Original Article

Determination of antibiotic resistance profile in *Klebsiella pneumonia* strains isolated from urinary tract infections of patients hospitalized in Peyambaran hospital (Tehran-Iran)

Tavakol M, Momtaz H*

Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord. I. R. Iran.

Received September 8, 2015; Accepted December 21, 2016

Abstract:

Background: Urinary tract infection (UTI) is the second prevalent infection in human mostly caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia*. The aim of this study was to determine the antibiotic resistance profile and detect the prevalence of antibiotic resistance encoding genes in *K .pneumoniae* isolated from UTI.

Materials and Methods: Fifty *K. pneumonia* strains isolated from 122 UTI samples of hospitalized patients in Payambaran Hospital (Tehran, Iran) which were subjected to this study (2014) were confirmed by standard biochemical tests. Isolates were tested for susceptibility to 10 antimicrobial drugs by using disk diffusion method. Antibiotic resistance encoding genes frequently include the *aadA1, aac(3)-IV, sul1*, *blaSHV, Cat1, cmlA, tetA, tetB, dfrA1, CITM, qnr* in isolates were determined by PCR.

Results: The highest antibiotic resistance in *K. pneumoniae* isolates were for Tetracycline and the lowest resistance (2%) for Gentamicin and Imipenem. To determine the frequency of antibiotic resistant genes, 64% and 4% of isolates had *tetA* and Gentamicin-(*aac(3)-IV*) resistant genes, respectively.

Conclusion: Frequency of antibiotic resistance encoding genes may have important and basic role in the occurrence and transfer of antibiotic resistance which can be due to the indiscriminate use of antibiotics.

Keywords: Urinary tract infection, *Klebsiella pneumonia*, antibiotic resistance profile

* **Corresponding Author.**
Email: hamomtaz@yahoo.com
Tel: 0098 383 336 1045
Fax: 0098 383 336 1064

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2017; Vol. 21, No 1, Pages 74-82

Please cite this article as: Tavakol M, Momtaz H. Determination of antibiotic resistance profile in *Klebsiella pneumonia* strains isolated from urinary tract infections of patients hospitalized in Peyambaran hospital (Tehran-Iran). ***Feyz*** 2017; 21(1): 74-82.

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری بیماران بستری در بیمارستان پیامبران شهر تهران طی سال ۱۳۹۳

مرضیه توکل [۱]، حسن ممتاز [۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: عفونت‌های دستگاه ادراری دومین عفونت شایع در انسان هستند که عمده‌ترین باکتری‌های ایجاد کننده این عفونت‌ها، *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی شیوع ژن‌های کد کننده مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۵۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* از ۱۲۲ نمونه مربوط به عفونت‌های ادراری بیماران بستری شده در بخش‌های مختلف بیمارستان پیامبران شهر تهران طی سال ۱۳۹۳ جدا گردید و توسط تست‌های بیوشیمیایی استاندارد تعیین هویت شدند. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌ها با استفاده از روش دیسک دیفوژن نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک تعیین گردید. فراوانی حضور ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی شامل ژن‌های *aadA1*، *aac(3)-IV*، *sul1*، *blaSHV*، *Cat1*، *cmlA*، *tetA*، *tetB*، *dfrA1*، *CITM* و *qnr* در ایزوله‌ها با استفاده از روش PCR تعیین شد.

نتایج: بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مربوط به آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین بود. تنها ۲ درصد از ایزوله‌ها نسبت به جنتامایسین و ایمی‌پنم مقاوم بودند. در بررسی شیوع ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی، ۶۴ درصد از ایزوله‌ها دارای ژن *tetA* و ۴ درصد از آن‌ها ژن مقاومت به جنتامایسین (*aac(3)-IV*) را دارا بودند.

نتیجه‌گیری: شیوع ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند نقش مهمی در ایجاد و انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی داشته باشد و این می‌تواند به‌دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها باشد.

واژگان کلیدی: عفونت‌های دستگاه ادراری، *کلبسیلا پنومونیه*، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶، صفحات ۸۲-۷۴

مقدمه

عفونت بیمارستانی به عفونتی اطلاق می‌شود که بیمار در زمان بستری بودن به آن دچار نبوده، در دوره کمون آن هم نبوده باشد و پس از پذیرش بیمار در بیمارستان یا طی دوره‌ای مشخص پس از ترخیص بیمار رخ دهد [۲،۱]. عفونت‌های ادراری یکی از شایع‌ترین انواع عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند [۴،۳]. این عفونت‌ها به‌طور معمول توسط خصوصیات میکروبیولوژیک مشخص می‌شوند. حضور بیش از 10^5 میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر ادرار همراه با حداکثر دو گونه باکتریال، نشانه عفونت مجاری ادراری توسط باکتری‌ها است [۵]. از جمله باکتری‌های شایع مولد عفونت‌های ادراری *اشریشیا کلی*، *پروتئوس* و *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشند [۶].

