Archive of SID

Identification and sequencing of bla CTX-M genes in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae isolated from Milad hospital

Samar Sedaghatpishe[1], Maryam Ghane[2], Laleh Babaeekhou[3]

[1] *Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad university, Islamshahr, Iran*
[2] ***Corresponding author;*** *Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad university, Islamshahr, Iran*
Tel: +982156358105 Email: ghane@iiau.ac.ir, maryamghaneh @yahoo.com
[3] *Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad university, Islamshahr, Iran*

Citation Sedaghatpishe S, Ghane M, Babaeekhou L. [Identification and sequencing of bla CTX-M genes in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from Milad hospital]. J Birjand Univ Med Sci. 2019; 26(4): 315-26. [Persian]

DOI http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2019.26.4.103

Received: 18 April , 2019 **Accepted:** 3 August ,2019

ABSTRACT

Background and Aim: *Klebsiella pneumoniae* is one of the most important causes of nosocomial infection which has recently received much attention due to its antibiotic resistance. The aim of the present study is the identification and sequencing of $bla_{\text{CTX-M}}$ genes in clinical isolates of *K. pneumonia* isolated from Milad Hospital in Tehran.

Materials and Methods: In this descriptive cross-sectional study, first, antibiotic resistance of 100 *K. pnuemoniae isolates* to cephalosporins was performed by agar diffusion method; then $bla_{\text{CTX-M group2}}$ and $bla_{\text{CTX-M group9}}$ resistance genes were identified by PCR. Genotyping was performed based on the sequence of these genes and the dendrogram was drawn using the Mega 6 software (version 6).

Results: According to the antibiotic sensitivity testing, the amount of resistance to cephalosporins was between 30 and 54 percent. Overall, 5% of isolates had $bla_{\text{CTX-M group2}}$ and 8% of isolates had $bla_{\text{CTX-M group9}}$ as well as, the genotyping results showed that in this study $bla_{\text{CTX-M group2}}$ sequence with the sequences in the global database (NCBI) had little similarity, and the $bla_{\text{CTX-M group9}}$ gene sequence was similar to the $bla_{\text{CTX-M-14}}$ sequence gene of *E. coli*.

Conclusion: However, the frequency of $bla_{\text{CTX-M}}$ genes was low in this study, but due to the ability of these genes to spread by mobile genetic elements among enterobacteriaceae, it is considered alarm in the development of drug resistance among *K. pneumoniae*.

Key Words: Klebsiella Pneumoniae; Genotyping; Beta-Lactamase; Drug Resistance

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله اصیل پژوهشی

شناسایی و توالی‌یابی ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$ در ایزوله های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بیمارستان میلاد

سمر صداقت‌پیشه[۱]، مریم قانع[۲]، لاله بابایی‌خو[۳]

چکیده

زمینه و هدف: *کلبسیلا پنومونیه* یکی از مهم‌ترین علل ایجاد عفونت بیمارستانی است که به دلیل ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، اخیراً بسیار مورد توجه قرار گرفته است. هدف از مطالعه حاضر، شناسایی و توالی‌یابی ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$ در سویه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بیمارستان میلاد تهران بود.

روش تحقیق: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ابتدا مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۰۰ جدایه بالینی *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به سفالوسپورین‌ها با استفاده از روش انتشار از آگار صورت گرفت؛ سپس ژن‌های مقاومت $bla_{\text{CTX-M group2}}$ و $bla_{\text{CTX-M group9}}$ با استفاده از روش PCR شناسایی شدند. در ادامه ژنوتایپینگ تعدادی از جدایه‌ها بر اساس توالی ژن‌های مذکور انجام گرفت و دندروگرام با استفاده از نرم‌افزار مگا (نسخه ۶) رسم شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی، میزان مقاومت به سفالوسپورین‌ها بین ۳۰ تا ۵۴ درصد بود. در مجموع، ۵ درصد جدایه‌ها دارای ژن $bla_{\text{CTX-M- group2}}$ و ۸ درصد جدایه‌ها دارای ژن $bla_{\text{CTX-M-group9}}$ بودند. همچنین نتایج ژنوتایپینگ نشان داد که توالی $bla_{\text{CTX-M- group2}}$ در این مطالعه با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه داده جهانی (NCBI) شباهت اندکی داشت و توالی ژن $bla_{\text{CTX-M grop9}}$ مشابه توالی $bla_{\text{CTX-M14}}$ جدایه *اشریشیاکلی* بود.

نتیجه‌گیری: هر چند فراوانی ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$ در این مطالعه پایین بود، اما با توجه به اینکه این ژن‌ها از طریق عناصر ژنی متحرّک در بین انتروباکتریاسه‌ها قابل انتقال هستند زنگ خطر جدی در گسترش مقاومت دارویی در بین *کلبسیلا پنومونیه* محسوب می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه*؛ ژنوتایپینگ؛ بتالاکتاماز؛ مقاومت دارویی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۸؛ ۲۶ (۴): ۳۱۵-۳۲۶.

دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۹ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۲۲

[۱] گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران

[۲] **نویسنده مسئول؛** گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران

آدرس: اسلامشهر، میدان نماز، خیابان شهید صیاد شیرازی، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه

تلفن: ۰۵+۹۸۲۱۵۶۳۵۸۱ پست الکترونیک: ghane@iiau.ac.ir, maryamghaneh@yahoo.com

[۳] گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه، جزئی از میکروفلور طبیعی بدن انسان را تشکیل داده و در حدود یک سوم افراد جامعه، ناقل این باکتری هستند و همچنین به‌عنوان یکی از عوامل مهم عفونت‌های اکتسابی از جامعه و بیمارستان به حساب می‌آید. این باکتری سبب ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌ها شامل: سپتی‌سمی، پنومونی، عفونت مجاری ادراری، مننژیت و آبسه‌های چرکی در اندام‌های مختلف انسان و دام می‌شود (۱).

