکتر کوسری بود.

روش: ۱۰۰ ایزوله سیتروباکتر با استفاده از روش‌های میکروب‌شناسی، تست‌های افتراقی و کیت API-E20 از نمونه‌های مختلف بیماران بیمارستان امام رضای (ع) کرمانشاه جدا گردید. بعد از انجام آنتی‌بیوگرام با دیسک، ایزوله‌های مقاوم به کارباپنم‌ها با استفاده از آزمون MHT (*Modified Hodge test*) جهت وجودآنزیم‌های کارباپنماز غربالگری شد. سپس ژن‌های کارباپنماز کد کننده VIM (Verona integrin-encoded metallo-beta-lactamase)، KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase)، IMP (Imipenemase) و NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase-1) به روش PCR (Polymerase chain reaction) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۱۰۰ ایزوله، ۱۱ مورد به کارباپنم‌ها مقاوم بود. در غربالگری فنوتیپی، ۲ جدایه کارباپنماز مثبت شد. بررسی PCR بر روی ایزوله‌های مقاوم به کارباپنم‌ها نشان داد که ۵ مورد ژن VIM [۳ مورد (۳/۹ درصد) سیتروباکتر فروندی و ۲ مورد (۱۵/۴ درصد) سیتروباکتر کوسری] داشتند، اما ژن‌های blaKPC، blaIMP و blaNDM در ایزوله‌ها یافت نشد. بیشترین و کمترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب به مروپنم (۹۳ درصد) و سفازولین (۱ درصد) اختصاص داشت.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که شیوع ژن‌های کارباپنماز در ایزوله‌های سیتروباکتر فروندی و کوسری در کرمانشاه پایین است، اما با این حال، ژن VIM در این دو گونه با احتمال شیوع بیشتری یافت می‌شود. نتیجه به دست آمده ممکن است بیانگر آن باشد که این ژن‌ها هنوز شیوع بالایی در این منطقه ندارند، اما ممکن است ژن‌های مقاوم دیگری نسبت به کارباپنم‌ها وجود داشته باشند که انجام تحقیقات بیشتر، ضروری است. نتایج نشان داد که کارباپنم‌ها هنوز داروهای مؤثری بر ضد گونه‌های سیتروباکتر هستند.

واژه‌های کلیدی: کارباپنمازها، سیتروباکتر فروندی، سیتروباکتر کوسری

۱- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، بیمارستان امام رضا، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** bartar2004@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۹/۱۶ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۳/۱۲/۱۶ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۴/۱/۲۶

مقدمه

باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه معمول‌ترین پاتوژن‌های گرم منفی عامل عفونت‌های بیمارستانی هستند (۱). گونه‌های مختلف سیتروباکتر درصد قابل توجهی از کل عفونت‌های ناشی از انتروباکتریاسه‌ها تشکیل می‌دهند؛ به طوری که در مطالعات مختلف انجام شده در کشورهای آسیایی و اروپایی، میزان این عفونت‌ها ۳ تا ۸ درصد گزارش شده است. در این میان، بیشترین میزان عفونت‌ها به وسیله گونه‌های سیتروباکتر فروندی (Citrobacter freundii یا C-freundii) و سیتروباکتر کوسری (Citrobacter koseri یا C-koseri) ایجاد شده است (۴-۲).

سیتروباکتر مانند دیگر انتروباکتریاسه‌ها می‌تواند باعث بروز طیف وسیعی از عفونت در افراد شود که از آن جمله می‌توان به عفونت‌های دستگاه ادراری، تنفسی، عفونت زخم و عفونت استخوان اشاره کرد. همچنین سیتروباکتر به عنوان عامل ایجاد کننده ۲ درصد از کل عفونت‌های منتقل شونده از بیمارستان گزارش شده است (۵). آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام جهت کنترل بیشتر عفونت‌های ناشی از انتروباکتریاسه به کار برده می‌شود، اما استفاده از این داروها با افزایش وجود بتالاکتامازها محدود شده است. برای درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم به ترکیبات بتالاکتام، از کارباپنم‌ها که نسبت به اثر بتالاکتامازها مقاوم‌تر هستند، استفاده می‌گردد (۶). در سال‌های اخیر مقاومت به کارباپنم‌ها به ویژه در سویه‌های انتروباکتریاسه که عامل عفونت‌های جدی هستند، توجه دانشمندان و جامعه پزشکی را به خود جلب کرده است (۷).

