Original Article

Molecular identification of CTX-M, TEM and SHV β-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolated from respiratory system of patients in the ICU of educational hospitals in Tehran

Soroush Z, Ghane M*

Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, I. R. Iran.

Received February 3, 2017; Accepted May 4, 2017

Abstract:

Background: Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) producing isolates of *Klebsiella pneumoniae* which have been increased in the hospitals were resulting in limitation of therapeutic options. The aims of this study were to evaluate the antibiotic susceptibility pattern and presence of ESBL genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from patients admitted to the intensive care units (ICUs).

Materials and Methods: In this descriptive cross-sectional study, a total of 65 *Klebsiella pneumoniae* strains were isolated from ICUs of educational hospitals in Tehran. Identification was performed using biochemical tests and the antimicrobial susceptibility was performed as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Molecular analysis of the ESBL genes was performed by Multiplex PCR (M-PCR).

Results: Most of the isolates were resistant to Cotrimoxazole (72.3%), Gentamicin (67.7%) and Ampicillin (69.2%) and the highest susceptibility was seen for Ciprofloxacin (50.8%) Tetracycline (49.2%), Imipenem (46.3%) and Ceftriaxone (43.1%). Among the ESBL-producing genes, *bla*CTX-M (55.3 %) was the most prevalent, followed by *bla*TEM (41.5 %) and *bla*SHV (10.7 %). The results showed that 1.5 % of the isolates had concurrently *bla*TEM/ *bla*SHV and *bla*SHV/ *bla*CTX-M genes and 21.6% of isolates the *bla*TEM/ *bla*CTX-M genes.

Conclusion: These findings reveal the high prevalence of multi drug resistant and ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients hospitalized in ICUs and emphasize the need for appropriate infection control policies.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Anti-bacterial agents, Intensive care units, Beta-lactamases, Multiplex polymerase chain reaction

*** Corresponding Author.**
Email: maryamghaneh@yahoo.com
Tel: 0098 912 5133 815
Fax: 0098 215 636 0468

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2017; Vol. 21, No 3, Pages 232-239

Please cite this article as: Soroush Z, Ghane M. Molecular identification of CTX-M, TEM and SHV β-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolated from respiratory system of patients in the ICU of educational hospitals in Tehran. ***Feyz*** 2017; 21(3): 232-9.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

شناسایی مولکولی بتالاکتامازهای CTX-M، TEM و SHV در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از دستگاه تنفسی بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های آموزشی تهران

زهرا سروش [۱]، مریم قانع [۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (Extended-spectrum beta-lactamases; ESBL)، در بیمارستان‌ها افزایش یافته و نتیجه آن محدودشدن گزینه‌های درمانی است. هدف از این مطالعه ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و بررسی حضور ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی توصیفی، در مجموع ۶۵ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های آموزشی تهران جمع‌آوری شد. شناسایی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و حساسیت آنتی‌بیوتیکی مطابق با توصیه‌های موسسه استاندارد روش‌های آزمایشگاهی (CLSI) انجام شد. آنالیز مولکولی ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف با استفاده از روش مالتی‌پلکس PCR انجام شد.

نتایج: اغلب ایزوله‌ها نسبت به کوتریموکسازول (۷۲/۳ درصد)، جنتامایسین (۶۷/۷ درصد) و آمپی‌سیلین (۶۹/۲ درصد) مقاوم بودند و بیشترین حساسیت نسبت به سیپروفلوکساسین (۵۰/۸ درصد)، تتراسایکلین (۴۹/۲ درصد)، ایمی‌پنم (۴۶/۳ درصد) و سفتریاکسون (۴۳/۱ درصد) بود. از بین ژن‌های تولیدکننده ESBL، *bla*CTX-M (۵۵/۳ درصد) شایع‌ترین ژن بود و بعد از آن *bla*TEM (۴۱/۵ درصد) و *bla*SHV (۱۰/۷ درصد) بودند. نتایج نشان داد که ۱/۵ درصد ایزوله‌ها ژن‌های *bla*TEM/ *bla*SHV و *bla*SHV/*bla*CTX-M را به‌طور هم‌زمان دارا بودند و ۲۱/۶ درصد ایزوله‌ها ژن‌های *bla*TEM/*bla*CTX-M را داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه شیوع بالایی از ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به چند دارو و تولید کننده ESBL را در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه نشان می‌دهد که این امر بر سیاست‌های مناسب برای کنترل عفونت تاکید دارد.