سفالوسپورین‌ها داروهای اصلی و پرکاربرد در درمان عفونت‌های ناشی از انتروباکتریاسه‌ها از جمله *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشند که متأسفانه در چند سال اخیر مقاومت بالایی به این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش شده است (۲). یکی از دلایل مهم مقاومت به سفالوسپورین‌ها، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز از جمله آنزیم‌های گروه CTX-M است (۳). سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL)، از لحاظ بالینی بسیار با اهمیت هستند؛ زیرا باعث افزایش مقاومت دارویی و به دنبال آن افزایش مرگ و میر بیماران به‌ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌ها می‌شوند (۴). آنزیم‌های بتالاکتاماز بیشتر بر روی پلاسمیدها و یا عوامل انتقال‌یابنده مانند ترانسپوزون‌ها قرار داشته و به‌طور سریع در بین سویه‌های باکتریایی انتشار می‌یابند و موجب مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف مانند سفالوسپورین‌ها می‌گردند. این آنزیم‌ها با تخریب حلقه بتالاکتام در داروها، از تأثیر ضد میکروبی دارو بر سنتز دیواره باکتری‌ها جلوگیری می‌کنند. تیپ‌های بتالاکتاماز که بیشتر در *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* دیده می‌شود معمولاً از نوع CTX-M، SHV-1 و TEM-1 می‌باشد. باکتری‌های حامل این بتالاکتامازها که به‌عنوان جدایه‌های ESBL شناخته می‌شوند، گاهی اوقات علت بیش از ۹۰ درصد مرگ و میر افراد مبتلا به عفونت‌های بیمارستانی هستند (۵).

آنزیم‌های گروه CTX-M گروهی از بتالاکتامازها هستند که از طریق پلاسمیدها کد می‌شوند و برای اولین بار در سال ۱۹۸۹ در آلمان شناسایی شده‌اند. نام این آنزیم، نشان‌دهنده پتانسیل فعالیت آن برای هیدرولیز آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم است (۳). این آنزیم‌ها باعث ایجاد مقاومت به پنی‌سیلین و طیف وسیعی از سفالوسپورین‌های نسل سوم مانند: سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و مونوباکتام‌ها مثل آزوترئونام می‌شوند؛ اما در عین حال مقاومت به سفامایسین‌ها و کارباپنم‌ها در آنها وجود ندارد (۵، ۴). عواملی مانند کلاولانیک اسید، تازوباکتام و سولباکتام با اثر بازدارندگی، منجر به مهار عملکرد این آنزیم‌ها می‌گردند (۳). بررسی‌ها نشان داده‌اند که ژن‌های حمل‌کننده این آنزیم‌ها می‌توانند بر روی عناصر ژنتیکی متحرک همچون پلاسمید، ترانسپوزون و اینتگرون قرار گرفته و بدین واسطه به راحتی از یک سویه به سویه‌ای دیگر منتقل شوند (۵). این بتالاکتامازها به ۵ گروه اصلی شامل: CTX-M1، CTX-M2، CTX-M8، CTX-M9 و CTX-M25 تقسیم شده که شیوع آنها در مناطق جغرافیایی متفاوت گزارش شده است. این آنزیم‌ها با بتالاکتامازهای تیپ TEM وSHV ارتباط ژنتیکی کمی دارند، اما شباهت زیادی با آنزیم کروموزومی AmpC دارند (۶).

تایپینگ انتروباکتریاسه‌ها از نظر اپیدمیولوژی اهمیت ویژه‌ای دارد و از این طریق می‌توان تیپ‌های غالب یک گونه از باکتری و نحوه انتشار آن در بین جامعه و منابع مختلف را شناسایی کرد (۷). روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی مختلفی برای تایپینگ باکتری‌ها وجود دارد که در این میان SLST (Single locus sequence typing)، یک روش سریع، دقیق و مطمئن در تایپینگ باکتری‌ها به حساب می‌آید (۸). در این روش، توالی ژن‌های خاص یک باکتری تعیین شده و با توالی‌های ثبت شده در پایگاه داده جهانی (مانند NCBI) مقایسه می‌گردد. در این میان، ژنوتایپینگ *کلبسیلا پنومونیه* بر اساس توالی ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$ که یکی از عوامل ژنی

www.SID.ir

Archive of SID

مقاومت به بتالاکتامازها محسوب می‌شود، می‌تواند در امر کنترل مقاومت باکتری‌ها به این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها کمک‌کننده باشد (۹).

در کل به‌دلیل کاربرد وسیع سفالوسپورین‌ها در درمان عفونت‌های حاصل از *کلبسیلا پنومونیه*، لازم است الگوی حساسیت باکتری به این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز مکانیسم‌های مقاومت به آنها به‌طور دائم مورد ارزیابی قرار گیرد. از آنجایی که آنزیم‌های بتالاکتاماز ازجمله آنزیم‌های گروه CTX-M، در ایجاد مقاومت به سفالوسپورین‌ها و سایر بتالاکتام‌ها نقش بسزایی دارد، بنابراین در مطالعه حاضر ابتدا مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های مورد بررسی نسبت به سفالوسپورین‌ها ارزیابی و در نهایت شناسایی ژن $bla_{\text{CTX-M}}$ و ژنوتایپینگ جدایه‌های مذکور با استفاده از توالی ژن $bla_{\text{CTX-M}}$ انجام شد تا دلایل مقاومت و نقش این آنزیم‌ها در ایجاد مقاومت مشخص گردد و کنترل عفونت ناشی از این باکتری‌ها به‌خوبی انجام گیرد.

روش تحقیق

جمعیت میکروبی:

جمعیت میکروبی شامل ۱۰۰ جدایه بالینی *کلبسیلا پنومونیه* بود که در مطالعه قبلی ما، از نمونه‌های ادراری بیماران بستری در بیمارستان میلاد تهران جمع‌آوری و با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی تأیید شده بود (۱۰). این مطالعه با رعایت کامل مفاد کمیته اخلاق در پژوهش و مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد واحد علوم پزشکی تهران (IR.IAU.TMU.REC.1396.278) انجام شد.

