

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, *blaCTX-M* (55.3 %) was the most prevalent, followed by *blaTEM* (41.5 %) and *blaSHV* (10.7 %). The results showed that 1.5 % of the isolates had concurrently *blaTEM*/ *blaSHV* and *blaSHV*/ *blaCTX-M* genes and 21.6% of isolates the *blaTEM*/ *blaCTX-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.

شناسایی مولکولی بتالاکتامازهای SHV و TEM در ایزوله‌های کلپسیلا پنومونیه جدا شده از دستگاه تنفسی بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های آموزشی تهران

*^۱ زهرا سروش ، مریم قانع

خلاصه:

سابقه و هدف: ایزوله‌های کلپسیلا پنومونیه مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL)، Extended-spectrum beta-lactamases؛ در بیمارستان‌ها افزایش یافته و نتیجه آن محدود شدن گزینه‌های درمانی است. هدف از این مطالعه ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و بررسی حضور ژن‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف در ایزوله‌های کلپسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بود.

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

نتایج: اغلب ایزوله‌ها نسبت به کوتیریموکسازول (۷۲٪ درصد)، جتابامایسین (۶۷٪ درصد) و آمپیسیلین (۶۹٪ درصد) مقاوم بودند و بیشترین حساسیت نسبت به سپروفلوكسازین (۵۰٪ درصد)، تتراسایکلین (۴۹٪ درصد)، ایمپن (۴۶٪ درصد) و سفتریاکسون (۴۳٪ درصد) بود. از بین ژن‌های تولیدکننده ESBL، blaCTX-M (۵۵٪ درصد) شایع‌ترین ژن بود و بعد از آن blaTEM (۴۱٪ درصد) و blaSHV (۱۰٪ درصد) بودند. نتایج نشان داد که ۱/۵ درصد ایزوله‌ها ژن‌های blaTEM/blaCTX-M و blaSHV را به طور هم‌زمان دارا بودند و ۲۱/۶ درصد ایزوله‌ها ژن‌های blaTEM/blaCTX-M را داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه شیوع بالایی از ایزوله‌های کلپسیلا 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 تأکید دارد.

وازگان کلیدی: کلپسیلا پنومونیه، عوامل ضد میکروبی، بخش مراقبت‌های ویژه، بتالاکتاماز، مالتی‌پلکس PCR

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

در طی دو دهه اخیر افزایش چشمگیری در زمینه تولید بتالاکتامازها و شیوع انتروباکتریاسه‌های تولید کننده ESBL وجود داشته است [۱،۲]. نکته مهم اینکه عفونت با پاتوژن‌های تولید کننده ESBL اغلب همراه با شکست درمان، طولانی‌تر شدن زمان بسترهای، نرخ بالای مرگ‌ومیر و هزینه‌های بالای درمان همراه است [۳]. به علاوه، همانند عفونت‌های بیمارستانی، در جامعه نیز انتشار وسیعی از انتروباکتریاسه‌های تولید کننده ESBL وجود دارد که نتیجه آن بحران سلامت جهانی است [۴]. ژن‌های ESBL اغلب روی پلاسمید قرار دارند [۵] 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 آرترئونام، به جز سفامامایسین‌ها یا کاربپن، 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 [۶]. در سال ۱۹۹۰ انتروباکتریاسه‌های تولید کننده ESBL شامل اشریشیاکلی و کلپسیلا پنومونیه به طور عمده به عنوان اعضای خانواده TEM و

مقدمه

ظهور انتروباکتریاسه‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL)، Extended-spectrum beta-lactamases؛ به ویژه اشریشیاکلی و کلپسیلا پنومونیه تهدید جدی برای سلامت انسان محسوب می‌شود. در حال حاضر این میکرووارگانیسم‌ها در میان ۶ پاتوژن مقاوم به دارو که برای آن‌ها داروهای موثر کمی وجود دارد، قرار می‌گیرند [۷]. اولین مورد ESBL در سال ۱۹۸۰ در اروپا و بعد از آن در آمریکا و پس از معرفی نسل سوم سفالوسپورین‌ها گزارش شد [۸].