کارباپنمازها آنزیم‌هایی هستند که کارباپنم‌ها و در برخی مواقع بتالاکتام‌ها را غیر فعال می‌کنند. این آنزیم‌ها متنوع‌ترین خانواده بتالاکتامازها می‌باشند که با دارا بودن طیف وسیعی در بین سایر آنزیم‌های هیدرولیز کننده بتالاکتام، بی‌رقیب هستند. کارباپنمازها در گونه‌های انتروباکتریاسه از جمله کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر یافت می‌شوند و بیشتر ژن‌های کد کننده آن‌ها به وسیله پلاسمیدها انتقال می‌یابد (۸).

سه خانواده اصلی سرین کارباپنمازهای کلاس A شامل آنزیم‌های NMC/IMI (Non-metallocarbapenemase/Imipenemase)، SME (Serratia marcescens enzyme) و KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase) می‌باشد (۹). کارباپنمازهای سرین شامل زیرگروه‌های مختلفی است و ژن‌های کنترل کننده تولید آن‌ها می‌توانند روی کروموزوم یا پلاسمید باکتری‌ها قرار بگیرند (۹، ۸). بیشترین آنزیم بالینی رایج در میان کارباپنمازهای کلاس A، نوع KPC است (۱۰). کارباپنمازهای کلاس B (Metallo-beta-lactamase) بیشتر شامل آنزیم‌های VIM (Verona integrin-encoded metallo-beta-lactamase)، NDM-1 (New Delhi metallo-beta-lactamase-1) و IMP (فعال روی Imipenem) هستند (۱۰، ۹). بررسی فراوانی این ژن‌ها از نظر پایش گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و شناخت اپیدمیولوژی منطقه‌ای اهمیت دارد. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی ژن‌های کارباپنماز در ایزوله‌های سیتروباکتر فروندی و سیتروباکتر کوسری بود.

روش بررسی

در تحقیق حاضر، ۲۸۸ نمونه بالینی مختلف (از جمله زخم، خون، ادرار، مدفوع و سایر نمونه‌ها) از بیماران بیمارستان امام رضا (ع) شهر کرمانشاه در سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری و پس از بررسی‌های میکروب‌شناسی، ۱۰۰ ایزوله سیتروباکتر جداسازی گردید. جهت تأیید نهایی گونه‌ها از کیت API-20E (BioMérieux) استفاده شد و سپس مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و مطابق جداول CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) تعیین گردید. بر اساس CLSI، حالت مقاوم ایزوله‌ها نسبت به کارباپنم‌ها (ارتاپنم، مروپنم و

ایمی‌پنم) برای شناسایی اولیه و احتمالی وجود ژن‌های کارباپنمازی مورد استفاده قرار گرفت. سپس از آزمون MHT (Modified Hodge test) جهت تشخیص فنوتیپی کارباپنمازها استفاده شد (۱۱).

در روش MHT ابتدا سوسپانسیون حاصل از سوش استاندارد *E.coli* ATCC25922 با غلظت ۰/۵ McFarland و با استفاده از سوآپ در سطح محیط Mueller-Hinton agar به صورت چمنی کشت داده شد و دیسک آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرمی در مرکز محیط قرار گرفت. ایزوله‌های سیتروباکتر مقاوم به کارباپنم‌ها به کمک سوآپ از لبه دیسک ایمی‌پنم در مرکز پلیت تا لبه خارجی پلیت به صورت یک خط مستقیم کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. هاله عدم رشد در ایزوله‌های تولید کننده آنزیم کارباپنماز در اطراف دیسک مرکزی به صورت نمای مضرسی و یا برگ شبدری ظاهر شد، اما در ایزوله‌های منفی تغییری در این هاله به وجود نیامد. تست تأیید نهایی وجود ژن‌های کارباپنماز به کمک پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) و با روش PCR (Polymerase chain reaction) انجام گرفت (۱۲).