تست آنتی‌بیوگرام:

برای انجام تست آنتی‌بیوگرام، ۵ دیسک مربوط به خانواده سفالوسپورین‌ها شامل: سفتریاکسون (۳۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفوکسیتین (۳۰ µg)، سفپیم (۳۰ µg) و سفتازیدیم (۳۰ µg) (Mast، انگلستان) مورد استفاده قرار گرفت. تست آنتی‌بیوگرام با استفاده از روش دیسک‌دیفیوژن، طبق روش ارائه‌شده توسط مؤسسه استاندارد روش‌های آزمایشگاهی (CLSI) انجام شد (۱۱).

استخراج DNA:

استخراج DNA به روش جوشاندن برای همه جدایه‌ها انجام گرفت. به طور خلاصه، از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط BHI (Merk، آلمان)، مقدار ۵ میلی‌لیتر در داخل میکروتیوب ریخته شد و بعد از عمل سانتریفیوژ (۱۰۰۰ rpm)، پلاک باکتری تهیه و به آن ۵۰۰ میکرولیتر بافر TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA [pH 8]) اضافه گردید؛ سپس پلاک ایجادشده توسط شیکر (کمپانی IKA، آلمان) با بافر TE یکنواخت شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد در داخل بن‌ماری (فاتر الکتریک، ایران) قرار گرفت. بعد از این مرحله، میکروتیوب‌ها با دور ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و مایع رویی به‌عنوان DNAی الگو استفاده شد (۱۲). کمیت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل ۲۰۰۰ (امریکا) در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد و در نهایت در فریزر ۲۰°C- برای آزمون‌های مولکولی نگهداری گردید.

تکثیر ژن‌های $bla_{\text{CTX-M group2}}$ و $bla_{\text{CTX-M group9}}$

برای تکثیر این ژن‌ها از پرایمرهای سفارش داده شده در شرکت سیناژن استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱- پرایمرهای به‌کار رفته برای تکثیر ژن‌های $bla_{\text{CTX-M group2}}$ و $bla_{\text{CTX-M group9}}$

منبع	اندازه محصول PCR (جفت باز)	توالی الیگونوکلئوتیدی (3´-5´)	ژن	پرایمر
(۱۲)	۸۶۵	ATGATGACTCAGAGCATTCG	bla CTX-M group2	CTX-M2-F
		TGGGTTACGATTTTCGCCGC		CTX-M2-R
	۸۶۹	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	bla CTX-M group9	CTX-M9-F
		CCCTTCGGCGATGATTCTC		CTX-M9-R

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش PCR شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس[1] ۲X (آمپلیکون، دانمارک)، ۲۵ پیکومول از هر کدام از پرایمرها و ۶ میکروگرم DNA الگو بود که با استفاده از آب دیونیزه به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. همچنین برنامه حرارتی PCR به‌صورت خلاصه شامل: واسرشت ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۷ دقیقه، ۳۲ سیکل تکثیری شامل ۹۴ درجه برای یک دقیقه، ۶۰ درجه برای ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه برای مدت یک دقیقه بود و در نهایت تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۰ دقیقه اعمال شد. در ادامه محصول PCR در ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد و از نظر حضور باندهای ۸۶۵ و ۸۶۹ جفت باز به‌ترتیب برای ژن‌های *bla* CTX-M group2 و *bla* CTX-M group9 مورد بررسی قرار گرفت و حضور و عدم حضور باند به‌ترتیب به‌صورت اعداد صفر و یک در نرم‌افزار Excel وارد شد (۱۳).

توالی‌یابی محصول PCR ژن $bla_{\text{CTX-M group2}}$ و $bla_{\text{CTX-M group9}}$ و رسم دندروگرام:

دو ژن $bla_{\text{CTX-M group2}}$ و شش ژن $bla_{\text{CTX-M group9}}$ مربوط به ۸ جدایه با استفاده از پرایمرهای مذکور در حجم ۶۰ میکرولیتر تکثیر یافتند. در ادامه، محصولات PCR این جدایه‌ها در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و با استفاده از کیت تخلیص DNA (سیناژن، ایران)، باند مورد نظر خالص و به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. با توجه با اینکه طول محصولات PCR این ژن نزدیک ۹۰۰ جفت باز بود، بنابراین توالی‌یابی دو طرفه انجام گرفت و توالی مشابه[2] با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک DNAstar (نسخه ۱۴/۱) به‌دست آمد. در ادامه توالی به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار مگا (نسخه ۶) با تعدادی از توالی‌های مشابه ژنی ثبت‌شده در پایگاه داده NCBI، مقایسه شد و دندروگرام بر اساس میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی رسم گردید (۱۴).

آنالیز آماری:

نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (ویرایش ۱۹)، با کمک آزمون ضریب همبستگی Spearman و آزمون Chi-squared در حد معنی‌داری P<۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها

جامعه آماری:

جامعه آماری در این مطالعه توصیفی- مقطعی، ۱۰۰ جدایه ادراری *کلبسیلا پنومونیه* بود که در بین سال‌های ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۶ از بیمارستان میلاد تهران جمع‌آوری شده بود و همه جدایه‌ها با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی به‌عنوان جدایه *کلبسیلا پنومونیه* تأیید شدند.

نتایج تست آنتی‌بیوگرام:

نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نمودار ۱ آورده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک سفپیم (۵۷ درصد) و کمترین میزان مقاومت مربوط به سفتریاکسون (۳۱ درصد) بود. در مجموع ۱۳ درصد جدایه‌ها به یک آنتی‌بیوتیک، ۳۰ درصد به ۲ آنتی‌بیوتیک، ۱۴ درصد به ۳ آنتی‌بیوتیک، ۵ درصد به ۴ آنتی‌بیوتیک و ۱۵ درصد به همه سفالوسپورین‌های مورد بررسی، مقاوم بودند. همچنین ۲۳ درصد جدایه به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی حساس گزارش شدند.

