Archive of SID

بررسی ارتباط مقاومت آنتی‌بیوتیکی با حضور ژن‌های بتالاکتاماز طیف وسیع *CMY-2*، *CTX-M-2* و *CTX-M-8* در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان‌های تهران با روش Multiplex-PCR

مهسا امیرانی[1]، شیوا خلیل‌مقدم[2*]، کیومرث امینی[3]

۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی(ره) شهرری، تهران، ایران
۲. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی(ره) شهرری، تهران، ایران
۳. استادیارگروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاداسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۵

چکیده

زمینه و هدف امروزه کلبسیلا پنومونیه یک پاتوژن فرصت‌طلب در عفونت‌های بیمارستانی شناخته می‌شود. طیف و سیعی از بتالاکتامازها در سرا سر جهان درحال افزایش ا ست. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام جزو مر سوم‌ترین عوامل ضدمیکروبی در کنترل و درمان عفونت‌های باکتریایی مح سوب می شود. هدف از این مطالعه، تعیین نقش ژن‌های *CTX-M-2*، *CTX-M-8* و *CMY-2* و جلوگیری از مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های کلبسیلا پنومونیهٔ مولد بتالاکتامازهای وسیع‌طیف است که در بیمارستان‌های تهران وجود دارد.

مواد و روش‌ها در این مطالعهٔ توصیفی، ۶۰ نمونهٔ بالینی از بیمارستان‌های مختلف تهران جمع‌آوری و با آزمون های بیوشیمیایی شناسایی شد. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن با توجه به استاندارد CLSI ۲۰۱۶[1] انجام شد. جهت شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه[1] استفاده شد.

در این تحقیق، بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین تعیین شد. از ۶۰ ایزولهٔ مورد بررسی، ۳۳ ایزوله حاوی ژن ***CMY-2***، ۸ ایزوله حاوی ژن ***CTX-M-2*** و ۲۵ ایزوله حاوی ژن ***CTX-M-8*** است. تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار **SPSS** نشان داد ارتباط بین ژن‌های مورد مطالعه و مقاومت آنتی‌بیوتیکی معنادار است (**p<۰/۰۵**).

نتیجه‌گیری نتایج این مطالعه شیوع بالایی از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیهٔ مقاوم به چند دارو و تولیدکنندهٔ بتالاکتاماز را در بیمارستان‌ها نشان می‌دهد که یک مشکل بزرگ سلامت ملی در ایران است و باید مورد توجه بیشتر قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها:
کلبسیلا پنومونیه، ژن‌های آنزیم بتالاکتاماز، PCR چندگانه، مقاومت آنتی بیوتیکی.

۱. مقدمه

کلبسیلا پنومونیه پاتوژنی فرصت‌طلب از خانوادهٔ انتروباکتریاسه بوده و در ایجاد عفونت‌های مهم بیمارستانی نظیر عفونت‌های مجاری ادراری، ریوی، پنومونی، سپتی سمی و عفونت بافت‌های نرم نقش دارد. از آنجا که کلبسیلا پنومونیه در افرادی با ضعف سیستم ایمنی ایجاد بیماری می‌کند، افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری تهدیدی جدی محسوب می‌شود. [۱] آنتی‌بیوتیک‌های خانوادهٔ بتالاکتام از

* **نویسندهٔ مسئول: شیوا خلیل‌مقدم**
نشانی: گروه زیست‌شناسی، دانشگاه علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی یادگار امام(ره)، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۳۳۵۹۸۹۸۸۷
رایانه: shivakhalilmoghadam0@gmail.com
شناسه ORCID: 0000-0001-5140-8733
شناسه ORCID نویسندهٔ اول: 0000-0002-9277-6003

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۷، شمارهٔ ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۹، ص ۵۴-۴۷
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