در ابتدا کل محتوای ژنومی باکتری با روش Boiling استخراج گردید. برای این منظور، چندین کلنی خالص باکتری در ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد و پس از ۵ دقیقه جوشاندن و خنک شدن، با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی جهت انجام واکنش PCR به لوله‌های اپندورف جدید انتقال داده شد و به عنوان DNA باکتری به کار رفت. در روش PCR از Master Mix (شرکت سیناکلون- ایران) استفاده گردید. در نهایت، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید به وسیله دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در روش PCR (Polymerase chain reaction)

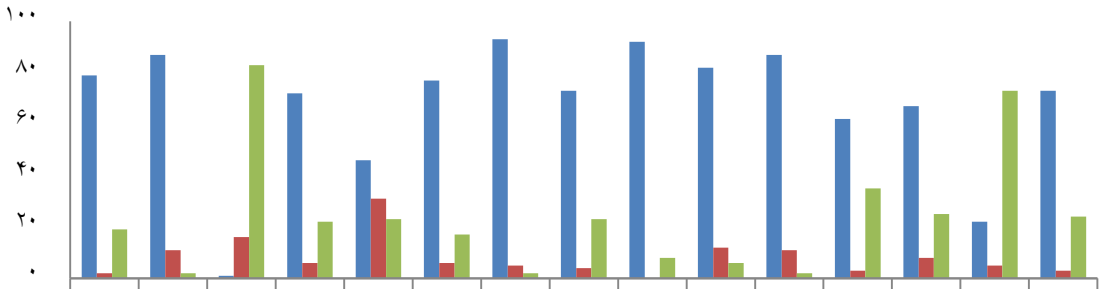
پرایمر	توالی (′3-′5)	ژن	اندازه محصول (جفت باز)
VIM-F, VIM-R	GATGGTGTTTGGTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	blaVIM	۳۹۰
NDM-F, NDM-R	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	blaNDM	۶۲۱
KPC-F, KPC-R	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	blaKPC	۷۹۸
IMP-F, IMP-R	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC GGTTTAAYAAAACAACCACC	blaIMP	۲۳۲

VIM-F: Verona integrin-encoded metallo-beta-lactamase-forward; VIM-R: Verona integrin-encoded metallo-beta-lactamase-reverse; NDM-F: New Delhi metallo-beta-lactamase-1-forward; NDM-R: New Delhi metallo-beta-lactamase-1-reverse; KPC-F: Klebsiella pneumoniae carbapenemase-forward; KPC-R: Klebsiella pneumoniae carbapenemase-reverse; IMP-F: Imipenem-forward; IMP-R: Imipenem-reverse

داده‌های حاصل از نتایج آزمایش‌های مختلف به همراه مشخصات نمونه‌های مورد بررسی در فایل Excel وارد گردید و سپس با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

