

## Molecular Identification of ESBLs Genes (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* and *bla<sub>CTX</sub>*) among Non-fermenting Gram-negative Bacteria Isolated from Hospitalized Patients in Mazandaran Province, Iran

Ghazaleh Elahi<sup>1</sup>,  
 Mohammad Ahanjan<sup>2</sup>,  
 Zahra Rafi Parhizkar<sup>3</sup>,  
 Hamid Reza Goli<sup>4</sup>,  
 Laleh Vahedi Larijani<sup>5</sup>,  
 Fatemeh Bagherzadeh<sup>6</sup>,  
 Mehrdad Gholami<sup>7</sup>

<sup>1</sup> MSc Student in Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> Professor, Antimicrobial Resistance Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> Medical Student, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>4</sup> Assistant Professor, Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>5</sup> Associate Professor, Department of Pathology, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>6</sup> BSc in Laboratory Sciences, Sari Imam Khomeini Hospital, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>7</sup> Assistant Professor, Antimicrobial Resistance Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 8, 2022 ; Accepted August 14, 2022)

### Abstract

**Background and purpose:** Production of beta-lactamase enzymes by bacteria, especially Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) is one of the major problems worldwide. ESBLs are mostly located on bacterial plasmids and it is recognized that SHV, TEM, and CTX-M are prevailing among them. The aim of this study was to determine the ability to produce ESBLs genes based on molecular method among non-fermenting Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*) isolated from hospitalized patients in Mazandaran province, Iran.

**Materials and methods:** In this cross-sectional descriptive study, 81 non-fermenting bacterial isolates were collected. The isolates were tested for antibiotic susceptibility according to CLSI guidelines. Molecular identification of *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, and *bla<sub>CTX-M</sub>* genes was performed using specific primers and polymerase chain reaction (PCR) method.

**Results:** Of 81 non-fermentative bacteria isolated, 49 (60.5%) isolates of *A. baumannii* were detected and 32 (39.5%) isolates were confirmed as *P. aeruginosa*. The prevalence of identified genes in these isolates was as follows: 26% *bla<sub>SHV</sub>*, 19% *bla<sub>TEM</sub>*, and 12% *bla<sub>CTX-M</sub>* in *P. aeruginosa* and 11% *bla<sub>TEM</sub>*, 8% *bla<sub>CTX-M</sub>*, and 4% *bla<sub>SHV</sub>* in *A. baumannii*.

**Conclusion:** ESBL positive strains of *P. aeruginosa* and *A. baumannii* are increasingly found in hospital isolates. Their high ability to pass resistant genes to other clinical strains requires their quick detection in clinical laboratories.

**Keywords:** non fermenter bacteria, antibiotic resistance, ESBL, PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (213): 150-158 (Persian).

**Corresponding Author:** Mehrdad Gholami - Antimicrobial Resistance Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: me.gholami@mazums.ac.ir)

# شناسایی مولکولی بتالاکتامازهای وسیع الطیف $bla_{SHV}$ ، $bla_{TEM}$ و $bla_{CTX}$ در بین باکتری های غیر تخمیری جدا شده از بیماران بستری در استان مازندران

غزاله الهی<sup>1</sup>  
محمد آهنگان<sup>2</sup>  
زهرا رفیع پرهیزکار<sup>3</sup>  
حمیدرضا گلی<sup>4</sup>  
لاله واحدی لاریجانی<sup>5</sup>  
فاطمه باقرزاده<sup>6</sup>  
مهرداد غلامی<sup>7</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** یکی از مکانیسم های مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها تولید آنزیم های بتالاکتاماز توسط باکتری ها است و تولید آن به ویژه نوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) یکی از مشکلات بهداشتی و درمانی در سطح دنیا می باشد. ESBL ها اغلب بر روی پلاسمید قرار دارند و از جمله شایع ترین آن ها می توان به TEM و CTX-M و SHV اشاره نمود. هدف از انجام این مطالعه، تعیین توانایی تولید ESBL براساس روش های مولکولی در بین باکتری های غیر تخمیری (سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر بومانی) جدا شده از بیماران در بیمارستان های آموزشی استان مازندران بود.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه توصیفی مقطعی، از میان نمونه های بالینی جمع آوری شده، تعداد 81 ایزوله باکتریایی غیر تخمیری جداسازی شد. ایزوله ها از نظر حساسیت به آنتی بیوتیک ها مطابق دستورالعمل CLSI بررسی شدند. شناسایی مولکولی ژن های  $bla_{SHV}$ ،  $bla_{TEM}$  و  $bla_{CTX-M}$  با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و تکنیک واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) انجام شد. **یافته ها:** از 81 باکتری غیر تخمیری جدا شده، 49 ایزوله (60/5 درصد) آسینتوباکتر بومانی و 32 ایزوله (39/5 درصد) به عنوان سودوموناس آئروژینوزا تایید شدند. شیوع ژن های شناسایی شده به ترتیب در بین ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا،  $bla_{SHV}$  (26 درصد)،  $bla_{TEM}$  (19 درصد) و  $bla_{CTX-M}$  (12 درصد) و در ایزوله های آسینتوباکتر بومانی  $bla_{TEM}$  (11 درصد)،  $bla_{CTX-M}$  (8 درصد) و  $bla_{SHV}$  (4 درصد) بود.