[۱] دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

[۲] استاد، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول:**
شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، صندوق پستی: ۱۶۶

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۴۵ **دورنویس:** ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۶۴

پست الکترونیک: hamomtaz@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۵/۱۰/۱

کلبسیلا، باسیلی گرم منفی متعلق به خانواده بزرگ انتروباکتریاسه است [۷]. این میکروارگانیسم جزیی از میکروفلور طبیعی بدن انسان بوده و حدود یک‌سوم افراد ناقل روده‌ای این میکروب هستند. این باکتری عامل طیف وسیعی از عفونت‌ها شامل سپتی-سمی، پنومونی، عفونت مجاری ادراری، منتژیت و آبسه‌های چرکی در اندام‌های مختلف به‌خصوص کبد می‌باشد [۹،۸]. مقاومت بالای کلبسیلاها به آنتی‌بیوتیک‌ها و گسترش سریع آنها در بخش‌های مختلف بیمارستان مشکلات عمده‌ای را در درمان ایجاد کرده و سپتی‌سمی و مرگ بیماران را موجب می‌گردد [۱۰]. برخی از ارگانیسم‌ها به‌طور ذاتی به تعداد یا تمامی عوامل ضدمیکروبی مقاوم هستند و برخی از ارگانیسم‌ها با مکانیسم‌های موتاسیون و انتشار ژن‌های مقاومت از ارگانیسم‌های مقاوم به سایر ارگانیسم‌ها مقاوم می‌شوند [۱۱]. انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از طریق پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها صورت می‌گیرد [۱۲]. عامل اصلی بروز این مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی حضور یکسری ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی ازجمله ژن‌های کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (*SHV* و *TEM* و *CITM*)، سولفانامیدها (*sul1*، *sul2* و *int1*)، جنتامایسین (*aac(3)-IV*)، سفالوتین (*blaSHV*)، استرپتومایسین (*strA*،

strB و *aadA1*)، تتراسایکلین (*tetA-tetE* و *tetG*)، تری-متوپریم (*dfrA1*، *dfrA13*، *dfr7* و *dfr17*)، فلورکوئینولون (*qnr*) و کلرامفنیکل (*catI-catIII* و cmlA) می‌باشد [۱۳]. وجود ژن‌های *SHV* و *TEM* که به‌وسیله پلاسمید در انتروباکتریاسه‌ها کد می‌شوند، سبب مقاومت‌های چند دارویی در باکتری‌ها شده که درمان عفونت با این دسته از ارگانیسم‌ها نیازمند تجویز آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف است. ژن‌های *qnr* جزء عوامل مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید هستند که حوزه جغرافیایی ژن *qnrA* نسبت به سایر ژن‌های *qnr* شیوع بالاتری در مناطق مختلف جهان دارد. تاکنون ۲۸ ژن *dfr* شناخته شده و معمولا در ارتباط با اینتگرون‌ها می‌باشند. مقاومت به تری‌متوپریم به‌علت تغییرات در آنزیم دی‌هیدروفولات ردوکتاز (*dfr*) است که توسط ژن‌های *dfr* کد می‌شوند. دو ژن پلاسمیدی *sul1* و *sul2* در ایجاد مقاومت به سولفونامیدها در باکتری‌های گرم منفی یافت می-شوند. شایع‌ترین ژن ایجاد کننده مقاومت به تتراسایکلین ژن *tetB* است که به‌دلیل دارا بودن عناصر ژنتیکی متحرک به‌راحتی بین جنس‌های مختلف باکتری‌ها انتقال می‌یابد [۱۳،۱۲]. باتوجه به شیوع بالای ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و گسترش عفونت‌های بیمارستانی ناشی از آنها، در این تحقیق ایزوله‌های *کلبسیلا پنو-مونیه* از موارد عفونت‌های ادراری در بیماران بستری جداسازی شده و الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که به‌صورت توصیفی-مقطعی و در فاصله زمانی شهریور تا آبان ۱۳۹۳ صورت گرفت، تعداد ۱۲۲ نمونه مربوط به عفونت های ادراری بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان پیامبران شهر تهران جمع‌آوری گردید. از هر بیمار ۲۰ میلی‌لیتر ادرار با استفاده از سوند ادراری در لوله‌های استریل جمع‌آوری شده و بلافاصله مورد آزمایش میکروبی قرار گرفت.

کشت و شناسایی باکتری‌ها:

نمونه‌ها در کنار شعله روی محیط کشت مک‌کانکی آگار کشت داده شد و به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی-گراد انکوبه شدند. پس از رشد باکتری‌ها، شناسایی سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* بر اساس روش‌های میکروبیولوژیک از جمله رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی باسیل‌ها، تست‌های افتراقی نظیر تست‌های اکسیداز، (OF) -Oxidative Ferment ative، Agar Triple Sugar Iron (TSI)، Sulfide Indol، Motility (SIM)، Methyl Red (MR)، Voges Pro- (VP) skauer، سیترات، اوره، لیزین دکربوکسیلاز و اورنیتین دکربو-کسیلاز انجام پذیرفت [۱۴].

