NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.9/35 , 2019

Scan online to view this article

dentifying antibiotic resistance genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing *IMP-1* and *TEM* β-lactamase

Leila Goodarzi[1] ,Reza Yari[1] ,Mohsen Mirzaei[2*]

1-Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran.
2- Department of Laboratory Sciences, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

Abstract

Aim and Background: *Klebsiella pneumoniae* is a common cause of β-lactamase-associated infections in hospitals. The present study aimed to determine the frequency of antibiotic resistance genes in *Klebsiella pneumoniae* strains producing IMP-1 and TEM β-lactamase.

Materials and methods: The present research identified 94 samples of *K. pneumoniae, using* antibiogram for the phenotypic confirmation of ESBLs. The antibiotic resistance of the isolates and the prevalence of *TEM* and *IMP-1* genes were determined using PCR method.

Findings: Of 94 samples, 77.6% were ESBL-positive and 22.3% ESBL-negative. A total of 4.1% of the samples carried the *IMP-1* gene and 43.8% the *TEM* gene, while 43.8% of the samples carried both genes.

Conclusion: Given that *TEM* and *IMP-1* genes were commonly present in a large number of the resistant samples, physicians are recommended to use therapeutic measures properly, and to prescribe antibiotics rationally.

Keywords: *Klebsiella pneumonia*, Extended-Spectrum Betalactamase (ESBL), *TEM, IMP-1*, Antibiotic Resistance.

Corresponding author:
Department of Laboratory Sciences, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran.

Email: mirzaei.iaub@gmail.com

www.SID.ir

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۹ - شماره ۳۵ - تابستان ۱۳۹۸
مقاله تحقیقی
Archive of SID

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

شناسایی ژن‌های مولد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های بالینی *کلبسیلاپنومونیه* تولید کننده بتالاکتاماز *IMP-1* و *TEM*

لیلا گودرزی[۱]، رضا یاری[۱]، محسن میرزایی[۲*]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
۲- گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *کلبسیلاپنومونیه* از عوامل شایع عفونت های ناشی از آنزیم‌های بتالاکتامازی در بیمارستان‌ها است. هدف از این مطالعه تعیین میزان فراوانی ژن‌های مولد مقاومت آنتی‌بیوتیکی *TEM* و *IMP-1* در سویه‌های *کلبسیلاپنومونیه* است.

مواد و روش‌ها: ۹۴ نمونه *کلبسیلاپنومونیه* جهت تأیید فنوتیپی ESBLs مورد استفاده قرار گرفتند. میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها مشخص و میزان شیوع ژن‌های *TEM* و *IMP-1* با روش واکنش PCR تعیین شدند.

یافته‌ها: ۷۷/۶٪ جدایه‌ها دارای فنوتیپ ESBL و ۲۲/۳٪ نمونه‌ها فاقد فنوتیپ ESBL بودند. نتایج نشان داد که ۴/۱٪ نمونه‌ها دارای ژن *IMP-1* و ۴۳/۸٪ نمونه‌ها دارای ژن *TEM* هستند. ۴۳/۸٪ نمونه‌ها نیز به‌طور مشترک واجد هر دو ژن *TEM* و *IMP-1* بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه‌به این‌که ژن‌های *TEM* و *IMP-1* به‌طور مشترک در تعداد زیادی از نمونه‌های مقاوم وجود داشتند، استفاده از راه‌کارهای درمانی مناسب، تجویز درست و منطقی آنتی‌بیوتیک‌ها توسط پزشکان در این زمینه پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: *کلبسیلاپنومونیه*، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، *TEM*، *IMP-1*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی.

مقدمه

کلبسیلاپنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*) باکتری گرم منفی و عامل *پنومونی*، سپسیس، عفونت‌های دستگاه ادراری و یکی از مهم‌ترین عوامل شناسایی شده در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی است (۱۶). عفونت‌های بیمارستانی یکی از مشکلات مطرح پزشکی در کشورهای توسعه یافته و نیز در حال توسعه است که موجب اشاعه بیماری‌های عفونی در جامعه می‌گردد (۴). از نظر بالینی، سویه *کلبسیلاپنومونیه* به‌طور وسیعی در بیمارستان‌ها، کلونیزه می‌گردد و در افرادی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند مانند افراد دیابتی و یا بیماران با نقص ایمنی اکتسابی و افراد مسن و کودکان، بیش‌تر مشاهده می‌گردد (۱۲). مطالعه‌ها نشان می‌دهد که بیش‌ترین مقاومت دارویی در بین باکتری‌های گرم منفی مانند *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli*)، *کلبسیلاپنومونیه* و سودوموناس *آئروژینوزای* (*Pseudomonas aeruginosa*) ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی، عفونت‌های مجاری ادراری و باکتریمی دیده می‌شود که می‌توان علت عمده آن را تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط این باکتری‌ها دانست (۲۸). بتالاکتامازهای طیف گسترده، با انتشار مقاومت‌های آنتی-بیوتیکی در سراسر دنیا، یکی از مشکلات موجود در درمان بیماری‌های عفونی مختلف محسوب می‌شوند. این آنزیم‌ها در گروه A بتالاکتامازها قرار دارند و به‌دلیل انتقال توسط