**استنتاج:** سویه های تولید کننده ESBL در میان سویه های سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیمارستان در حال افزایش است. توانایی بالای این سویه ها در انتقال ژن های مقاومت به سایر سویه ها، اهمیت شناسایی سریع آن ها در آزمایشگاه را نشان می دهد.

**واژه های کلیدی:** باکتری های غیر تخمیری، مقاومت آنتی بیوتیکی، PCR، ESBL

## مقدمه

باکتری های غیر تخمیر کننده گلوکز (Non-fermenter) یکی از دلایل مهم عفونت های بیمارستانی در بیماران دچار سرکوب ایمنی می باشند (1). در مطالعات جهانی باکتری های گرم منفی غیر تخمیر کننده

**مؤلف مسئول:** مهرداد غلامی - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی  
1. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران  
2. استاد، مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران  
3. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران  
4. استادیار، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران  
5. دانشیار، گروه پاتولوژی، مرکز تحقیقات ایمونونیتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران  
6. کارشناس آزمایشگاه، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران  
7. استادیار، مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران  
تاریخ دریافت: 1401/2/18 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/3/1 تاریخ تصویب: 1401/5/23

(NFGNBS) Nonfermenting gram-negative bacilli، 5/11 درصد سویه‌های گرم منفی جدا شده از نمونه‌های کلینیکی را تشکیل می‌دهند. متاسفانه NFGNBS به بیش‌تر داروهای ضد میکروبی تجویزی مقاوم هستند (3،2). یکی از مکانیسم‌های مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشد (4). بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف Extended spectrum betalactamase (ESBL) توسط بسیاری از باکتری‌های گرم منفی تولید می‌شوند و توانایی هیدرولیز کردن سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم و آزترونام را دارند، ولی عملکرد آن‌ها به وسیله کلاولانیک اسید مهار می‌شود. آنزیم‌های ESBL، اغلب توسط ژن‌های موجود در سطح کروموزوم یا پلاسمیدهای باکتری کد می‌شوند و از رایج‌ترین این ژن‌ها می‌توان به *bla<sub>TEM</sub>* و *bla<sub>CTX-M</sub>* و *bla<sub>SHV</sub>* اشاره نمود (5،6). گسترش بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف کلاس A نگرانی بزرگی را در به خطر افتادن سلامت عمومی و خصوصاً بیماران مبتلا به سوختگی ایجاد کرده است (7).

عفونت کنترل نشده در بیماران سوختگی عامل اصلی افزایش عوارض و مرگ و میر است. بیش از 75 درصد مرگ و میرهای ناشی از سوختگی مستقیماً به عفونت مربوط می‌شود و ارگانیسم‌های مقاوم به چند دارو Multidrug resistance (MDR) مرگ و میر را از 42 به 86 درصد افزایش می‌دهند. از طرف دیگر، این عفونت‌ها هزینه‌های مالی بالایی را برای هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی کشورهای مانند ایران به همراه دارند (8،9). با توجه به دلایل ذکر شده و شیوع بالای باکتری‌های گرم منفی غیرتخمیری و خصوصاً توانایی مقاومت آن‌ها نسبت به داروهای رایج در درمان، خصوصاً به دلیل تولید رو به تزاید ESBL، هدف از این مطالعه تشخیص مولکولی ژن‌های بتالاکتامازی *bla<sub>SHV</sub>*، *bla<sub>CTX</sub>* و *bla<sub>TEM</sub>* درین باکتری‌های غیرتخمیری جدا شده از بیماران بستری در استان مازندران بود.