^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

* لشانی نویسنده مسئول:

اسلامشهر، میدان نماز، خیابان صیاد شیرازی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر

تلفن: ۰۲۱۵۶۳۶۰۴۶۸ | دورنیش: ۰۹۱۲۵۱۳۳۸۱۵ | پست الکترونیک: maryamghaneh@yahoo.com

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

و تست‌های بیوشیمیابی نظیر ایندول، متیل رد، وزس پروسکوثر، 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 ایزوله

سنجد حساسیت ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به آنتی‌بیوتیک 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 سپیروفلوکسازین (μg)_۵، تتراسایکلین (μg)_{۳۰}، کوتريموکساز-زول (μg)_{۲۵}، سفتریاکسون (μg)_{۳۰}، آمپیسیلین (μg)_{۱۰}، آیمی‌پنم (μg)_{۱۰}، و جنتامیسین (μg)_{۱۰} (شرکت Rosco، دانمارک) بودند. آزمون آنتی‌بیوگرام با استفاده از سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی و مقایسه دورت آن با نیمکفارلندر انجام شد. سوسپانسیون تهیه شده با استفاده از سواب استریل روی پلیت حاوی محیط کشت مولرهیتون‌آگار (Merk، آلمان) به صورت متراکم کشت داده شد و پس از قرار دادن دیسک‌ها روی سطح محیط کشت، پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم‌گذاری 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 blaCTX-M، blaSHV و blaTEM

تمامی ایزوله‌ها از لحاظ حضور ژن‌های blaCTX-M و blaSHV و blaTEM مورد آزمایش قرار گرفتند. برای تهیه ژنومی، یک کلونی منفرد از هریک از ایزوله‌ها در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به صورت 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 blaCTX-M، blaSHV، blaTEM و blaTEM انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های فوق و نیز طول قطعه حاصل از PCR در جدول شماره ۱ آمده است.

معرفی شدند [۸]. بعد از آن در سال ۲۰۰۰ کلبسیلا پنومونیه به عنوان اصلی‌ترین تولید کننده SHV و TEM شناخته شد [۹]؛ با این وجود اشریشیاکای تولید کننده ESBL با ژنوتیپ CTX-M شایع‌ترین ایزوله‌ها در کشورهای غربی و آسیایی هستند [۹]. ارگانیسم‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از لحاظ بالینی بسیار با اهمیت هستند، زیرا الگوی مقاومت دارویی گسترده‌ای از خود نشان می‌دهند و باعث افزایش مرگ و میر بیماران به ویژه 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. به علاوه، ماهیت متحرك بودن ژن‌های ESBL می‌تواند به انتشار آنها دامن زده و سبب ایجاد ایزوله‌های شود که به طور هم‌زمان چندین ژن مقاومت را حمل می‌کنند. پیامد این عوامل، افزایش روزافرون ایزوله‌های مولد بتالاکتام‌ز در بخش‌های مختلف بیمارستان و به ویژه بخش مراقبت‌های مولد می‌باشد [۱۰-۱۳]. با توجه به شیوع روزافرون باکتری‌های مولد ESBL و اهمیت این ایزوله‌ها در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و متعاقب آن شکست درمان، مطالعه الگوی ژن‌های مولد ESBL به ویژه در میان باکتری‌های ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی ضروری می‌باشد. تعیین ژن‌های شایع blaSHV مانند blaCTX-M و blaTEM 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 به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌گذاری شدند. ایزوله‌ها با استفاده از روش‌های متداول بیوشیمیابی و میکروبیولوژی شناسایی و تایید شدند. برای شناسایی ایزوله‌های کلبسیلا از روش رنگ‌آمیزی گرم

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

منابع	توالی پرایمر(۳'→۵')	طول قطعه (bp)	ژن هدف
[۱۷]	F: ۵'-ATGCGTTATTCGCCTGTG-3' R: ۵'-TGCTTGTATTGGGCCAA-3'	۷۴۷	<i>blaSHV</i>
[۱۸]	F: ۵'-TCGCCGCATAACTATTCTCAGAATGA-3' R: ۵'-ACGCTCACCGGCTCCAGATTAT-3'	۴۴۵	<i>blaTEM</i>
[۱۹]	F: ۵'-ATGTGCAGCACCAAGTAAAGTGTGGC-3' R: ۵'-TGGTAAAGTAAGTGTGACCAGAACATCAGCGG-3'	۵۹۳	<i>blaCTX-M</i>

شماره ۲). ایزوله‌های کلیسیلا پنومونیه حاصل از این تحقیق حساسیت مشابهی را نسبت به سیروفلوکسازین، آیمی‌پنم و ترا-ساپلین نشان دادند؛ در مقایسه، نسبت ایزوله‌هایی که به کوترا-یموکسازول حساسیت داشتند، به طور معنی‌داری پایین‌تر بود ($P<0.05$).

