

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 ceftazidime 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 *Klebsiella 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): 56-66.

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 Tel: 05157220578 Fax: 05157220578

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 مردانه³

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%) مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بر ضد 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 باکتریایی، کلبسیلا پنومونیه، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، حساس وابسته به دوز

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1395؛ دوره 23 (1): 56-66.

پذیرش: 1394/12/04

دریافت: 1394/2703

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 میکروپزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران.

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

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

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه؛ باسیلی گرم منفی، دارای کپسول، غیر متحرک 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 کاربامپم یعنی کاربامپمازها - در حال گسترش در سراسر جهان بوده و سبب افزایش مرگ و میر در مبتلایان می‌گردد. مکانیسم مقاومت به کاربامپما بسیار حائز اهمیت هستند؛ زیرا اغلب به‌وسیله تست‌های غربالگری روتین قابل شناسایی نیستند و پتانسیل بالقوه‌ای 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 جدی 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 کاربامپما، یک مشکل جدی 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 کاربامپم 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 باکتریی یا عفونت‌های تنفسی ناشی از کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده کاربامپمازها 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 پنی‌سیلین‌های کروموزومی است، این ارگانیسم به‌خوبی به‌عنوان یک جمع‌کننده پلاسمیدهای مقاومت چنددارویی 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 کاربامپما به‌عنوان آخرین خط درمانی آنتی‌بیوتیکی انجام شود (8). معمولاً کمتر آنتی‌بیوتیکی بر روی کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده آنزیم KPC مؤثر 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 کاربامپماز، 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 کاربامپماز گزارش شده است. در گزارشی از ایالات متحده آمریکا که بر روی عفونت‌های گردش خون ناشی از باکتری‌های تولیدکننده کاربامپماز در سال 2011 انجام شد، میزان مرگ و میر بیماران 47 تا 66 درصد بود (9). در بررسی دیگری نشان داده شد که

مورفولوژی و بیوشیمیایی اولیه شامل: رنگ آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز و حرکت (Merck Co. Germany) و به دنبال آن با استفاده از تست های بیوشیمیایی تعبیه شده در سیستم API 20E اختصاصی انتروباکتریاسیه ها و به دست آوردن کد ارگانیزم و وارد نمودن کد در نرم افزار API، مورد شناسایی نهایی قرار گرفتند.

تعیین حساسیت ایزوله ها به آنتی بیوتیک ها:

در این مطالعه به کمک روش استاندارد دیسک دیفیوژن و بر اساس پروتکل ارائه شده توسط سازمان استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI 2014) (10) و استفاده از دیسک های 8 آنتی بیوتیک (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)، ایمی پنم (IMP, 10?g) و کلیستین (CO, 10?g)، حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های جدا شده مورد مطالعه قرار گرفت. در این روش با استفاده از نرمال سالین، رقت 0/5 مک فارلند از باکتری تهیه گردید. سپس کشت بر روی محیط مولر هیتون آگار انجام شد. پس از انکوباسیون محیط ها در دمای 35 ± 2 درجه سانتی گراد به مدت 16 تا 18 ساعت، نتایج خوانده شدند.

شناسایی سویه های حساس وابسته به دوز:

برای شناسایی ایزوله های SDD بر اساس پروتکل (CLSI 2014)، از روش استاندارد دیسک دیفیوژن استفاده شد. سویه هایی که هاله عدم رشد 19-24 میلی متر در اطراف دیسک سفپیم داشتند، به عنوان SDD در نظر گرفته شدند.

شناسایی سویه های تولید کننده AmpC-beta-lactamase با استفاده از تست فنوتیپی:

در این روش، از دیسک های آنتی بیوتیکی سفوکسیتین (FOX, 30?g) و سفپیم (CPM, 30?g) استفاده شد. ایزوله هایی که مقاوم به سفوکسیتین و حساس به سفپیم بودند، به عنوان AmpC-beta-lactamase positive

خطر مرگ در بیماران مبتلا به عفونت های ناشی از این سویه ها 2 برابر افزایش داشت (9).