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی

مازندران به شماره IR.MAZUMS.REC.1399.8174 تصویب شد. در این مطالعه توصیفی - مقطعی و طبق فرمول کوکران تعداد 81 ایزوله از باکتری‌های گرم منفی غیرتخمیری از نمونه‌های بالینی مختلف از بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی استان مازندران در سال 1399 جمع‌آوری شدند. برای اطمینان از نوع باکتری مورد نظر، ایزوله‌ها با استفاده از تکنیک‌های میکروب‌شناسی استاندارد تحت بررسی قرار گرفتند (10،11). همچنین تایید نهایی ایزوله‌ها توسط کیت API (Microgen GN-ID) انجام شد. ایزوله‌های تایید شده در محیط TSB (Tryptic Soy Broth) حاوی 30 درصد گلیسرول در دمای 80- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند، تا در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

### تست حساسیت آنتی بیوتیکی

حساسیت آنتی بیوتیکی 81 سویه باکتری گرم منفی جدا شده به روش دیسک دیفیوژن آگار بر روی محیط مولر هیتون آگار با روش کربی بائر انجام شد. جهت انجام این آزمون از دیسک‌های پپراسیلین (100 میکروگرم)، پپراسیلین تازوباکتام (10/100 میکروگرم)، سفتازیدیم (30 میکروگرم)، سفیم (30 میکروگرم)، دوریپنم (10 میکروگرم)، ایمپنم (10 میکروگرم)، جنتامایسین (10 میکروگرم)، توبرامایسین (10 میکروگرم)، آمیکاسین (30 میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (5 میکروگرم)، تهیه شده از شرکت (MAST, England) استفاده شد. نتایج حاصل براساس جدول استاندارد CLSI 2021، Clinical Laboratory Standard Institute تفسیر شدند. از سویه *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (12).

### شناسایی ژنوتیپی ESBL

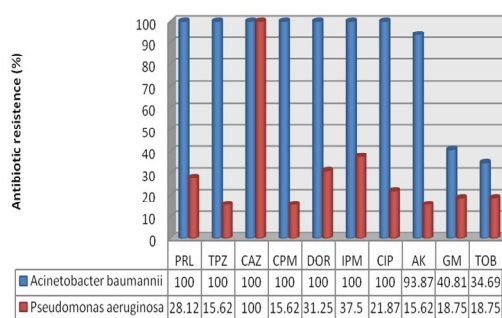
برای شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز از روش PCR استفاده شد. ابتدا DNA نمونه‌ها با استفاده از روش Boiling استخراج شدند (13). ژن‌های

77/77 درصد بود و سایر بخش‌ها شامل اتاق عمل (5 درصد)، اطفال (5 درصد)، داخلی (4 درصد)، اورولوژی (4 درصد)، سوختگی (3 درصد)، اورژانس (1 درصد)، هر کدام درصد ناچیزی را به خود اختصاص دادند. از میان نمونه‌های جمع‌آوری شده از ICU بیش‌ترین تعداد مربوط به آسینتوباکتر بومانی به میزان 45 نمونه (69/8 درصد) مشاهده شد.

جدول شماره 1: فراوانی ایزوله‌های غیر تخمیری جمع‌آوری شده بر اساس نوع نمونه

| نوع نمونه    | خط    | خون   | ادرار | زخم  | گوش  | ترشه | کاتتر | پلور | چشم  |
|--------------|-------|-------|-------|------|------|------|-------|------|------|
| تعداد (درصد) | 40/74 | 22/22 | 13/58 | 9/87 | 4/93 | 3/7  | 2/46  | 1/23 | 1/23 |

نتایج تست آنتی‌بیوگرام نشان داد که در میان 81 سویه باکتری گرم منفی مورد بررسی، بیش‌ترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم با 81 مورد (100 درصد) بود، در حالی که بیش‌ترین حساسیت به ترتیب در برابر آنتی‌بیوتیک‌های توبرامایسین، 51 مورد (62/96 درصد) و جنتامایسین 49 مورد (60/49 درصد) مشاهده شد. هم‌چنین میزان مقاومت ایزوله‌های آسینتوباکتر بومانی به‌طور چشمگیری بیش‌تر از ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا بودند (نمودار شماره 1).