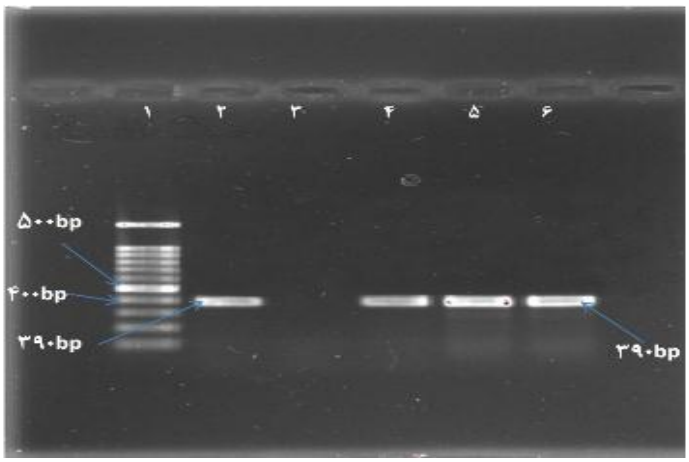
نتایج

نتایج بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است. در مجموع از ۱۰۰ ایزوله سیتروباکتر جدا شده، ۷۷ مورد (۷۷/۰ درصد) به سیتروباکتر فروندی، ۱۳ مورد (۱۳/۰ درصد) به سیتروباکتر کوسری، ۹ مورد (۹/۰ درصد) به سیتروباکتر براکی (C.braakii یا Citrobacter braakii) و ۱ مورد (۱/۰ درصد) هم به سیتروباکتر یانگی (C.youngae یا Citrobacter youngae) تعلق داشت. بیشترین ایزوله‌های جدا شده به ترتیب از نمونه‌های ادرار، خون و مدفوع بود. از میان ایزوله‌ها، در ۵ ایزوله (۵/۵ درصد) ژن blaVIM مشاهده شد که ۳ مورد (۳/۹ درصد) به سیتروباکتر فروندی و ۲ مورد (۱۵/۴ درصد) به سیتروباکتر کوسری جدا شده از نمونه‌های ادرار متعلق داشت (شکل ۲). ژن‌های blaNDM، blaKPC و blaIMP در ایزوله‌ها یافت نشد. در بین ایزوله‌های سیتروباکتر مورد بررسی، کمترین و بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب در سفازولین و مروپنم با ۱ و ۹۳ درصد گزارش شد. تست MHT در ۲ مورد از ایزوله‌ها مثبت بود (شکل ۳).



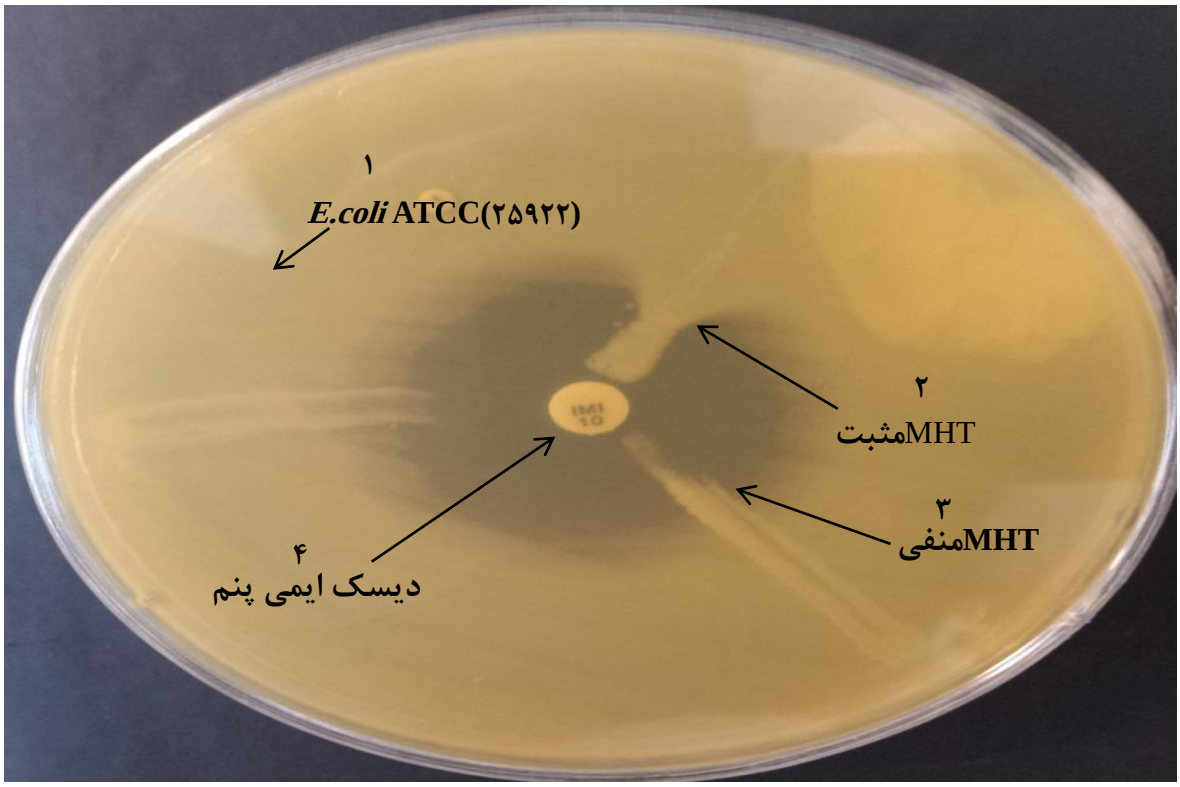
	آزتروئونام	ایمی پنم	سفازولین	سفتازیدیم	سفپودوکسیم	سیپروفلوکساسین	مروپنم	توبراماسین	جنتاماسین	تازوباکتام	ارتاپنم	کوتریموکسازول	سفوتاکسیم	آمپی سیلین	سفتریاکسون
حساس	۷۹	۸۷	۱	۷۲	۴۶	۷۷	۹۳	۷۳	۹۲	۸۲	۸۷	۶۲	۶۷	۲۲	۷۳
نیمه حساس	۲	۱۱	۱۶	۶	۳۱	۶	۵	۴	۰	۱۲	۱۱	۳	۸	۵	۳
مقاوم	۱۹	۲	۸۳	۲۲	۲۳	۱۷	۲	۲۳	۸	۶	۲	۳۵	۲۵	۷۳	۲۴