نویسنده مسئول:
گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
پست الکترونیکی: mirzaei.iaub@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۳

www.SID.ir
Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

Archive of SID

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

پلاسمیدها، توانایی انتقال هم‌زمان ژن‌های مقاومت در برابر سایر آنتی‌بیوتیک‌ها را دارند و به‌دنبال آن، محدودیت در انتخاب آنتی‌بیوتیک را موجب می‌شوند.

رایج‌ترین بتالاکتاماز موجود در بین خانواده انتروباکتریاسه، ژن *TEM*[1] است اما *CTX-M*[2] دارای توانایی گستردگی بیش‌تری بر روی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است (۳۵،۲۱). ژن *TEM* با تولید سیدروفور در بیماری‌زایی نقش دارد (۳۴).

درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌های مولد این آنزیم‌ها مشکل است چون از یک سو مقاومت‌به طیف وسیعی از سفالوسپورین‌ها مشاهده می‌شود و از سوی دیگر بسیاری از ژن‌های ESBLs[3] بر روی پلاسمیدهای بزرگی (بیش از ۱۰۰) کیلوباز قرار دارد که هم‌زمان حامل ژن‌های مقاومت به سایر عوامل ضدمیکروبی مانند: آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، سولفونامید و تتراسایکلین است. این عفونت‌ها دارای رابطه معنی‌داری با میزان مرگ‌ومیر بیماران است و هزینه درمانی بالایی دارد (۲۹). این پلاسمیدهای کونژوگاتیو به‌راحتی می‌توانند از یک سویه به سویه دیگر و یا حتی به گونه‌های دیگری منتقل شوند. در مواردی نیز ژن‌های فوق در ترانسپوزون‌ها و یا اینتگرون‌ها جای می‌گیرند (۲۵). متالوبتالاکتامازها جز کلاس B طبقه‌بندی آمبر هستند که شامل ژن‌های *VIM*، *NDM*، *KHM*، *AIM*، *SIM*، *GIM*، *SPM* و *IMP* می‌شوند. متالوبتالاکتامازهای نوع *IMP*، *GIM*، *VIM* و *SPM* در *کلبسیلاپنومونیه* شناسایی شده‌اند (۲). آنزیم *IMP* جزء زیر کلاس B_1 است که دارای یک فلز روی در جایگاه فعال آنزیم به‌همراه سه هیستیدین و یک سیستئین است. *IMP* پلاسمیدی در سال ۱۹۸۸ از سویه GN_{17203} *سودوموناس آئروجینوزا* در ژاپن گزارش شد (۳۳). این آنزیم پروتئینی با ۲۴۶ اسید آمینه و وزن مولکولی ۳۰ kDa است که بر روی پلاسمید بزرگی (۱۲۰Kb) در داخل اینتگرون کلاس III قرار دارد. از جمله باکتری‌های گرم منفی مولد *IMP-1* می‌توان به *اشریشیاکلی*، *کلبسیلاپنومونیه*، *سیتروباکتر فروندی* (*Citrobacter freundii*)، *آلکالیجنز گزیلواکسیدانس* (*Alcaligenes xylosoxidans*) و سویه‌های *اسینتوباکتر* (*Acinetobacter*) اشاره کرد (۱۸). انتروباکتریاسه‌های تولید کننده *IMP* به‌طور عمده در آسیا- اقیانوس آرام یعنی چین، ژاپن، تایوان و استرالیا شناسایی شده‌اند (۲۳،۳). سویه‌های دارای ژن‌های *IMP-1* به‌دلیل توانایی بالا در هم یوغی و انتقال از طریق اینتگرون‌ها به‌راحتی نسبت به کاربانم و پنی‌سیلین‌ها مقاوم می‌شوند. این ژن جز متالوبتالاکتامازهای کلاس B است که توانایی هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کاربانم‌ها را دارد. قدرت انتقال ژن به باکتری‌ها و کلونیزه شدن طولانی مدت در بیمارستان‌ها خطر جدیدی در مراکز درمانی محسوب می‌شود(۲).

بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی آگاهی کاملی از اهمیت و نحوه شناسایی ESBL ندارند. آزمایشگاه‌ها فاقد منابعی برای مهار شیوع مکانیسم‌های مقاومت هستند. این فقدان اطلاعات علتی برای شکست در جلوگیری از شیوع جهانی پاتوژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف است (۱۹). بهترین روش برای شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، غربالگری برای حساسیت کاهش یافته نسبت‌به آنتی‌بیوتیک‌های پیشنهادی CLSI[4] و سپس انجام آزمون تأییدی به‌منظور اثبات اثر سینرژیسم بین یک آنتی‌بیوتیک سفالوسپورینی و یک مهار کننده بتالاکتامازی است (۶). با توجه‌به این‌که میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت است هدف اصلی این تحقیق، شناسایی بتالاکتامازهای با طیف گسترده *TEM* و *IMP-1* که از مهم‌ترین و شایع‌ترین بتالاکتامازها در جدایه‌های *کلبسیلاپنومونیه* هستند و از سراسر جهان گزارش شده‌اند است، تعیین فراوانی این ژن‌ها که ایجاد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلاپنومونیه* هستند از نظر اپیدمیولوژیکی حائز اهمیت است.

روش کار

در این مطالعه توصیفی – تحلیلی از ۹۴ جدایه *کلبسیلاپنومونیه* که از آبان ۱۳۹۴ تا مهرماه ۱۳۹۵ از بیمارستان‌های امام خمینی (ره) و شهید چمران شهرستان

[1] Temoneria
[2] Cefotaxime
[3] Extended spectrum β- lactamase
[4] Clinical and Laboratory Standards Institute

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

بروجرد بر اساس فرمول کوکران جمع‌آوری شدند و در پلیت‌های میکروبی به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد بروجرد منتقل شدند، استفاده گردید. این جدایه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه تحقیقاتی واحد بروجرد با انجام تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل تخمیر قندها در محیط TSI، حرکت در محیط SIM، واکنش در محیط MR/ VP و رشد در محیط سیمون سیترات و اوره آگار جداسازی شدند. جدایه‌های تأیید شده تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در محیط کشت TSB حاوی ۱۵ درصد گلیسرول و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۴).

آزمون آنتی‌بیوگرام جهت تشخیص ایزوله‌های مولد ESBL

به‌منظور شناسایی باکتری‌های تولید کننده ESBLs در ابتدا آزمون غربالگری طبق دستورالعمل CLSI با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفتریاکسون و سفتازیدیم انجام گردید. از سری دیسک‌های سفتازیدیم µg ۳۰ و سفتازیدیم کلاولانیک اسید µg۳۰/۱۰، سفتریاکسون µg۳۰، سفتریاکسون- کلاولانیک‌اسید µg۳۰/۱۰ (شرکت بایو آنالایز ترکیه) و روش انتشار در دیسک استفاده شد. دیسک‌ها در فاصله ۲۰ میلی‌متری از هم در محیط مولر هینتون آگار (مرک) قرار گرفتند. سپس پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک به‌تنهایی و در ترکیب با کلاولانیک‌اسید سنجیده شد. افزایش ≤ ۵ mm قطر هاله دیسک‌های ترکیبی با کلاولانیک‌اسید نسبت به دیسک‌های فاقد کلاولانیک‌اسید نشان دهنده این بود که باکتری مولد ESBLs است (شکل ۱).

شناسایی ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف

واکنش PCR برای شناسایی ژن‌های *TEM* و *IMP-1* در ۹۴ جدایه *کلبسیلاپنومونیه* انجام شد. DNA الگو با استفاده از روش جوشاندن (Boiling) جداسازی شد. جهت انجام واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، از مخلوط ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (شرکت سیناکلون - ایران)، ۳ میکرولیتر $dNTP_S$ و ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Master cycler® gradient) انجام گرفت. از باکتری *کلبسیلاپنومونیه* ATCC ۷۰۰۶۰۳ و *اشریشیاکلی* ATCC۲۵۹۲۲ برای ژن *TEM* و از سویه *سودوموناس آئروژینوزوا* با شماره KP ۷۸۰۱۶۵ برای ژن *IMP-1* به‌عنوان سویه‌های کنترل به‌منظور کنترل صحت و دقت آزمایش استفاده گردید. فهرست پرایمرهای مورد استفاده و شرایط PCR برای هر یک از ژن‌های مورد بررسی در جدول ۱ ذکر شده است. در برنامه PCR از دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه، دمای اتصال ژن *tem* ۵۲ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه و دمای اتصال ژن *imp-1* ۵۱ درجه به‌مدت یک دقیقه، پلی-مریزاسیون در چرخه ۷۲ درجه به‌مدت یک دقیقه، پلی-مریزاسیون نهایی ۷۲ درجه به‌مدت ۵ دقیقه استفاده شد. تعداد چرخه PCR ژن *tem* ۳۵ و ژن *imp-1* ۳۰ چرخه در نظر گرفته شد.