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی:

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌ها با استفاده از روش دیسک دیفوژن طبق معیار CLSI 2010 انجام گرفت [۱۵]. باکتری مورد نظر در محیط کشت مایع (BHI) -Brain Heart In-fection کشت داده شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه گردید. پس از رشد باکتری و ایجاد کدورت برابر استاندارد نیم مک‌فارلند [۱۶]، با استفاده از سواب استریل روی محیط کشت مولرهینتون آگار کشت داده شد. تست آنتی‌بیوگرام در حضور دیسک‌های سفتریاکسون (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین(µg ۳۰)، سفازولین (۳۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg)، آمیکاسین (µg ۳۰)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، ایمی‌پنم (۱۰ µg)، سفپیم (۳۰ µg)، تیکارسیلین (۷۵ µg) و جنتامایسین (۱۰ µg) ساخت شرکت پادتن طب ایران انجام شد. از سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* *ATCC 700603* به‌عنوان کنترل کیفی استفاده شد. پس از دیسک‌گذاری، پلیت‌ها در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه شدند و نتایج حاصل از آن با استفاده از جدول استاندارد CLSI 2010 مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج DNA:

استخراج DNA ژنومی ایزوله‌های مورد مطالعه با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت فرمنتاس آلمان مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. پس از استخراج DNA هر نمونه تا انجام (PCR) Polymerase chain reaction در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

PCR:

جهت تایید قطعی وجود *کلبسیلا پنومونیه* در ایزوله‌های مورد مطالعه آزمایش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای ATTT-TTCACTCTGA- و GAAGAGGTTGCAAACGAT-AGTTTTCTTGTGTTC، جهت ردیابی ژن *16S-23S ITS*، انجام شد. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer 10X، ۱ میکرولیتر $Mgcl_2$، ۰/۷۵ میکرولیتر dNTP Mix، ۱ میکرولیتر از زوج پرایمرهای فوق، ۰/۲ میکرو-لیتر آنزیم Taq Polymerase و ۳ میکرولیتر از DNA مربوط به هر نمونه تنظیم شد. برنامه حرارتی مورد استفاده در این مرحله

شامل یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه و سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶ دقیقه بود. وجود قطعه ۱۳۰ جفت بازی تکثیر یافته در این واکنش نشان‌گر وجود *کلبسیلا پنومونیه* در ایزوله‌های مورد مطالعه بود [۱۷]. به‌منظور ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی شامل ژن‌های *aadA1*، *aac(3)-IV*، *sul1*، *blaSHV*، *Cat1*، *cmlA*، *tetA*، *tetB*، *dfrA1*، *CITM* و *qnr* از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول شماره ۱ با شرایط PCR ذکر شده در جدول شماره ۲ در قالب PCR چندگانه (Multiplex PCR) انجام گرفت. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد محلول رنگی DNA safe stain (سیناژن-ایران) در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به‌مدت حدودا ۱ ساعت انجام گرفت. ژل مورد نظر با دستگاه ترانس‌لومیناتور UV مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل نتایج:

داده‌های حاصل از نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۸ و مدل آماری دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P<۰/۰۵$) آنالیز شد و اختلاف آماری بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها به انواع آنتی‌بیوتیک‌های آزمایش شده تعیین گردید.

نتایج

در این مطالعه ۱۲۲ نمونه مربوط به عفونت‌های ادراری بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان پیامبران شهر تهران مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش میکروبیولوژی بر پایه کشت و خصوصیات بیوشیمیایی (جدول شماره ۳) از مجموع ۱۲۲ نمونه ادرار مورد مطالعه، تعداد ۵۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* جداسازی شد. برای نمونه‌های جدا شده، تست تعیین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها انجام شد. بیش‌ترین میزان مقاومت در ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین و کم‌ترین میزان مقاومت به جنتامایسین و ایمی‌پنم بود (جدول شماره ۴). در آنالیز آماری نتایج حاصل از آزمایش آنتی‌بیوگرام، اختلاف آماری معنی‌داری بین مقاومت ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به تتراسیکلین و سیپروفلوکساسین با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز بین مقاومت ایزوله‌ها به جنتامایسین، ایمی‌پنم و سفپیم با دیگر آنتی‌بیوتیک‌های آزمون شده مشاهده شد. بعد از استخراج DNA ژنومی از ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* و تایید نمونه‌ها با ردیابی ژن اختصاصی *16S-23S ITS*، حضور ژن‌های کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های معمول در درمان عفونت‌های ادراری به روش PCR چندگانه مورد بررسی قرار گرفت (تصاویر شماره ۱ تا ۳). همان‌گونه که جدول شماره ۵ نشان می‌دهد فراوانی حضور ژن *tetA* (کدکننده مقاومت به تترا-سیکلین) (۶۴ درصد) بیش‌ترین و ژن کدکننده مقاومت به جنتا-مایسین (۴ درصد) کم‌ترین مقدار بود. طبق اطلاعات درج شده در این جدول، بین فراوانی حضور ژن *aac(3)-IV* در ایزوله‌ها با دیگر ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی و نیز بین حضور سه ژن *blaSHV, catI, qnr* با ژن‌های *sulI* و *tetA* اختلاف آماری معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد مشاهده گردید.