www.SID.ir

Archive of SID

شایع‌ترین عوامل ضدمیکروبی در درمان عفونت‌های باکتریایی ازجمله کلبسیلا پنومونیه است. تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز عمده‌ترین مکانیسم مقاومت باکتریایی در برابر خانوادهٔ بتالاکتام‌ها است. [۲ـ۳] آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به دلیل قدرت سمیت پایین برای سلول‌های یوکاریوتی و اثر ضدمیکروبی قوی، از پرمصرف‌ترین گروه آنتی‌بیوتیکی در دسترس است. در بین انواع مقاومت‌های تولیدشده به‌وسیلهٔ باکتری‌ها، انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها با تولید آنزیم بتالاکتاماز مؤثر علیه سفالوپورین‌های نسل سوم، به‌خصوص سفوتاکسیم، از نظر بالینی اهمیت خاصی دارند که به این گروه باکتری‌های مولد بتالاکتاماز گفته می‌شود. [۴] بتالاکتامازها آنزیم‌هایی است که توسط بعضی باکتری‌ها تولید می‌شود و با شکستن حلقهٔ بتالاکتام، خاصیت کشندگی بتالاکتام‌ها را غیرفعال می‌کند. [۵] عفونت توسط باکتری‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌طیف، با انتشار گستردهٔ سویه‌های مقاوم (به‌ویژه در بیمارستان‌ها) باعث افزایش مدت بستری شدن بیماران می‌شود و هزینه‌های درمانی فراوانی را بر کشور تحمیل می‌کند. به‌علاوه باکتری‌های مولد بتالاکتاماز وسیع طیف غالباً به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های غیربتالاکتام نیز مقاومت نشان می‌دهند که این امر مشکلات درمان را دوچندان می‌کند. [۷] امروزه وجود انتروباکتریاسه‌های مولد بتالاکتاماز وسیع‌طیف نگرانی بزرگ و فزاینده‌ای است و استفادهٔ مداوم از آنتی‌بیوتیک‌ها و فشار انتخابی ناشی از این عوامل باعث بروز مقاومت‌هایی به این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. [۶ـ۷] بتالاکتامازهای وسیع‌طیف اغلب توسط ژن‌های پلاسمیدی کد می‌شود و به‌راحتی در میان انواع باکتری‌های خانوادهٔ انتروباکتریاسه انتقال می‌یابد. [۸ـ۹] بتالاکتامازهای *CTX-M* و *CMY-2* به‌طور فزاینده‌ای در کلبسیلا پنومونیه وجود دارد. این آنزیم‌ها قادر به هیدرولیز سفالوسپورین‌های نسل سوم هستند. [۷ـ۸] آنزیم‌های *CTX-M* به پنج گروه تقسیم می‌شود که عبارت‌اند از: *CTX-M- I* (*CTX-M*-1-3-10-11-12-15-22-23-28)، *CTX-M-II* (*CTX-M-2-4-5-6-7-20*)، *CTX-M-III* (*CTX-M-8*)، *CTX-M–IV* (*CTX-M-9-13-14-16-17-24-27*) و *CTX-M-V* (*CTX-M-25*). [۵] بررسی‌های اخیر در ایران نشان می‌دهد بتالاکتامازهای وسیع‌طیف به خصوص *CTX-M* درحال افزایش است. *CMY* جزو کلاس C در کارباپنم‌ها و *CMY-2* دارای گسترهٔ جغرافیایی است که در دو ایزولهٔ اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه یافت شده بود. *CMY-2* ژن موجود در پلاسمید الحاقی است. در میان آنزیم های مشابه، *CMY-2* شایع‌ترین آنزیم در جدایه‌های انتروباکتر بالینی است. [۱۲] به‌تازگی تعداد جدایه‌های تولیدشده توسط *CMY-2* درحال افزایش است. [۱۳] هدف از این مطالعه بررسی هم‌زمان فراوانی ژن بتالاکتامازهای وسیع‌طیف *CTX-M-2*، *CTX-M-8* و *CMY-2* و *مقاومت آنتی بیوتیک* در کلبسیلا پنومونیهٔ جداشده از عفونت ادراری است. [۹]

۲. مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر، ۶۰ ایزوله باکتری کلبسیلا پنومونیهٔ جداشده از نمونهٔ ادراری بیماران بستری در بیمارستان‌های تهران، در بازهٔ زمانی پنج‌ماهه از ابتدای اردیبهشت تا پایان شهریور ۹۶، مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های باکتری در محیط بلاد آگار و مک کانکی آگار به مدت ۲۴ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به‌منظور تأیید کلنی‌های رشدیافتهٔ کلبسیلا پنومونیه، از تست‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده شد و با استفاده از جدول استاندارد، ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جداسازی گردید.

با روش استاندارد دیسک دیفیوژن، براساس پروتکل سازمان استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی ۲۰۱۶ CLSI، و استفاده از دیسک‌های شامل آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۳۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۳۰ میکروگرم)، آموکسی‌کلاو (۱۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و پنی‌سیلین (۱۰ میکروگرم) تهیه‌شده از شرکت پادتن طب، حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های جداشده مورد مطالعه قرار گرفت. در این روش، سوسپانسیون میکروبی (معادل ۰/۵ مک فارلند) تهیه و به‌طور یک‌نواخت به محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح کرده شد و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فاصلهٔ لازم در کنار هم قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قطر هاله‌های عدم رشد تعیین شد. نتایج برای سویه‌های باکتریایی به کمک جدول استاندارد ۲۰۱۶ CLSI از روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید (شکل ۲). در این پژوهش، کلبسیلا پنومونیه ATCC ۷۰۰۶۰۳ به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جهت استخراج DNA ایزوله‌های مورد بررسی، کیت استخراج سینا کلون CAT.NO:DM۰۴۰۵۰ به‌کار رفت و برای بررسی فراوانی هم‌زمان ژن‌های بتالاکتاماز *CTX-M-2*، *CTX-M-8* و *CMY-2* از روش PCR چندگانه به کمک پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید (جدول ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده [۱۴]

سایز پرایمر	توالی پرایمر	پرایمر
۹۰۱	TTAATGATGACTCAGAGCATTC-GATACCTCGCTCCATTTATTG	(CTX-M-2 f1) R1)(CTX-M-2
۳۰۷	CGCTTTGCCATGTGCAGCACC GCTCAGTACGATCGAGCC	CTX-M-8(F2) CTX-M-8(R2)
۴۶۲	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	CMY-2(F3) CMY-2(R3)

واکنش PCR چندگانه برای تمـام ۶۰ سـویه کلبسیلا پنومونیه تأیید شد و تسـت PCR صورت گرفت. واکنش PCR چندگانه در دستگاه ترموسایکلر به این شرح انجام شد: برای هر PCR، ۳ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده به ۱۰ میکرولیتر mix PCR Master (Amplicon2X)، ۱ میکرولیتر آب‌مقطر دو بار تقطیر، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) معرفی‌شده توسط حسین و همکاران [۱۴] در سال ۲۰۱۱ استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد: مرحلهٔ واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل هرکدام شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحلهٔ اتصال در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و مرحلهٔ طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، درضمن مرحلهٔ طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. به‌منظور شناسایی بیشتر ماهیت و مشخصات ژن‌های بتالاکتاماز شناسایی‌شده توسط PCR چندگانه، آنالیز توالی DNA نیز انجام گرفت. همچنین ژل اگارز ۲ درصد برای الکتروفورز محصولات PCR و نیز سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز استفاده شد. داده‌ها نیز با نرم‌افزار SPPS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