با توجه به استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها در ایران و افزایش خطر مقاومت دارویی و نیز با توجه به اینکه در ایران کمتر مطالعه ای بر روی باکتری کلبسیلا اکسی توکا انجام شده است، اهداف این مطالعه شامل: تعیین پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های بالینی کلبسیلا اکسی توکا، شناسایی ایزوله های حساس وابسته به دوز¹ نسبت به سفپیم، مشخص نمودن مقاومت متقاطع² در بین ایزوله ها، بررسی توانایی تولید آنزیم AmpC-beta-lactamase و شناسایی ژن blaCTX کدکننده آنزیم بتالاکتاماز با استفاده از روش PCR در ایزوله ها بود.

روش تحقیق

در این مطالعه مقطعی که در طی یک سال -از فروردین تا اسفندماه سال 1393- انجام شد، نمونه های مختلف (خون، ادرار، خلط، زخم، تراشه) از بیماران بستری در بیمارستان های فقیهی، قطب الدین و نمازی شیراز جمع آوری شد. برای هر یک از افراد مورد بررسی، پرسشنامه تنظیم و کدگذاری گردید. نمونه گیری از افراد، پس از مشخص نمودن هدف مطالعه برای آنها و کسب رضایت کتبی آگاهانه از هر یک از افراد تحت مطالعه، صورت پذیرفت.

جداسازی و شناسایی باکتری:

ابتدا نمونه ها بر روی محیط های معمول میکروب شناسی شامل: محیط های بلاد آگار، شکلات آگار و مک کانکی آگار (Merck Co. Germany) کشت داده شدند؛ سپس نمونه ها در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز انکوباسیون شده و از نظر رشد باکتری و تشکیل کلونی بر روی محیط ها مورد بررسی قرار گرفتند. باکتری های گرم منفی ایزوله شده از نمونه های ارسالی، به کمک تست های

¹ Susceptible-dose dependent (SDD)

² Cross-resistance

در نظر گرفته شدند.

PCR Assay

سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مورد تأیید قرار گرفته، بر روی محیط TSA کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت 16-18 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه شدند؛ سپس با استفاده از روش Boiling، ژنوم ارگانیسم استخراج گردید. در روش Boiling یک میلی‌لیتر از کشت باکتری رشد کرده به صورت شبانه در محیط TSB در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 4 دقیقه در دور 1000rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی بیرون ریخته شد و رسوب به دست آمده در یک میلی‌لیتر TE Buffer (pH=7.8, 1mM EDTA, 10mM Tris) حل و به طور مجدد سانتریفیوژ گردید؛ سپس رسوب حاصله در 100 میکرولیتر TE Buffer حل شد. میکروتیوب در دمای 94 درجه سانتی‌گراد برای مدت 10 دقیقه قرار داده شد؛ سپس به مدت 10 دقیقه در 13000rpm سانتریفیوژ گردید. مایع رویی در میکروتیوب‌های کدگذاری شده ذخیره و به عنوان نمونه DNA در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. قبل از انجام PCR، نمونه DNA استخراج شده، به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر و نیز بابرند 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-denaturing در دمای 94 درجه سانتی‌گراد (5 دقیقه)، Denaturing 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 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه اعمال گردید. واکنش PCR در طی 30 سیکل انجام شد. محصول PCR با استفاده از آگارز یک درصد روی دستگاه الکتروفورز حاوی بافر 0.5X TAE، الکتروفورز شد و با استفاده از دستگاه ترانسلومیناتور به منظور

جستجوی باند 544bp، مورد آنالیز قرار گرفت. در طی این مطالعه از سویه‌های استاندارد *K.pneumoniae* ATCC 7881 به عنوان 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	TTTGCATGTGCAGTACCAGTAA	23	544
	CTX-R	CGATATCGTTGGTGGCCATA	22	