جدول ۱. ترادف پرایمرهای مورد استفاده و برنامه PCR به‌منظور شناسایی ژن‌های *IMP-1* و *TEM*

ژن ها	توالی نوکلئوتیدی پرایمرها (′۳-′۵)	امپلیکون (جفت باز)	منبع
TEM	F-GAGTATTCAACATTTCCGTGTC	۸۴۸	(۲۰)
	R-TAATCAGTGAGGCACCTATCTC		
IMP-1	F-ACAACCAFTTTTGCCTTACC	۵۸۷	(۹)
	R-ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC		

آنالیز آماری

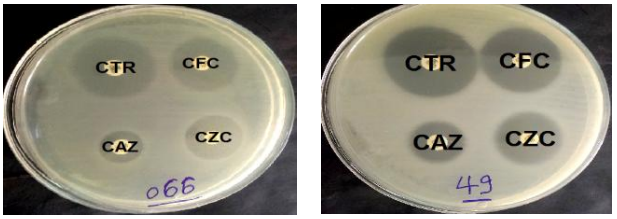
تجزیه تحلیل داده‌ها و نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۰) و Excel و آزمون آماری t تک نمونه‌ای انجام گرفت. ٪۵ > *P*-value از نظر آماری با اهمیت و معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج الگوی آنتی‌بیوگرام: نتایج حاصل از بررسی حساسیت ضدمیکروبی نشان داد که از بین ۹۴ جدایه *کلبسیلاپنومونیه* مورد بررسی ۶۰ جدایه (٪۶۳/۸) به سفتازیدیم، ۲ جدایه (٪۲/۱) به سفتریاکسون مقاوم بودند. ۷۳ جدایه (٪۷۷/۶) فنوتیپ ESBL را نشان دادند و۲۱ جدایه (٪۲۲/۳) نمونه‌ها غیر ESBL بودند.

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020



شکل ۱- نمونه آنتی‌بیوگرام جدایه‌های *کلبسیلاپنومونیه*
CTR سفتریاکسون، CFC سفتریاکسون+کلاولانیک‌اسید
CAZ سفتازیدیم، CZC سفتازیدیم+کلاولانیک‌اسید

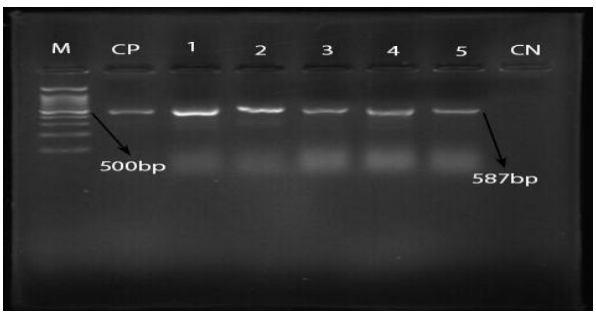
نتایج PCR

از بین ۹۴ جدایه *کلبسیلاپنومونیه* مورد بررسی ۴۹ جدایه (۵۲/۱٪) مربوطبه زنان و ۴۵ جدایه (۴۷/۸٪) مربوطبه مردان بود. هم‌چنین فراوانی این جدایه‌ها در بخش‌های مختلف بیمارستانی به این شرح بود: ۳۴ جدایه (۳۶/۱٪) از ICU، ۱۱ جدایه (۱۱/۷٪) از اورژانس، ۳۴ جدایه (۳۶/۱٪) از بخش داخلی، ۱۵ جدایه (۱۵/۹٪) از بخش اطفال بودند. پس از انجام PCR و ژل الکتروفورز مربوطبه امپلیکون ژن‌های *IMP-1* شکل۲ و *TEM* شکل۳ نتایج ارائه شده در جدول۲ مشخص گردید.

جدول ۲: فراوانی ژن‌های مورد بررسی

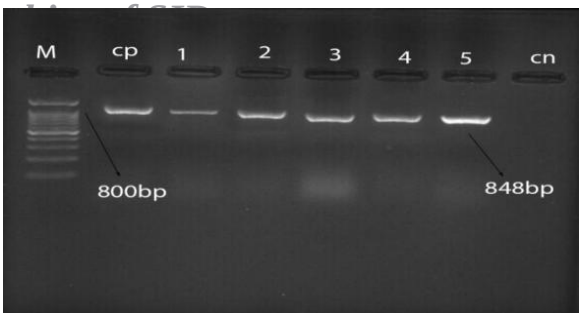
شیوع ژن *IMP-1*			شیوع ژن *TEM*		
وضعیت حضور ژن	فراوانی	درصد فراوانی	وضعیت حضور ژن	فراوانی	درصد فراوانی
مثبت	۳۵	۴۷/۹	مثبت	۶۴	۸۷/۶
منفی	۳۸	۵۲	منفی	۹	۱۲/۳
جمع کل	۷۳	۱۰۰	جمع کل	۷۳	۱۰۰

از ۷۳ جدایه ESBLs، ۳۵ جدایه (۴۷/۹٪) *IMP-1* مثبت و ۶۴ جدایه (۸۷/۶٪) *TEM* مثبت بودند.



شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ محصول PCR ژن *IMP-1*

ستون M DNA ladder ۱۰۰bp، CP کنترل مثبت، CN
کنترل منفی، ستون‌های ۱-۵ باند اختصاصی ۵۸۷ bp ژن *IMP-1*



شکل۳-الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ محصول PCR ژن *TEM*
ستون M DNA ladder ۱۰۰bp، CP کنترل مثبت، CN
کنترل منفی، ستون‌های ۱-۵ باند اختصاصی ۸۴۸ bp ژن *TEM*

۳۲ جدایه (۴۳/۸٪) واجد هر دو ژن *IMP-1* و *TEM* بوده و تعداد ۹ جدایه (۹/۵٪) به‌طور هم‌زمان فاقد هر دو ژن *IMP-1* و *TEM* بودند که این نشان می‌دهد احتمال بروز هر دو ژن در بیش‌تر جدایه‌های واجد یک ژن از ژن‌های *IMP-1* و *TEM* بیش‌تر از عدم حضور این دو ژن در کل جدایه‌ها است. بر اساس نتایج آزمون t تک نمونه‌ای ارتباط معنی‌داری بین دو گروه نمونه‌های ESBLs و غیر ESBLs از نظر آماری در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ یافت شد. نتایج آزمون t تک نمونه‌ای با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری ۰/۰۱ نشان داد که نمونه‌های ESBLs به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از نمونه‌های فاقد ESBLs هستند. هم‌چنین ارتباط معنی‌داری بین حضور دو ژن *IMP-1* و *TEM* و مقاومت نسبت‌به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون، سفتازیدیم وجود دارد.

بحث

کلبسیلاپنومونیه از نظر کلینیکی نقش مهمی در ایجاد عفونت بیمارستانی و عفونت مجاری ادراری ایفا می‌کند. متاسفانه مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در دهه‌های اخیر موجب افزایش ظهور سویه‌های مقاوم با مقاومت چند گانه دارویی در باکتری‌های روده‌ای گرم منفی از جمله *کلبسیلاپنومونیه* شده است به‌طوری‌که این باکتری‌ها با تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف یا (ESBLs) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر سفالوسپورین، پنی‌سیلین، سیپروفلوکساسین و سفوتاکسیم مقاومت نشان می‌دهند. وجود ژن کد کننده آنزیم‌های بتالاکتامازی و انتقال آن در بین باکتری‌های گرم منفی روده‌ای یک تهدید بزرگ برای مصرف‌کنندگان سفالوسپورین‌های با طیف وسیع به‌شمار می‌آیند (۲۶،۳۰). بر اساس نتایج حاصل از آزمون دیسک ترکیبی از ۹۴ جدایه *کلبسیلاپنومونیه* مورد بررسی ۷۳

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

جدایه (۷۷/۶٪) به‌عنوان مولد ESBL شناسایی شدند که در مقایسه با مطالعه Mirsalehan و همکاران، ۷۶٪ سویه‌های *کلبسیلاپنومونیه* دارای آنزیم ESBLs بودند که هم‌خوانی مناسبی با مطالعه حاضر دارد و نشان‌دهنده پتانسیل بالای بیماری‌زایی و بقای این سویه‌ها در بخش‌های مختلف بیمارستانی است (۲۲). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط Pornour و همکاران انجام شد از ۴۷ جدایه *کلبسیلاپنومونیه* ۹۷/۸ ٪ مولد $ESBL_S$ بودند (۲۷) و مطالعه دیگری که در سال ۱۳۸۹ در تهران بر روی ۱۰۴ نمونه *کلبسیلاپنومونیه* توسط Feizabadi و همکاران مورد بررسی قرار گرفت ۷۲/۱٪ از این نمونه‌ها تولید کننده $ESBL_S$ بودند که همگی نشان‌دهنده درصد بالای $ESBL_S$ در ایران است (۱۲).