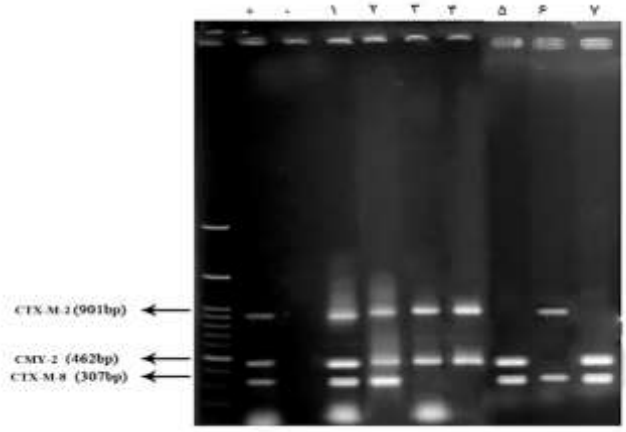
در این مطالعه، ۶۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی قرار گرفت. از میان ۶۰ ایزوله، ۸ نمونه (۱۳/۳ درصد) دارای ژن *CTX-M-2*، ۲۵ نمونه (۴۱/۶۶ درصد) دارای ژن *CTX-M-8* و ۳۳ نمونه (۵۵ درصد) دارای ژن *CMY-2* بود و ۱۶ نمونه (۲۶/۶۶ درصد) فاقد ژن بتالاکتاماز بود (شکل ۱). با توجه به شکل ۱، چاهک ۱ و ۲ سه ژن را به‌صورت هم‌زمان دارد، چاهک ۳ و ۴ دو ژن *CTX-M-2* و *CMY-2*، چاهک ۵ و ۷ دو ژن دو ژن *CTX-M-8* و *CMY-2* و چاهک ۶ دو ژن دو ژن *CTX-M-8* و *CTX-M-2* را دارد که حضور ژن‌های هم‌زمان را نشان می‌دهد. به‌وجود آمدن مقاومت آنتی بیوتیکی دربرابر ژن‌ها باعث مهار کرن حلقهٔ بتالاکتاماز می‌شود. احتمالاً باکتری‌ها مقاومت چند دارویی را از طریق انتقال افقی ژن های مقاومت به‌واسطهٔ عناصر ژنتیکی محرک ژنتیکی به‌دست آورده اند. در میان ایزوله‌های مورد بررسی، ۲۶/۶ درصد سویه‌ها به‌صورت هم‌زمان دارای ژن *CMY-2* و *CTX-M-8*، ۳/۳ درصد سویه‌ها به‌صورت هم‌زمان دارای ژن *CMY-2* و *CTX-M-2*، ۳/۳ درصد دارای ژن هم‌زمان *CMY-2*، *CTX-M-2* و *CTX-M-8* بودند.

۳. یافته‌های پژوهش

نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش PCR نشان داد از مجموع ۶۰ ایزولهٔ مورد بررسی، ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیهٔ جداشده از نمونه‌های ادراری بیشترین حساسیت را به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین (۸۳/۳ درصد)، سفوتاکسیم (۸۱/۶ درصد) و وایمی‌پنم (۷۸/۳ درصد) نشان دادند. درمقابل بیشترین میزان مقاومت به‌ترتیب دربرابر آمپی‌سیلین (۹۳/۳ درصد)، پنی‌سیلین (۹۱/۶ درصد)، آموکسی‌کلاو (۹۰ درصد)، سیپروفلوکساسین (۸۸/۳ درصد)، جنتامایسین (۸۳/۳ درصد) و سفتریاکسون (۷۳/۳ دصد) به‌دست آمد (جدول ۲). درصد حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی براساس میانگین قطر هالهٔ عدم رشد پس از سه بار تکرار مشخص شد. یکی از اهداف این مطالعه بررسی ارتباط بین حضور ژن‌های *CTX-M-2*، *CTX-M-8* و *CMY-2* با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج بود. در این مرحله، با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های مربع کای و فیشر رابطهٔ بین حضور ژن‌های *CMY-2*، *CTX-M-2* و *CTX-M-8* و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها با محاسبهٔ سطح معناداری برای تک‌تک آن‌ها آورده شده است. بین حضور ژن *CMY-2* و آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین، آموکسی‌کلاو، سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون و آمپی‌سیلین و ژن *CTX-M-2* با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، آموکسی‌کلاو، سیپروفلوکساسین و آمپی‌سیلین و همچنین حضور ژن *CTX-M-8* و آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون، جنتامایسین، پنی‌سیلین و آموکسی‌کلاو رابطهٔ معنادار یافت شد (جدول ۲ و شکل ۳). طبق آزمون دانکن، رابطهٔ بین آنتی بیوتیک‌های مقاوم معنادار درنظر گرفته شد ($p<۰/۰۵$). نتایج آزمون دانکن نشان می‌دهد آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، پنی‌سیلین و آمپی سیلین دارای میانگین کمتری در مقایسه با آموکسی‌کلاو و سایر آنتی‌بیوتیک‌های ارائه‌شده است. نتایج آزمون فوق نمایانگر افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ژن‌های بتالاکتاماز است که بیشترین درصد مقاومت متعلق به ژن *CMY* و بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین است.