نمودار شماره 1: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر بومانی

PRL, piperacillin; TPZ, piperacillin-tazobactam;  
CAZ, ceftazidime; CPM, cefepime;  
DOR, doripenem; IPM, imipenem;  
CIP, ciprofloxacin; AK, amikacin;  
GM, gentamicin; TOB, tobramycin

بتالاکتاماز وسیع الطیف *bla<sub>SHV</sub>* و *bla<sub>CTX-M</sub>*، *bla<sub>TEM</sub>* به ترتیب با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (F: 5'-ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG-3')، (R: 5'-TTA ATC AGT GAG GCA CCT AT-3')، (F: 5'-GCG ATG GGC AGT ACC AGT AA-3')، (R: 5'-TTA CCC AGC GTC AGA TTC CG-3') و (F: 5'-ATTGTGCTGCTTCTTTACTCGC-3')، (R: 5'-TTT ATG GCG TTA CCT TTG ACC-3') و با استفاده از دستگاه Therma Cycler T100 Bio-Rad شناسایی شدند (14-16). سپس محصولات PCR در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند و در نهایت، ژل از نظر وجود ژن‌های مورد نظر در دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت.

#### آنالیز آماری داده‌ها

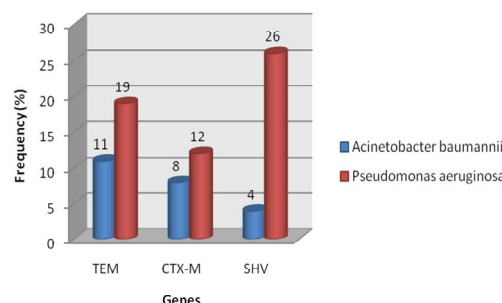
اطلاعات به‌دست آمده به کمک نرم‌افزار SPSS16 مورد تحلیل قرار گرفتند. جهت تحلیل داده‌ها از آمار توصیفی (فراوانی، درصد و میانگین) استفاده شد.

## یافته‌ها و بحث

در این مطالعه توصیفی-مقطعی تعداد 81 باکتری گرم منفی غیر تخمیری از بیماران بستری در بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی مازندران در سال 1399 جدا شد. در این میان تعداد 31 ایزوله از زنان (38/27 درصد) و 50 ایزوله از مردان (61/72 درصد) جدا شدند. بیش‌ترین نمونه جمع‌آوری شده از خلط، 40/74 درصد، سپس خون و ادرار به ترتیب، 22/22 و 13/58 درصد بود و سایر موارد به میزان کم‌تری جداسازی شدند (جدول شماره 1). نتایج حاصل از شناسایی باسیل‌های گرم منفی جدا شده نشان داد بیش‌ترین فراوانی به ترتیب مربوط به آسینتوباکتر بومانی (49 مورد، 60/49 درصد) و سودوموناس آئروژینوزا (32 مورد، 39/5 درصد) بودند. بیش‌ترین نمونه به‌دست آمده از بخش ICU به میزان

بودند. در مطالعات مشابهی در مازندران، شیراز و هند نیز در میان باسیل‌های گرم منفی جدا شده، فراوانی ایزوله‌های آسینتوباکتر بومانی نسبت به ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا بیش تر بود (3، 23، 24). اما وحدانی و همکاران و همچنین حاکمی والا و همکاران، فراوانی سودوموناس آئروژینوزا را گزارش کردند (25، 26). مطالعه‌ای که توسط حاکمی والا و همکاران در تهران بر روی نمونه‌های بخش سوختگی صورت گرفت، میزان مقاومت ایزوله‌های آسینتوباکتر بومانی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمینم، سفنازیدیم، سیپروفلوکساسین و سفپیم به طور مشابه با مطالعه حال حاضر، 100 درصد گزارش شد. اما در مطالعه حاکمی والا میزان مقاومت ایزوله‌های سودوموناس بیش تر بودند (26). همچنین مقاومت سویه‌های آسینتوباکتر بومانی در مطالعه حاضر نسبت به مطالعه‌ای مشابه در همین منطقه افزایش یافته بود (3). دلیل این اختلاف مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند به این علت باشد که ایزوله‌های مورد بررسی در این مطالعه از بخش‌های مختلف بیمارستان جمع‌آوری شده است، اما مقاومت در بخش سوختگی بالاتر است. نتایج حاصل مویید این واقعیت است که در کشور ما به علت استفاده بی‌رویه از داروهای بتالاکتام، متاسفانه فراوانی ایزوله‌های ESBLs در بیماران بستری نسبت به بسیاری از مناطق به خصوص کشورهای توسعه یافته بیش تر است. الگوی مقاومت گونه‌های آسینتوباکتر بومانی مطالعه حاضر با الگوی مقاومت مطالعه اولیا و همکاران (سفنازیدیم 98 درصد و ایمینم 85 درصد) قابل مقایسه است و نتایج ما را تایید می‌کند. این مقاومت‌ها به خاطر هیدرولیز بتالاکتام‌ها توسط بتالاکتامازهای نوع A می‌باشد زیرا همگی این بتالاکتامازها توسط کلاولانیک اسید مهار می‌شوند (27). مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم و همچنین کارباپنم‌ها در سودوموناس آئروژینوزا‌های جدا شده در این مطالعه در مقایسه با نتایج مطالعه Rossolini و Mantengoli در نمونه‌های جدا شده از آمریکای لاتین (سفپیم 67 درصد و ایمینم 76 درصد) و مطالعات داخلی به میزان کم تری می‌باشد (28، 29). اما

