مقاله اصیل پژوهشی

شناسایی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه دارای ژن bla_{CTX} و تعیین مقاومت متقاطع آنها در بیماران بستری در بیمارستان

غلامرضا پورعلی شش بلوکی[2,1]، جلال مردانه[3]

چکیده

زمینه و هدف: کلبسیلا پنومونیه یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسیه است که سبب عفونت‌های بیمارستانی می‌شود. در حال حاضر، با ظهور سویه‌های مقاوم به چنددارو (MDR) این باکتری در جهان، روبرو هستیم. هدف از مطالعه حاضر جداسازی کلبسیلا پنومونیه از بیماران بستری در بیمارستان، شناسایی ایزوله‌های دارای ژن bla_{CTX}، تعیین Cross-resistance و شناسایی ایزوله‌های حساس وابسته به دوز ((Susceptible-dose dependent (SDD) نسبت به سفپیم بود.

روش تحقیق: در این مطالعه مقطعی، 111 سویه کلبسیلا پنومونیه از بیماران بستری در بیمارستان‌های قطب‌الدین، فقیهی و نمازی شیراز (ایران) جداسازی شدند. ایزوله‌ها بر اساس تست‌های بیوشیمیایی موجود در سیستم API20E به‌عنوان کلبسیلا پنومونیه شناخته شدند. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک‌دیفیوژن و پروتکل سازمان استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI 2014) انجام شد. ایزوله‌های حساس وابسته به دوز نسبت به سفپیم شناسایی شدند. شناسایی سویه‌های تولیدکننده AmpC β- lactamase با استفاده از دیسک‌های سفوکسیتین و سفپیم انجام گرفت. از روش ملکولی PCR برای شناسایی سویه‌های دارای ژن bla_{CTX} استفاده شد.

یافته‌ها: به‌طور کلی 111 ایزوله کلبسیلا پنومونیه، مورد مطالعه قرار گرفتند. کم‌اثرترین دارو سفتازیدیم (37/8 درصد ایزوله‌ها حساس بودند) بود. همه سویه‌های SDD حساس به ایمی‌پنم و کلیستین بودند. کلیستین (96/4%) و ایمی‌پنم (88/3%) مؤثّرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بر ضدّ ایزوله‌ها بودند. میزان مقاومت به جنتامایسین 41/4 درصد بود. نتایج انجام PCR به‌منظور جستجوی ژن bla_{CTX} در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه نشان داد که 70/3 درصد سویه‌ها دارای این ژن بودند.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان داد که سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چنددارو (MDR) و مقاوم به طیف وسیعی از داروها (XDR) در حال افزایش است و کمتر آنتی‌بیوتیکی ممکن است برای درمان عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: بیماران بستری در بیمارستان، خون، عفونت باکتریای، کلبسیلا پنومونیه، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، حساس وابسته به دوز

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1395؛ دوره 23 (1): .

دریافت: 1394/2703 پذیرش: 1394/12/04

[1] گروه میکروبیولوژی، پردیس علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران؛

[2] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران.

[3] نویسنده مسؤول؛ گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران.

آدرس: گروه میکروب‌شناسی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی گناباد - گناباد - ایران.

تلفن: 05157220578 نمابر: 05157220578 پست الکترونیکی: Jalalmardaneh@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه؛ باسیلی گرم منفی، دارای کپسول، غیر متحرّک و فاقد اسپور است که در خانواده باکتریایی انتروباکتریاسیه قرار دارد. این باکتری، یک پاتوژن فرصت‌طلب محسوب شده و به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی به‌کمک روش‌های مختلف، مقاومت نشان می‌دهد (1).

عفونت‌های ناشی از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه- تولیدکننده آنزیم‌های غیرفعال‌کننده آنتی‌بیوتیک‌های کاباپنم یعنی کاباپنمازها- در حال گسترش در سراسر جهان بوده و سبب افزایش مرگ و میر در مبتلایان می‌گردد. مکانیسم مقاومت به کاباپنم‌ها بسیار حائز اهمیت هستند؛ زیرا اغلب به‌وسیله تست‌های غربالگری روتین قابل شناسایی نیستند و پتانسیل بالقوّه‌ای برای گسترش دارند. به‌دلیل محدود بودن انتخاب‌های درمانی، علاوه بر چالش‌های کنترل عفونت که در حال افزایش هستند، عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم، پزشکان را با چالش‌های جدّی در درمان روبرو کرده است (1). انتروباکتریاسیه‌ها در بین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی هستند. شناسایی سریع باکتری‌های تولیدکننده KPC به‌وسیله روش‌های آزمایشگاهی به‌منظور دست‌یابی به کنترل عفونت، بسیار حائز اهمیت است (2).

کلبسیلا پنومونیه از جمله میکروارگانیسم‌های مسئول بسیاری از عفونت‌های حاد از جمله عفونت‌های گردش خون در بیماران بستری در بیمارستان است. ظهور سویه‌های با مقاومت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف شامل کاباپنم‌ها، یک مشکل جدّی در بیماران دارای بیماری شدید است (2، 3). مقاومت دارویی یک مشکل عمده در درمان بیماران مبتلا به بیماری‌های عفونی در تمام جهان است. انتروباکتریاسیه‌های مقاوم به کاباپنم به‌ویژه کلبسیلا پنومونیه، به‌عنوان یک عامل مهم بروز عوارض و مرگ و میر در بین عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان و عفونت‌های طولانی‌مدت مرتبط با مراقبت‌های بهداشتی مطرح است. به‌طور قابل توجهی مرگ و میر بسیار بالایی (30 تا 70 درصد) در بین بیماران مبتلا به باکتریمی یا عفونت‌های تنفسی ناشی از کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده کاباپنمازها وجود دارد (4، 5).