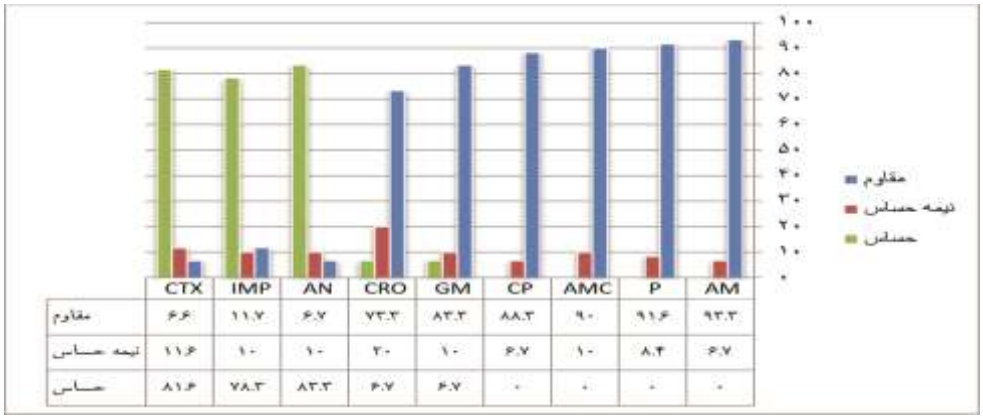
www.SID.ir

Archive of SID



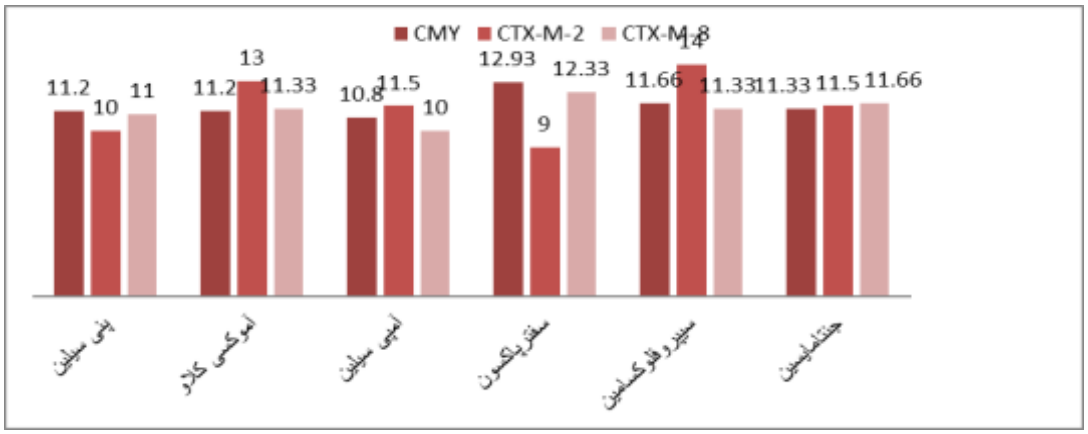
شکل ۱. شناسایی ژن *CTX-M, CMY-2* در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه با روش PCR چندگانه

چاهک اول از سمت چپ: Ladder (100 جفت باز)؛ چاهک دوم: کنترل مثبت از نمونه‌های گرفته‌شده از بیماران بستری در بیمارستان‌ها؛ چاهک سوم: کنترل منفی آب‌مقطر؛ چاهک ۱ـ۷ سویه‌های مثبت دارای ژن هم‌زمان



	CTX	IMP	AN	CRO	GM	CP	AMC	P	AM
مقاوم	۶.۶	۱۱.۷	۶.۷	۷۳.۳	۸۳.۳	۸۸.۳	۹۰	۹۱.۶	۹۳.۳
نیمه حساس	۱۱.۶	۱۰	۱۰	۲۰	۱۰	۶.۷	۱۰	۸.۳	۶.۷
حساس	۸۱.۶	۷۸.۳	۸۳.۳	۶.۷	۶.۷	۰	۰	۰	۰

شکل ۲. توزیع درصد فراوانی کلبسیلا پنومونیه نسبت به مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیک‌ها (آمپی‌سیلین (AM)، پنی‌سیلین (P)، آموکسی‌کلاو (Amc)، سیپروفلوکساسین (CP)، جنتامایسین (GM)، سفتریاکسون (CRO)، آمیکاسین (AN)، ایمی‌پنم (IMP) و سفوتاکسیم (CTX)) که به ترتیب مقاوم، نیمه‌حساس و حساس بودن آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد.