آنالیز آماری:

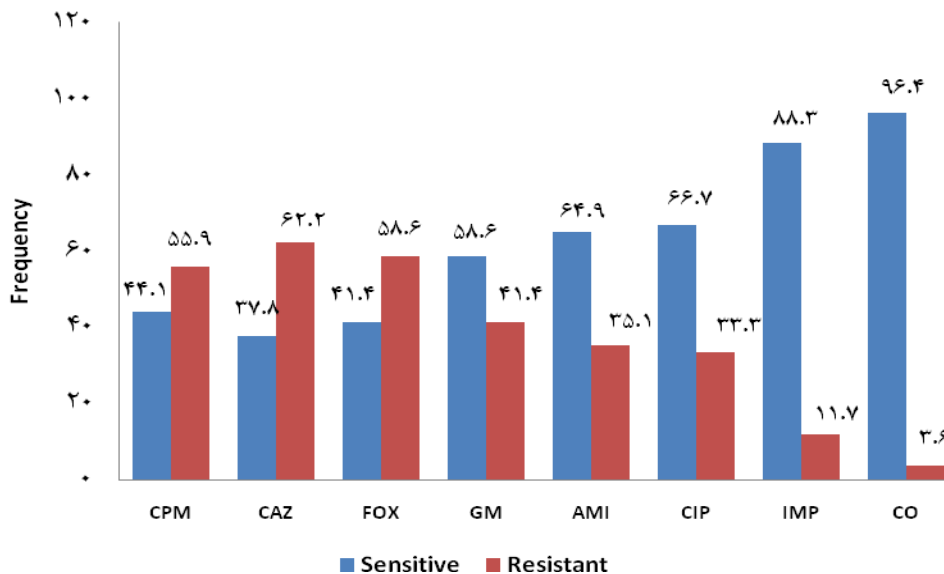
داده‌های به دست آمده، به کمک نرم افزار SPSS (ویرایش 19) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

در این مطالعه 111 سویه کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز نتایج تست‌های تعیین حساسیت دارویی نشان داد که به ترتیب کلستین و ایمی‌پنم مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بر ضد 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 (3/6 درصد سویه‌ها) به کلستین مقاومت نشان دادند (نمودار 1). در این مطالعه هیچ سویه مقاومت گسترده دارویی¹ مشاهده نشد.

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

¹ Pan-drug resistance



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	-

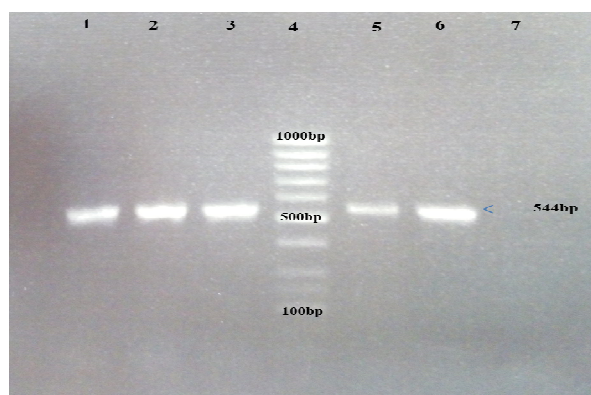
(جتنامایسین، آمیکاسین) حساست نشان دادند (جدول 2). بررسی الگوی مقاومت متقاطع نشان داد که 33/3 درصد ایزوله‌ها به داروهای کلاس آمینوگلیکوزیدهای مورد بررسی مقاوم بودند. 7/2 درصد سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه دارای مقاومت چنددارویی¹ بودند و به 3 کلاس آنتی‌بیوتیکی بزرگ مورد بررسی یعنی سفالوسپورین‌ها، کارباپنم‌ها و کینولون‌ها پاسخ ندادند. 16 سویه (14/4 درصد)