واژگان کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه*، عوامل ضد میکروبی، بخش مراقبت‌های ویژه، بتالاکتاماز، مالتی پلکس PCR

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۶، صفحات ۲۳۹-۲۳۲

مقدمه

ظهور *انتروباکتریاسه‌های* تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع-الطیف (Extended-spectrum beta-lactamases; ESBL)، به‌ویژه *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* تهدید جدی برای سلامت انسان محسوب می‌شود. در حال حاضر این میکروارگانیسم‌ها در میان ۶ پاتوژن مقاوم به دارو که برای آن‌ها داروهای موثر کمی وجود دارد، قرار می‌گیرند [۱]. اولین مورد ESBL در سال ۱۹۸۰ در اروپا و بعد از آن در آمریکا و پس از معرفی نسل سوم سفالوسپورین‌ها گزارش شد [۲].

در طی دو دهه اخیر افزایش چشم‌گیری در زمینه تولید بتالاکتامازها و شیوع *انتروباکتریاسه‌های* تولید کننده ESBL وجود داشته است [۴،۳]. نکته مهم اینکه عفونت با پاتوژن‌های تولید کننده ESBL اغلب همراه با شکست درمان، طولانی‌تر شدن زمان بستری، نرخ بالای مرگ‌ومیر و هزینه‌های بالای درمان همراه است [۵]. به‌علاوه، همانند عفونت‌های بیمارستانی، در جامعه نیز انتشار وسیعی از *انتروباکتریاسه‌های* تولید کننده ESBL وجود دارد که نتیجه آن بحران سلامت جهانی است [۶]. ژن‌های ESBL اغلب روی پلاسمید قرار دارند [۷] و اغلب متعلق به بتالاکتامازهای گروه A هستند. این بتالاکتامازها سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف با یک زنجیر جانبی اکسی‌ایمینو (Oximino) را هیدرولیز کرده و باعث بروز مقاومت باکتری‌ها نسبت به پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های نسل اول، دوم، سوم و آزترئونام، به‌جز سفامایسین‌ها یا کارباپنم، می‌شوند. این دسته از بتالاکتامازها توسط مهارکننده‌های بتالاکتاماز مانند کلاولانیک اسید مهار شده و از لحاظ ژنتیکی به ۳ ژنوتیپ TEM، SHV و CTX-M تقسیم می‌شوند [۵]. در سال ۱۹۹۰ *انتروباکتریاسه‌های* تولیدکننده ESBL شامل *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* به‌طور عمده به‌عنوان اعضای خانواده TEM و

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی

[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی

* **نشانی نویسنده مسئول:** اسلامشهر، میدان نماز، خیابان صیاد شیرازی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر

تلفن: ۰۹۱۲۵۱۳۳۸۱۵ **دورنویس:** ۰۲۱۵۶۳۶۰۴۶۸

پست الکترونیک: maryamghaneh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۵ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۶/۲/۱۴

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

SHV معرفی شدند [۸]. بعد از آن در سال ۲۰۰۰ *کلبسیلا پنومونیه* به‌عنوان اصلی‌ترین تولید کننده TEM و SHV شناخته شد [۹]؛ با این وجود *اشریشیاهای* تولیدکننده ESBL با ژنوتیپ CTX-M شایع‌ترین ایزوله‌ها در کشورهای غربی و آسیایی هستند [۹]. ارگانیسم‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از لحاظ بالینی بسیار با اهمیت هستند، زیرا الگوی مقاومت دارویی گسترده‌ای از خود نشان می‌دهند و باعث افزایش مرگ‌ومیر بیماران به‌ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌ها می‌شوند [۹]. بیماران بستری در این بخش‌ها به‌دلیل ضعف سیستم ایمنی و بیماری‌های شدیدی که از آن رنج می‌برند، مستعد آلوده شدن با این ارگانیسم‌ها می‌باشند. پیدایش و انتشار باکتری‌های مولد ESBL اغلب ناشی از استفاده گسترده از داروهای بتالاکتام وسیع‌الطیف در بخش‌های مختلف بیمارستان می‌باشد. به‌علاوه، ماهیت متحرک بودن ژن‌های ESBL می‌تواند به انتشار آنها دامن زده و سبب ایجاد ایزوله‌هایی شود که به‌طور هم‌زمان چندین ژن مقاومت را حمل می‌کنند. پیامد این عوامل، افزایش روزافزون ایزوله‌های مولد بتالاکتاماز در بخش‌های مختلف بیمارستان و به‌ویژه بخش مراقبت‌های ویژه می‌باشد [۱۳-۱۰]. باتوجه به شیوع روزافزون باکتری‌های مولد ESBL و اهمیت این ایزوله‌ها در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و متعاقب آن شکست درمان، مطالعه الگوی ژن‌های مولد ESBL به‌ویژه در میان باکتری‌های ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی ضروری می‌باشد. تعیین ژن‌های شایع ESBL مانند *bla*SHV، *bla*TEM و *bla*CTX-M با روش‌های مولکولی در باکتری‌های تولید کننده ESBL و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند اطلاعات مفیدی را در مورد اپیدمیولوژی فراهم آورده و نیز می‌تواند به درمان ضد میکروبی منطقی کمک کند. در این راستا هدف از این مطالعه بررسی شیوع ژن‌های مذکور در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مقطعی-توصیفی طی یک دوره ۱ ساله از فروردین تا اسفند ۱۳۹۴ انجام شد. در این مطالعه ۶۵ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* از نمونه‌های تنفسی (خلط صبحگاهی) بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های امام خمینی و شریعتی تهران جدا شد. نمونه‌ها روی محیط بلاد آگار و مک‌کانگی آگار (Merk، آلمان) کشت داده شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. ایزوله‌ها با استفاده از روش‌های متداول بیوشیمیایی و میکروبیولوژی شناسایی و تایید شدند. برای شناسایی ایزوله‌های کلبسیلا از روش رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی نظیر ایندول، متیل رد، وژس پروسکوئر، سیترات، اوره و حرکت استفاده گردید. پس از تایید نهایی باکتری‌های جدا شده، کلونی‌های باکتری در محیط نگهدارنده شامل محیط لوریا برتانی براث (Merk، آلمان) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۴].

بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها

سنجش حساسیت ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به آنتی-بیوتیک با روش انتشار از دیسک [۱۵] و مطابق با توصیه‌های موسسه استاندارد روش‌های آزمایشگاهی (Clinical and laboratory standard institute; CLSI) انجام شد [۱۶]. انتخاب آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بر اساس فراوانی استفاده از آن‌ها در بیمارستان‌ها صورت گرفت. این آنتی‌بیوتیک‌ها شامل سیپروفلوکساسین (۵ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg)، کوتریموکسازول (۲۵ µg)، سفتریاکسون (۳۰ µg)، آمپی‌سیلین (۱۰ µg)، ایمی‌پنم (۱۰ µg)، و جنتامیسین (۱۰ µg) (شرکت Rosco، دانمارک) بودند. آزمون آنتی‌بیوگرام با استفاده از سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی و مقایسه کدورت آن با نیم‌مک‌فارلند انجام شد. سوسپانسیون تهیه شده با استفاده از سواب استریل روی پلیت حاوی محیط کشت مولرهینتون‌آگار (Merk، آلمان) به‌صورت متراکم کشت داده شد و پس از قرار دادن دیسک‌ها روی سطح محیط کشت، پلیت‌ها به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. بعد از این مدت، مسافت انتشار اطراف هر دیسک با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری و نتایج با استفاده از جداول استاندارد CLSI تفسیر گردید. برای کنترل کیفی از سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603 استفاده شد [۱۰].

شناسایی مولکولی ژن‌های *bla*TEM، *bla*SHV و *bla*CTX-M

تمامی ایزوله‌ها از لحاظ حضور ژن‌های *bla*TEM، *bla*SHV و *bla*CTX-M مورد آزمایش قرار گرفتند. برای تهیه DNA ژنومی، یک کلونی منفرد از هریک از ایزوله‌ها در ۵ میلی-لیتر محیط کشت LB در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌صورت شبانه کشت داده شد [۱۴]. سپس استخراج DNA با استفاده از کیت DNA (سیناکلون، ایران) و براساس دستور کار شرکت سازنده کیت صورت گرفت. آزمایش مالتی‌پلکس PCR برای شناسایی هم‌زمان ژن‌های *bla*TEM، *bla*SHV و *bla*CTX-M انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های فوق و نیز طول قطعه حاصل از PCR در جدول شماره ۱ آمده است.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در مالتی‌پلکس PCR و طول قطعات حاصل از تکثیر

ژن هدف	طول قطعه (bp)	توالی پرایمر('3→ '5)	منابع
*bla*SHV	۷۴۷	F: 5'-ATGCGTTATATTCGCCTGTG-3' R: 5'-TGCTTTGTTATTCGGGCCAA-3'	[۱۷]
*bla*TEM	۴۴۵	F: 5'-TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA-3' R: 5'-ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT-3'	[۱۸]
*bla*CTX-M	۵۹۳	F: 5'-ATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGC-3' R: 5'-TGGGTAAAGTAAGTGACCAGAATCAGCGG-3'	[۱۹]