نتایج بررسی حضور ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$

در الکتروفورز محصول PCR ژن‌های $bla_{\text{CTX-M group2}}$ و $bla_{\text{CTX-M group9}}$، باندهای مورد انتظار برای هر کدام از ژن‌ها به‌صورت جداگانه مشاهده و ثبت گردید (شکل ۱). طبق نتایج الکتروفورز، فراوانی ژن‌های $bla_{\text{CTX-M group2}}$ و $bla_{\text{CTX-M group9}}$ به ترتیب ۵ درصد و ۸ درصد بود. در مجموع از بین ۱۰۰ جدایه مورد مطالعه، ۸۷ درصد جدایه‌ها فاقد هر یک از ژن‌های مورد بررسی بودند و ۱۳ درصد

[1] *Mastermix*
[2] *Consensus*

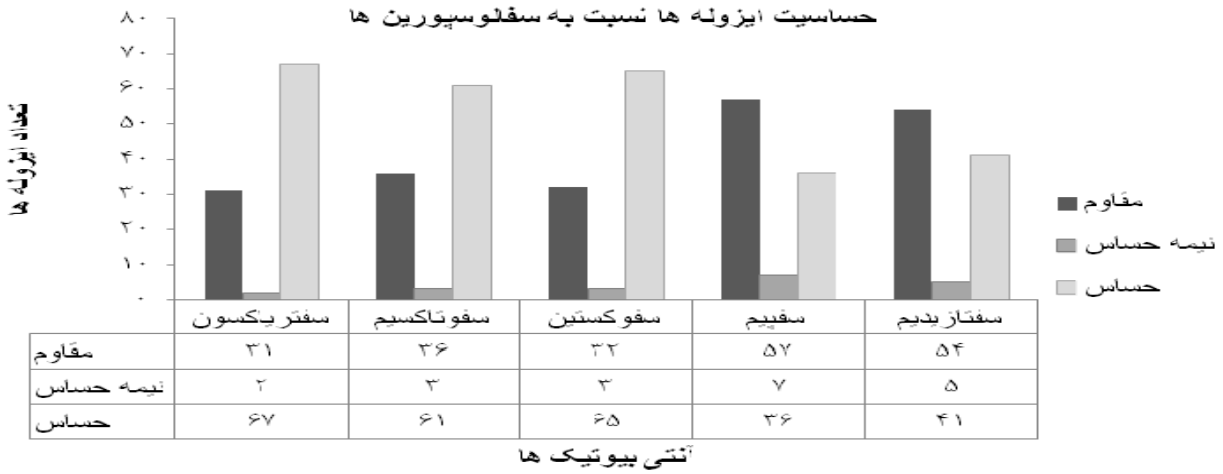
www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌ها یکی از ژن‌ها را در بر داشتند.

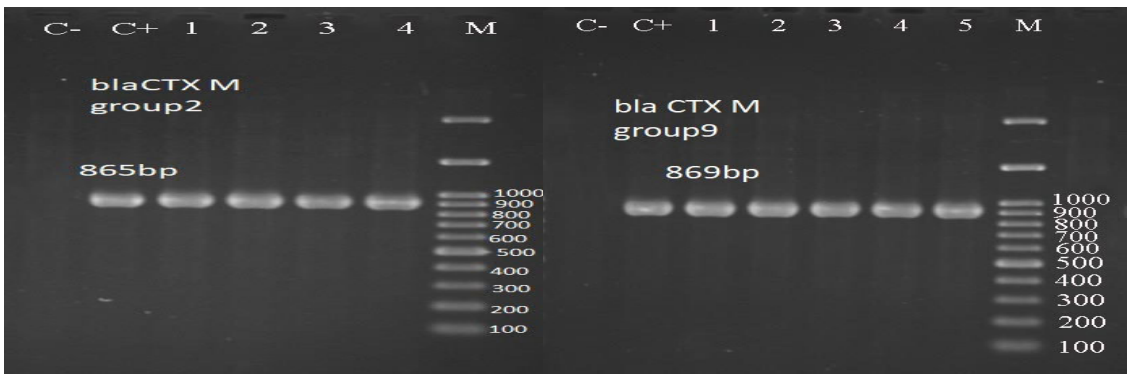
توالی‌یابی و ژنوتایپینگ:

نتایج توالی نوکلئوتیدی ۲ جدایه حامل ژن $bla_{\text{CTX-M group2}}$ و ۶ جدایه حامل ژن $bla_{\text{CTX-M group9}}$ با نرم‌افزار DNAstar آنالیز و توالی مشابه هر جدایه به‌دست آمد. در ادامه برای هر کدام از ژن‌ها به‌صورت جداگانه درخت فیلوژنی رسم شد. درخت فیلوژنی بر اساس میزان تشابه توالی‌ها با توالی های ثبت‌شده در سایت NCBI رسم شد و توالی‌هایی که تشابهات بیشتری داشتند، نزدیک یکدیگر قرار گرفتند. در شکل ۲ الف، توالی ۲ جدایه حامل ژن $bla_{\text{CTX-M group2}}$ به‌صورت دایره توپر با اسامی B16 TRIR 2017 و B17 TRIR 2017 نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، هر دو جدایه از نظر ژن مربوطه بسیار نزدیک به هم بودند و در درخت فیلوژنی کنار هم قرار گرفتند؛ اما نسبت به سایر توالی‌های ثبت شده در پایگاه داده NCBI، در انتهای هرم دندروگرام جای داشتند و تفاوت ژنتیکی زیادی با آنها نشان دادند که نشان از تفاوت بالای توالی ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه با سایر توالی‌های ثبت شده دارد.