شکل ۳. تحلیل ارتباط ژن‌های بتالاکتاماز مورد بررسی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی توسط نرم‌افزار SPSS
پنی‌سیلین(P)، آموکسی‌کلاو (AMC)، آمپی‌سیلین (AMC)، سفتریاکسون (CP)، سیپروفلوکساسین (CPO)، جنتامایسین (GM)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲. مقدار سطح معناداری برای تعیین رابطهٔ بین ژن‌های *CMY*، *CTX-M-2* و *CTX-M-8* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی

آنتی‌بیوتیک	*CMY-2*	*CTX-M-2*	*CTX-M-8*
سفتریاکسون	0.001>	0.067	0. 01>
جنتامایسین	0.172	0.05>	0.05>
سیپروفلوکساسین	0.05>	0.001>	0.324
آمپی‌سیلین	0.01>	0.001>	0.089
آموکسی‌کلاو	0.001>	0.001>	0.001>
پنی‌سیلین	0.001>	0.457	0.01>

۰/۰۵> معنادار بودن و ۰/۰۵< معنادار نبودن رابطهٔ حضور ژن و مقاومت به آنتی‌بیوتیک را نشان می‌دهد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

امروزه وجود انتروباکتریاسهٔ تولیدکنندهٔ آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌طیف نگرانی بزرگ و فزاینده‌ای محسوب می‌شود. [۱۵] سویه‌های کلبسیلا پنومونیهٔ تولیدکنندهٔ بتالاکتاماز از عوامل بیماری‌زای مهمی هستند که عفونت‌های جدی در بیماران بستری ایجاد می‌کنند. این عفونت‌ها اغلب به‌سختی درمان می‌شوند؛ زیرا این ایزوله‌ها نه‌تنها به داروهای بتالاکتام، بلکه به آمینوگلیکوزیدها و فلئوروکینولون‌ها نیز مقاومت نشان می‌دهند. کلبسیلا پنومونیهٔ تولیدکنندهٔ بتالاکتاماز می‌تواند به‌راحتی ژن‌های مقاومت را از طریق پلاسمید به‌صورت افقی منتقل کند و باعث ایجاد عفونت‌های بیمارستانی شود. [۱۶] کلبسیلا پنومونیه عامل ۱۰ درصد از عفونت بیمارستانی به‌شمار می‌رود که عفونت مجاری ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در بیماران سرپایی و بیماران بستری در بیمارستان است. [۱۷] با توجه به میزان بالای مقاومت چند دارویی، باید به این نکته اشاره کرد که بتالاکتامازهای وسیع‌طیف اغلب پلاسمیدی‌اند و از آنجایی که این پلاسمیدها به راحتی در میان انواع مختلف باکتری‌های خانوادهٔ انتروباکتریاسه انتقال می‌یابند، تجمع ژن‌های مقاوم منجر به ایجاد سویه‌هایی با مقاومت چند دارویی می‌شود. پس بی‌دلیل نیست که امروزه ظهور بتالاکتامازها در سرتاسر جهان حائز اهمیت است. [۱۱] حضور بتالاکتامازها و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی دیگر در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و همچنین انتقال همزمان آن‌ها به سویه‌های دیگر در تهران بالا بوده که این امر نشان‌دهندهٔ اهمیت درمان صحیح آنتی‌بیوتیکی است. مصرف نابجا و خودسرانهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است عواقب ناخوشایندی درپی داشته باشد. مصرف آنتی بیوتیک‌های نامناسب نه‌تنها عفونت را درمان نمی‌کند، بلکه ممکن است سبب بروز عوارض جانبی گردد. از سوی دیگر مصرف آنتی بیوتیک‌ها به باکتری‌های مفید بدن آسیب می‌رساند. [۱۸] تحقیقات و گزارش‌های متعددی درخصوص افزایش شیوع میکروارگانیسم‌های مولد بتالاکتاماز باعث ایجاد نگرانی شده است. در میان آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، خانوادهٔ کاربا‌پنم‌ها به‌عنوان عوامل دارویی مناسب به‌منظور درمان عفونت‌های ناشی از باکتری های گرم منفی دارای مقاومت چند دارویی مطرح است. [۵]

در مطالعهٔ حاضر، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری گرم منفی به‌نسبت بالا بوده و بیشترین مقاومت به بتالاکتام‌ها (۹۳/۳ درصد مقاومت به آمپی سیلین، ۹۱/۶ درصد به پنی‌سیلین، ۹۰ درصد به آموکسی‌کلاو، ۸۸/۳ درصد به سیپروفلوکساسین و۸۳/۳ درصد به جنتامایسین) مشاهده شد.

در مطالعه‌ای دربارهٔ کلبسیلا پنومونیهٔ جداشده از نمونه‌های بالینی بیمارستان آراد تهران نشان داده شد که بیشترین میزان حساسیت به سفوتاکسیم، ایمی‌پنم و آمیکاسین و بیشترین میزان مقاومت به جنتامایسین، سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین است. [۱۹] نتایج مطالعهٔ حاضر در تأیید یافته‌های فوق است و از آنتی بیوتیک‌های سفوتاکسیم، ایمی‌پنم و آمیکاسین می‌توان در درمان عفونت‌های این باکتری استفاده کرد.

نخعی‌مقدم و همکاران [۱] در سال ۱۳۹۰ در مطالعه‌ای با عنوان حساسیت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی بتالاکتامازهای وسیع طیف *CTX-M* در ایزوله‌های ادراری کلبسیلا پنومونیهٔ شهر مشهد دریافتند که تمامی ایزوله‌ها دارای ژن *CTX-M* هستند. صد درصد ایزوله‌ها به ایمی‌پنم و آمیکاسین حساسیت داشتند. [۱] نتایج تحقیق حاضر کاهش حساسیت کلبسیلا پنومونیه به دو آنتی بیوتیک ایمی‌پنم (۷۸/۳ درصد) و آمیکاسین (۸۳/۳ درصد) را در مقایسه با مطالعهٔ انجام‌شده در سال ۱۳۹۰ نشان داد.