واکنش PCR با استفاده از ۲ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر محلول dNTP، ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۸ میکرولیتر از پرایمر-های هر سه ژن، ۵ میکرولیتر DNA ژنومی (۵۰ نانوگرم)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز و آب مقطر دوبار تقطیر تا حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. برنامه زمانی PCR شامل ۹۵ درجه سانتی-گراد به‌مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل)، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه (۳۰ سیکل) و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل) بود. واکنش PCR در دستگاه ترمال سایکلر (PEQ STAR، آلمان) انجام شد. سپس محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد (Merk، آلمان) الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Sigma-Aldrich، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت [۱۴]. در این مطالعه سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603 به-عنوان کنترل مثبت و سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC 25922 به‌عنوان کنترل منفی انتخاب شدند [۲۰]. تمام سویه‌های استاندارد از گنجینه باکتریایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون مجذور کای و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ صورت گرفت. سطح معنی‌داری ۰/۰۵> جهت تفسیر داده‌ها استفاده شد.

نتایج

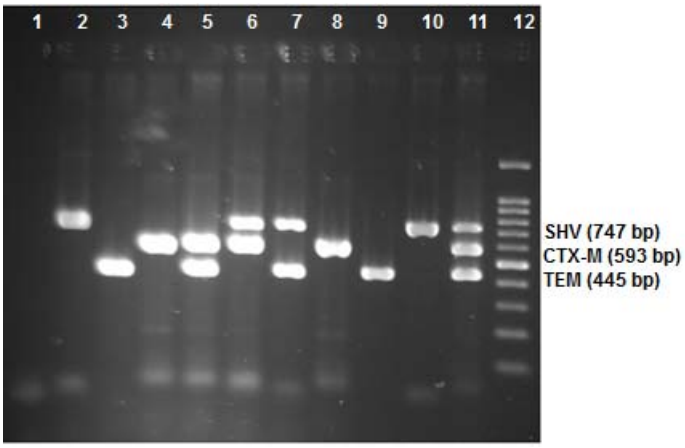
در این تحقیق ۶۵ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* از نمونه‌های تنفسی بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه جدا شد. متوسط سن افراد مورد مطالعه ۹/۸±۴۵ سال بود. از ۶۵ بیمار مورد مطالعه، ۴۰ نفر (۶۱/۵ درصد) مرد بودند. در میان ایزوله‌ها، ۴ ایزوله (۶/۱ درصد) نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها و ۱۱ ایزوله (۱۶/۹ درصد) به ۶ آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. هم‌چنین، نتایج نشان داد که اغلب ایزوله‌ها به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش مقاوم بودند (جدول شماره ۲). ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* حاصل از این تحقیق حساسیت مشابهی را نسبت به سیپروفلوکساسین، ایمی‌پنم و تترا-سایکلین نشان دادند؛ در مقایسه، نسبت ایزوله‌هایی که به کوتر-یموکسازول حساسیت داشتند، به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود (P<۰/۰۵).

جدول شماره ۲- الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه‌های تنفسی بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه

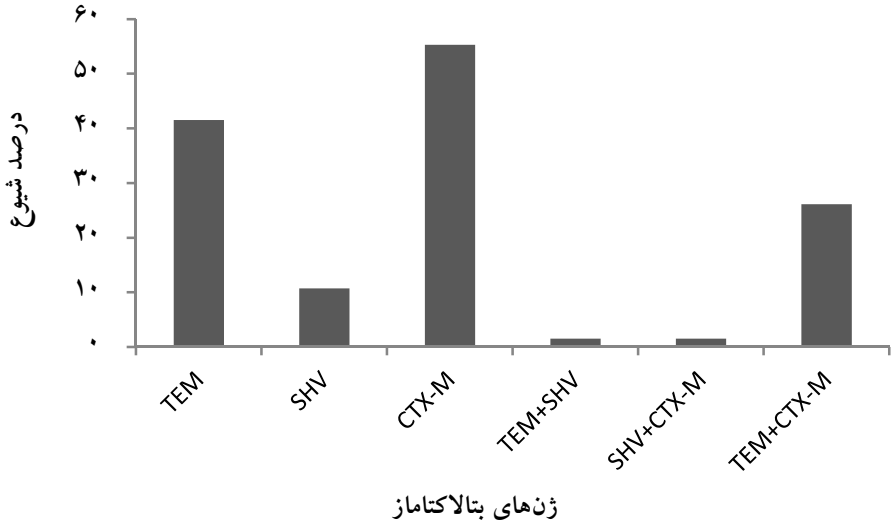
آنتی‌بیوتیک	حساس تعداد (درصد)	نیمه حساس تعداد (درصد)	مقاوم تعداد (درصد)
تتراسایکلین	۳۲ (۴۹/۲)	۸ (۱۲/۴)	۲۵ (۳۸/۴)
کوتریموکسازول	۸ (۱۲/۴)	۱۰ (۱۵/۳)	۴۷ (۷۲/۳)
سفتریاکسون	۲۸ (۴۳/۱)	۵ (۷/۷)	۳۲ (۴۹/۲)
سیپروفلوکساسین	۳۳ (۵۰/۸)	۶ (۹/۲)	۲۶ (۴۰)
جنتامایسین	.	۲۱ (۳۲/۳)	۴۴ (۶۷/۷)
آمپی‌سیلین	۱۲ (۱۸/۴)	۸ (۱۲/۴)	۴۵ (۶۹/۲)
ایمی‌پنم	۳۰ (۴۶/۳)	۱۰ (۱۵/۳)	۲۵ (۳۸/۴)