در سال 2013، شیوع عفونت‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه تخمین زده شده در ایالات متحده در بیمارستان‌های با مراقبت‌های طولانی‌مدت در مقایسه با واحدهای مراقبت ویژه بیمارستانی کوتاه‌مدت، بالاتر بود (6). اگر چه کلبسیلا پنومونیه دارای میزان متوسطی از پنی‌سیلینازهای کروموزمی است، این ارگانیسم به‌خوبی به‌عنوان یک جمع‌کننده پلاسمیدهای مقاومت چندارویی است (7). کسب پلاسمیدهای مقاومت و وقوع موتاسیون‌های کروموزومی که سبب بروز مقاومت به فلوروکینولون‌ها می‌شود، سبب می‌شود که اغلب درمان عفونت ناشی از کلبسیلا پنومونیه مرتبط با عفونت‌های مراقبت‌های بهداشتی، فقط به‌وسیله استفاده از کاباپنم‌ها به‌عنوان آخرین خط درمانی آنتی‌بیوتیکی انجام شود (8). معمولاً کمتر آنتی‌بیوتیکی بر روی کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده آنزیم KPC مؤثّر است و عفونت با این سوش، با مرگ و میر بالایی در بین بیماران مبتلا به عفونت‌های گردش خون مرتبط است. در حقیقت بسیاری از این سویه‌ها به کلیستین، تیگسیکلین و حداقل یکی از آمینوگلیکوزیدها حساس هستند؛ اما برخی از آنها حتی به این داروها نیز مقاوم هستند (6).

عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده کاباپنماز، همراه با افزایش هزینه‌های درمانی و بستری‌شدن طولانی‌مدت در بیمارستان و شکست درمانی و مرگ و میر همراه خواهد بود. پیش‌آگهی ضعیفی از عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی تولیدکننده کاباپنماز گزارش شده است. در گزارشی از ایالات متحده آمریکا که بر روی عفونت‌های گردش خون ناشی از باکتری‌های تولیدکننده کاباپنماز در سال 2011 انجام شد، میزان مرگ و میر بیماران 47 تا 66 درصد بود (9). در بررسی دیگری نشان داده شد که

www.SID.ir

خطر مرگ در بیماران مبتلا به عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها 2 برابر افزایش داشت (9).

با توجه به استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در ایران و افزایش خطر مقاومت دارویی و نیز با توجه به اینکه در ایران کمتر مطالعه‌ای بر روی باکتری کلبسیلا اکسی‌توکا انجام شده است، اهداف این مطالعه شامل: تعیین پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا اکسی‌توکا، شناسایی ایزوله‌های حساس وابسته به دوز[1] نسبت به سفپیم، مشخص‌نمودن مقاومت متقاطع[2] در بین ایزوله‌ها، بررسی توانایی تولید آنزیم AmpC-beta-lactamase و شناسایی ژن *blaCTX* کدکننده آنزیم بتالاکتاماز با استفاده از روش PCR در ایزوله‌ها بود.

روش تحقیق

در این مطالعه مقطعی که در طی یک سال -از فروردین تا اسفندماه سال 1393- انجام شد، نمونه‌های مختلف (خون، ادرار، خلط، زخم، تراشه) از بیماران بستری در بیمارستان‌های فقیهی، قطب‌الدین و نمازی شیراز جمع‌آوری شد. برای هر یک از افراد مورد بررسی، پرسشنامه تنظیم و کدگذاری گردید. نمونه‌گیری از افراد، پس از مشخص‌نمودن هدف مطالعه برای آنها و کسب رضایت کتبی آگاهانه از هر یک از افراد تحت مطالعه، صورت پذیرفت.

جداسازی و شناسایی باکتری:

ابتدا نمونه‌ها بر روی محیط‌های معمول میکروب‌شناسی شامل: محیط‌های بلاد آگار، شکلات آگار و مک‌کانکی آگار (Merck Co. Germany) کشت داده شدند؛ سپس نمونه‌ها در دمای 37درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شبانه‌روز انکوباسیون شده و از نظر رشد باکتری و تشکیل کلونی بر روی محیط‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. باکتری‌های گرم منفی ایزوله‌شده از نمونه‌های ارسالی، به‌کمک تست‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی اولیه شامل: رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز و حرکت (Merck Co. Germany) و به‌دنبال آن با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی تعبیه‌شده در سیستم API 20E اختصاصی انتروباکتریاسیه‌ها و به‌دست آوردن کد ارگانیسم و وارد نمودن کد در نرم افزار API، مورد شناسایی نهایی قرار گرفتند.

تعیین حساسیت ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها:

در این مطالعه به کمک روش استاندارد دیسک‌دیفیوژن و بر اساس پروتکل ارائه‌شده توسط سازمان استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI 2014) (10) و استفاده از دیسک‌های 8 آنتی‌بیوتیک (Rosco, Danish) شامل: سفوکسیتین (FOX، 30?g)، آمیکاسین (AMI، 30?g)، سیپروفلوکساسین (CIP، 5?g)، سفتازیدیم (CAZ، 30?g)، سفپیم (CPM، 30?g)، جنتامایسین (GM، 10?g)، ایمی‌پنم (IMP، 10?g) و کلیستین (CO، 10?g)، حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جداشده مورد مطالعه قرار گرفت. در این روش با استفاده از نرمال‌سالین، رقّت 0/5 مک‌فارلند از باکتری تهیه گردید. سپس کشت بر روی محیط مولرهینتون آگار انجام شد. پس از انکوباسیون محیط‌ها در دمای 2±35 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 16 تا 18 ساعت، نتایج خوانده شدند.