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

آنتی‌بیوتیک	حساس	نیمه حساس	مقاوم
تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
تراسایپلین	۳۲	۴۹/۲	(۲۵/۴) ۲۵
کوتريموکسازول	۸	۴۹/۲	(۱۲/۴) ۱۰
سفتریاکسون	۲۸	۴۳/۱	(۷۲/۳) ۴۷
سیروفلوکسازین	۳۳	۵۰/۸	(۹/۲) ۲۶
جنتامایسین	.	۳۲/۳	(۴۷/۷) ۴۴
آمیپسیلین	۱۲	۱۸/۴	(۱۲/۴) ۴۵
آیمی‌پنم	۳۰	۴۶/۳	(۱۵/۳) ۲۵

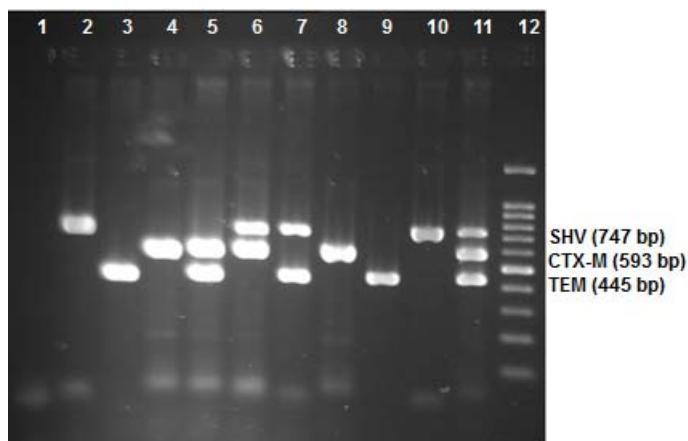
نتایج حاصل از PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های *blaSHV* و *blaTEM* و *blaCTX-M* در شکل شماره ۱ آمده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، اندازه ژن‌های *blaSHV* و *blaTEM* و *blaCTX-M* به ترتیب ۷۴۷، ۵۹۳ و ۴۴۵ جفت باز می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از مجموع ۵۵/۳ نمونه بالینی، ۲۱/۵ درصد جدایه‌ها دارای ژن *blaTEM* درصد جدایه‌ها دارای ژن *blaCTX-M* و ۱۰/۷ درصد جدایه‌ها نیز دارای ژن *blaSHV* بودند. بعلاوه، برخی از جدایه‌ها نیز بیش از یک ژن مقاومت داشتند؛ به طوری که فراوانی ژن *-blaTEM/blaSHV* و نیز *-blaSHV/blaCTX-M* به میزان ۱/۵ درصد و فراوانی ژن *blaTEM/blaCTX-M* به میزان ۲۱/۶ درصد بود. توزیع فراوانی هر کدام از ژن‌ها در شکل شماره ۲ ذکر شده است.

واکنش PCR با استفاده از ۲ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر محلول dNTP، ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۰/۸ میکرولیتر از پرایم-های هر سه ژن، ۵ میکرولیتر DNA ژنومی (۵۰ نانوگرم)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز و آب م قطره دوبار نقطیر تا حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. برنامه زمانی PCR شامل ۹۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل)، ۹۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه (۳۰ سیکل) و در نهایت ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت 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 برومايد (Sigma-Aldrich، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت [۱۴]. در این مطالعه سویه استاندارد کلیسیلا پنومونیه ATCC 700603 به عنوان کنترل مثبت و سویه استاندارد اشربیشایکلی ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی انتخاب شدند [۲۰]. تمام سویه‌های استاندارد از گنجینه باکتریایی دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند.