نتایج حاصل از PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های *bla*TEM، *bla*SHV و *bla*CTX-M در شکل شماره ۱ آمده است. همان‌طورکه در شکل مشاهده می‌شود، اندازه ژن‌های *bla*SHV، *bla*CTX-M و *bla*TEM به‌ترتیب ۷۴۷، ۵۹۳ و ۴۴۵ جفت باز می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از مجموع ۶۵ نمونه بالینی، ۴۱/۵ درصد جدایه‌ها دارای ژن *bla*TEM، ۵۵/۳ درصد جدایه‌ها دارای ژن *bla*CTX-M و ۱۰/۷ درصد جدایه‌ها نیز دارای ژن *bla*SHV بودند. به‌علاوه، برخی از جدایه‌ها نیز بیش از یک ژن مقاومت داشتند؛ به‌طوری‌که فراوانی ژن *bla*TEM/-*bla*SHV و نیز *bla*SHV/*bla*CTX-M به میزان ۱/۵ درصد و فراوانی ژن *bla*TEM/*bla*CTX-M بسیار بالاتر و به میزان ۲۱/۶ درصد بود. توزیع فراوانی هرکدام از ژن‌ها در شکل شماره ۲ ذکر شده است.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]



شکل شماره ۱- الکتروفورز محصول آزمایش مالتی‌پلکس PCR ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* روی ژل آگاروز ۱ درصد. ستون ۱ کنترل منفی، ستون‌های ۱۰-۲ نتیجه مالتی‌پلکس PCR در ایزوله‌های مختلف *کلبسیلا پنومونیه*. ستون ۱۱ کنترل مثبت، و ستون ۱۲ مارکر (100bp ladder).



شکل شماره ۲- فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* با روش مالتی‌پلکس PCR

بحث

ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و مقاوم به چند دارو از عوامل ایجادکننده عفونت در بخش مراقبت‌های ویژه بسیاری از بیمارستان‌های سراسر جهان می‌باشد [۲۱]. در این مطالعه، کم‌ترین مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین و تتراسایکلین و بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول و آمپی‌سیلین مشاهده شد. مبین و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کرده‌اند که در بین ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان کودکان در تبریز، بیشترین مقاومت نسبت به کاربنی‌سیلین وجود دارد و همانند نتایج حاصل از مطالعه حاضر، سیپروفلوکساسین را به‌عنوان موثرترین آنتی‌بیوتیک گزارش کرده‌اند [۲۲]. در مطالعه طالبی و همکاران (۲۰۰۹) روی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان فیروزگر تهران، مقاومت بالایی (۹۲ درصد) نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم مشاهده شد و کمترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم و سفی‌پنم (۳۱ درصد) وجود داشت [۲۳]. ایزوله‌های به‌دست آمده در این تحقیق هم حساسیت نسبتا بالایی نسبت به ایمی‌پنم نشان دادند (۴۶/۳ درصد)؛ این در حالی‌است‌که در مطالعه درخشان و همکاران (۲۰۱۳) در تهران، تمام ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه، به استثنای یک ایزوله، نسبت به ایمی‌پنم حساس بودند [۲۴] و در مطالعات انجام شده توسط آرچین و همکاران (۲۰۱۴) در شیراز نیز ۹۸/۳۴ درصد ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به ایمی‌پنم حساسیت داشتند [۱۳]. در مطالعات سلطان دلال و همکاران (۲۰۱۲) در بیمارستان امام خمینی تهران [۲۵]، Amin و همکاران (۲۰۰۹) در کشور پاکستان [۲۶]، Al-shara و همکاران (۲۰۱۱)