شناسایی سویه‌های حساس وابسته به دوز:

برای شناسایی ایزوله‌های SDD بر اساس پروتکل CLSI(2014)، از روش استاندارد دیسک‌دیفیوژن استفاده شد. سویه‌هایی که هاله عدم رشد 24-19 میلی‌متر در اطراف دیسک سفپیم داشتند، به‌عنوان SDD در نظر گرفته شدند.

شناسایی سویه‌های تولیدکننده AmpC-beta-lactamase با استفاده از تست فنوتیپی:

در این روش، از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین (FOX، 30?g) و سفپیم (CPM، 30?g) استفاده شد. ایزوله‌هایی که مقاوم به سفوکسیتین و حساس به سفپیم بودند، به‌عنوان AmpC-beta-lactamase positive

[1] *Susceptible-dose dependent (SDD)*
2 Cross-resistance

Archive of SID
www.SID.ir

در نظر گرفته شدند.

PCR Assay:

سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مورد تأیید قرار گرفته، بر روی محیط TSA کشت داده شدند. پلیت‌ها به‌مدّت 18-16 ساعت در دمای 37 درجه‌سانتی گراد انکوبه شدند؛ سپس با استفاده از روش Boiling، ژنوم ارگانیسم استخراج گردید. در روش Boiling یک میلی‌لیتر از کشت باکتری رشد کرده به‌صورت شبانه در محیط TSB در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 4دقیقه در دور 1000rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی بیرون ریخته شد و رسوب به‌دست‌آمده در یک‌میلی‌لیتر TE Buffer (10mM Tris، 1mM EDTA، pH=7.8) حل و به‌طور مجدد سانتریفیوژ گردید؛ سپس رسوب حاصله در 100 میکرولیتر TE Buffer حل شد. میکروتیوب در دمای 94 درجه سانتی‌گراد برای مدت 10دقیقه قرار داده شد؛ سپس به‌مدت 10دقیقه در 13000rmp سانتریفیوژ گردید. مایع رویی در میکروتیوب‌های کدگذاری شده ذخیره و به‌عنوان نمونه DNA در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. قبل از انجام PCR، نمونه DNA استخراج‌شده، به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر و نیز بابردن بر روی ژل آگارز و انجام الکتروفورز و سپس مشاهده باند زیر نور UV، مورد ارزیابی قرار گرفت.

از پرایمرهای موجود در جدول یک برای انجام واکنش PCR استفاده شد. هر سیکل واکنش PCR شامل مراحل: Pre-denaturating در دمای 94 درجه سانتی‌گراد (5 دقیقه)، Denaturating در دمای 94 درجه سانتی‌گراد (30 ثانیه)، Annealing در دمای 62 درجه سانتی‌گراد (30 ثانیه) و تکثیر Extention در دمای 72 درجه سانتی‌گراد (30 ثانیه) بود و یک مرحله Post-extention در دمای 72درجه سانتی‌گراد به‌مدت 5 دقیقه اعمال گردید. واکنش PCR در طی 30 سیکل انجام شد. محصول PCR با استفاده از آگارز یک‌درصد روی دستگاه الکتروفورز حاوی بافر 0.5X TAE، الکتروفورز شد و با استفاده از دستگاه ترانسلومیناتور به‌منظور جستجوی باند 544bp، مورد آنالیز قرار گرفت. در طی این مطالعه از سویه‌های استاندارد *K.pneumoniae* ATCC 7881 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

جدول 1- پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی ژن CTX با استفاده از PCR در ایزوله‌ها

PCR name	Primer name	Sequence (5′–3′)	Length (base)	Amplicon size (pb)
CTX	CTX-F	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	23	544
	CTX-R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	22	

آنالیز آماری:

داده‌های به‌دست‌آمده، به‌کمک نرم‌افزار SPSS (ویرایش 19) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

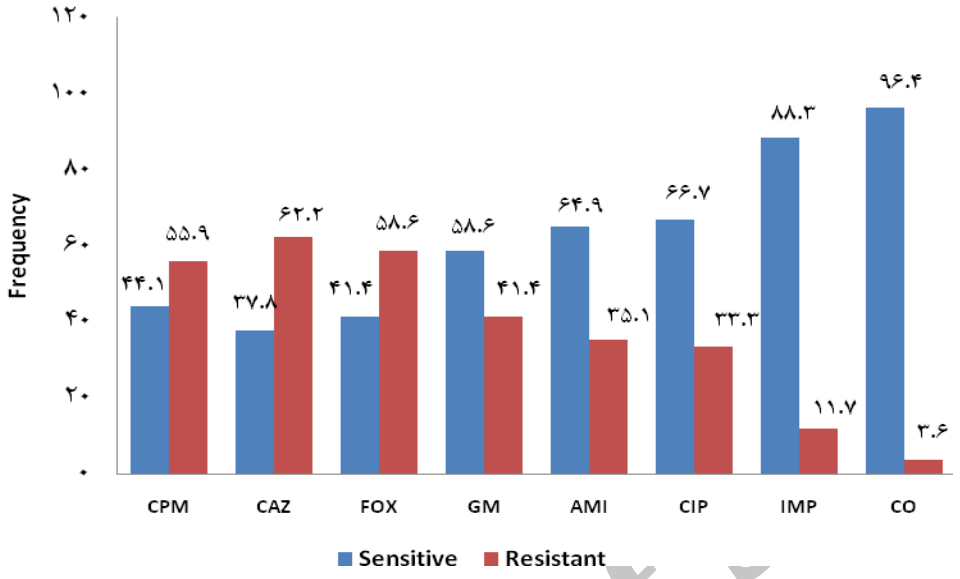
در این مطالعه 111 سویه کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز نتایج تست‌های تعیین حساسیت دارویی نشان داد که به‌ترتیب کلستین و ایمی‌پنم مؤثّرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بر ضدّ ایزوله‌ها می‌باشند. در بین آنتی‌بیوتیک‌های کلاس بتالاکتام، سویه‌ها بهترین پاسخ را به نسل چهارم سفالوسپورین‌ها یعنی سفپیم (44/1%) نشان دادند. در کلاس داروهای آمینوگلیکوزیدی مورد بررسی، ایزوله‌ها بهترین پاسخ را به آمیکاسین نشان دادند. چهار ایزوله (3/6درصد سویه‌ها) به کلستین مقاومت نشان دادند (نمودار 1). در این مطالعه هیچ سویه مقاومت گسترده دارویی[1] مشاهده نشد.