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* شده از عفونت‌های ادراری در بیمارستان پیامبران تهران طی سال ۱۳۹۳

منبع	اندازه محصول (جفت باز)	توالی پرایمر	نام ژن	مقاومت آنتی‌بیوتیکی
۱۸	۴۴۷	(F) TATCCAGCTAAGCGCGAACT (R) ATTTGCCGACTACCTTGGTC	*aadA1*	استرپتومایسین
۱۸	۲۸۶	(F) CTTCAGGATGGCAAGTTGGT (R) TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	*aac(3)-IV*	جنتامایسین
۱۸	۸۲۲	(F) TTCGGCATTCTGAATCTCAC (R) ATGATCTAACCCTCGGTCTC	*sul1*	سولفانامید
۱۸	۷۶۸	(F) TCGCCTGTGTATTATCTCCC (R) CGCAGATAAATCACCACAATG	*blaSHV*	سفالوتین
۱۸	۵۴۷	(F) AGTTGCTCAATGTACCTATAACC (R) TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	*Cat1*	کلرامفنیکل
۱۸	۶۹۸	(F) CCGCCACGGTGTTGTTGTTATC (R) CACCTTGCCTGCCCATCATTAG	*cmlA*	کلرامفنیکل
۱۹	۵۷۷	(F) GGTTCACTCGAACGACGTCA (R) CTGTCCGACAAGTTGCATGA	*tetA*	تتراسیکلین
۱۹	۶۳۴	(F) CCTCAGCTTCTCAACGCGTG (R) GCACCTTGCTGATGACTCTT	*tetB*	تتراسیکلین
۲۰	۳۶۷	(F) GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC (R) GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC	*dfrA1*	تری متوپریم
۱۸	۴۶۲	(F) TGGCCAGAACTGACAGGCAAA (R) TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	*CITM*	آمپی‌سیلین
۲۱	۶۷۰	(F) GGGTATGGATATTATTGATAAAG (R) CTAATCCGGCAGCACTATTTA	*qnr*	فلورکوئینولون

جدول شماره ۲- شرایط PCR چندگانه مورد استفاده جهت ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه شده از عفونت‌های ادراری در بیمارستان پیامبران تهران طی سال ۱۳۹۳

ژن	برنامه PCR	حجم PCR (50 µL)
aadA1, *aac(3)-IV*, *sul1*, *blaSHV*, *cat1*, *cmlA*	1 cycle: 94 0C ---------- 8 min. 32 cycle: 95 0C ---------- 60 s 55 0C ---------- 70 s 72 0C ---------- 2 min 1 cycle: 72 0C ---------- 8 min	۵ میلی لیتر PCR buffer 10X ۲/۵ میکرولیتر $Mgcl_2$ ۱ میکرولیترdNTP ۱ میکرولیتر از پرایمرهای F, R ۰/۴ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase ۳ میکرولیتر DNA الگو
tetA, *tetB*, *dfrA1*, *blaCITM*	1 cycle: 94 0C ---------- 8 min. 32 cycle: 95 0C ---------- 60 s 55 0C ---------- 70 s 72 0C ---------- 2 min 1 cycle: 72 0C ---------- 8 min	۵ میلی لیتر PCR buffer 10X ۲/۵ میکرولیتر $Mgcl_2$ ۱ میکرولیترdNTP ۱ میکرولیتر از پرایمرهای F, R ۰/۴ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase ۳ میکرولیتر DNA الگو
qnr	1 cycle: 94 0C ---------- 6 min. 32 cycle: 95 0C ---------- 60 s 55 0C ---------- 70 s 72 0C ---------- 70 s 1 cycle: 72 0C ---------- 5 min	۵ میلی لیتر PCR buffer 10X ۲/۵ میکرولیتر $Mgcl_2$ ۱ میکرولیترdNTP ۱ میکرولیتر از پرایمرهای F, R ۰/۴ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase ۳ میکرولیتر DNA الگو

جدول شماره ۳- خصوصیات بیوشیمیایی *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌های ادراری در بیمارستان پیامبران تهران طی سال ۱۳۹۳

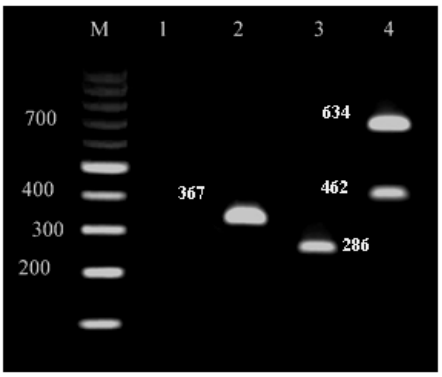
اورنیتین دکربوکسیلاز	لیزین دکربوکسیلاز	اوره	سیترات	VP	MR	SIM	TSI	OF	اکسیداز
منفی	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	اسیدی/اسیدی	اکسیداسیون منفی تخمیر مثبت	منفی