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

در اردن [۲۷]، Ishii و همکاران (۲۰۰۵) در کشور ژاپن [۲۸] و Bratu و همکاران (۲۰۰۵) در آمریکا [۲۹] نیز آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک موثر در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری *کلبسیلا پنومونیه* معرفی شده است. در اکثر موارد به‌علت استفاده بی-رویه و خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها شاهد موارد زیادی از مقاومت‌های دارویی در پاتوژن‌ها هستیم که این امر خود سبب عدم موفقیت در درمان می‌شود. مقاومت‌های دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در مناطق مختلف ایران و جهان به‌دلیل تغییرات ژنتیکی در ایزوله‌های ایجاد کننده و تفاوت در میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف و جدید متفاوت می-باشند. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که موثرترین آنتی‌بیوتیک برای ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* سیپروفلوکساسین و ایمی‌پنم می‌باشد. فلذا، بهتر است در درمان اولیه این عفونت از آنتی بیوتیک‌های آمیکاسین، تتراسیکلین و آمپی‌سیلین کمتر استفاده شود، زیرا نتایج بیان کننده میزان بالای مقاومت باکتری *کلبسیلا پنومونیه* در نمونه‌های بالینی جدا شده نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. بررسی مولکولی ایزوله‌های مورد آزمایش از لحاظ وجود ژن‌های *bla*TEM، *bla*SHV و *bla*CTX-M نشان داد که ژن *bla*CTX-Mبیشترین فراوانی را دارد و پس از آن ژن‌های *bla*TEM، *bla*SHV قرار دارند. این درحالی‌است‌که در مطالعه فیض آبادی و همکاران (۲۰۱۰) روی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بیمارستان لبافی نژاد، شیوع ژن *bla*SHV بالاتر بوده (۶۷/۴ درصد) و پس از آن شیوع ژن‌های *bla*TEM (۵۴ درصد) و *bla*CTX-M (۴۶/۵۱ درصد) قرار داشت [۳۰]. در مطالعه انجام شده روی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه در بیمارستان نمازی شیراز فراوانی ژن *bla*TEM، ۳۸/۳۴ درصد گزارش شد که تقریبا با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌خوانی دارد، درحالی‌که شیوع ژن *bla*CTX-M بسیار پایین‌تر (۳/۳۲ درصد) از نتایج حاصل از این تحقیق و تحقیق فیض آبادی و همکاران در بیمارستان لبافی نژاد بود [۱۳]. هم‌چنین، پیمانی و همکاران (۲۰۱۳) فراوانی ژن‌های *bla*TEM و *bla*SHV را در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بیمارستان‌های شهر قزوین، به‌ترتیب ۵۸ و ۴۲ درصد گزارش نمودند که نسبت به تحقیق حاضر از شیوع بالاتری برخوردار بودند [۳۱]. در مطالعه رنجبر و همکاران (۲۰۱۷) در تهران، شیوع ژن‌های *bla*TEM در ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* ۴۱/۹ درصد گزارش شد که با نتایج حاصل از این تحقیق کاملا مطابقت دارد، درحالی‌که شیوع ژن *bla*SHV، ۵۴/۸ درصد و بسیار بالاتر از نتایج حاصل از این تحقیق بود [۳۲]. هم-چنین، ژن *bla*SHV در ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* که توسط لطیف‌پور و همکاران (۲۰۱۶) در شهرکرد جدا شده بود، نیز نسبت به مطالعه حاضر شیوع بالاتری داشت [۳۳]. در مطالعه دیگری که در ترکیه در سال ۲۰۱۰ انجام شد، میزان جداسازی ژن‌های *blaTEM* و *blaSHV* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جمع‌آوری شده از بیماران بستری به‌ترتیب ۷۳/۴ و ۲۱/۸ درصد گزارش شد [۳۴]. هم-چنین، گزارشات نشان داده است که میزان شیوع ژن‌های *bla*SHV، *bla*TEM و *bla*CTX-M در *انتروباکتریاسه‌های* جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های دوحه قطر بین سال‌های ۲۰۱۳-۲۰۱۲ به‌ترتیب ۵۳/۲، ۴۰/۴ و ۶۴/۱ درصد بوده است [۱۰]. مقایسه نتایج فوق نشان می‌دهد که میزان شیوع ژن‌های بتالاکتاماز در ایزوله‌های جدا شده از کشورهای مختلف و نیز در یک کشور از یک بیمارستان به بیمارستان دیگر متفاوت است که این امر بستگی به سیستم کنترل درمانی و رژیم درمانی مورد استفاده در هر منطقه و بیمارستان دارد. نتایج حاصل از مالتی‌پلکس PCR حضور توام ژن‌های بتالاکتاماز را در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* نشان داد. در بین ایزوله‌ها، ژن‌های *bla*CTX-M/ *bla*TEM بیشترین فراوانی را داشتند، ولی فراوانی ژن‌های *bla*SHV/*bla*TEM و *bla*SHV /*bla*CTX-M بسیار پایین‌تر بود. در مطالعه آرچین و همکاران (۲۰۱۴) در شیراز، فراوانی ژن‌های *bla*TEM و *bla*SHV، ۳/۳۳ درصد و فراوانی *bla*TEM و *bla*CTX-M به‌میزان ۳۸/۳۴ گزارش شده است [۱۳] که اگرچه شیوع بیشتری دارد، ولی تا حدودی با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. این درحالی-است‌که در مطالعه پیمانی و همکاران (۲۰۱۳) در قزوین، فراوانی هم‌زمان ژن‌های *bla*TEM و *bla*SHV در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* ۲۴ درصد و بسیار بالاتر از نتایج حاصل از این تحقیق و نیز مطالعه آرچین و همکاران می‌باشد [۳۱]. مطالعات آینده روی تعداد بیشتری از ایزوله‌ها می‌تواند در درک الگوی ژنتیکی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مولد ESBL سودمند باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که سویه‌های تولید-کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستان‌های امام خمینی و شریعتی تهران از شیوع بالایی برخوردار بوده و یک معضل جدی روبه پیشرفت است. بنابراین، ضروری است تا با تجهیز آزمایشگاه‌ها به روش‌های سریع و دقیق مولکولی، میزان شیوع سویه‌های مقاوم را مورد ارزیابی قرار داده و تدابیر لازم جهت درمان بیماران و کنترل مقاومت در باکتری‌ها را اتخاذ نمود.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی واحد اسلامشهر به‌دلیل فراهم آوردن شرایط لازم برای اجرای این پژوهش، کمال تشکر را دارند.