در بررسی نتایج حساسیت دارویی نسبت به سفپیم بر اساس استانداردهای CLSI، در حدود 6/3درصد ایزوله‌ها (7سویه) حساس وابسته به دوز بودند که از این بین 5سویه به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و تنها یک سویه به همه داروهای مورد بررسی حساسیت نشان داد. 6سویه از 7سویه SDD، به آنتی‌بیوتیک‌های کلاس آمینوگلیکوزیدها

[1] Pan-drug resistance

Archive of SID
www.SID.ir

(جنتامایسین، آمیکاسین) حساست نشان دادند (جدول 2).



نمودار 1- الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی.

جدول 2- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه SDD نسبت به سفپیم (N=7)

Strain No.	Sensitive (%)	Resistant (%)
1	Gentamicin, Amikacin, Imipenem, Colistin	Cefoxitin, Ciprofloxacin, Ceftazidime
2	Imipenem, Colistin, Cefoxitin, Ceftazidime	Gentamicin, Amikacin, Ciprofloxacin
3	Ciprofloxacin, Gentamicin, Amikacin, Imipenem, Colistin	Cefoxitin, Ceftazidime
4	Gentamicin, Amikacin, Imipenem, Colistin	Cefoxitin, Ceftazidime, Ciprofloxacin
5	Cefoxitin, Ceftazidime, Gentamicin, Amikacin, Imipenem, Colistin	Ciprofloxacin
6	Gentamicin, Amikacin, Imipenem, Colistin	Cefoxitin, Ciprofloxacin, Ceftazidime
7	Ciprofloxacin, Cefoxitin, Ceftazidime, Gentamicin, Amikacin, Imipenem, Colistin	-

بررسی الگوی مقاومت متقاطع نشان داد که 33/3 درصد ایزوله‌ها به داروهای کلاس آمینوگلیکوزیدهای مورد بررسی مقاوم بودند. 7/2درصد سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه دارای مقاومت چنددارویی[1] بودند و به 3کلاس آنتی‌بیوتیکی بزرگ مورد بررسی یعنی سفالوسپورین‌ها، کاربانپم‌ها و کینولون‌ها پاسخ ندادند. 16 سویه (14/4درصد ایزوله‌ها)، همزمان به آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین، آمیکاسین) و کینولون‌ها (سیپروفلوکساسین) مقاوم بودند (جدول 3). نتایج انجام PCR به‌منظور جستجوی ژن bla_{CTX} در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه نشان داد که 70/3درصد سویه‌ها دارای این ژن بودند (شکل 1). بررسی پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه که دارای ژن bla_{CTX} بودند نشان داد که این ایزوله‌ها بیشترین مقاومت

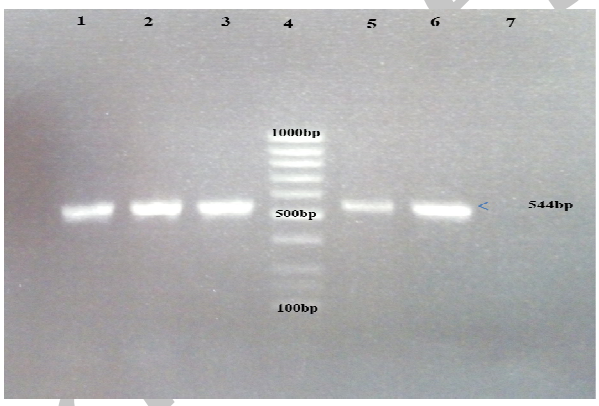
[1] *Multidrug resistance*

Archive of SID
www.SID.ir

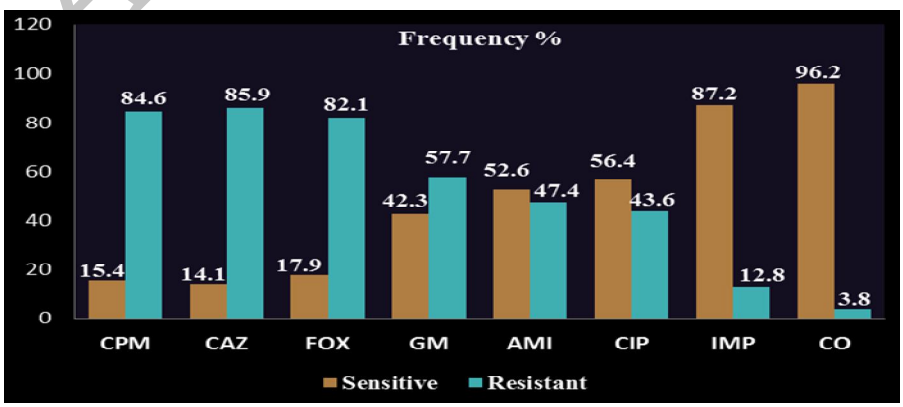
را به‌ترتیب به سفتازیدیم (85/9%) و سفپیم (84/6%) نشان دادند؛ همچنین این ایزوله‌ها بیشترین حساسیت را به کلیستین (96/2% سویه‌ها حساس بودند) نشان دادند (نمودار 2).