	سفتر یکسون	سفوتاکسیم	سفوکستین	سفپیم	سفتازیدیم
مقاوم	۳۱	۳۶	۳۲	۵۷	۵۴
نیمه حساس	۲	۳	۳	۷	۵
حساس	۶۷	۶۱	۶۵	۳۶	۴۱

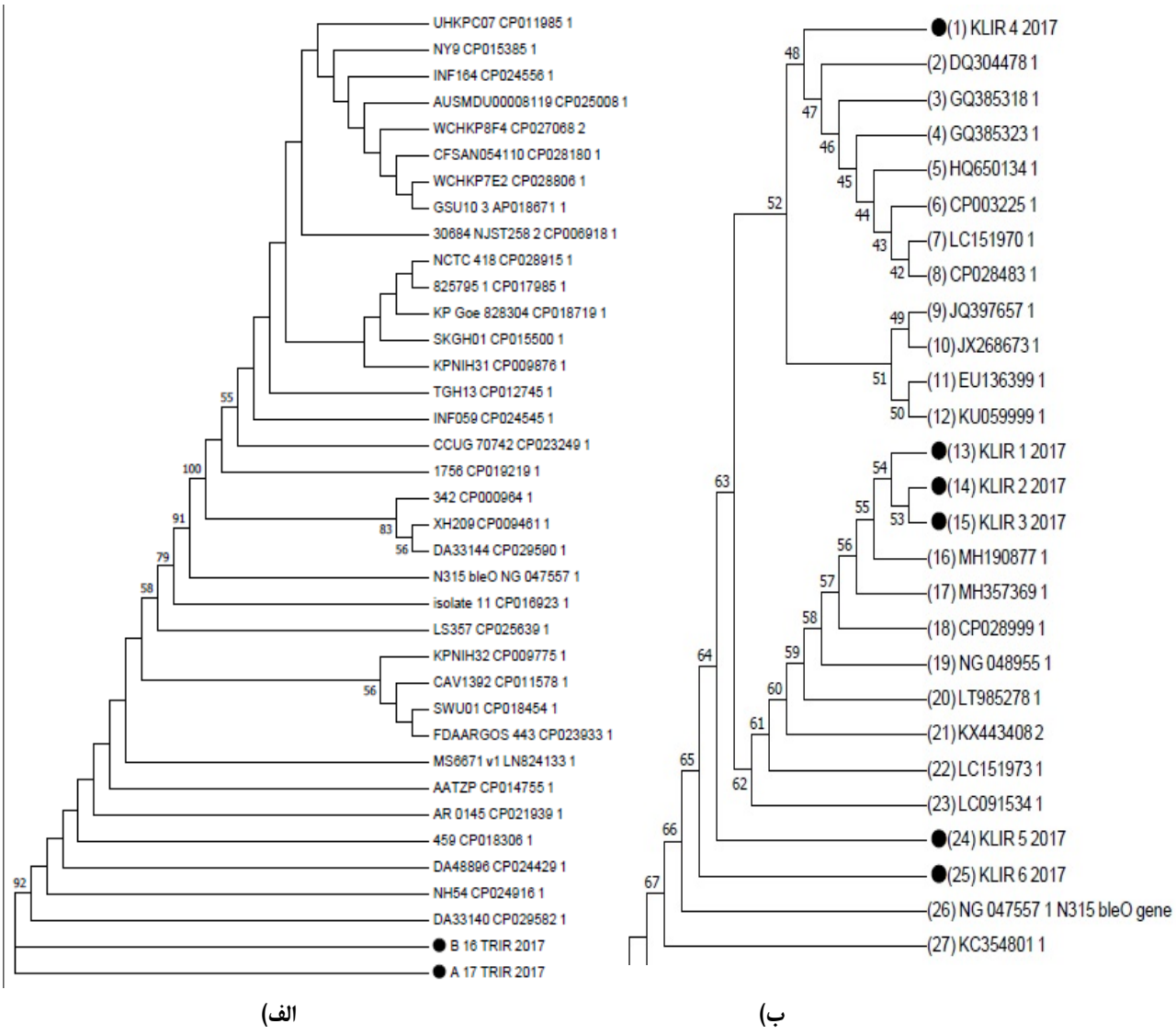
نمودار ۱- نتایج تست دیسک دیفیوژن مربوط به ۱۰۰ جدایه بالینی کلبسیلا پنومونیه



شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصول PCR مربوط به $bla_{\text{CTX-M group2}}$ و $bla_{\text{CTX-M group2}}$، چاهک -C: کنترل منفی، چاهک +C: کنترل مثبت، چاهک ۱ تا ۵ مربوط به جدایه‌های مورد مطالعه، چاهک M: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی

www.SID.ir

Archive of SID



الف) ب)

شکل ۲- دندروگرام‌های مربوط به توالی دو ژن *bla* CTX-M group2 (شکل الف) و *bla* CTX-M group9 (شکل ب)

در شکل ۲ ب، ۶ جدایه حامل ژن blaCTX-M group9 به‌صورت دایره توپر با اسامی KLIR 1 2017T، KLIR 2 2017، KLIR 4 2017، KLIR 4 2017 و KLIR 4 2017 نشان داده شده است. در مجموع ۶ جدایه مورد بررسی در سه گروه یک‌تایی، دوتایی و سه‌تایی قرار گرفتند که نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی بالا در بین جدایه‌های توالی‌یابی‌شده از نظر ژن blaCTX-M group9 بوده است و به عبارت دیگر منشأ آنها احتمالاً متفاوت بوده و یا جهش‌های ژنی یا توالی‌های الحاقی زیادی در آنها رخ داده است.