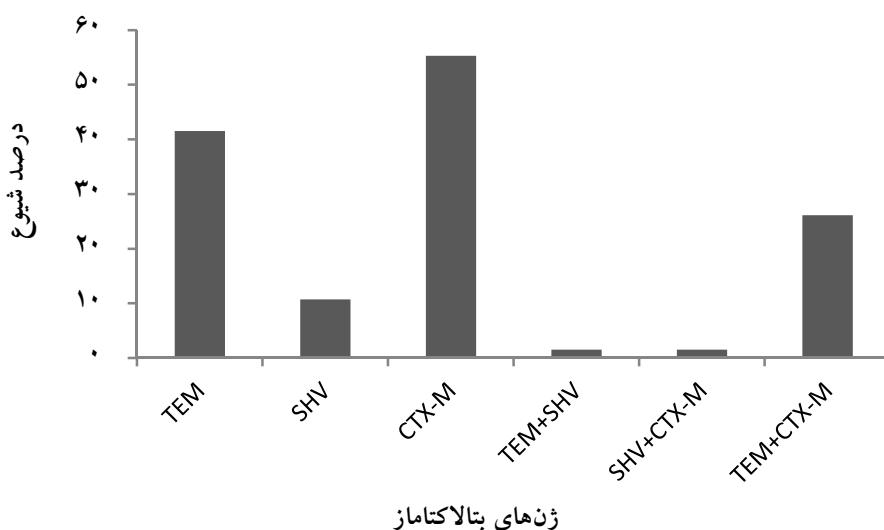
تجزیه و تحلیل آماری
تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون مجذور کای و با استفاده از نرمافزار SPSS ویرایش ۲۰ صورت گرفت. سطح معنی‌داری <0.05 جهت تفسیر داده‌ها استفاده شد.

نتایج

در این تحقیق ۶۵ ایزوله کلیسیلا پنومونیه از نمونه‌های تنفسی بیماران بستری در بخش مراقبتهای ویژه جدا شد. متوسط سن افراد مورد مطالعه $45\pm9/8$ سال بود. از ۶۵ بیمار مورد مطالعه، ۶۰ 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



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



شکل شماره ۲- فراوانی ژن‌های بتالاکتماز در ایزوله‌های کلپسیلا پنومونیه با روش مالتی پلکس PCR

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 بدست آمده در این تحقیق هم حساسیت نسبتاً بالایی نسبت به ایمی‌پنم نشان دادند (۴۶/۳ درصد؛ این در حالی است که در مطالعه درخشان و همکاران (۲۰۱۳) در تهران، تمام ایزوله‌های کلپسیلا پنومونیه جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه، به استثنای یک ایزوله، نسبت به ایمی‌پنم حساس بودند [۲۴] و در مطالعات انجام شده توسط آرچن و همکاران (۲۰۱۴) در شیراز نیز ۹۸/۳۴ درصد ایزوله‌های کلپسیلا 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)

بحث

ایزوله‌های کلپسیلا پنومونیه مولد بتالاکتمازهای 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 سپروفلوکسازین و تتراسایکلین و بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتور-یموکسازول و آمپیسیلین مشاهده شد. میین و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که در بین ایزوله‌های کلپسیلا پنومونیه جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان کودکان در تبریز، بیشترین مقاومت نسبت به کاربینی‌سیلین وجود دارد و همانند نتایج حاصل از مطالعه حاضر، سپروفلوکسازین را به عنوان موثرترین آنتی‌بیوتیک گزارش کردند [۲۲]. در مطالعه طالبی و همکاران (۲۰۰۹) روی ایزوله‌های کلپسیلا پنومونیه جدا شده از بخش مراقبت‌های

لطیفپور و همکاران (۲۰۱۶) در شهر کرد 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 کلیسیلا پنومونیه جمع‌آوری شده از بیماران بستری به ترتیب $\frac{73}{4}$ و $\frac{21}{8}$ درصد گزارش شد [۳۴]. هم‌چنان، گزارشات نشان داده است که میزان شیوع ژن‌های *blaSHV* در انترباکتریاسه‌های جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های دوچه قطر بین سال‌های ۲۰۱۲–۲۰۱۳ به ترتیب $\frac{53}{2}$ و $\frac{40}{4}$ 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 کلیسیلا پنومونیه نشان داد. در بین ایزوله‌ها، ژن‌های *blaCTX-M/blaTEM* بیشترین فراوانی را داشتند، ولی فراوانی ژن‌های *blaSHV/blaTEM* و *blaSHV* در *blaCTX-M/blaTEM* بسیار پایین‌تر بود. در مطالعه آرچین و همکاران (۲۰۱۴) در شیراز، فراوانی ژن‌های *blaTEM* و *blaSHV* در مطالعه آرچین و همکاران (۲۰۱۳) که اگرچه شیوع بیشتری دارد، ولی تا حدودی با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. این در حالی است که در مطالعه پیمانی و همکاران (۲۰۱۳) در قزوین، فراوانی ژن‌های *blaSHV* در ایزوله‌های کلیسیلا هم‌زمان با *blaTEM* و *blaCTX-M* درصد و فراوانی *blaTEM* و *blaSHV* پنومونیه در مطالعه آرچین و همکاران می‌باشد [۳۱]. مطالعات آینده روی تعداد بیشتری از ایزوله‌ها می‌تواند در درک الگوی ژنتیکی ایزوله‌های کلیسیلا پنومونیه مولد ESBL سودمند باشد.