در پژوهش دیگری که روی بیماران بستری در بیماستان‌های شیراز صورت گرفت، نتایج حاکی از این بود که در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیهٔ دارای ژن *CTX* تولیدکنندهٔ بتالاکتاماز، بیشترین مقاومت مربوط به جنتامایسین (۴۱/۴ درصد) و دارای حساسیت به ایمی‌پنم (۸۸/۳ درصد) بود. [۲۰] نتایج تحقیق حاضر در مقایسه با مطالعهٔ فوق، افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۸۸/۳ درصد) و کاهش حساسیت به ایمی‌پنم (۷۸/۳ درصد) را بیان کرد. براساس نتایج، با گذشت زمان، میزان حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک کاهش و میزان مقاومتشان افزایش پیدا کرده است.

www.SID.ir

Archive of SID

لی و همکاران [۲۱] در سال ۲۰۰۳ به بررسی شیوع ژن بتالاکتاماز در سویه‌های اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه در کره پرداختند و فراوانی ژن‌های *CMY-1* (۷۶/۲ درصد) و *CMY-2* (۱۲/۱ درصد) را در ۲۸۳ ایزوله بررسی کردند که در مقایسه با تحقیق حاضر، ۵۵ درصد از کلبسیلا پنومونیه‌های مورد بررسی حاوی ژن *CMY-2* بودند. این نتایج نشان‌دهندهٔ افزایش فراوانی این ژن است. در تحقیقی دربارهٔ ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه در بیمارستان بعثت و امام رضای تهران، از ۱۰۰ نمونهٔ مورد بررسی، ۴۲ درصد نمونه‌ها حاوی ژن *CTX-M* و ۲۶ درصد ایزوله‌ها دارای آنزیم بتالاکتاماز گزارش شد. آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم (۱۴ درصد) و آمیکاسین (۳ درصد) به‌ترتیب دارای مقاومت بودند. [۸] در پژوهش حاضر، ۵۳/۹۶ درصد ایزوله‌ها دارای ژن بتالاکتاماز است. از آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی، ایمی‌پنم (۱۱/۷ درصد) و آمیکاسین (۶/۷ درصد) دارای مقاومت است. نتایج مطالعهٔ حاضر پژوهش‌های قبلی را تأیید می‌کند که افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیک ها را در چند سال اخیر نشان می‌دهد. افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در مطالعهٔ حاضر نگرانی‌هایی به‌دنبال دارد؛ زیرا ژن‌های مقاومت توسط روش‌های مختلف انتقال ژن به‌راحتی و به‌سرعت می‌تواند انتقال یابد. بررسی مولکولی انجام‌شده بر روی ژن‌های بتالاکتاماز *CMY-2*، *CTX-M-2* و *CTX-M-8* در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه، در سال‌های ۱۹۹۸ـ۲۰۰۳، در برنامهٔ های در ناحیهٔ آسیای آرام نشان داد که ۲۵ درصد سویه‌ها حاوی ژن *CMY-2* بودند؛ درحالی که در مطالعهٔ حاضر ۵۳/۹۶ درصد از سویه‌ها حاوی ژن *CTX-M* است. این مقایسه نشان می‌دهد تعداد بتالاکتامازهای وسیع‌طیف نوع *CTX-M* به‌سرعت درحال توسعه است. *CTX-M* از فراوان‌ترین نوع بتالاکتامازهای وسیع‌طیف در سراسر جهان محسوب می‌شود. [۲۲]

براساس نتایج آزمون تأییدی فنوتیپی سینرژی دو دیسک، ۶۰ درصد سویه‌های باکتریایی کلبسیلا پنومونیهٔ دارای ژن بتالاکتاماز وسیع‌طیف گزارش گردید و سویه‌های تولیدکنندهٔ بتالاکتاماز بیشترین و کمترین مقاومت به آمپی‌سیلین (۱۰۰ درصد) و ایمی پنم (۱/۶۶ درصد) را از خود نشان داد [۲۲] که در مقایسه با مطالعهٔ حاضر، آمپی‌سیلین (۹۳/۳ درصد) دارای بیشترین مقاومت و ایمی پنم (۱۱/۷ درصد) کمترین مقاومت است. در مقایسهٔ نتایج مطالعات مورد بررسی، افزایش مقاومت سویه‌های کلبسیلا پنومونیه به آنتی‌بیوتیک‌ها مشاهده می‌شود.

تحقیق حسنا سروآزاد و همکاران [۵] در زمینهٔ ارتباط مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها با حضور ژن‌های بتالاکتاماز در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیهٔ جمع‌آوری‌شده از بیمارستان‌های کرمانشاه در سال ۱۳۹۵ نشان داد که مقاومت‌های مربوط به آنتی‌بیوتیک ایمی پنم ۳/۹ درصد و سفتریاکسون ۶۲/۸۸ درصد است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از PCR چندگانه، ۳۵/۵ درصد ایزوله‌ها دارای ژن *CTX-M* و ۶۳/۹۱ و ۹/۲۷ درصد ایزوله‌ها دارای ژن *SHV* و *TEM* است. [۵] در مقایسه، سویه‌های مورد بررسی در مطالعهٔ حاضر دربرابر ایمی‌پنم (۱۱/۷ درصد) و سفتریاکسون (۷۳/۳ درصد) مقاومت نشان دادند و ۵۳/۹۶ درصد ایزوله‌ها حاوی ژن بتالاکتاماز *CTX-M* هستند. سطح معناداری به‌دست‌آمده از روش مربع کای و فیشر نشان داد ارتباط بین ژن‌های مورد بررسی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی معنادار است.