مطالعه‌های مشابه زیادی در ایران و سایر نقاط جهان در زمینه *کلبسیلاپنومونیه* تولید کننده $ESBL_S$ صورت گرفته که تأیید کننده اطلاعات به‌دست آمده از این مطالعه است که می‌توان به مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ که توسط Ehlers و همکاران انجام شد اشاره کرد که ۵۸/۴ ٪ سویه‌های *کلبسیلا* فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع‌الطیف را نشان دادند (۱۱). هم‌چنین میزان شناسایی فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در سویه‌های *کلبسیلا* در سال ۲۰۰۸ توسط Leung Ho و همکاران، ۵۰ ٪ گزارش گردید (۱۴). این میزان شیوع بالای ژن‌های $ESBL_S$ توجیه کننده مقاومت بالا به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و سفالوسپورین‌های نسل سوم است که متأسفانه تولید میزان بالای $ESBL_S$ نشان دهنده این موضوع است که سویه‌های *کلبسیلاپنومونیه* تولید کننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در چند دهه اخیر رو به افزایش بوده‌اند (۱۲). با توجه‌به این گزارش‌ها به‌نظر می‌رسد که میزان شیوع سویه‌های تولید کننده $ESBL_S$ در سویه‌های *کلبسیلاپنومونیه* شهرستان بروجرد در سطح جهانی بوده و از بعضی نقاط ایران مانند اصفهان (۱۵)، کرمانشاه (۳۲)، تبریز(۲۲)، شهرکرد(۳۱) بیش‌تر است که گمان می‌رود به‌دلیل مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها توسط بیماران و عدم انجام تست‌های اختصاصی تحت نظر پزشک است. در این مطالعه تعداد ۷۳ جدایه (۷۷/۶٪) تولید کننده $ESBL_S$ بودند که از این تعداد ۴۹ جدایه (۵۲/۱٪) افراد مؤنث و تعداد ۴۵ جدایه (۴۷/۸٪) از افراد مذکر جدا شده بودند. Khorshidi در ۱۳۸۸ نشان داد که ۳۲٪ سوش‌های *کلبسیلاپنومونیه* تولید کننده $ESBL_S$ هستند و از میان آن‌ها ۵۲/۵٪ بیماران مذکر و ۴۷/۵٪ مؤنث بودند که نشان‌دهنده آن است‌که در طی این چند سال میزان سویه‌های *کلبسیلاپنومونیه* تولید کننده $ESBL_S$ از لحاظ جنسیت تفاوت چندانی نکرده است (۱۷). در ادامه مشخص شد که ۳۶/۱٪ جدایه‌های تولید کننده $ESBL_S$ به‌طور مشابه از بخش‌های ICU و داخلی جمع‌آوری شدند، که به‌نظر می‌رسد بستری طولانی مدت بیماران و وخیم بودن بیماری، به کارگیری ابزارهای تهاجمی و مواجهه طولانی با داروهای عمده مصرفی در این بخش از جمله عوامل تأثیرگذار در حضور قابل توجه این ارگانیسم‌های مقاوم هستند (۲۲). هم‌چنین در این مطالعه در ۹ جدایه که پس از انجام آزمون تأییدی $ESBL_S$ مثبت بودند، دو ژن مورد اشاره شناسایی نشدند که به‌نظر می‌رسد ژن‌های دیگری در تولید $ESBL_S$ نقش دارند.

در مطالعه حاضر فراوانی دو ژن *TEM* و *IMP-1* با استفاده از آزمون PCR در جدایه‌های تولید کننده $ESBL_S$ به‌ترتیب ۸۷/۶٪ و ۴۷/۹٪ گزارش گردید. در مطالعه‌های انجام شده در سال‌های گذشته فراوانی ژن *TEM* در *کلبسیلا* با توجه‌به جامعه آماری زیاد بوده به‌طوری-که در مطالعه Pornour و همکاران در سال ۱۳۸۹ در شهر تبریز و در مطالعه Zamanzad در سال ۱۳۸۷میزان شیوع *TEM* به‌ترتیب ۷۴/۴٪ (۲۷) و ۵۸/۳٪ (۳۶) گزارش گردید. هم‌چنین در مطالعه Ehlers و همکاران در سال ۲۰۰۹ و در مطالعه Bali و همکاران در سال ۲۰۱۰ فراوانی ژن *TEM* به‌ترتیب ۲۴ و ۷۴/۴ درصد گزارش گردید (۱۱،۵). در مطالعه Akpaka و همکاران از ۶۵ ایزوله *کلبسیلا* بررسی شده با روش Multiplex PCR ۸۴/۳٪ حاوی ژن *TEM* بودند (۱). این اختلاف شیوع می‌تواند به‌دلیل تفاوت در بیماری‌زایی این باکتری در مناطق مختلف باشد.

در مطالعه حاضر فراوانی ژن *IMP-1* ۴۷/۹٪ گزارش شد که در مقایسه با پژوهشی که توسط azizi و همکاران در سال ۱۳۹۶ بر روی ۱۰۰ سویه ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزوای* جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان شهید بهشتی شهرستان قم انجام شد بیش‌ترین فراوانی ژنی متعلق‌به ژن *IMP-1* به میزان ۲۵ درصد و کم‌ترین

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

فراوانی مربوط به ژن *VIM-1* به میزان ۱۲/۵ درصد مشاهده شد(۱۳).