جدول شماره ۴- حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* شده از عفونت‌های ادراری در بیمارستان پیامبران تهران طی سال ۱۳۹۳

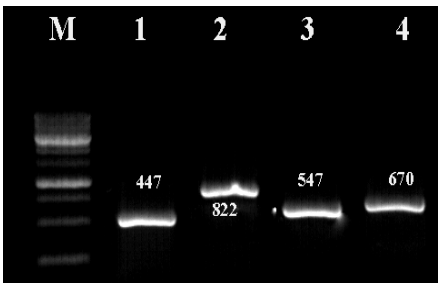
آنتی‌بیوتیک	حساس تعداد (درصد)	نیمه حساس تعداد (درصد)	مقاوم تعداد (درصد)
سفتریاکسون	(۴۶)۲۳	(۱۶)۸	(۳۸)۱۹
سیپروفلوکساسین	(۳۴)۱۷	(۱۲)۶	(۵۴)۲۷
سفازولین	(۷۰)۳۵	(۱۰)۵	(۲۰)۱۰
سفوتاکسیم	(۵۴)۲۷	(۱۴)۷	(۳۲)۱۶
آمیکاسین	(۶۲)۳۱	(۱۲)۶	(۲۶)۱۳
سفتازیدیم	(۸۰)۴۰	(۶)۳	(۱۴)۷
ایمی پنم	(۹۰)۴۵	(۸)۴	(۲)۱
سفپیم	(۸۶)۴۳	(۶)۳	(۸)۴
تتراسیکلین	(۲۰)۱۰	(۸)۴	(۷۲)۳۶
جنتامایسین	(۹۲)۴۶	(۶)۳	(۲)۱

جدول شماره ۵- توزیع ژن‌های کد کننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* شده از عفونت‌های ادراری در بیمارستان پیامبران تهران طی سال ۱۳۹۳

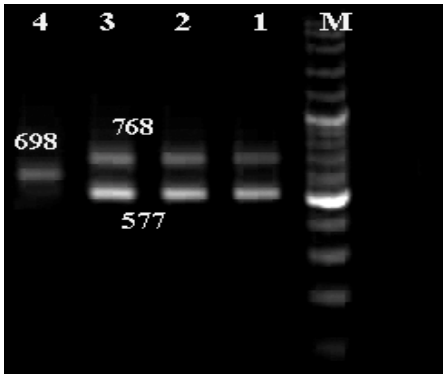
تعداد (درصد)	ژن	آنتی بیوتیک
۱۶ (۳۲)	*aadA1*	استرپتومایسین
۲ (۴)	*aac(3)-IV*	جنتامایسین
۳۰ (۶۰)	*sul1*	سولفانامید
۸ (۱۶)	*blaSHV*	سفالوتین
۸ (۱۶)	*Cat1*	کلرامفنیکل
۱۲ (۲۴)	*cmlA*	کلرامفنیکل
۳۲ (۶۴)	*tetA*	تتراسیکلین
۲۲ (۴۴)	*tetB*	تتراسیکلین
۲۲ (۴۴)	*dfrA1*	تری متوپریم
۱۲ (۲۴)	*CITM*	آمپی سیلین
۱۰ (۲۰)	*qnr*	فلورکوئینولون



تصویر شماره ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به تعدادی از ژن‌های مورد مطالعه (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون ۱= نمونه کنترل منفی، قطعه ۲۸۶ جفت بازی در ستون ۳ مربوط به ژن *aac(3)-IV*، قطعه ۳۶۷ جفت بازی در ستون ۲ مربوط به ژن *dfrA1*، قطعه ۴۶۲ جفت بازی در ستون ۴ مربوط به ژن *CITM*، قطعه ۶۳۴ جفت بازی در ستون ۴ مربوط به ژن *tetB*.



تصویر شماره ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به تعدادی از ژن‌های مورد مطالعه (ستون M= مارکر ۱ کیلو بازی DNA، قطعه ۴۴۷ جفت بازی در ستون ۳ مربوط به ژن *aadA1*، قطعه ۸۲۲ جفت بازی در ستون ۲ مربوط به ژن *sul1*، قطعه ۵۴۷ جفت بازی در ستون ۳ مربوط به ژن *cat1*، قطعه ۶۷۰ جفت بازی در ستون ۴ مربوط به ژن *qnr*.



تصویر شماره ۳- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به تعدادی از ژن‌های مورد مطالعه (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، قطعه ۷۶۸ جفت بازی در ستون‌های ۱-۳ مربوط به ژن *blaSHV*، قطعه ۵۷۷ جفت بازی در ستون‌های ۱-۳ مربوط به ژن *tetA*، قطعه ۶۹۸ جفت بازی در ستون ۴ مربوط به ژن *cmlA*.