جدول 3- الگوهای Cross-resistance در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه (N=111)

Pattern	Antibiotics	No.
1	Gentamicin, Amikacin	37
2	Cefoxitin, Ciprofloxacin	31
3	Gentamicin, Amikacin, Ciprofloxacin	16
4	Cefoxitin, Ceftazidime, Imipenem, Cefepime	10
5	Ciprofloxacin, Imipenem	10
6	Gentamicin, Amikacin, Imipenem	9
7	Gentamicin, Imipenem, Ciprofloxacin	8
8	Gentamicin, Imipenem, Ciprofloxacin, Cefepime	8
9	Gentamicin, Amikacin, Colistin	1
10	Gentamicin, Amikacin, Colistin, Ciprofloxacin	1



شکل 1- شناسایی ژن blaCTX در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه با استفاده از روش PCR. 1، 2 و 3: نمونه‌های مثبت؛ 4: نشانگر 100bp؛ 5 و 6: کنترل مثبت شماره 1 (Klebsiella pneumoniae ATCC 7881) و کنترل مثبت شماره 2 (سویه بالینی کلبسیلا پنومونیه)؛ 7: کنترل منفی.



نمودار 2- پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه که با استفاده از PCR، ژن blaCTX در آنها شناسایی شده است.

www.SID.ir

بحث

اگرچه توجه بسیاری از محققین به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی جداشده از بیماران در بیمارستان‌ها و نیز باکتری‌هایی که به‌طور مستقیم اثر مخرّب بر روی سلامتی انسان دارند، می‌باشد؛ اما گسترش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها یک پدیده اکولوژیکی طبیعی است که حاصل بیلیون‌ها سال تکامل است. به‌دلیل استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌ها در جهان در بخش‌های مختلف از جمله: پزشکی، درمان حیوانات، کشاورزی، پرورش زنبور عسل و نیز صنایع نفت و دریایی و نیز استفاده در برخی از آزمایشگاه‌ها برای مطالعات و دستکاری‌های ژنتیکی، فشار تکاملی برای ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی بسیار بالاست. بنابراین مطالعات بر روی گسترش مقاومت و مکانیسم‌های آن، باید ضرورتاً در مراحل اولیه کشف و استفاده از آنتی‌بیوتیک انجام شود (11-14).

در مطالعه حاضر، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های معمول مورد استفاده در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی، به‌نسبت بالا بود و بیشترین مقاومت، به بتالاکتام‌ها (62/2درصد مقاومت به سفتازیدیم، 58/6درصد به سفوکسیتین، 55/9درصد مقاومت به سفپیم) مشاهده شد؛ همچنین 33/3درصد ایزوله‌ها به آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین و آمیکاسین) و 33/3درصد به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند.

مطالعات انجام‌شده در نقاط مختلف جهان نتایج متفاوتی از مقاومت به سیپروفلوکساسین را نشان داده‌اند؛ به‌طوری‌که در مطالعه Paterson و همکاران در سال 2000 بر روی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه ایزوله‌شده از بیماران مبتلا به باکتریمی، 5/5درصد ایزوله‌های ایجادکننده باکتریمی، مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند (15). در مطالعه‌ای در ترکیه، 42درصد ایزوله‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. همچنین در آرژانتین 15درصد ایزوله‌ها، در ایالات متحده آمریکا 9درصد ایزوله‌ها و در تایوان 6درصد آنها مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. در مقابل در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه ایجادکننده باکتریمی در آفریقای جنوبی، استرالیا و بلژیک، هیچ مورد مقاومت به سیپروفلوکساسین مشاهده نشد (15). در مطالعه Al-Marzooq و همکاران (2014) در مالزی، 71درصد ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه، مقاوم به سیپروفلوکساسین گزارش شدند (16).

میزان مقاومت دارویی در بین ایزوله‌های شایع در کشور ایران از بسیاری از کشورها از جمله: آمریکا، استرالیا، تایوان، آفریقای جنوبی، بلژیک، آرژانتین بسیار بالاتر است؛ بنابراین استفاده از این آنتی‌بیوتیک باید با ملاحظات خاصی صورت گیرد. اما نسبت به کشورهای مالزی و ترکیه مقاومت به سیپروفلوکساسین در ایران کمتر است.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که 11/7درصد از ایزوله‌ها به ایمی‌پنم مقاوم بودند که این میزان مقاومت برای دارویی که به‌عنوان آخرین خط درمانی برای عفونت‌های گرم منفی استفاده می‌شود، مقاومت به‌نسبت بالایی است. از سوی دیگر 3/6درصد ایزوله‌ها به داروی کلیستین مقاوم بودند که نشان از افزایش مقاومت به این آنتی‌بیوتیک دارد. Ah و همکاران در مطالعه خود، 5 سویه کلبسیلا پنومونیه مقاوم به کلیستین و کارباپنم را شرح دادند. در مطالعه آنها گفته شده است که افزایش استفاده از کلیستین برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی مقاوم به چنددارو، منجر به ظهور مقاومت به کلیستین در کلبسیلا پنومونیه در سراسر جهان از جمله کشورهای اروپایی شده است و میزان آن در حال افزایش است (17).

ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده کارباپنماز، به بسیاری از عوامل ضدّمیکروبی دیگر مورد استفاده در درمان باکتری‌های گرم منفی از جمله کینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها مقاوم هستند. در مطالعه حاضر، 8 ایزوله همزمان به آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین، آمیکاسین)، کینولون‌ها (سیپروفلوکساسین) و کارباپنم‌ها (ایمی‌پنم) مقاوم بودند. آنالیز

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج مقاومت متقاطع نشان داد که 7/2درصد سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه، دارای مقاومت چندداروییی بودند و به 3 کلاس آنتی‌بیوتیکی بزرگ مورد بررسی یعنی سفالوسپورین‌ها، کارباپنم‌ها و کینولون‌ها پاسخ ندادند. 9درصد ایزوله‌ها (10 مورد) به هیچ‌یک از بتالاکتام‌های مورد بررسی پاسخ ندادند؛ همین‌طور 8سویه همزمان به جنتایسین، ایمی‌پنم، سیپروفلوکساسین و سفپیم مقاومت نشان دادند. همچنین نزدیک به 6درصد سویه‌ها به نسل چهارم سفالوسپورین‌ها مقاوم بودند.

در این مطالعه، نتایج انجام PCR بر روی ژن bla_{CTX} در ایزوله‌ها نشان داد که 70/3درصد آنها دارای این ژن بوده و 87/2درصد این سویه‌ها به ایمی‌پنم حساس بودند. همچنین نتایج نشان داد که در بین آمینوگلیکوزیدها، آمیکاسین در مقایسه با جنتامایسین پاسخ بهتری نشان داد؛ به‌طوری‌که 52/6درصد آنها به آمیکاسین حساس بودند. در مطالعه Wang و همکاران (2013) در کشور آمریکا بر روی کلبسیلا پنومونیه، در سال 2005 تا 2009 در حدود 1/7درصد ایزوله‌ها دارای ژن CTX بودند؛ در صورتی‌که در طی سال 2010 تا 2012 در حدود 26/4درصد ایزوله‌ها دارای این ژن بودند (18). در مطالعه Ahmed و همکاران (2013)، 53/3 درصد سویه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای ژن CTX بودند (19). در مطالعه حاضر، درصد شیوع این ژن در ایزوله‌ها بالاتر بود که با نتایج دیسک‌دیفیوژن همخوانی دارد و هر دو روش فنوتیپی و ژنتیکی، نشان از بالاتربودن مقاومت در ایزوله‌های شایع در بیمارستان‌های کشور ما دارد.

در مطالعه حاضر، سویه‌های SDD، مقاومت بالایی به کینولون‌ها (سیپروفلوکساسین) نشان دادند؛ به‌طوری‌که 6سویه از 7سویه SDD به این دارو مقاوم بودند؛ در نتیجه از کینولون‌ها نباید به‌عنوان جایگزین برای درمان عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها استفاده نمود. خوشبختانه تمام سویه‌های SDD به کارباپنم‌ها (ایمی‌پنم) حساس بودند؛ بنابراین ایمی‌پنم جایگزین مناسبی برای درمان بیماران مبتلا به بیماری‌های ایجادشونده توسط این سویه‌هاست. همچنین همه سویه‌های SDD به آنتی‌بیوتیک کلیستین حساسیت نشان دادند.

در گزارش مردانه و همکاران در سال 1394 در شیراز بر روی باکتری‌های جداشده از کشت خون بیماران، 21/5درصد موارد کشت مثبت متعلّق به خانواده انتروباکتریاسیه بودند. در بین اعضای این خانواده، 28درصد آنها کلبسیلا بودند که پس از اشریشیاکلی رتبه دوم را به خود اختصاص دادند. داروهای پلی‌میکسین B، کلستین و ایمی‌پنم مؤثّرترین داروها بر ضدّ سویه‌های ESBL مثبت کلبسیلا بودند (20). نتایج این گزارش با مطالعه ما همخوانی دارد و ایزوله‌های مطالعه حاضر نیز بهترین پاسخ را به این داروها نشان دادند. در بررسی‌های پورعباس و همکاران در سال 1394 در شیراز، از 175 باکتری گرم منفی جداشده از خون، 15درصد آنها گونه‌های کلبسیلا بودند. در مطالعه پورعباس، مؤثّرترین داروها بر روی ایزوله‌های کلبسیلا به‌ترتیب: ایمی‌پنم (98%) و لووفلوکساسین (80%) بودند که در مقایسه با ایزوله‌های مطالعه ما مقاومت بالاتری (88/3%) به ایمی‌پنم نشان دادند (3). این تفاوت می‌تواند در نتیجه دو عامل، اتفاق افتاده باشد: اول اینکه مطالعه ما جدیدتر بوده و سویه‌ها با گذشت زمان مقاوم‌تر شدند؛ دوم اینکه مطالعه ما بر روی انواع نمونه‌ها بوده و در نتیجه احتمال مشاهده مقاومت بالاتر بیشتر است.