References:

[1] Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the antimicrobial availability task force of the Infectious Diseases society of America. ***Clin Infect Dis*** 2006; 42(5): 657–68.

[2] Livermore DM, Hawkey PM. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. ***J Antimcrob Chemother*** 2005; 56: 451–4.

[3] Yezli S, Shibl AM, Memish ZA. The molecular basis of β-lactamase production in gram-negative bacteria from Saudi Arabia. ***J Med Microbiol*** 2015; 64(2): 127–36.

[4] Brolund A. Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. ***Infect Ecol Epidemiol*** 2014; 4: 1-9.

[5] Malloy AM, Campos JM. Extended-spectrum beta-lactamases: a brief clinical update. ***Pediatr Infect Dis J*** 2011; 30(12): 1092–3.

[6] Lewis JS 2nd, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2007; 51(11): 4015–21.

[7] Nakamura T, Komatsu M, Yamasaki K, Fukuda S, Miyamoto Y, Higuchi T, et al. Epidemiology of *Escherichia coli*, *Klebsiella Species*, and *Proteus mirabilis* strains producing extended-spectrum β-lactamases from clinical samples in the Kinki region of Japan. ***Am J Cli Pathol*** 2012; 137(4): 620–6.

[8] Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. ***Clin Microbiol Rev*** 2001; 14(4): 933–51.

[9] Colodner R. Extended spectrum beta lactamase: a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. ***Am J Infect Control*** 2005; 33(2): 104-7.

[10] Sid Ahmed MA, Bansal D, Acharya A, Elmi AA, Hamid JM, Sid Ahmed AM. Antimicrobial susceptiblity and molecular epidemiology of extended spectrum beta lactamse producing *Enterobacteriaceae* from intensive care units at Hamad Medical Corporation, Qatat. ***Antimicrob Resist Infect Control*** 2016; 5(4): 1-6.

[11] Ahmed OI, El-Hady SA, Ahmed TM, Ahmed IZ. Detection of blaSHV and blaCTX-M genes in ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Egyption patients with suspected nosocomial infections. ***Egypt J Med Hum Genet*** 2013; 14(3): 277-83.

[12] Mirsalehian M, Akbari-Nakhjavani F, Peymani A, Kazemi B, Jabal Ameli F, Mirafshari SM. Prevalence of extended spectrum beta lactamase producing *Enterobacteriaceae* by phenotypic and genitypic methods in intensive care units in tehran, Iran. ***Daru*** 2008; 16(3): 169-73.