بحث

در دنیا سالیانه ۱۵۰ میلیون نفر به عفونت‌های ادراری مبتلا می‌شوند و شیوع این عفونت‌ها در خانم‌ها ۱۰ برابر آقایان است. سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان ایزوله‌های کسب شده از جامعه و بیمارستان رو به افزایش است و این امر یک مشکل بزرگ و جهانی می‌باشد [۲۳،۲۲]. مطالعه حاضر روی *کلبسیلا پنومونیه* ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری صورت گرفت که ایزوله‌های جدا شده بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به تتراسیکلین نشان دادند. در مطالعه‌ای که توسط Rijavec و همکاران در اسلووانی و در سال ۲۰۰۶ روی سویه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت‌های ادراری انجام گرفت، بیش‌ترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین، تتراسیکلین و کلرامفنیکل بود [۲۴]. در مطالعه‌ای که در کشور هند توسط Tsering و همکاران طی سال‌های ۲۰۰۷ تا ۲۰۰۸ انجام شد، فراوانی نسبی کلبسیلاهای جدا شده از عفونت-های ادراری بیمارستانی ۵۷ درصد گزارش شد. در این مطالعه میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول ۷۵ درصد، سیپروفلوکساسین ۵۲ درصد و جنتامایسین ۴۵ درصد بود [۲۵]. کم‌ترین مقاومت ایزوله‌های *کلبسیلا* در مطالعه حاضر نسبت به جنتامایسین و ایمی‌پنم بود که این امر نشان می‌دهد در حال حاضر این دو آنتی‌بیوتیک داروهای موثر روی *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری می‌باشند. نتایج برخی مطالعات مشابه نیز نشان می‌دهد طی سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ کم‌ترین میزان مقاومت در میان سویه‌های *کلبسیلا* نسبت به ایمی‌پنم بوده است [۲۸-۲۶]. در مطالعه SoltanDalal و همکاران در شهر تهران [۲۹]، Amin و همکاران در کشور پاکستان [۳۰]، Ishii در کشور ژاپن [۳۱] و Al-shara و همکاران در کشور اردن [۳۲] نیز آنتی-بیوتیک ایمی‌پنم به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک موثر در درمان باکتری *کلبسیلا پنومونیه* معرفی شده است. بنابراین، مقایسه نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده هم‌خوانی نتایج به‌دست آمده با این مطالعات می-باشد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ در کشور چین به‌عمل آمد، نتایج نشان داد ایمی‌پنم و جنتامایسین موثرترین آنتی‌بیوتیک هستند که با نتایج به‌دست آمده با این مطالعه هم‌خوانی دارد و هم‌چنین نتایج نشان داد که سفوتاکسیم با ۹۶/۸ درصد مقاومت کم‌اثرترین آنتی‌بیوتیک است، ولی در مطالعه حاضر تتراسیکلین با ۷۲ درصد مقاومت کم‌اثرترین آنتی‌بیوتیک گزارش شد و تنها ۳۲ درصد از ایزوله‌ها به سفوتاکسیم مقاوم بودند که با نتایج به‌دست آمده با این مطالعه هم‌خوانی ندارد [۳۳]. سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان سویه‌های ایجاد کننده عفونت‌های دستگاه ادراری از کشوری به کشور دیگر متغیر است و از دلایل ایجاد این تفاوت‌ها می‌توان به