شکل ۱. فراوانی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۱۰۰ ایزوله سیتروباکتر



شکل ۲. الکتروفورز محصولات PCR (Polymerase chain reaction)

چاهک ۱ = نشانگر (۱۰۰ جفت باز)، چاهک ۲ = کنترل مثبت (۳۹۰ جفت باز)، چاهک ۳ = کنترل منفی و چاهک ۴، ۵ و ۶ = نمونه مثبت (۳۹۰ جفت باز)



شکل ۳. تست MHT (Modified Hodge test) ایزوله‌های سیتروباکتر

بحث

با توجه به این که کارباپنم‌ها، داروهای اصلی درمان عفونت‌های ناشی از گونه‌های سیتروباکتر می‌باشند، مقاومت به آن‌ها ممکن است در آینده مشکلات پیچیده‌ای برای درمان تجربی این عفونت‌ها ایجاد کند. مقاومت‌های دارویی در گونه‌های مختلف سیتروباکترها در بسیاری از نقاط جهان بررسی شده و گزارش‌هایی نیز از این مقاومت‌ها در کشورهای مختلف ذکر شده است (۴). مطالعه حاضر نشان داد که آنتی‌بیوتیک‌های دسته کاربا‌پنم‌ها هنوز مؤثرترین داروها در درمان عفونت‌های ناشی از ایزوله‌های سیتروباکتر می‌باشند. از طرف دیگر، بالاترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب در سفازولین، آمپی‌سیلین و کوتریموکسازول مشاهده شد که از این نظر با نتایج سایر مطالعات (۱۳) همخوانی داشت.

تحقیقات بر روی شیوع ژن‌های مختلف کاربا‌پنماز در بین ایزوله‌های سیتروباکتر در نقاط مختلف جهان انجام شده است. برای نمونه، مطالعه‌ای در اندونزی بر روی ایزوله‌های مختلف انتروباکتریاسه حاصل از نمونه‌های مختلف بالینی نشان داد که ژن NDM-1 در ۱ درصد ایزوله‌های سیتروباکتر فروندی وجود داشت (۱۴). بر اساس تحقیق دیگری در بنگلادش بر روی ۴۰۳ ایزوله انتروباکتریاسه با مقاومت چند دارویی، وجود ژن NDM-1 در ۱۴ ایزوله (۳/۵ درصد) گزارش شد که سیتروباکتر فروندی ۱ درصد از این ایزوله‌ها را به خود اختصاص داد (۱۵).

وجود ژن NDM-1 در بیشتر کشورها گزارش شده است و در اغلب موارد ناشی از عفونت گونه‌های مختلف انتروباکتریاسه می‌باشد. به طور مثال، از مجموع ۲۱۰ ایزوله انتروباکتریاسه حاصل از نمونه‌های مختلف بالینی بیمارستانی در ترکیه، وجود یک مورد (۰/۵ درصد) سیتروباکتر

فروندی NDM-1 مثبت تأیید گردید (۱۶). در مطالعات مولکولی اخیر بر روی ژن‌های مقاومت دارویی در اندونزی (۱۴) و همچنین مطالعات انجام شده در تایوان بر روی نمونه‌های مختلف (ادرار، خون، مدفوع، خلط و سایر مایعات)، وجود ژن NDM-1 در سیتروباکتر فروندی و کلبسیلا پنومونیه به میزان ۳/۵ درصد گزارش شد (۱۷). پژوهش دیگری در کشور کانادا بر روی ایزوله‌های مختلف انتروباکتریاسه‌ها، فراوانی شیوع ژن NDM-1 در سیتروباکتر فروندی را ۱ درصد بیان نمود (۱۸). نتایج حاصل از تحقیق حاضر حاکی از آن بود که ایزوله‌های مورد بررسی فاقد ژن NDM-1 می‌باشند. شاید بتوان گفت این ژن تاکنون در شهر کرمانشاه و بین ایزوله‌های سیتروباکتر گسترش پیدا نکرده است. البته با توجه به این‌که ژن NDM-1 اغلب به وسیله پلاسمید کد می‌شود و پلاسمیدها عناصر قابل انتقالی هستند، این نتیجه پایدار نخواهد ماند و امکان گسترش این ژن در مناطق مختلف وجود دارد.