ایزوله‌های آسینتوباکتر بومانی در بیش تر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی (پیراسیلین، پیراسیلین تازوباکتام، سفنازیدیم، سفپیم، دوریپنم، ایمینم و سیپروفلوکساسین) مقاومت 100 درصدی نشان دادند. آزمون PCR جهت تشخیص ژن‌های *bla<sub>CTX-M</sub>* و *bla<sub>TEM</sub>* و *bla<sub>SHV</sub>* نشان داد که از مجموع 81 ایزوله گرم منفی جدا شده بیش ترین فراوانی به ترتیب مربوط به ژن *bla<sub>TEM</sub>* (11 مورد، 13/5 درصد)، *bla<sub>SHV</sub>* (10 مورد، 12/34 درصد) و *bla<sub>CTX-M</sub>* (8 مورد، 9/87 درصد) می‌باشد. نتایج آزمون PCR به تفکیک نوع باکتری در نمودار شماره 2 نشان داده شده است.



نمودار شماره 2: توزیع ژن‌های مورد مطالعه در جدایه‌های بالینی

باکتری‌های گرم منفی غیرتخمیری از جمله سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر بومانی نقش عمده‌ای در ایجاد عفونت‌های فرصت طلب و عفونت‌های شدید دارند، به شکلی که درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها به صورت یک مشکل جهانی درآمده است (17-19). مکانیسم‌های مختلفی در ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام نقش دارند که مهم‌ترین آن‌ها تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز بخصوص بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) می‌باشد (20). شناسایی باسیل‌های گرم منفی تولید کننده ESBL، برای موفقیت در درمان، و بالا رفتن خدمات کلینیکی و محدود کردن انتشار این ارگانیزم‌های مقاوم به چند دارو لازم و ضروری به نظر می‌رسد (21، 22). در مطالعه ما شایع‌ترین ایزوله‌ها شامل آسینتوباکتر بومانی (60/49 درصد) و سودوموناس آئروژینوزا (39/5 درصد)

11، 4 و 8 درصد بود. در دو مطالعه مشابه در تهران، ژن *bla<sub>SHV</sub>* در میان ایزوله‌های *اسیتوباکتر شناسایی* نشدند، اما ژن *bla<sub>TEM</sub>* و *bla<sub>CTX-M</sub>* شیوع بیش تری نسبت به مطالعه حاضر داشت (33، 39). همچنین شباهت معنی داری بین شیوع این ژن‌ها در مطالعه حاضر و دیگر مطالعات انجام شده در ایران و سایر نقاط جهان مشاهده نشد (40-43). امروزه به دلایلی چون مصرف بی‌رویه داروها و تجویز نامناسب آن‌ها، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها زیاد شده است، لذا پیشنهاد می‌شود تا تست‌های تشخیصی جهت غربالگری و شناسایی بتالاکتامازهای وسیع الطیف انجام پذیرد تا شیوع این ایزوله‌ها شناسایی و کنترل شود. نتایج آنتی‌بیوگرام ما نشان داد که هیچ کدام از سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم داروی مناسبی برای درمان *اسیتوباکتر بومانی* نمی‌باشند، هر چند که استفاده از داروهای بتالاکتام همراه با مهارکننده‌های بتالاکتاماز می‌تواند ترکیب مناسبی برای درمان باشند. اما تاثیر این ترکیب بسیار بستگی به نوع ESBL تولید شده توسط باکتری دارد. با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه و با توجه به مقاومت بالای ایزوله‌ها و شیوع پایین ژن‌های مورد بررسی، این طور به نظر می‌رسد که این سویه‌ها مکانیسم‌های متنوعی را برای ایجاد مقاومت به کار می‌گیرند. در مورد شیوع ژن‌های مورد نظر، مشخص شد که بیش‌ترین شیوع مربوط به دو ژن *bla<sub>TEM</sub>* و *bla<sub>SHV</sub>* است که در گونه *سودوموناس آئروژینوزا* بودند. توانایی بالای این سویه‌ها در انتقال ژن‌های مقاومت به سایر سویه‌های کلینیکی، اهمیت شناسایی سریع آن‌ها در آزمایشگاه را نشان می‌دهد.