ایزوله‌ها)، همزمان به آمینوگلیکوزیدها (جتنامایسین، آمیکاسین) و کینولون‌ها (سیپروفلوکساسین) مقاوم بودند (جدول 3). نتایج انجام PCR به‌منظور جستجوی ژن *bla_{CTX}* در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه نشان داد که 70/3 درصد 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 را به‌ترتیب به سفنازیدیم (85/9%) و سفپیم (84/6%) نشان

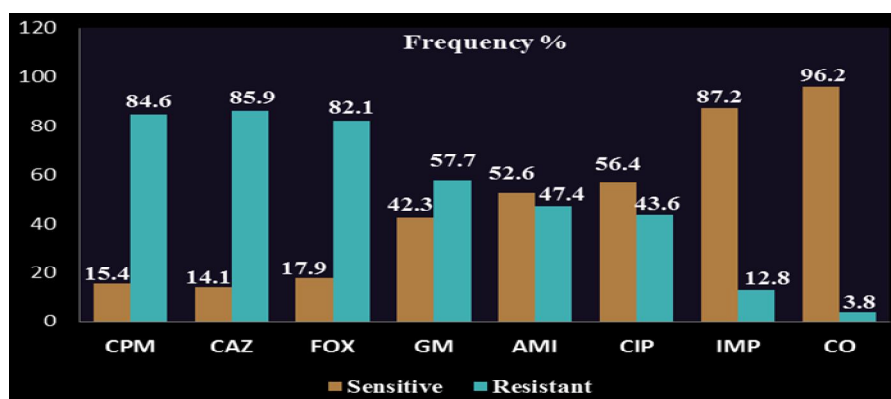
¹ Multidrug resistance

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 bla_{CTX} 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 bla_{CTX} در آنها شناسایی شده است.

بحث

اگرچه توجه بسیاری از محققین به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی جدا شده از بیماران در بیمارستان‌ها و نیز باکتری‌هایی که به‌طور مستقیم اثر مخرب بر روی سلامتی انسان دارند، می‌باشد؛ اما گسترش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها یک پدیده اکولوژیکی طبیعی است که حاصل بیلیون‌ها سال تکامل است. به دلیل 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، به نسبت بالا بود و بیشترین مقاومت، به بتالاکتام‌ها (62/2 درصد مقاومت به سفنازیدیم، 58/6 درصد به سفوکسیتین، 55/9 درصد مقاومت به سفپیم) مشاهده شد؛ همچنین 33/3 درصد ایزوله‌ها به آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین و آمیکاسین) و 33/3 درصد به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند.

مطالعات انجام شده 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 ایزوله شده از بیماران مبتلا به باکتری، 5/5 درصد ایزوله‌های ایجادکننده باکتری، مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند (15). در مطالعه‌ای در ترکیه، 42 درصد ایزوله‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. همچنین در آرژانتین 15 درصد ایزوله‌ها، در ایالات متحده آمریکا 9 درصد ایزوله‌ها و در تایوان 6 درصد آنها مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. در مقابل در ایزوله‌های کلبسیلا

پنومونیه ایجادکننده باکتری در آفریقای جنوبی، استرالیا و بلژیک، هیچ مورد مقاومت به سیپروفلوکساسین مشاهده نشد (15). در مطالعه Al-Marzooq و همکاران (2014) در مالزی، 71 درصد 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 11/7 درصد از ایزوله‌ها به ایمی‌پنم مقاوم بودند که این میزان مقاومت برای دارویی که به عنوان آخرین خط درمانی برای عفونت‌های گرم منفی استفاده می‌شود، مقاومت به نسبت بالایی است. از سوی دیگر 3/6 درصد 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 ضد میکروبی 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 نتایج مقاومت متقاطع نشان داد که 7/2 درصد سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه، دارای مقاومت چنددارویی

نشان دادند.