مطالعه‌های مشابه انجام شده سایر نقاط جهان مانند یونان، آلمان، آمریکا، و برزیل نتایج متفاوتی را گزارش می‌دهند ژن *IMP-1* در هیچ‌کدام از جدایه‌های *کلبسیلاپنومونیه* مورد بررسی مشاهده نگردید (۷،۸،۱۰). نتایج این بررسی‌ها برای ژن *IMP-1* در مقایسه با مطالعه حاضر نشان دهنده شیوع بالای انتشار این ژن در میان جدایه‌های *کلبسیلاپنومونیه* در منطقه مورد بررسی است علاوه‌بر این ذکر این نکته ضروری است که فراوانی ژن‌های *IMP-1* در قاره آسیا به‌صورت اندمیک بیش‌تر در کشورهای آسیای شرقی و هندوستان گزارش شده است (۲۳). این تنوع در شیوع می‌تواند در هر منطقه‌ای بنا بر شرایط محیطی و مواد غذایی که برای *کلبسیلاپنومونیه* حیاتی است در بیان ژن-های مقاومتی مرتبط با بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و متالوبتاکتامازها متفاوت عمل کند اما حضور هم‌زمان این دو بتالاکتاماز می‌تواند خطرات زیادی را در بین بیماران بستری داشته باشد که بدون اطلاع از حضور هم‌زمان این دو ژن برای آن‌ها اقدام به تجویز آنتی‌بیوتیک می‌شود.

نتیجه‌گیری

شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تولید ESBLs درمنطقه مورد مطالعه، نشان‌دهنده نیاز به غربالگری نمونه‌های کلینیکی از نظر ESBLs توسط آزمایشگاه و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب با قدرت ممانعت-کنندگی بتالاکتامازی و آنتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت ترکیب با کلاولانیک توسط پزشکان است. طی سال‌های اخیر با افزایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها مواجه بودیم که منجر به افزایش مشکلات درمانی و هزینه-های درمانی می‌شود. استریلیزاسیون صحیح محیط بیمارستانی، رعایت بهداشت توسط پرسنل بهداشتی - درمانی، الگوی صحیح برای مصرف آنتی‌بیوتیک-ها، عدم خوددرمانی و یا درمان‌های ناقص با آنتی‌بیوتیک-ها، محدود نمودن استفاده از سفالوسپورین‌های وسیع-الطیف وآگاهی پزشکان در ارتباط با میزان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی از جمله راه‌کارهایی هستند که می‌توانند برای کنترل و پیش‌گیری از عفونت‌های ناشی از ارگانیسم‌های تولیدکننده ESBLs به‌کار گرفته شوند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی در تحقیق حاضر وجود ندارد.

سپاسگزاری

نویسندگان از کارشناسان آزمایشگاه تحقیقاتی بیولوژی سلولی مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد کمال تشکر و قدردانی را دارند. پژوهش انجام شده حاصل داده-های پایان‌نامه خانم لیلا گودرزی با کد مصوب ۱۱۲۳۰۵۱۳۹۶۱۰۰۳ است.

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

منابع

1.Akpaka PE, Legall B, Padman J. Molecular detection and epidemiology of extended-spectrum β-lactamase genes prevalent in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from Trinidad and Tobago. West Indian Med J. 2010. 59(6):591-6.

2.Alamri AM. Factors affecting gene expression following horizontal gene transfer studied using the blaIMP-1 gene cassette as a model system: University of Bristol. 2012.

3.Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, group ESoC-PEEw et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. Euro Surveill 20. 2015. 20(45):1-18.

4.Arvanitidou M, Katikaridou E, Douboyas J, Tsakris A. Prognostic factors for nosocomial bacteraemia outcome: a prospective study in a Greek teaching hospital. J Hosp Infect. 2005; 61:219-224.

5.Bali EB, Acik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV,TEM, CTX-M and extended spectrum-lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. Afr J Microbiol Res. 2010; 4(8):650-4.

6.Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferble enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumonia*. Lancet. 1987. 2(8554):302-6.

7.Cabral AB, Melo RDCDA, Maciel MAV, Lopes ACS. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumonia* isolated in Recife, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2012; 45(5):572-78.

8.Carvalhaes CG, Picao RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaftest (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: Be aware of false positive results. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(2): 249-51.

9.Compain F, Babosan A, Brisse S, Genel N, Audo J, Ailloud F, et al. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2014. 52(12):4377-80.

10.Correa L, Martino MDV, Siqueira I, Pasternak J, Gales AC, Silva CV, et al. A hospital-based matched case–control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. BMC Infect Dis. 2013; 13(1):1-8.

11. Ehlers MM, Veldsman C, Makgotlho EP, Dove MG, Hoosen AA, Kock MM. Detection of bla_{SHV},bla_{TEM} and bla_{CTX-M} antibiotic resistance genes in randomly selected bacterial pathogens from the Steve Biko Academic hospital. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009. 5(3):191–96.

12. Feizabadi MM, Mohammadi-Yeganeh S, Mirsalehian A, Azimi P, Mirafshar S-M, Mahboobi M, et al. Genetic characterization of ESBL-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* from Tehran hospitals. J Infect Dev Ctries . 2010. 4(10):609-15.

13. Ghasem azizi A, Jamshidi L, Mirzaee M. The study phenotype and genotype bla (IMP) and bla(VIM) metallo-β- lactamases genes and pattern antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical samples Beheshti hospital in the city of Qom. Yafte. 2018; 20(1):32-40.