[13] Archin T, Afzalian E, Kargar M, Ghasemi Y. β lactamases genes and antibiotics resistance pattern of *K. pneumoniae* isolates collected from ICU patients of Namazi Hospital, Shiraz, Iran. ***Armaghan-e-Danesh*** 2014; 18(10): 816-25. [in Persian]

[14] Sambrok J, Russell DW, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p. 470.

[15] Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. ***Am J Clin Pathol*** 1996; 45(4): 493-6.

[16] Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Fifth Informational Supplement M100-S25, CLSI, Wayne, PA, USA; 2015.

[17] Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, et al. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV and CTX-M-type beta-lactamases. ***Antimicrob agents Chemother*** 2003; 47(11): 3554-60.

[18] Monstain HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex amplification assay for detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in *Enterobacteriaceae*. ***APMIS*** 2007; 115(12): 1400-8.

[19] Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, et al. Complete nucleotide sequence of the 92 kilibase plasmid harbouring the CTX-M-15 extended spectrum beta lactamase involved in an outbreak in long term care facilities in Toronto, Canada. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2004; 48(10): 3758-64.

[20] Seyedjavadi SS, Goudarzi M, Sabzehali F. Relation between bla_{TEM}, bla_{SHV} and $bla_{\text{CTX-M}}$ genes and acute urinary tract infections. ***J Acute Dis*** 2016; 5(1): 71–6.

[21] Girish N, Saileela K, Mohanty SK. Extended-Spectrum bata-Lactamase producing *Klebsiella Pneumoniae* and *Escherichia coli* in neonatal intensive care unit. ***J Bacteriol Parasitol*** 2012; 3(4): e1000141.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

[22] Mobin H, Nahaie MR, Amir mozafari N, Sadeghi J, Rasouli M. *Enterobacteriaceae* producing Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and plasmid patterns in intensive care unit of children's hospital in Tabriz. ***Med J Tabriz Univ Med Sci*** 2007; 28: 95-101.
[23] Talebi Taher M, Golestanpour A. Symptomatic nosocomial urinary tract infectin in ICU patiant: identification of antimicrobial resistance pattern. ***Iran J Clin Infect Dis*** 2009; 4(1): 25-9.
[24] Derakhshan S, Najar peerayeh F, Fallah F, Bakhshi B, Rahbar M, Mohammad-Zadeh M. Identification of expended spectrum betalactamase producing Klebsiella pneumonia isolated from intensive care unit (ICU) patiants in three hospitals in Iran. ***Infect Epidemiol Med*** 2013; 1(1): 9-13.
[25] Soltan Dalal MM, Miremadi SA, Sharify Yazdi MK, Rastegar Lari A, Rajabi Z, Avadis Yans S. Antimicrobial resistance trends of *Klebsiella* spp. isolated from patients in Imam Khomeini hospital. ***Payavard Salamat*** 2012; 6(4): 275-81. [in Persian]
[26] Amin A, Ghumro PB, Hussain S, Hameed A. Prevalence of antibiotic resistance among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a tertiary care hospital in Pakistan. ***Malays J Microbiol*** 2009; 5(2): 81-6.
[27] Al-Shara MA. Emerging antimicrobial resistant of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from pediatric patients in Jordan. ***New Iraqi J Med*** 2011; 7(2): 81-7.
[28] Ishii Y, Alba J, Kimura S, Shiroto K, Yamaguchi K. Evaluation of antimicrobial activity of β-lactam antibiotics using E-test against clinical isolates from 60 medical centres in Japan. ***Int J Antimicrob Agents*** 2005; 25(4): 296-301.
[29] Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. ***J Antimicrob Chemother*** 2005; 56(1): 128–32.
[30] Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, et al. Distribution of bla(TEM), bla(SHV), bla(CTX-M) genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafinejad hospital, Tehran, Iran. ***Microb Drug Resist*** 2010; 16(1): 49-53.
[31] Peymami A, Moeini-Rad M, Naserpour T, Sanikhani R, Pahlevan AA. Frequency of extended spectrum beta lactamase and TEM and SHV genotypes in *Klebsiella pneumoniae*. ***Iran J Infectious Dis Tropical Med*** 2013; 18(60): 15-20. [in Persian]
[32] Ranjbar R, Memariani H, Sorouri R. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from children with urinary tract infections. ***Arch Pediatr Infect Dis*** 2017; 5(2): e 39000.
[33] Latifpour M, Gholipour A, Damavandi MS. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in nosocomial and community-acquired urinary tract infections. ***Jundishapur J Microbiol*** 2016; 9(3): e31179.
[34] Bali BE, Açik 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. ***Afr J Microbiol Res*** 2010; 4(8): 650-4.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]