شرایط جغرافیایی، شیوه زندگی و نحوه تجویز آنتی‌بیوتیک اشاره کرد. معمولا حضور ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی عامل اصلی بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های باکتری است. نتایج PCR برای شناسایی تعدادی از ژن‌های ایجادکننده مقاومت آنتی-بیوتیکی در ۵۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* نشان داد که در مجموع ۲۷ مورد از ایزوله‌ها از نظر حضور ژن‌های *tetA* و *tetB* مثبت بودند. و شیوع این ژن‌ها باتوجه به نتایج به‌دست آمده در این بررسی ۶۴ و ۴۴ درصد بود. در یک مطالعه انجام شده در ایران روی ۱۲۱ سویه *اشریشیا کلی* ایزوله شده از نمونه‌های ادرار افراد مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه، ژن‌های کدکننده مقاومت پادزیستی علیه جنتامایسین (۹۶/۷ درصد)، بتالاکتام‌ها (به‌ترتیب ۹۰/۳ و ۸۸/۷ درصد) و تتراسیکلین (۸۲/۲ درصد) بیشترین فراوانی را در جدایه‌های باکتری داشتند [۳۴]. در یک مطالعه انجام شده در بیمارستان‌های ترکیه طی سال ۲۰۰۵ روی ایزوله‌های آنتروباکتر-یاسه مولد بتالاکتاماز، شایع‌ترین ژن‌های جدا شده *SHV-1* و *SHV-5* بودند [۳۵]. در مطالعه‌ای که توسط خورشیدی و همکاران در سال ۱۳۸۸ در کاشان انجام گرفت، مشخص گردید که از ۳۲ ایزوله کلبسیلا مورد بررسی، ۵۰ درصد ژن *SHV-1* و ۳۷/۵ درصد ژن *TEM-1* را داشتند [۳۶]. مطالعه ما شیوع ۲۰ درصد ژن *qnr* در میان ۵۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* را نشان داد که در مقایسه با مطالعه دیگر محققان که در ایران (۵۱/۷ درصد)، مراکش (۵۰ درصد) و چین (۶۵/۵ درصد) بودند، شیوع کمتری را نشان داد [۳۷]. در مطالعه Shibl و همکاران در سال ۲۰۱۲ در عربستان از ۶۰ نمونه بالینی، ۳۹ مورد حامل ژن بتالاکتامازی و ۱۲ مورد حامل ژن کرباپنماز بودند [۳۸] و هم‌چنین مقاومت چند دارویی در ایزوله‌هایی که حامل چند ژن بتالاکتاماز بودند، گزارش شد [۳۸]. در مطالعه Teo و همکاران در سال ۲۰۱۱ در سنگاپور مقاومت علیه سفالوسپورین‌های نسل سوم و متولاکتام مشاهده شد و بیشترین مقاومت‌های چنددارویی مرتبط با *کلبسیلا پنومونیه* و *اشریشیا کلی* بود [۳۹]. مصرف بیش از حد و طولانی مدت سفالو-سپورین‌های وسیع‌الطیف یکی از علل پیدایش سویه‌های مقاوم به بتالاکتام است که براساس بسیاری از گزارشات شیوع این ارگانیسم‌ها از طریق به‌کارگیری روش‌های کنترل عفونت و محدود کردن استفاده از سفالوسپورین‌ها کاهش می‌یابد [۳۹،۳۸]. در مطالعه ما میزان فراوانی ایزوله‌های مقاوم به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف ۲۳ درصد بود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان از افزایش مقاومت سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین و سیپروفلو-کساسین دارد که شاید علت آن مصرف بی‌رویه این آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. هم‌چنین، شیوع ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بیماران بستری بیانگر انتشار گسترده سویه‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در بیمارستان می‌باشد. باتوجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، تشخیص سریع و به‌موقع سویه‌های مقاوم به‌منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از زحمات مدیریت محترم بخش عفونی بیمارستان مورد مطالعه و کارشناس محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد جناب آقای مهندس محمد ربیعی تشکر و قدردانی می‌کنند.

References:

[1] Kim JM, Park ES, Jeong JS, Kim KM, Kim JM, Oh HS, et al. Multicenter surveillance study for nosocomial infections in major hospitals in Korea. Nosocomial Infection Surveillance Committee of the Korean Society for Nosocomial Infection Control. ***Am J Infect Control*** 2000; 28(6): 454-8.

[2] Larypoor M, Frsad S. Evaluation of nosocomial infections in one of hospitals of Qom, 2008. ***Iran J Med Microbiol*** 2011; 5(3): 7-17. [in Persian]

[3] Sefton AM. The impact of resistance on the management of urinary tract infections. ***Int J Antimicrob Agents*** 2000; 16(4): 489-91.

[4] Ahanjan M, Haghshenas MR, Naghshvar F, Bairamvand E. Survey and detect of bacteria caused UTI in patients referring to the Imam Khomeini hospital in Sari city 1388-89. ***J Mazand Univ Med Sci*** 2013; 22(Suppl 1): 82-6. [in Persian]

[5] Yankowitz J, Niebyl JR. Drug therapy in pregnancy. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 63-72.

[6] DelzellJr JE, Lefevre ML. Urinary tract infections during pregnancy. ***Am Fam Physician*** 2000; 61(3): 713-20.

[7] Falade AG, Ayede AI. Epidemiology, etiology and management of childhood acute community-acquired pneumonia in developing countries--a review. ***Afr J Med Med Sci*** 2011; 40(4): 293-308.

[8] Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. ***Korean J Intern Med*** 2012; 27(2): 128-42.