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

14. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Yip K, Wong SS, Que TL. CTX-M type beta lactamases among fecal *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* isolates in non-hospitalized children and adults. J Microbiol Immunol Infect. 2008. 41(5):428-32.

15. Jazi Masjedian F, Valle F, Talebi A, Rstgarlary A. Molecular evaluation of resistance to broad spectrum antibiotics in E. coli and *Klebsiella pneumoniae*. Iranian J Med Microbiol. 2007; 1(2):24-27.

16. Kargar M, Baghernejad M, Ghorbani-Dalini S, Hashemizadeh Z. Evaluation of molecular mechanis ms resistance to macrolide by S. pneumoniae strains isolated from Nemazee and Shahid Faghihi Hospitals in Shiraz. Scientific J Kurdistan Uni Medical Scientific. 2012. 16(4):83-91.

17. Khorshidi A, Moazen Z, Rohani M, Moniri R, Shajari Gh, Mousavi Gh. Prevalence of TEM1 and SHV1 genes in β- Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Military Med. 2009. 11(3):149-53.

18. Koh TH, Babini GS, Woodford N, Sng LH, Hall MLC, Livermore DM. Carbapenem hydrolyzing IMP-1 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Singapore. Lancet. 1999. 353(9170): 2162.

19. Lashgari NV, Yousefi J, Siadat SD, Shahcheraghi F, Khosravi M, Vakili H, Moshiri A, Zanganeh M, Bahremnd AR. Identification of bla-CTX-M β-lactamase in *Klebsiella pnumoniae* clinical isolates by polymerase chain reaction. Med Sci J. 2014. 24(3):148-152.

20. Lin J-C, Koh TH, Lee N, Fung C-P, Chang F-Y, Tsai Y-K, et al. Genotypes and virulence in serotype K2 Klebsiella pneumoniae from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan. Gut pathogens. 2014;6(1):1.

21. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M,Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M:Changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother. 2007. 59(2):165-74.

22. Mirsalehan A, Akbari-Nakhjavani F, Peymani A, Kazemi B, Jabal Ameli F, Mirafshar S.M. Prevalence of Extended Spectrum β- Lactamase Producing Enterobacteriaceae by Phenotypic and Genotypic Methods in Intensive Care Units in Tehran, Iran. Daru. 2008. 16(3):169-73.

23. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2011. 17(10):1791-98.

24. P. Bailey & Scott's. diagnostic microbiology.13rd ed. Elsevier Health Sciences; 2013.

25. Padmini S, Raju B. Evaluation of CIVA agar for rapid detection of extended spectrum beta lactamases (ESBL) among isolates of Enterobacteriaceae. Indian J Med Res. 2008 Feb. 127:195-197.

26. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. N Engl J Med. 2010. 362(19):1804-1813.

27. Pornour M, Reza NM, Mobayen H, Mobasher A. Molecular study of TEM type Extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. Med Tabriz Uni Med Sci. 2010. 23(2):30-34.

28. Silvestri L, Van Seane H. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. N Engl J Med. 2010. 363(15):1482-1486.

29. Sturenburg E, Mack D. Extended spectrum beta lactamases: implication for the clinical microbiology, therapy and infection control. J Infect. 2003 Nov. 47:273-95.

www.SID.ir

30. Subha A, Ananthan S. Extended spectrum beta lactamase (ESBL) mediated resistance to third generation cephalosporins among *Klebsiella pneumoniae* in Chennai. Indian J Med Microbiol. 2002. 20(2):92-95.

31. Torshizi R, Zaman Zad B, Mokhtarian K, Karimi A. Study frequency of prevalence of CTXM genes in ESBL-producing intestinal bacteria by PCR. J Shahrekord Univ Med Sci. 2011. 13(3): 9-17.

32. Vaziri S, Mansouri F, Abiri R, Alvandi A, Mortazavi SH, Ahmadi K, et al. Prevalence study of extended spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumonia* isolated from patients with ventilator associated Pneumonia in Kermanshah city, Iran. J Isfahan Med Sch. 2017; 35(444): 1113-9.

33. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-betalactamases: The quiet before the storm? Clin Microbiol Rev. 2005. 18(2):30.

34. Winkelmann G. Microbial siderophore-mediated transport. Biochemical Society Transactions. 2002;30(4):691-6.

35. Yousefi Fatmesari G, Hemmati M, Mortazavi SH, Mansouri F, Azizi M, Etemadimajd M, et al. Frequency of blaCTX-M, blaTEM, and blaSHV Genes in *Escherichia coli* isolated from urine samples of children in Kermanshah City, Iran. J Isfahan Med Sch. 2017. 35(430):551-7.

36. Zamanzad B, Deyham B, Nafisi M, Karimi A, Farokhi E. The Frequency of TEM-1 Gene in extended spectrum β- lactamases producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and Enterobacter strains isolated from hospital clinical samples using PCR. 2008. 14(4): 19-25.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

www.SID.ir