نتایج آماری:

در مجموع همبستگی معنی‌داری بین آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم با سفیپیم وجود داشت (P<۰/۰۵)؛ اما رابطه بین وجود ژن‌های $bla_{\text{CTX-M group2}}$ و $bla_{\text{CTX-M group9}}$ با مقاومت آنتی‌بیوتیکی معنی‌دار نبود.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

کلبسیلا پنومونیه، یکی از عوامل بیماری‌زای مهم عفونت‌های بیمارستانی و کسب‌شده از جامعه به حساب می‌آید. یکی از مشکلات اساسی در بخش پزشکی و دامپزشکی، مقاومت انتروباکتریاسه‌ها از جمله *کلبسیلا پنومونیه* و *اشریشیاکلی* به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام (از جمله سفالوسپورین‌ها) است (۱۵) که به‌دلیل قرارگیری ژن‌های عامل در پلاسمید، به‌راحتی در بین گونه‌های مختلف انتشار می‌یابد و موجب مقاومت طیف وسیعی از سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شود. استفاده مؤثّر از آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی برای تشخیص صحیح و جلوگیری از گسترش چنین پاتوژن‌هایی موجب کاهش نیاز به استفاده از داروها می‌شود (۵). یکی از فاکتورهای اساسی و مهم در کنترل عفونت‌ها، تشخیص و شناسایی سویه‌های مقاوم است. برای شناسایی مقاومت دارویی باکتری‌ها، روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی مختلف وجود دارد (۱۶) که در این مطالعه از هر دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی برای شناسایی جدایه‌های مقاوم استفاده شد. همچنین برای اطلاع دقیق از وضعیت اپیدمیولوژی این جدایه‌ها و مقایسه توالی ژن‌های مقاومت با پایگاه داده جهانی (NCBI)، تعدادی از جدایه‌ها توالی‌یابی و تایپینگ شدند.

در مطالعه حاضر، مقاومت آنتی‌بیوتیکی تمام ۱۰۰ جدایه نسبت به ۵ آنتی‌بیوتیک خانواده سفالوسپورین‌ها با استفاده از روش انتشار از آگار بررسی شد و نتایج نشان داد میزان مقاومت ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفوکسیتین و سفتریاکسون به‌ترتیب: ۵۷، ۵۴ ، ۳۶ ، ۳۲ و ۳۱ درصد بوده است.

در این مورد، مطالعه‌ای که توسط نجار پیرایه و همکاران در تهران بر روی ۸۵ نمونه بالینی *کلبسیلا پنومونیه* انجام گرفت، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و سفپیم ۵۶/۵ درصد گزارش شد (۱۷). در مطالعه‌ای دیگر که توسط فیض‌آبادی و همکاران در تهران انجام گرفت، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم و سفتازیدیم به‌ترتیب ۷۱ و ۸۵ درصد گزارش شد (۱۸). البته باید گفت که دلایل متعددی در متغیر بودن نتایج حساسیت دارویی یک گونه باکتری در مطالعات مختلف وجود دارد که از آن جمله می‌توان به نوع دیسک‌های مورد بررسی و میزان حساسیت روش مورد استفاده اشاره کرد. همچنین تفاوت در منطقه جغرافیایی و منشأ نمونه هم می‌تواند در تنوع نتایج مقاومت دارویی باکتری نقش داشته باشد. اگرچه در هر دو مطالعه مذکور، میزان مقاومت به سفالوسپورین‌ها نسبت به مطالعه ما از میزان بالاتری برخوردار بود، با این همه باید خاطر نشان کرد که در مطالعه حاضر نیز مقاومت به سفالوسپورین‌ها وضعیت مناسبی نداشته و بیش از ۵۰ درصد بود.

در این مطالعه همچنین فراوانی دو ژن $bla_{\text{CTX-M group2}}$ و $bla_{\text{CTX-M group9}}$ با استفاده از PCR سنجیده شد. نتایج حاکی از حضور این ژن‌ها در ایزوله‌های مورد بررسی بود. در مطالعه سروش و قانع، ۶۵ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* که از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های آموزشی تهران جمع‌آوری شده بود، از نظر فراوانی ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$، bla_{TEM} و bla_{SHV} مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه آنها حاکی از بالا بودن فراوانی (۵۵/۳٪) ژن $bla_{\text{CTX-M}}$ در بین جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* بود (۱۹). در مطالعه Chaudhary و همکاران فراوانی ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$ (CTX-M3) و (CTX-M9) در بین ۱۵۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه*، ۳۷ درصد گزارش شد. آنها همچنین بیان کردند که وجود ژن CTX-M به‌طور معنی‌داری همراه با ژن‌های TEM و SHV بوده است (۲۰). در مطالعه Edelstein و همکاران، از ۹۰۴ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* و *اشریشیاکلی*، ۱۶ درصد حامل ژن $bla_{\text{CTX-M}}$ بودند که در دو گروه CTX-M1 و CTX-M2 جای داشتند و در مجموع سهم *کلبسیلا پنومونیه* از *اشریشیاکلی* در داشتن ژن‌های CTX-M بیشتر بود (۲۱)؛ اما در مطالعه ترشیزی و همکاران، فراوانی ژن $bla_{\text{CTX-M}}$ در بین ۳۲۵ جدایه انتروباکتریاسه مورد مطالعه

www.SID.ir

Archive of SID

قرار گرفت و نتایج نشان داد که فراوانی این ژن در بین *اشریشیاکلی* (۲۰ درصد) بیشتر از *انتروباکتر* (۱۵ درصد) و *کلبسیلا پنومونیه* (۴ درصد) است (۲۲). در مطالعه حاضر، دو ژن مورد بررسی نسبت به بقیه مطالعات از فراوانی پایین‌تری برخوردار بودند و در واقع ۸۷ درصد جدایه‌ها فاقد این دو ژن بودند که از یک دیدگاه کم‌بودن فراوانی این دو گروه از ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$ مطلوب به نظر می‌رسد، اما به دلیل اینکه CTX-Mها دارای گروه‌های مختلف و متعددی هستند بنابراین برای آگاهی و اطلاع دقیق از وضعیت شیوع این ژن‌ها بهتر است در مطالعات بعدی، سایر گروه‌ها نیز مورد بررسی و آنالیز قرار گیرد تا برای کنترل وضعیت بتالاکتامازها تصمیم بهتر و کارشناسی‌شده انجام گیرد.