نتیجه‌گیری

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

در اردن [۲۷]، Ishii و همکاران (۲۰۰۵) در کشور ژاپن [۲۸] و Bratu و همکاران (۲۰۰۵) در آمریکا [۲۹] نیز آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم به عنوان یک آنتی‌بیوتیک موثر در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری کلیسیلا پنومونیه معرفی شده است. در اکثر موارد به علت استفاده بی‌رویه 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 می‌باشند. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که موثرترین آنتی‌بیوتیک برای ایزوله‌های کلیسیلا پنومونیه سپروفلوکساسین و ایمی‌پنم می‌باشد. فلنذ، بهتر است در درمان اولیه این عفونت از آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، تراسیکلین و آمبی‌سیلین کمتر استفاده شود، زیرا نتایج بیان کننده میزان بالای مقاومت باکتری کلیسیلا پنومونیه در نمونه‌های بالینی جدا شده نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. بررسی مولکولی ایزوله‌های مورد آزمایش از لحاظ وجود ژن‌های *blaCTX-M* و *blaSHV* نشان داد که ژن *blaCTX-M* بیشترین فراوانی را دارد و پس از آن ژن‌های *blaSHV* و *blaTEM* قرار دارند. این در حالی است که در مطالعه فیض آبادی و همکاران (۲۰۱۰) روی ایزوله‌های کلیسیلا پنومونیه جدا شده از بیمارستان لبافی نژاد، شیوع ژن *blaSHV* بالاتر بوده (۶۷/۴ درصد) و پس از آن شیوع ژن‌های *blaTEM* (۵۴ درصد) و *blaCTX-M* (۴۶/۵۱ درصد) قرار داشت [۳۰]. در مطالعه انجام شده روی ایزوله‌های کلیسیلا پنومونیه جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه در بیمارستان نمازی شیراز فراوانی ژن *blaTEM* (۳۸/۳۴ درصد) گزارش شد که تقریباً با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌خوانی دارد، در حالی که شیوع ژن *blaCTX-M* بسیار پایین‌تر (۳/۳۲ درصد) از نتایج حاصل از این تحقیق و تحقیق فیض آبادی و همکاران در بیمارستان لبافی نژاد بود [۱۳]. هم‌چنان، پیمانی و همکاران (۲۰۱۳) فراوانی ژن‌های *blaTEM* و *blaSHV* را در ایزوله‌های کلیسیلا پنومونیه جدا شده از بیمارستان‌های شهر قزوین، به ترتیب 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 *blaTEM* در ایزوله‌های بالینی کلیسیلا پنومونیه ۴۱/۹ درصد گزارش شد که با نتایج حاصل از این تحقیق کاملاً مطابقت دارد، در حالی که شیوع ژن *blaSHV* (۵۴/۸ درصد) و بسیار بالاتر از نتایج حاصل از این تحقیق بود [۳۲]. هم‌چنان، ژن *blaSHV* در ایزوله‌های بالینی کلیسیلا پنومونیه که توسط

اسلامشهر بدلیل فراهم آوردن شرایط لازم برای اجرای این پژوهش،
کمال تشکر را دارند.

تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی واحد

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 Antimicrob Chemother* 2005; 56: 451–4.
- [3] Yezli S, Shibli 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 Clin 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 susceptibility 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 genotypic 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, Sabzevali F. Relation between bla_{TEM}, bla_{SHV} and bla_{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.

- [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 infection in ICU patient: 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) patients 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, Moaty 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, Açık 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.