احمد و همکاران [۲۳] به بررسی شیوع مقاومت به آنتی‌بیوتیک ها و تولید طیف گستردهٔ بتالاکتامازها در سویه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه در بیمارستان نیروی هوایی مسلح در عربستان صعودی پرداختند. در مطالعهٔ مذکور، درصد بالایی از کلبسیلا پنومونیه‌ها به آمپی‌سیلین (۱۰۰ درصد) مقاومت نشان دادند و همهٔ باکتری‌ها دربرابر ایمی‌پنم حساس بودند. در مقایسه با مطالعات انجام‌شده، کلبسیلا پنومونیه دارای ۹۳/۳ درصد مقاومت به آمپی‌سیلین است و به ایمی‌پنم ۷۸/۳ درصد حساسیت دارد.

نتایج پژوهش حاضر بیانگر مقاومت بالای ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه دربرابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف است که علت آن مصرف بی‌رویهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها در پزشکی است. همچنین ژن‌های کدکنندهٔ مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیهٔ جداشده از بیماران بیانگر انتشار گستردهٔ سویه‌های کلبسیلا پنومونیهٔ مقاوم به آنتی‌بیوتیک در بیمارستان‌هاست. بدیهی است افزایش بی‌رویهٔ مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و متعاقب آن گسترش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در جامعه منجر به ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو می‌شود. لذا توصیه می‌گردد از مصرف خودسرانهٔ آنتی‌بیوتیک خودداری شود و تجویز آن در شرایط لزوم براساس نتایج آنتی بیوگرام صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت علمی ـ پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی(ره) شهرری و نیز مسئولان آزمایشگاه پاسارگاد جهت همکاری در این پروژه، در قالب پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد، سپاس‌گزاری می‌شود. این پژوهش با کد اخلاقی IR.IAUSR.AC.1396.332138630 صورت گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

References

[1]. Nakhaimoghadam M, Naderi far S, Zolfaghari M, Ameljamedar S, HashemiM.Pattern of antibiotic susceptibility and detection of CTX-M-type extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) in urinary isolates of Klebsiellapneumoniae in Mashhad. cientific-Research Journal of Shahed University. 2012; 19(96): 29-36. (Persian)

[2]. Jacoby GA, Munoz-price LS. The New beta-lactamases. N Engl J Med. 2005; 27(32): 380-3971.

[3]. Moradi, m. Norozi, A. Taatimoghadam, M.The prevalence of bla-TEM, bla-shv, bla-ctx-m genes and comparison of antibiotic resistance pattern in two groups of Klebsiellapneumoniae without broad-spectrum beta-lactamase enzymes in clinical specimens. 2014; 20(1): 120-128. (Persian)

[4]. Mosavi S, Davari K, Amini S. Prevalence of (CTX-M-2) beta lactamase gene in E.coli isolated from patients with urinary tract infections (UTI) in Sanandaj, Iran. Scientific Journal of Kurdistan University Medical Science. 2015; 20(6): 107-115. (Persian)

[5]. Sarvzade H, Darbouy M. Correlation of Antibiotic Resistance with SHV, CTX-M and TEM Extended-Spectrum Beta Lactamases Genes among Klebsiellapneumoniae Isolates from Patients in Kermanshah Hospitals. Journal If Ardabil university Medical Scienes. 2017; 17(3): 353-362.( )Persian(

[6]. Falgas ME, Karageorgopoulis DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms.JHosp Infect. 2009; 73(4): 345-54.

[7]. Niakan M, chitsaz M, MatvaiA.Prevalence of Ampc broad-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiellapneumoniae. Iranian Journal of Microbiology. 2008; 2(2): 1-8. (Persian)

[8]. Lashkari N, yousefi Y, sayadat S, shahcheraghi F, khosravi M, VakiliH,et al. Identification of bla-CTX-M β-lactamase in Klebsiellapnumoniae clinical isolates by polymerase chain reaction .Medical Science Journal of Islamic Azad University Tehran. Medical Branch. 2014; 24(3): 148-52. (Persian)

[9]. Shabanpishe S, Rezaian A. Prevalence and prevalence of TEM and CTX-M, SHV β-lactamase women in Klebsiellapneumoniae in Klebsiellapneumoniae and Escherichia coli isolated from clinical specimens in Bandar Abbas Abortion Laboratory. Journal of Molecular Cell Biotechnology, Jahrom. 2014; 30(8). (Persian)

[10]. Farrokhnazar E, khaki P, Bidhendi S. Investigation of ampC&esbl genes in Escherichia coli isolated from human and poultry.Journal of the World of Germs. 2014; 7(2): 138-47. (Persian)

[11]. BehzadianNejad Q , Abdollahi A, NajarPeeraveh SH , ForouheshTehrani H.Evaluationofbla-ctx-m-type Gene in Multi Drug Resistance Klebsiella pneumonia Species Isolated from Clinical Samples.Razi Journal of Medical Sciences. 2009; 15(60): 37-48.

[12]. Peymani A, Naserpour-Farivar T, Yaylagh-Beygi M, Bolori SH. Emergence of CMY-2- and DHA-1-typeAmpC β-lactamases in Entero- bacter cloacae isolated from several hospitals of Qazvin and Tehran, Iran. Iran Journal Microbial. 2016; 8(3): 168-74.