از آنجایی‌که الگوی مقاومت دارویی در کشورهای مختلف و حتی در مناطق مختلف یک کشور متفاوت است و نیز این پروفایل مقاومت با گذشت زمان و افزایش استفاده از داروها، به‌طور مدام در حال تغییر است؛ بنابراین انجام بررسی‌های دوره‌ای و منظم الگوی مقاومت به‌منظور دست‌یابی به یک رژیم درمانی مناسب برای درمان بیماران ضرورت دارد (10، 21، 22). در بسیاری از موارد، بروز مقاومت در باکتری‌ها به‌دلیل استفاده داروها در صنایع مختلف از جمله صنایع دامداری و پروش ماکیان، به‌منظور کاهش عفونت‌ها و افزایش باروری و سوددهی، اتفاق می‌افتد. این ایزوله‌های مقاوم به

www.SID.ir

دارو می‌توانند از طریق مواد غذایی و محصولات دیگر به جامعه انسانی و نیز محیط‌های بیمارستانی منتقل شوند و سبب بروز عفونت در افراد بستری در بیمارستان‌ها گردند (23-27).

نتیجه‌گیری

همه نتایج به‌دست‌آمده، نگران‌کننده و نشان‌دهنده افزایش رو به رشد مقاومت‌های چندداروی در بین باکتری‌های بیماری‌زای بیمارستانی بودند. نتایج نشان از آن دارد که آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام معمول، عملاً در درمان عفونت‌های بیش از 55درصد ایزوهای کلبسیلا پنومونیه، مؤثّر نیستند و استفاده از آنها در درمان، علاوه بر بالا رفتن هزینه‌های درمانی سبب بروز هر چه بیشتر مقاومت می‌گردد؛ در نتیجه ضروری است که حتماً رژیم درمانی مورد استفاده توسط پزشکان بر اساس نتایج آنتی‌بیوگرام انجام‌شده توسط آزمایشگاه میکروب‌شناسی بالینی باشد.

منابع:

1- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(4): 657-86.

2- Adams-Sapper S, Nolen S, Donzelli GF, Lal M, Chen K, Justo da Silva LH, et al. Rapid induction of high-level carbapenem resistance in heteroresistant KPC-producing Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(6): 3281-9.

3- Poorabbas B, Mardaneh J, Rezaei Z, Kalani M, Pouladfar G, Alami MH, et al. Nosocomial Infections: Multicenter surveillance of antimicrobial resistance profile of Staphylococcus aureus and Gram negative rods isolated from blood and other sterile body fluids in Iran. Iran J Microbiol. 2015; 7(3): 127-35.

4- Deleo FR, Chen L, Porcella SF, Martens CA, Kobayashi SD, Porter AR, et al. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 Klebsiella pneumoniae. Proc Natl Acad Sci USA. 2014; 111(13): 4988-93.

5- Snitkin ES, Zelazny AM, Thomas PJ, Stock F; NISC Comparative Sequencing Program Group, Henderson DK, et al. Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae with whole-genome sequencing. Sci Transl Med. 2012; 4(148): 148ra116.

6- Vuotto C, Longo F, Balice MP, Donelli G, Varaldo PE. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in Klebsiella pneumoniae. Pathogens. 2014; 3(3): 743-58.

7- Reich F, Atanassova V, Klein G. Extended-spectrum β-lactamase- and AmpC-producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany. Emerg Infect Dis. 2013; 19(8): 1253-9.

8- Traub WH, Schwarze I, Bauer D. Nosocomial outbreak of cross-infection due to multiple-antibiotic-resistant Klebsiella pneumoniae: Characterization of the strain and antibiotic susceptibility studies. Chemotherapy. 2000; 46(1): 1-14.

9- Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Kristie Johnson J, Morgan DJ. Emergence of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. South Med J. 2011; 104(1): 40-5.

10- Amin Shahidi M, Anvarinejad M, Abbasian A, Abbasi P, Rafaatpour N, Dehyadegari MA, et al. Characterization of nonfermenter bacteria resistant to multidrug ESBL producing isolated from patients blood samples using phenotypic methods in Shiraz (Iran). J Birjand Univ Med Sci. 2015; 22(3): 256-5. [Persian]

11- Shahid M, Malik A, Akram M, Agrawal LM, Khan AU, Agrawal M. Prevalent phenotypes and antibiotic resistance in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae at an Indian tertiary care hospital: plasmid-mediated cefoxitin resistance. Int J Infect Dis. 2008; 12(3): 256-64.

12- Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. PLoS One. 2012; 7(4): e34953.

13- D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. Nature

Archive of SID

www.SID.ir

2011; 477(7365): 457-61.

14- Hern?ndez J, Stedt J, Bonnedahl J, Molin Y, Drobni M, Calisto-Ulloa N, et al. Human-associated extended-spectrum β-lactamase in the Antarctic. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(6): 2056-8.

15- Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in Klebsiella pneumoniae isolates causing bacteremia. Clin Infect Dis. 2000; 30(3): 473-8.

16- Al-Marzooq F, Mohd Yusof MY, Tay ST. Molecular analysis of ciprofloxacin resistance mechanisms in Malaysian ESBL-producing Klebsiella pneumoniae isolates and development of mismatch amplification mutation assays (MAMA) for rapid detection of gyrA and parC mutations. Biomed Res Int. 2014; 2014: 601630.

17- Ah YM, Kim AJ, Lee JY. Colistin resistance in Klebsiella pneumoniae. Int J Antimicrob Agents. 2014; 44(1):8-15.

18- Wang G, Huang T, Surendraiah PK, Wang K, Komal R, Zhuge J, et al. CTX-M β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in suburban New York City, New York, USA. Emerg Infect Dis. 2013; 19(11): 1803-10.