بر اساس یافته‌های پژوهش انجام گرفته در چین، ژن KPC-2 برای اولین بار از گونه سیتروباکتر فروندی جداسازی شد (۱۹). تحقیقات در مورد بررسی ژن KPC در چین (۱۹) و همچنین، بررسی ۹ نوع از این ژن در نقاط مختلف دنیا، بیان کننده این موضوع می‌باشد که ژن KPC در بیشتر مطالعات در ایزوله‌های سیتروباکتر جدا شده از نمونه‌های ادراری یافت شده است (۲۰). بیشترین تعداد ایزوله‌های سیتروباکتر جدا شده در مطالعه حاضر از نمونه‌های ادراری بود، اما هیچ کدام از آن‌ها دارای ژن KPC نبودند و این موضوع نشان دهنده عدم شیوع این ژن در میان ایزوله‌ها می‌باشد. وجود ژن KPC در نقاط مختلف دنیا از جمله یونان، اسپانیا و چند بیمارستان در نیویورک و نیوجرسی آمریکا با شیوع حدود ۱ تا ۲ درصد گزارش شده است. همچنین، در این مطالعات ژن KPC از گونه‌های مختلف انتروباکتریاسه‌ها شامل اشریشیاکلی، سیتروباکتر و کلبسیلا پنومونیه جداسازی گردید (۲۲-۲۰). تحقیقی در میشیگان آمریکا بر روی گونه‌های مختلف انتروباکتریاسه مشخص کرد که ژن KPC در سیتروباکتر فروندی و کلبسیلا پنومونیه توسط پلاسمیدهای مشابه حمل می‌شود (۲۳).

فراوانی ژن IMP در نقاط مختلف دنیا مورد بررسی قرار گرفته است. طی مطالعه‌ای که بر روی نمونه‌های مختلف بالینی در بیمارستانی در تایلند انجام شد، فراوانی شیوع ژن IMP در سویه سیتروباکتر فروندی ۱ تا ۲ درصد گزارش گردید (۲۴). مطالعه حاضر در مورد بررسی ژن IMP نشان داد که ایزوله‌های مورد بررسی فاقد این ژن می‌باشند. شاید یکی از دلایل عمده این نوع اختلاف در تحقیقات دیگر و مطالعه حاضر، وجود شرایط مختلف جغرافیایی، نوع نمونه مورد بررسی، نوع و میزان آنتی‌بیوتیک مصرفی و تکنیک مورد استفاده باشد. با فرض یکسان بودن این شرایط، مسأله تفاوت در انتشار و انتقال ژن‌ها بین گونه‌های مختلف باکتری‌ها در نقاط مختلف جهان می‌تواند توجیه این اختلاف باشد.

مطالعه‌ای در چین بر روی گونه‌های مختلف انتروباکتریاسه، شیوع ژن VIM را در ایزوله‌های سیتروباکتر حدود ۱ تا ۲ درصد گزارش کرد (۲۵). این ژن در شمار دیگری از گونه‌های انتروباکتریاسه (کلبسیلا پنومونیه، اشریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا) نیز یافت گردید. بررسی شیوع ژن VIM در نقاط مختلف دنیا (آمریکا، فرانسه، اسپانیا و اسرائیل) با فراوانی ۱ تا ۲ درصد گزارش شده است (۲۵). در تحقیقی بر روی نمونه‌های مختلف انتروباکتریاسه به دست آمده از بیمارستان‌های مرکزی کشور کرواسی در ایزوله‌های انتروباکتر کلواکه، کلبسیلا پنومونیه و سیتروباکتر فروندی، فراوانی ژن‌های VIM-1 و NDM-1 به میزان ۱ درصد بیان شد (۲۶). در مطالعه حاضر، ژن VIM شیوع بالاتری داشت و میزان شیوع این ژن در سیتروباکتر کوسری بیشتر از سیتروباکتر فروندی بود؛ البته