[9] Lu PL, Liu YC, Toh HS, Lee YL, Liu YM, Ho CM, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: 2009-2010 results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). ***Int J Antimicrob Agents*** 2012; 40 Suppl: S37-43.
[10] Gootz TD. The global problem of antibiotic resistance. ***Crit Rev Immunol*** 2010; 30(1): 79-93.
[11] Jalalpoor SH, KasraKermanshahi R, Nouhi AS, ZarkeshIsfahani H. Comparing the frequency of β-lactamase enzyme in isolated nosocomial infectious bacteria. ***JRMS*** 2009; 8(3): 203-14. [in Persian]
[12] Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. ***Trends Microbiol*** 2007; 15(7): 301-9.
[13] Lapierre L, Cornejo J, Borie C, Toro C, San Martín B. Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and class 2 integrons in commensal strains of *Escherichia coli* isolated from poultry and swine. ***Microb Drug Resist*** 2008; 14(4): 265-72.
[14] Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. New York: Saunders; 2014.
[15] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; 20th informational supplement. CLSI/NCCLS M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa; 2010.
[16] Forbes AB, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 12th ed. Philadelphia. Mosby; 2007. p. 236-40, 365-584.
[17] Liu Y, Liu C, Zheng W, Zhang X, Yu J, Gao Q, et al. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S–23S internal transcribed spacer. ***Int J Food Microbiol*** 2008; 125(3): 230–5.
[18] Van TT, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ. Safety of rawmeat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. ***Int J Food Microbiol*** 2008; 124(3): 217-23.
[19] Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJ, Woodward MJ. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-fiveserotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. ***J Antimicrob Chemother*** 2004; 53(2): 208-16.
[20] Toro CS, Farfán M, Contreras I, Flores O, Navarro N, Mora GC, et al. Geneticanalysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant *Shigella* strains isolated from Chileanchildren. ***Epidemiol Infect*** 2005; 133(1): 81-6.
[21] Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2005; 49(1): 71-6.
[22] Stanton SL, Dwyer PL. Urinary tract infection in female. 1st ed. London: Marlin Duntize; 2000. p. 304.
[23] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Perinatal group B streptococcal disease after universal screening recommendations. United States, 2003-2005. ***MMWR Morb Mortal Wkly Rep*** 2007; 56(28): 701-5.
[24] Rijavec M, StarcicErjavec M, Ambrozic Avgustin J, Reissbrodt R, Fruth A, Krizan-Hergouth V, et al. High prevalence of multidrug resistance and ran dom distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. ***Curr Microbiol*** 2006; 53(2): 158–62.
[25] Tsering DC, Das S, Adhiakari L, Pal R, Singh TS. Extended Spectrum Beta-lactamase Detection in Gram-negative Bacilli of Nosocomial Origin. ***J Glob Infect Dis*** 2009; 1(2): 87-92.
[26] Mathai E, Grape M, Kronvall G. Integrons and multidrug resistance among *Escherichia coli* causing communityacquired urinary tract infection in southern India. ***APMIS*** 2004; 112(3): 159–64.
[27] Gulsun S, Oguzoglu N, Inan A, Ceran N. The virulence factors and antibiotic sensitivities of *Escherichia coli* isolated from recurrent urinary tract infections. ***Saudi Med J*** 2005; 26(11): 1755–58.
[28] Tariq N, Jaffery T, Ayub R, Alam AY, Javid MH, Shafique S. Frequency and antimicrobial susceptibility of aerobic bacterial vaginal isolates. ***J Coll Physicians Surg Pak*** 2006; 16(3): 196–99.
[29] SoltanDalal MM, Miremadi S, SharifyYazdi M K, RastegarLari A, Rajabi Z, AvadisYans S. Antimicrobial Resistance Trends Of *Klebsiella* Spp. Isolated From Patients In Imam Khomeini Hospital. ***J Payavard Salamat*** 2012; 6(4): 275-81. [in Persian]
[30] Amin A, Ghumro PB, Hussain S, Hameed A. Prevalence of antibiotic resistance among clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* isolated from a Tertiary Care Hospital in Pakistan. ***Malays J Micro*** 2009; 5(2): 81-6.
[31] Ishii Y, Alba J, Kimura S, Shiroto K, Yamaguchi K. Evaluation of antimicrobial activity of Blactam antibiotics using E-test against clinical isolates from 60 medical centers in Japan. ***J Antimicrob Agent*** 2005; 25(4): 296-301.
[32] Al Shara MA. Emerging Antimicrobial Resistance of *Klebsiella pneumonia* strains Isolated from Pediatric Patients in Jordan. ***Iraqi J Med*** 2011; 7(2): 29-32.
[33] Du J, Li P, Liu H, Lü D, Liang H, Dou Y. Phenotypic and molecular characterization of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university teaching hospital, China. ***PloS One*** 2014; 9(4): e95181.

[34] Dormanesh B, Mirnejad R, Khodaverdi Dariyan E, Momtaz H, Yahaghi E, Safarpour Dehkordi F, et al. Characterization and study the antibiotic resistance of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pediatrics with pyelonephritis and cystitis in Iran. ***Iran J Med Microbiol*** 2013; 7(2): 27-39.
[35] Machado E, Coque TM, Canton R, Novais A, Sousa JC, Baquero F, et al. Portuguese Resistance Study Group. High diversity of extended-spectrum betalactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. ***J Antimicrob Chemother*** 2007; 60(6): 1370-74.
[36] Khorshidi A, Moazen Z, Rohani M, Moniri R, shagari GH. Prevalence of *TEM* and *SHV1* genes in *Kelebsiella pneumoniea* with ESBL. ***J Mil Med*** 2009; 3(11): 153-49. [in Persian]
[37] Shams E, Firoozeh F, Moniri R, Zibaei M. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Human Isolates in Iran. ***J Pathog*** 2015; 2015: 434391.
[38] Shibl A, Al-Agamy M, Memish Z, Senok A, Khader SA, Assiri A. The emergence of OXA-48- and NDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. ***Int J Infect Dis*** 2013; 17(12): 1130–3.
[39] Teo J, Ngan G, Balm M, Jureen R, Krishnanb P, Lina R. Molecular characterization of NDM-1producing Enterobacteriaceae isolates in Singapore hospitals. ***Western Pac Surveill Response J*** 2012; 3(1): 19-24.