19- Ahmed OI, El-Hady SA, Ahmed TM, Ahmed IZ. Detection of bla SHV and bla CTX-M genes in ESBL producing Klebsiella pneumoniae isolated from Egyptian patients with suspected nosocomial infections. Egypt J Med Hum Genet. 2013; 14(3): 277-83.

20- Mardaneh J, Anvarinejad M, Abbasian A, Abbasi P, Rafaatpour N, Dehyadegari M, et al. Emergence of Multi-drug Resistant ESBL Producing Strains among Enterobacteriaceae Members Isolated from Patients Blood Samples in South of Iran. Iranian South Medical Journal. 2015; 18(5): 970-81. [Persian]

21- Abbas Poor SH, Mardaneh J, Dehbashi S, Jasemi SS. Profile of antimicrobial susceptibility isolated microorganisms from hospitalized patients in PICU ward and detection of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and ESBL-producing bacteria by phenotypic methods. Iranian South Medical Journal. 2014; 17 (4): 647-57. [Persian]

22- Jasemi SS, Alipoor F, Dehbashi S, Mardaneh J. Isolation of Citrobacter spp. from Blood Specimens in Patients Hospitalized in Kermanshah Imam Khomeini hospital and determination of the of isolates sensitivity to antibiotics: Short Communication. J Birjand Univ Med Sci. 2014; 21(3): 385-91. [Persian]

23- Mardaneh J, Soltan Dallal MM. Isolation and Identification Enterobacter asburiae from Consumed Powdered Infant Formula Milk (PIF) in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU). Acta Med Iran. 2016; 54(1): 39-43.

24- Soltani J, Poorabbas B, Miri N, Mardaneh J. Health care associated infections, antibiotic resistance and clinical outcome: A surveillance study from Sanandaj, Iran. World J Clin Cases. 2016; 4(3): 63-70.

25- Mardaneh J, Soltan-Dallal MM. Isolation and Identification of E. cowanii from Powdered Infant Formula in NICU and Determination of Antimicrobial Susceptibility of Isolates. Iran J Pediatr. 2014; 24(3): 261-6.

26- Abbasi P, Kargar M, Doosti A, Mardaneh J, Ghorbani-Dalini S, Dehyadegari MA. Characterization of Shiga-toxin producing E.coli (STEC) and enteropathogenic E.coli (EPEC) using multiplex Real-Time PCR assays for stx1, stx2, eaeA. Iran J Microbiol. 2014; 6(3): 169-74.

27- Anvarinejad M, Pouladfar G, Japoni A, Bolandparvaz S, Satiary Z, Abbasi P, et al. Isolation and Antibiotic Susceptibility of the Microorganisms Isolated from Diabetic Foot Infections in Nemazee Hospital, Southern Iran. J Pathog. 2015; 2015: 328796.

Archive of SID

www.SID.ir

Abstract *Original Article*

Characterization of *bla$_{CTX}$* gene and Cross-resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Hospitalized Patients

Gholamreza Pourali Sheshblouki[1,2], Jalal Mardaneh[3*]

Background and Aim: *Klebsiella pneumoniae* is a member of the Enterobacteriaceae family. There is a global emergence of multidrug-resistant (MDR) strains of *K. pneumoniae*, a Gram-negative enteric bacterium that causes nosocomial and urinary tract infections. The aims of the present study were to identify the *Klebsiella pneumoniae* infections in hospitalized patients, characterization of *bla*$_{CTX}$ gene, detection cross-resistance and cefepime susceptible-dose dependent (SDD) in isolates.

Materials and Methods: In present study, 111 strains of *Klebsiella pneumoniae* were isolated from patients hospitalized in Ghotbadden, Faghihi and Nemazee hospitals (Shiraz, Iran). The isolates were identified as *K.pneumoniae*, based on biochemical tests embedded in the API-20E system. Susceptibility testing (disc diffusion) was performed according clinical and laboratory standards institute (CLSI) guidelines. Detection cefepime susceptible-dose dependent (SDD) was performed. The detection of AmpC β-lactamases producing strains was done based on cefoxitin and cefepime disk tests. The *bla*$_{CTX}$ gene was detected in the isolates by PCR molecular method.

Results: Total 111 *Klebsiella pneumoniae* isolates were studied. The less effective drug was ceftazidime (37.8% isolates were sensitive). All SDD strains were susceptible to colistin and imipenem. Colistin (96.4%) and imipenem (88.3%) were the most effective antibiotics against isolates. Respectively, 41.4% and 35.1% isolates displayed resistance to gentamicin and amikacin. All colistin resistant isolates were imipenem sensitive. The results of PCR on *bla*$_{CTX}$ gene showed that 70.3% of the isolates possess the gene.

Conclusion: Carbapenem drugs are effective against *Klebsieella pneumoniae* infections. These results indicate that multidrug-resistant (MDR) and extensively drug resistant (XDR) strains of *K.pneumoniae* are rising, and fewer antibiotics may be useful for treating infections caused by these strains. Routine investigation and reporting of antibiotics resistance profile in patients presenting with *Klebsiella* infections is suggested.

Key Words: Hospitalized patients, Blood, Bacterial infection, *Klebsiella pneumoniae*, Antibiotic resistance pattern, Susceptible-dose dependent.

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2016; 23 (1):

Received: June 17, 2015 ***Accepted: February 23, 2016***

[1] *Department of Microbiology, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.*

[2] *Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.*

[3] ***Corresponding author,*** *Department of Microbiology, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran. Jalalmardaneh@yahoo.com*

Archive of SID

www.SID.ir