چون تعداد کل ایزوله‌های سیتروباکتر کوسری اندک بود، این نتیجه خیلی قابل تعمیم نیست.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد کـه ژن‌هـای کارباپنمـاز blaIMP، blaKPC و blaNDM در ایزولـه‌هـای سـیتروباکتر فروندی و سیتروباکتر کوسری مورد بررسی شهر کرمانشاه، شیوع پایینی دارند و حاکی از آن است که هنوز این ژن‌ها شیوع بالایی در این منطقه پیدا نکرده‌اند، اما ژن VIM در این دو گونه سیتروباکتر دارای شیوع به نسبت بالایی می‌باشـد. ممکن است ژن‌های دیگر مقاوم بـه آنتـی‌بیوتیـک‌هـای کارباپنم در این منطقه وجود داشته باشند که در این زمینه به تحقیقات بیشتری نیاز است. از نظر مقاومت آنتی‌بیـوتیکی، بیشترین و کمتـرین مقاومـت بـه ترتیـب در مـروپنم و سفازولین مشاهده شد که به نظر می‌رسد کارباپنم‌ها هنـوز داروهای مؤثری علیه سیتروباکتر می‌باشند.

سپاسگزاری

بـدین‌وسـیله از مـدیریت و کارکنـان آزمایشـگاه تحقیقـاتی میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علـوم پزشـکی کرمانشـاه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4): 557-84.
2. Jones ME, Avison MB, Damdinsuren E, MacGowan AP, Bennett PM. Heterogeneity at the beta-lactamase structural gene ampC amongst Citrobacter spp. assessed by polymerase chain reaction analysis: potential for typing at a molecular level. *J Med Microbiol* 1994; 41(3): 209-14.
3. Lipsky BA, Hook EW, III, Smith AA, Plorde JJ. Citrobacter infections in humans: experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a review of the literature. *Rev Infect Dis* 1980; 2(5): 746-60.
4. Mohanty S, Singhal R, Sood S, Dhawan B, Kapil A, Das BK. Citrobacter infections in a tertiary care hospital in Northern India. *J Infect* 2007; 54(1): 58-64.
5. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(10): 1791-8.
6. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41(10): 4623-9.
7. Gazin M, Paasch F, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum-beta-lactamase-harboring and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2012; 50(4): 1140-6.
8. Marsik FJ, Nambiar S. Review of carbapenemases and AmpC-beta lactamases. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30(12): 1094-5.

9. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(3): 440-58, table.

10. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(6): 1119-25.

11. Shivaprasad A, Antony B, Shenoy P. Comparative evaluation of four phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase and carbapenemase production in acinetobacter baumannii. *J Clin Diagn Res* 2014; 8(5): DC05-DC08.

12. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70(1): 119-23.

13. Metri BC, Jyothi P, Peerapur BV. Anti-microbial resistance profile of Citrobacter species in a tertiary care hospital of Southern India. *Indian J Med Sci* 2011; 65(10): 429-35.

14. Karuniawati A, Saharman YR, Lestari DC. Detection of carbapenemase encoding genes in Enterobacteriace, Pseudomonas aeruginosa, and Acinetobacter baumanii isolated from patients at Intensive Care Unit Cipto Mangunkusumo Hospital in 2011. *Acta Med Indones* 2013; 45(2): 101-6.

15. Islam MA, Talukdar PK, Hoque A, Huq M, Nabi A, Ahmed D, et al. Emergence of multidrug-resistant NDM-1-producing Gram-negative bacteria in Bangladesh. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(10): 2593-600.

16. Yanik K, Emir D, Eroglu C, Karadag A, Guney AK, Gunaydin M. [Investigation of the presence of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1) by PCR in carbapenem-resistant gram-negative isolates]. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(2): 382-4.

17. Lee CM, Liao CH, Lee WS, Liu YC, Mu JJ, Lee MC, et al. Outbreak of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-2-producing K. pneumoniae sequence type 11 in Taiwan in 2011. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(10): 5016-22.

18. Peirano G, Ahmed-Bentley, Fuller J, Rubin JE, Pitout JDD. Travel-related carbapenemase-producing gram-negative bacteria in Alberta, Canada: the first 3 years. *J Clin Microbiol* 2014; 52(5): 1575-81.