[13]. Lee H, Yon J, Wu J, Chang CH, Wu Chi, Lee Non, et al. Clonal Spread Of Klebsiella Pneumonia Producing CMY-2 Ampc-type Beta-Lactamase in Surgical intensive Care Units. Microbial Immunol Infect. 2009; 42(6): 479-87.

[14]. Hussain M, Hassan F, Ali shah H, HameedA,Jung M, RayamajhiN,et al. Prevalence of class A and Ampc B-Lactamases in Clinical Escherichia coli Isolates from Pakestan Institute of Medical Science, Islamabad, Pakestan. Jpo.J.Infect. Dis. 2011; 64(3): 249-52.

[15]. Piymani A, Moini rad M, Naserpor T, sanikhani R, Javadi A, Pahlevan A. Extended Spectrum β-lactamases and TEM and SHV Genotypes in Klebsiellapneumoniae. Iranian Journal of Infectious Diseases. 2013; 18(60): 15-20. (Persian)

[16]. Shikhi, j. Amini, M. Ebrahimzadenamvar, A. Frequency of CTXM-1, CTXM -15 genes among Klebsiellapneumoniae strains isolated from patients admitted to Amal hospitals. Journal of Yazd University of Medical Sciences. 2017; 26(5): 385-92. (Persian)

[17]. Paknejad Z, Momtaz H, Tajbakhsh E. Determination of antibiotic resistance pattern in different serotypes of Klebsiellapneumoniae strains isolated from hospital infections in Zarinshahr. Quarterly Journal of Applied Biology. 2017; 8(1): 21-31. (Persian)

[18]. Nazre M, Darvishi M. Prescribe and use of antibiotics and its role in microbial resistance and its effects on resistance economy. Yafte. 2017; 19(3). (Persian)

[19]. Eslami K, Molaabaszade H, Hamidi M, Bahmanabadi R. Antibiogram Pattern of Acinetobacter Isolated from Clinical Samples at Tehran's Araad Hospital (2009 - 2011). Iranian Journal of Infectious Medicine. 2014; 19(64): 37-41. (Persian)

[20]. PouraliSheshblouki GH, Mar daneh J. Charecterization of bla *CTX* gene and Cross-Resistance in KlebsiellaPneumoniae Isolated From Hospitalized Patients.Journal Of Birjand University of Medical Science. 2016; 23(1): 56-66. (Persian)

[21]. Lee K, Lee M, SHin JH, Lee MH, Park AJ, Chong Y. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Escherichia coli and Klebsiellapneumoniae in Korea. Microb Drug Resist. 2006; 12(1): 44-9.

[22]. Archin T, Afzalian E, Kargar M, Chasemi Y. Molecular Identification of SHV, TEM, CTX-M β lactamases Genes and Antibiotics Resistance Pattern of k.pneumoniae Isolates Collected from ICU Patients of Namazi Hospital, Shiraz, Iran. Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal. 2014; 18(10): 816-25. (Persian)

[23]. Ahmad SH, Aal-juaid N.F, Alinzi F, Essam M, Bakheet O. Prevalence Antibiotic Susceptibility pattern and Production of Extended-Spectrum beta-lactamases Amongst clinical isolates of Klebsiellapneumoniae at Armed Forces Hospital in Saudi Arabia. Journal of College of physician and Surgeons Pakestan .2009; 19(4): 264-5.

www.SID.ir

Archive of SID

Correlation between Antibacterial Resistance and the Presence of *CMY-2*, *CTX-M-2 and CTX-M-8* extended Spectrum Beta Lactamase Genes Among K. Pneumoniae Isolates in Tehran Hospital by Multiplex-*PCR*

Mahsa Amirani[1], Shiva Khalilmoghadam*[2], Kumarss Amini[3]

1. MSC in Microbiology, Department of Biology, College of science, Yadegar–e-Imam Khomeini (RAH) Shahr-e-rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, College of science, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahr-e-rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Microbiology, College of science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Abstract

Introduction: *Klebsiellapneumoniae* is an opportunistic pathogen causing nosocomial infections**.** The prevalence ESLBs is increasing worldwide. β-lactam antibiotics are among the most common antimicrobial agents in controlling and treating bacterial infections. The aim of this study was to determine the role of *CTX-M-2*,*CTX-M-8* and *CMY-2* genes in *K. pneumoniae* strains and to prevent antibacterial resistance in β-lactamase producing *K. pneumonia* isolated from Tehran hospitals.

Materials and Methods: In the current study, 60 clinical samples were collected from different hospitals in Tehran and were identified by biochemical tests. Antibiotic susceptibility test was performed using disk diffusion method according to CLSI2016. Multiplex-PCR was used to detect beta-lactamase genes.

Results: In this study, the highest and lowest resistance rate were against ampicillin and amikacin, respectively. Among 60 samples, 33, 8, and 25 isolates harbored the CMY-2, CTX-M-2, and CTX-M-8 genes, respectively. Statistical analysis by SPSS software showed a significant correlation between the studied genes and antibiotic resistance (p value<0.05).

Conclusion: These findings revealed the high prevalence of multi drug resistant and β-lactamase -producing *K. pneumoniae* isolated from hospitals which suggest a major public health problem in Iran.

Received: 2018/11/12
Accepted: 2019/0031/04

Keywords: *Klebsiella pneumonia*, Beta-Lactamases enzyme genes, Multiplex-PCR.

www.SID.ir