## References

1. Enoch DA, Birkett CI, Ludlam HA. Non-fermentative Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents 2007; 29(Suppl3): S33-S41.
2. Jean S-S, Hsueh P-R, Lee W-S, Chang H-T, Chou M-Y, Chen I-S, et al. Nationwide surveillance of antimicrobial resistance among

مقاومت به سفتازیدیم در *سودوموناس آئروژینوزا* در مطالعه حاضر نسبت به مطالعات پیشین بیش تر بوده و 100 درصد گزارش شد (29-31).

شیوع ژن‌های *bla<sub>CTX-M</sub>*، *bla<sub>SHV</sub>* و *bla<sub>TEM</sub>* در میان *سودوموناس آئروژینوزا*های مطالعه ما به ترتیب 26 و 19 درصد بود که نتایج مشابه و متفاوتی در دیگر مطالعات انجام شده در ایران و سایر نقاط جهان مشاهده شد. شیوع ژن‌های *bla<sub>CTX-M</sub>* و *bla<sub>SHV</sub>* در مطالعه ما مشابه مطالعه انجام شده رحیمی و همکاران می‌باشد، اما در بررسی آن‌ها *bla<sub>TEM</sub>* شیوع بالاتری نسبت به مطالعه حاضر داشت (32). در مطالعه یزدی و همکارانش شیوع *bla<sub>TEM</sub>* همراستا با مطالعه حاضر بود (33). مقادیر بیش تر از نتایج ما در رابطه با ژن *bla<sub>SHV</sub>* در مطالعات مختلف نشان داده شده است (31، 34، 35). و در مطالعه فولادی و همکارانش شیوع ژن *bla<sub>TEM</sub>* به میزان کم‌تری گزارش شد (35).

Ahmed و همکارانش در مکه، ژن *bla<sub>CTX-M</sub>* در *سودوموناس آئروژینوزا* را نزدیک به مطالعه حاضر به میزان 10/7 درصد گزارش کردند، اما در مطالعه آن‌ها ژن‌های *bla<sub>TEM</sub>* و *bla<sub>CTX-M</sub>* شناسایی نشدند (36). فراوانی ژن *bla<sub>SHV</sub>* توسط سلیمی و همکاران 13/3 درصد گزارش شد (29). مطالعه Farzeali Shirehjini و همکاران نشان داد که ایزوله‌های *سودوموناس* دارای مقاومت بالایی بوده و 21/6 درصد و 34/2 درصد از سویه‌ها دارای ژن *bla<sub>CTX-M</sub>* و *bla<sub>TEM</sub>* بودند (37). شیوع ژن *bla<sub>TEM</sub>* در مطالعه Mohammed 25 درصد بود که بیش تر از شیوع در مطالعه حاضر است (38). همچنین شیوع ژن‌های *bla<sub>SHV</sub>*، *bla<sub>TEM</sub>* و *bla<sub>CTX-M</sub>* در میان *اسیتوباکتر*های این مطالعه به ترتیب

- non-fermentative Gram-negative bacteria in Intensive Care Units in Taiwan: SMART programme data 2005. Int J Antimicrob Agents 2009; 33(3): 266-271.
3. Bagheri-Nesami M, Rezai MS, Ahangarkani F, Rafiei A, Nikkhah A, Eslami G, et al.