19. Zhang R, Yang L, Cai JC, Zhou HW, Chen GX. High-level carbapenem resistance in a Citrobacter freundii clinical isolate is due to a combination of KPC-2 production and decreased porin expression. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt 3): 332-7.

20. Li G, Wei Q, Wang Y, Du X, Zhao Y, Jiang X. Novel genetic environment of the plasmid-mediated KPC-3 gene detected in Escherichia coli and Citrobacter freundii isolates from China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30(4): 575-80.

21. Bratu S, Brooks S, Burney S, Kochar S, Gupta J, Landman D, et al. Detection and spread of Escherichia coli possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. *Clin Infect Dis* 2007; 44(7): 972-5.

22. Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, et al. Emergence of KPC-possessing Klebsiella pneumoniae in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(7): 3018-20.

23. Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KF, Washer L, Chenoweth C, Perrin J, et al. Detection of the Klebsiella pneumoniae carbapenemase type 2 Carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of Citrobacter freundii and K. oxytoca carrying a common plasmid. *J Clin Microbiol* 2008; 46(6): 2066-9.

24. Rimrang B, Chanawong A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Sribenjalux P, et al. Emergence of NDM-1- and IMP-14a-producing Enterobacteriaceae in Thailand. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(11): 2626-30.

25. Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernandez-Romero S, Hernandez-Molina JM, Perez-Vazquez M, et al. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(12): 6344-7.

26. Zujic AV, Bedenic B, Kocsis E, Mazzariol A, Sardelic S, Barisic M, et al. Diversity of carbapenemases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Croatia--the results of a multicentre study. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(11): O894-O903.

The Frequency of Carbapenemase Genes in Citrobacter Frundii and Citrobacter Koseri Isolated from Clinical Specimens in Imam Reza Hospital, Kermanshah, Iran

Alisha Akya, Ph.D.[1], Somayeh Jafari, B.Sc.[2*], Kamal Ahmadi. B.Sc.[3], Azam Elahi, B.Sc.[3]

1. Associate Professor, Department of Medical Microbiology, Nosocomial Infection Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

2. MSc Student, Department of Microbiology, Imam Reaza Hospital, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

3. MSc Student, Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

* Corresponding author; e-mail: bartar2004@yahoo.com

(Received: 7 Dec. 2014 Accepted: 15 April 2015)

Abstract

Background & Aims: The inappropriate use of antibiotics has led to antibiotic resistance in microorganisms of Enterobacteriaceae family, especially in carbapenems. The aim of this study was to identify the carbapenemase producing Citrobacter frundii and Citrobacter koseri isolated from clinical specimens.

Methods: One hundred Citrobacter isolates from various patient samples in Imam Reza Hospital, Kermanshah, Iran, were identified using the microbiologic differential tests and API-E20 Kit. After antibiotic susceptibility testing with disc, the isolates resisted to carbapenems were screened using MHT (Modified Hodge Test) for the presence of carbapenemases. Then, carbapenemase genes coded Verona integrin-encoded metallo-beta-lactamase (VIM), Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC), Imipenemase (IMP), New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM) were tested using specific primers via polymerase chain reaction (PCR) method.

Results: From 100 isolates, 11 cases were carbapenem resistant. In the phenotypic screening test, 2 isolates were positive. PCR on isolates resistant to carbapenams confirmed VIM gene in 5 isolates: 3 (3.9%) of Citrobacter frundii and 2 (15.4%) of Citrobacter koseri. But the genes of bla_{KPC}, bla_{VIM}, bla_{IMP} and bla_{NDM} were not found in isolates. The highest and lowest antibiotic susceptibility were for meropenem (93%) and cefazolin (1%), respectively.

Conclusion: It seems that the prevalence of carbapenemase genes in Citrobacter kosari and Citrobacter frundii was low in Kermanshah; however, VIM gene in these two species is probably more prevalent. This may suggest that most genes have not been high prevalent in this area yet. But, there may be other genes for resistance to carbapenems in our area which need further investigations. The results indicate that carbapenems are still effective antibiotics against Citrobacter species.

Keywords: Carbapenemases, Citrobacter frundii, Citrobacter koseri

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2015; 22(6): 629-638