در گزارش مردانه و همکاران در سال 1394 در شیراز بر روی باکتری‌های جدا شده از کشت خون بیماران، 21/5 درصد موارد کشت مثبت متعلق به خانواده انتروباکتریاسیه بودند. در بین اعضای این خانواده، 28 درصد آنها کلبسیلا بودند که پس از اشریشیاکلی رتبه دوم را به خود اختصاص دادند. داروهای پلی‌میکسین B، کلستین و ایمپنم مؤثرترین داروها بر ضد 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 جدا شده از خون، 15 درصد آنها گونه‌های کلبسیلا بودند. در مطالعه پورعباس، مؤثرترین داروها بر روی ایزوله‌های کلبسیلا به ترتیب: ایمپنم (98%) و لووفلوکساسین (80%) بودند که در مقایسه با ایزوله‌های مطالعه ما مقاومت بالاتری (88/3%) به ایمپنم 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 آنجایی که 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 به دلیل استفاده داروها در صنایع مختلف از جمله صنایع دامداری و پرورش ماکیان، به‌منظور کاهش عفونت‌ها و افزایش باروری و سوددهی، اتفاق می‌افتد. این ایزوله‌های مقاوم به دارو می‌توانند از طریق مواد غذایی و محصولات دیگر به جامعه انسانی و نیز محیط‌های بیمارستانی منتقل شوند و

بودند و به 3 کلاس آنتی‌بیوتیکی بزرگ مورد بررسی یعنی سفالوسپورین‌ها، کارباپنم‌ها و کینولون‌ها پاسخ ندادند. 9 درصد ایزوله‌ها (10 مورد) به هیچ‌یک از بتالاکتام‌های مورد بررسی پاسخ ندادند؛ همین‌طور 8 سویه همزمان به جنتامیسین، ایمپنم، سیپروفلوکساسین و سفپیم مقاومت نشان دادند. همچنین نزدیک به 6 درصد سویه‌ها به نسل چهارم سفالوسپورین‌ها مقاوم بودند.

در این مطالعه، نتایج انجام PCR بر روی ژن bla_{CTX} در ایزوله‌ها نشان داد که 70/3 درصد آنها دارای این ژن بوده و 87/2 درصد این سویه‌ها به ایمپنم حساس بودند. همچنین نتایج نشان داد که در بین آمینوگلیکوزیدها، آمیکاسین در مقایسه با جنتامیسین پاسخ بهتری نشان داد؛ به‌طوری‌که 52/6 درصد 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 1/7 درصد ایزوله‌ها دارای ژن CTX بودند؛ در صورتی‌که در طی سال 2010 تا 2012 در حدود 26/4 درصد 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 فوتوتیپی و ژنتیکی، نشان از بالاتر بودن مقاومت در ایزوله‌های شایع در بیمارستان‌های کشور ما دارد.

در مطالعه حاضر، سویه‌های SDD، مقاومت بالایی به کینولون‌ها (سیپروفلوکساسین) نشان دادند؛ به‌طوری‌که 6 سویه از 7 سویه 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 (ایمپنم) حساس بودند؛ بنابراین ایمپنم جایگزین مناسبی برای درمان بیماران مبتلا به بیماری‌های ایجادشونده توسط این سویه‌هاست. همچنین همه سویه‌های SDD به آنتی‌بیوتیک کلیستین حساسیت

سبب بروز عفونت در افراد بستری در بیمارستان‌ها گردند (27-23).
 دارد که آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام معمول، عملاً در درمان عفونت‌های بیش از 55 درصد ایزوهای کلبسیلا پنومونیه، مؤثر 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 میکروبی‌شناسی بالینی باشد.

نتیجه‌گیری

همه نتایج به‌دست‌آمده، نگران‌کننده و نشان‌دهنده افزایش رو به رشد مقاومت‌های چنددارویی در بین باکتری‌های بیماری‌زای بیمارستانی بودند. نتایج نشان از آن

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

2011; 477(7365): 457-61.

14- Hernandez 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, Razaatpour 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.