- Multidrug and co-resistance patterns of non-fermenting Gram-negative bacilli involved in ventilator-associated pneumonia carrying class 1 integron in the North of Iran. *Germes* 2017; 7(3): 123-131.
4. Bandekar N, Vinodkumar CS, Basavarajappa K, Prabhakar P, Nagaraj P. Beta lactamases mediated resistance amongst gram negative bacilli in burn infection. *Int J Biol Med Res* 2011; 2(3): 766-270.
  5. Tzang BS, Tsai CC, Tsay GJ, Wang M, Sun YS, Hsu TC. Anti-human parvovirus B19 nonstructural protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Clinica chimica acta. Clin Chem Acta* 2009; 405(1-2): 76-82.
  6. Bagheri-Nesami M, Rafiei A, Eslami G, Ahangarkani F, Rezai MS, Nikkhah A, et al. Assessment of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and integrons among Enterobacteriaceae in device-associated infections: multicenter study in north of Iran. *Antimicrob Resist Infect Control* 2016; 5(1): 1-8.
  7. Endimiani A, Hujer AM, Hujer KM, Gatta JA, Schriver AC, Jacobs MR, et al. Evaluation of a commercial microarray system for detection of SHV-, TEM-, CTX-M-, and KPC-type  $\beta$ -lactamase genes in Gram-negative isolates. *J Clin Microbiol* 2010; 48(7): 2618-2622.
  8. Javanmardi F, Emami A, Pirbonyeh N, Rajaei M, Hatam G, Keshavarzi A. Study of multidrug resistance in prevalent Gram negative bacteria in burn patients: A systematic review and meta-analysis. *J Global Antimicrobial Resist* 2019.
  9. Vickers ML, Dulhunty JM, Ballard E, Chapman P, Muller M, Roberts JA, et al. Risk factors for multidrug-resistant Gram-negative infection in burn patients. *ANZ J Surg* 2018; 88(5): 480-485.
  10. Abdi-Ali A, Hendiani S, Mohammadi P, Gharavi S. Assessment of biofilm formation and resistance to imipenem and ciprofloxacin among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran. *Jundishapur J Microbiol* 2014; 7(1): e8606.
  11. Elahi G, Goli HR, Salehian M, Gholami M. Prevalence of MDR, XDR and PDR Phenotypes among *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Hospitalized Patients in Mazandaran Province, Iran. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2021; 31(203): 61-72 (Persian).
  12. CLSI (Clinic and laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31<sup>st</sup> ed. CLSI supplement M 100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.
  13. Gholami A, Majidpour A, Talebi-Taher M, Boustanshenas M, Adabi M. PCR-based assay for the rapid and precise distinction of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from burns patients. *J Prev Med Hyg* 2016; 57(2): E81-E85.
  14. Jemima SA, Verghese S. Multiplex PCR for blaCTX-M & blaSHV in the extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing gram-negative isolates. *Indian J Med Res* 2008; 128(3): 313-317.
  15. Grimm V, Ezaki S, Susa M, Knabbe C, Schmid RD, Bachmann TT. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3766-3774.
  16. Hakemi Vala M, Hallajzadeh M, Hashemi A, Goudarzi H, Tarhani M, Sattarzadeh Tabrizi M, et al. Detection of Ambler class A, B and D  $\beta$ -lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from burn patients. *Ann Burns Fire Disasters*

- 2014; 27(1): 8-13.
17. Whistler T, Sangwichian O, Jorakate P, Sawatwong P, Surin U, Piralam B, et al. Identification of Gram negative non-fermentative bacteria: How hard can it be? PLoS Negl Trop Dis 2019; 13(9): e0007729.
  18. Su SC, Vaneeschoutte M, Dijkshoorn L, Wei YF, Chen YL, Chang TC. Identification of non-fermenting Gram-negative bacteria of clinical importance by an oligonucleotide array. J Med Microbiol 2009; 58(5): 596-605.
  19. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 21(3): 538-582.
  20. Wu K, Wang F, Sun J, Wang Q, Chen Q, Yu S, et al. Class 1 integron gene cassettes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China. Int J Antimicrob Agents 2012; 40(3): 264-267.
  21. Lascols C, Hackel M, Hujer AM, Marshall SH, Bouchillon SK, Hoban DJ, et al. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel  $\beta$ -lactamases: a snapshot of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases throughout the world. J Clin Microbiol 2012; 50(5): 1632-1639.
  22. Begum S, Salam MA, Alam KF, Begum N, Hassan P, Haq JA. Detection of extended spectrum  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas* spp. isolated from two tertiary care hospitals in Bangladesh. BMC Res Notes 2013; 6(1): 1-4.
  23. Khashei R, Navabi Z, Mohebi S, Samadi N. Antibiotic Resistance Among *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Isolates Obtained From Shiraz Nemazi Hospital ICU Wards. Iran J Med Microbiol 2018; 12(4): 294-300 (Persian).
  24. Goel V, Hogade SA, Karadesai S. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases, AmpC beta-lactamase, and metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit in a tertiary care hospital. J Scientific Soc 2013; 40(1): 28-31.
  25. Vahdani M, Khandan D N. The Frequency of of class 1, 2, and 3 Integrons and Extended-spectrum Beta-Lactamase Genes of bla-CTX-M, bla-SHV, and bla-TEM in Gram-negative Bacilli Isolated from Bandar Abbas Pediatric Hospital, Iran-2016. Sci Res Appl Biol 2020; 10(38): 47-62 (Persian).
  26. Hakemi Vala M, Hallajzadeh M, Fallah F, Hashemi A, Goudarzi H. Characterization of the extended-spectrum beta-lactamase producers among non-fermenting Gram-negative bacteria isolated from burnt patients. Arch Hygiene Sci 2013; 2(1): 1-6.
  27. Owlia P, Azimi L, Gholami A, Asgari B, Larry AR. ESBL-and MBL-mediated resistance in *Acinetobacter baumannii*: a global threat to burn patients. Infez Med 2012; 20(3): 182-183.
  28. Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 17-32.
  29. Salimi A, Akya A, Haidari E. Prevalence Of  $\beta$ -Lactamases Genes Of Imp, Shv And Per In *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated From Hospitals In Kermanshah. J Clin Res Paramed Sci 2015; 4(2): 152-159 (Persian).
  30. Komijani M, Shahin K, Barazandeh M, Sajadi M. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases genes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Med Laborat J 2018; 12(5): 34-41.
  31. Bahrami M, Mmohammadi-Sichani M, Karbasizadeh V. Prevalence of SHV, TEM, CTX-M and OXA-48  $\beta$ -Lactamase Genes in



- Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Bandar-Abbas, Iran. *Avicenna J Clin Microbiol Infect* 2018; 5(4): 86-90.
32. Rahimi E, Asgari A, Azimi T, Soleiman-Meigooni S. Molecular Detection of Carbapenemases and Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases-Encoding Genes in Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* in Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2021; 14(7): 1-6.
  33. Attarpour Yazdi MM, Hosseini SS. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from a burn hospital in Tehran, Iran. *J Basic Clin Pathophysiol* 2019; 7(2): 40-43.
  34. Aljanabi FA, Alnaji HA, Duaibel AK. PCR for the Detection of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases Genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2018; 7(11): 3402-3408.
  35. IMANI Foladi A, Rostami Z, Shapouri R. Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimen by phenotypic and genotypic methods. *J Ardabil Univ Med Sci* 2010; 10(37): 189-198 (Persian).
  36. Ahmed OB, Asghar AH, Bahwerth FS. Prevalence of ESBL genes of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from Makkah Hospitals, Saudi Arabia. *Euro J Biol Med Sci Res* 2015; 3(6): 12-8.
  37. Farzali Shirehjini F, Amini K, Fatahi H. Identification of blaCTX-M, blaSHV, and blaTEM genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from human and animal samples using multiplex-PCR method. *Qom Univ Med Sci J* 2017; 10(11): 51-60 (Persian).
  38. Mohammed H, Elsadek Fakhr A, Mohammed H, Al Johery SE, Abdel Ghani Hassanein W. Spread of TEM, VIM, SHV, and CTX-M  $\beta$ -lactamases in imipenem-resistant Gram-negative bacilli isolated from Egyptian hospitals. *Int J Microbiol* 2016; 2016.
  39. Abdar MH, Taheri-Kalani M, Taheri K, Emadi B, Hasanzadeh A, Sedighi A, et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from nosocomial infections in Tehran, Iran. *GMS Hyg Infect control* 2019; 14.
  40. Vafaei S, Mirnejad R, Amirmozafari N. Determining the Patterns of Antimicrobial Susceptibility and the Distribution of blaCTX-M Genes in Strains of *Acinetobacter Baumannii* Isolated from Clinical Samples. *J Isfahan Med School* 2013; 31(252): 1443-1451.
  41. Bali EB, Acik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum-lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. *African J Microbiol Res* 2010; 4(8): 650-654.
  42. ezai MS, Rafiei A, Ahangarkani F, Bagheri-Nesami M, Nikkhah A, Shafahi K, et al. Emergence of extensively drug resistant *acinetobacter baumannii*-encoding integrons and extended-spectrum beta-lactamase genes isolated from ventilator-associated pneumonia patients. *Jundishapur J Microbiol* 2017; 10(7): e14377.
  43. Jin H, Xu XM, huang Mi Z, Mou Y, Liu P. Drug-resistant gene based genotyping for *Acinetobacter baumannii* in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial settings. *Chin Med J* 2009; 122(3): 301-306.