در این مطالعه همچنین ارتباط فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌ها از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت و نتایج نشان داد که بین وجود هر کدام از ژن‌های مورد بررسی با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مذکور رابطه معنی‌داری وجود ندارد ($P<۰/۰۵$). این یافته به این دلیل است که عوامل ژنی زیادی در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام وجود دارد (۲۳)؛ بنابراین برای بررسی علت مقاومت دارویی، بهتر است مکانیسم‌های مقاومت متعددی بررسی گردد. همچنین تعداد ایزوله‌های باکتریایی برای بررسی فراوانی ژن‌های مقاومت دارویی و مکانیسم ایجاد مقاومت، از اهمیت بالایی برخوردار است و هر چند در مطالعه حاضر ۱۰۰ جدایه بالینی مورد بررسی قرار گرفت، اما در صورت بالابودن این تعداد می‌توانست نتایج مطلوب‌تر و دقیق‌تری هم داشته باشد. با این همه، همبستگی معنی‌داری بین مقاومت به سفتازیدیم و سفپیم در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* دیده شد که یکی از دلایل وجود همبستگی بین آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌تواند ناشی از حمل پلاسمیدهای مقاومت مشابه در بین جدایه‌های باکتری باشد (۲۴).

ژنوتایپینگ تعدادی از جدایه‌ها بر اساس توالی دو ژن $bla_{\text{CTX-M group2}}$ و $bla_{\text{CTX-M group9}}$ به صورت دو دندروگرام نشان داده شده است. در دندروگرام مربوط به ژن $bla_{\text{CTX-M group2}}$، چهار سویه *کلبسیلا پنومونیه* با مقاومت چند دارویی (MDR)، نزدیکترین توالی را نسبت به جدایه‌های ما داشتند که این امر می تواند نقش احتمالی این ژن را در مقاومت بالای *کلبسیلا پنومونیه* به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دهد. همچنین از نظر جغرافیایی هر چهار سویه، از قاره آسیا گزارش شده بود که این مطلب احتمال شیوع منطقه‌ای پلاسمیدهای حامل این ژن را می‌رساند. البته باید خاطر نشان کرد که تنوع ژنتیکی ژن‌های بتالاکتاماز معمولاً در بین جدایه‌های انتروباکتریاسه در مطالعات مختلفی مانند Henriques و همکاران پایین گزارش شده است که نشان از نیای مشترک آنها دارد (۲۵). در این مورد حتی در مطالعه Gatica و همکاران نشان داده شد که به‌دلیل تشابه ژنتیکی بالا بین ژن‌های بتالاکتاماز در جدایه‌های غیر بالینی و بالینی، احتمال انتقال آنها به‌صورت افقی از باکتری‌های محیطی به باکتری‌های عامل مولد بیماری انسانی وجود دارد (۲۶).

در دندروگرام $bla_{\text{CTX-M group9}}$، نتایج نشان داد که تنوع این ژن نسبت به گروه ۲ از میزان بالاتری برخوردار است و ۶ جدایه مورد بررسی در سه دسته جای داشتند. در دسته اول KLIR 4 قرار داشت که از نظر مقایسه توالی، مشابه یک سویه *کلبسیلا پنومونیه* ثبت شده در چین بود. در دسته دوم سه جدایه KLIR 1، KLIR 2 و KLIR3 وجود داشت که از نظر توالی نوکلئوتیدی مشابه ژن $bla_{\text{CTX-M-14}}$ در سویه‌های *اشریشیاکلی* ثبت‌شده در اروپا بود. در دسته سوم هم دو سویه KLIR 5 و KLIR 6 قرار داشت که مشابه با توالی دو پلاسمید pJEG011 و pFAM22321 به‌ترتیب در *کلبسیلا* و *اشریشاکلی* بود. در مجموع از نظر ژن $bla_{\text{CTX-M group9}}$ سویه‌های مطالعه حاضر در هرم سویه‌های ثبت‌شده در جهان قرار داشتند، اما از نظر ژن $bla_{\text{CTX-M group2}}$ تفاوت زیادی بین سویه‌های این مطالعه با سویه‌های ثبت شده وجود داشت که در دندروگرام رسم‌شده، به‌صورت جداگانه در انتهای دندروگرام جای گرفته‌اند. البته این امر می‌تواند ناشی از دلایل

www.SID.ir

Archive of SID

متفاوتی مانند توالی‌های الحاقی و جهش‌های نقطه‌ای باشد. همچنین به‌دلیل مطالعات نادر در مورد توالی ژن‌های بتالاکتاماز در ایران، هیچ جدایه‌ای از ایران در دندروگرام رسم‌شده برای دو ژن مورد مطالعه مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع در این مطالعه نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که سفالوسپورین‌ها که جزء داروهای پرکاربرد در درمان *کلبسیلا پنومونیه* هستند، کم‌کم اثر خود را در درمان این نوع از عفونت‌ها از دست می‌دهند و احتمال افزایش مقاومت به این خانواده در آینده زیاد است. اگرچه فراوانی ژن‌های $bla_{\text{CTX-M group2}}$ و $bla_{\text{CTX-M group9}}$ در بین جدایه‌های مورد مطالعه زیاد نبود، ولی به‌دلیل مقاومت فنوتیپی بالا به این آنتی‌بیوتیک‌ها، احتمال وجود سایر ژن‌های مرتبط با مقاومت به سفالوسپورین‌ها در بین این جدایه‌ها بیشتر است. در توالی‌یابی هم مشخص شد که تیپ‌های متنوعی از این ژن‌ها در ایران وجود دارد که البته تنوع ژنتیکی $bla_{\text{CTX-M group9}}$ از $bla_{\text{CTX-M group2}}$ بیشتر بود. همچنین به‌دلیل تشابه جدایه‌های *کلبسیلاپنومونیه* از نظر توالی نوکلئوتیدی ژن‌های بتالاکتاماز در این مطالعه با سویه‌های MDR ثبت‌شده در NCBI، خطر گسترش تیپ‌های MDR *کلبسیلا* در تهران بیشتر است.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد (کد مصوب ۲۳۱۳۰۵۱۳۹۶۱۰۰۱) است. نویسندگان مقاله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر، نهایت تشکر و سپاس‌گزاری را دارند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1- Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of Klebsiella pneumoniae. Future Microbiol. 2014; 9(9): 1071-81. doi: 10.2217/fmb.14.48.

2- Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice MP, Libori MF, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in Klebsiella pneumoniae urinary strains. J Appl Microbiol. 2017; 123(4): 1003-18. doi: 10.1111/jam.13533.

3- Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. Clin Microbiol Infect. 2008; 14 Suppl 1: 90-103. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x

4- Díaz-Agero Pérez C, López-Fresneña N, Rincon Carlavilla AL, Hernandez Garcia M, Ruiz-Garbajosa P, Aranaz-Andrés JM, et al. Local prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae intestinal carriers at admission and co-expression of ESBL and OXA-48 carbapenemase in Klebsiella pneumoniae: a prevalence survey in a Spanish University Hospital. BMJ open. 2019; 9(3): e024879. doi: 10.1136/bmjopen-2018-024879.

5- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP, et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol. 2001; 39(6): 2206-12. DOI: 10.1128/JCM.39.6.2206-2212.2001

6- Swanson E, Freeman L, Seleem M, Guba Jr A, Morris S, Yang D, et al. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. J Am Vet Med Assoc. 2014; 244(10): 1126-7. doi: 10.2460/javma.244.10.1126

7- Hakimi Alni R, Ghobadi N, Najafi Asl M, Sharifi A. Genotyping of Escherichia coli isolated from human and water samples using ERIC-PCR method in Hamadan city. J Birjand Univ Med Sci. 2018; 25(4): 297-306. [Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

8- Hakimi Alni R, Mohammadzadeh A, Mahmoodi P. Molecular typing of Staphylococcus aureus of different origins based on the polymorphism of the spa gene: characterization of a novel spa type. 3 Biotech. 2018; 8(1): 58. doi: 10.1007/s13205-017-1061-6.

9- Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β-lactamase CTX-M-3. J Antimicrob Chemother. 2002; 50(6): 1031-4. DOI: 10.1093/jac/dkf240

10- Amiri M, Ghane M, BabaeeKhou L. Molecular typing and investigating the presence of efflux genes in urinary isolates of Klebsiella pneumoniae. J Urmia Univ Med Sci. 2019; 30(1): 8-20. [Persian]

11- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

12- Ribeiro Junior JC, Tamanini R, Fritegoto Soares B, Marangon de Oliveira A, de Godoi Silva F, Fernandes da Silva F, et al. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. Semina: Ciências Agrárias. 2016; 37(5): 3069-78. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n5p3069

13- Guessennd N, Bremont S, Gbonon V, Kacou-Ndouba A, Ekaza E, Lambert T, et al. [Qnr-type quinolone resistance in extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteria in Abidjan, Ivory Coast]. Pathol Biol (Paris). 2008; 56(7-8): 439-46. [French] doi: 10.1016/j.patbio.2008.07.025.

14- Grillová L, Bawa T, Mikalová L, Gayet-Ageron A, Nieselt K, Strouhal M, et al. Molecular characterization of Treponema pallidum subsp. pallidum in Switzerland and France with a new multilocus sequence typing scheme. PloS one. 2018; 13(7): e0200773. doi: 10.1371/journal.pone.0200773.

15- Wyres KL, Holt KE. Klebsiella pneumoniae population genomics and antimicrobial-resistant clones. Trends Microbiol. 2016; 24(12): 944-56. doi: 10.1016/j.tim.2016.09.007.

16- Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. Front Microbiol. 2016; 7: 895. doi: 10.3389/fmicb.2016.00895.

17- Najar-Peerayeh S, Derakhshan S, Fallah F, Bakhshi B, Alebouyeh M. Prevalence of Extended-Spectrum β-Lactamases Among Klebsiella pneumoniae Isolated from Intensive Care Unit Patients in a Tertiary Hospital. Arch Clin Infect Dis. 2019; 14(1):e69199. doi: 10.5812/archcid.69199.

18- Feizabadi MM, Mahamadi-Yeganeh S, Mirsalehian A, Mirafshar SM, Mahboobi M, Nili F, et al. Genetic characterization of ESBL producing strains of Klebsiella pneumoniae from Tehran hospitals. J Infect Dev Ctries. 2010; 4(10): 609-15.

19- 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. [Persian]

20- Chaudhary M, Payasi A. Antimicrobial susceptibility patterns and molecular characterization of Klebsiella pneumoniae clinical isolates from north Indian patients. Int J Med Med Sci. 2013; 46(2): 1218-24.

21- Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Russian hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(12): 3724-32. doi: 10.1128/aac.47.12.3724-3732.2003

22- Torshizi R, Zamanzad B, Mokhtareyan K, Karimi A. Determination of CTX-M genes in Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase using PCR method. J Shahrekord Univ Med Sci. 2011; 3(13): 9-17. [Persian]

23- Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum β-lactamase-producing organisms. J Hosp Infect. 2009; 73(4): 345-54. doi: 10.1016/j.jhin.2009.02.021.

24- Hosseini Jazani N, Omrani MD, Yekta Z, Nejadrahim R, Afshar Yavari SH, Zardashti M. Plasmid profile of Pseudomonas aeruginosa and its relation with antibiotic resistance in hospital isolates. J Kerman UnivMed Sci. 2008; 15(1): 9-17. [Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

25- Henriques IS, Fonseca F, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Occurrence and diversity of integrons and β-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. Res Microbiol. 2006; 157(10): 938-47. DOI: 10.1016/j.resmic.2006.09.003

26- Gatica J, Jurkevitch E, Cytryn E. Comparative Metagenomics and Network Analyses Provide Novel Insights Into the Scope and Distribution of beta-Lactamase Homologs in the Environment. Front Microbiol. 2019; 10: 146. doi: 10.3389/fmicb.2019.00146.

www.SID.ir