Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 29, No.3, Autumn 2019 **ORIGINAL ARTICLE**

Evaluation of the prevalence of broad-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and carbapenemase genes in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from burn wounds in patients referred to Shahid Motahari Hospital in Tehran

Ali Shivaee[1], Shahla Shahbazi[2], Armaghan Soltani[3], Elaheh Ahadi[4]
[1]MSc in Medical Microbiology, Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]PhD Student, Department of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran, Teheran, Iran
[3]MSc Student in Microbiology, Department of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran, Teheran, Iran
[4] MSc Student in Microbiology, Department of Biology, Alborz Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Abstract

Background: Klebsiella species are common causes of nosocomial, ulcers, blood and urinary tract infections, and also acquired pneumonia from the hospital and various intra-abdominal infections. Bacterial resistance mechanisms against antibiotics are different, but one of these resistance mechanisms, which is very problematic, is the production of β-lactamase enzymes in bacteria. The aim of this study was to determine the antibiotic resistance pattern and the presence of beta-lactamase genes in Klebsiella isolated from burn wounds among patients referred to Shahid Motahhari Hospital in Tehran.
Materials and methods: 100 strains collected for confirmation of production of broad-spectrum beta-lactamases (ESBLs) were tested by CDT (Combined Disk Test). Finally, β-lactamase genes were investigated using polymerase chain reaction.
Results: The highest resistance rate was observed to ampicillin (93%). 23% of isolates produced ESBLs. The highest frequency of genes was bla shv gene (26.8%).
Conclusion: The presence of beta-lactamase genes with high antibiotic resistance is very worrying. Since the present genes can spread through mobile genetic elements in bacteria, among bacteria, it is considered to be a serious alert in the treatment of infections caused by Klebsiella.
Keywords: *Klebsiella pneumoniae, Antibiotic resistance, Beta-lactamase genes, ESBLs.*

Cited as: Shivaee A, Shahbazi SH, soltani A, Ahadi E. Evaluation of the prevalence of broad-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and carbapenemase genes in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from burn wounds in patients referred to Shahid Motahari Hospital in Tehran. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2019; 29(3): **232-239.**

Correspondence to: Shahla Shahbazi
Tel: *+98 89910179127*
E-mail: shahbazi.shahla@yahoo.com
ORCID ID: 0000-0001-5189-9974
Received: 20 Aug 2018; **Accepted:** 25 Nov 2018

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۹، شماره ۳، پاییز ۹۸، صفحات ۲۳۲ تا ۲۳۹

Original Article

بررسی میزان شیوع ژن‌های کد کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) و کارباپنماز در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از زخم‌های سوختگی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شهید مطهری تهران

علی شیوایی[۱]، شهلا شهبازی[۲]، ارمغان سلطانی[۳]، الهه احدی[۴]

[۱]کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
[۲]دانشجوی دکترای باکتری شناسی، گروه میکروب شناسی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران
[۳]دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۴]دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی،گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *باکتری جنس‌های کلبسیلا از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی، زخم، عفونت مجاری ادراری، عفونت خون، پنومونی اکتسابی از بیمارستان و عفونت‌های مختلف داخل شکمی هستند. از بین مکانیسم‌های مقاومت باکتریایی در برابر آنتی بیوتیک‌ها، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری‌ها مشکل‌ساز شده است. هدف از این مطالعه، بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و حضور ژن‌های بتالاکتامازی در باکتری‌های کلبسیلای جداسازی شده از زخم سوختگی افراد مراجعه کننده به مرکز سوانح و سوختگی شهید مطهری تهران بود.*

روش بررسی: *۱۰۰ سویه جمع آوری شده برای تایید تولید بتالاکتاماز های وسیع الطیف (ESBL) با روش CDT (Combined Disk Test) تحت آزمایش قرار گرفتند. در نهایت با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ژن‌های بتالاکتامازی تحت بررسی قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *بیشترین میزان مقاومت در برابر آمپی سیلین (۹۳ ٪) مشاهده شد. ۲۳ ٪ ایزوله‌ها تولید کننده ESBLs بودند. بیشترین فراوانی ژن‌های مورد بررسی مربوط به ژن blashv (۲۶/۸ ٪) بود.*

نتیجه‌گیری: *حضور ژن‌های بتالاکتامازی همراه با مقاومت بالای آنتی بیوتیکی بسیار نگران کننده است و از آنجا که ژن‌های حاضر می‌توانند از طریق عناصر متحرک ژنتیکی در میان باکتری‌ها گسترش یابند، زنگ خطر جدی در درمان عفونت‌های ناشی از کلبسیلا محسوب می‌شوند.*

واژگان کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه، مقاومت آنتی بیوتیکی، ژن های بتالاکتامازی، ESBLs*

مقدمه

همان طورکه تحقیقات در کشورهای مختلف نشان داده، کلبسیلا دومین عامل شایع ایجاد کننده عفونت زخم است (۱). زخم‌های سوختگی یکی از عمده‌ترین شرایط مستعد به عفونت است، به نحوی که شیوع عفونت‌های زخم سوختگی از ۲/۵ ٪ تا ۲۱ ٪ متغیر است (۲, ۳). براساس مطالعات بزرگ انجام شده در ایران بر روی آسیب‌های سوختگی، میزان بروز کلی مرگ ومیر در بیماران سوختگی ۲ تا ۵/۶ مرگ در هر ۱۰۰،۰۰۰ نفر در سال است (۱). از جمله راهکارهای درمانی برای مقابله با این عفونت‌ها استفاده از آنتی بیوتیک‌ها است. مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتام‌ها ، کارباپنم‌ها ، کینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها

آدرس نویسنده مسئول: تهران، انستیتوپاستور ایران، گروه میکروب شناسی، شهلا شهبازی
(**email**: shahbazi.shahla@yahoo.com)
ORCID ID: 0000-0001-5189-9974
تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۸/۲۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۷/۹/۱۴

و کوتریماکسازول هستند. به دلیل ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در طول درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط کلبسیلا پنومونیه، استفاده صحیح آنتی‌بیوتیکی بسیار مهم است (۴). مکانیسم‌های مقاومت باکتریایی در برابر آنتی بیوتیک‌ها متفاوت است، اما یکی از این مکانیسم‌های مقاومتی که بسیار مشکل ساز شده است، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری‌ها است. طی دهه‌های اخیر بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) در باسیل‌های گرم منفی یافت شده است و به عنوان مکانیسم مهم مقاومت محسوب می‌شوند. آنزیم‌های ESBL قادر به هیدرولیز پنی سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های وسیع الطیف و مونوباکتام‌ها هستند. عواملی همچون کلاولونیک اسید، تازوباکتام و سولباکتام با اثر بازدارندگی منجر به مهار عملکرد این آنزیم‌ها می‌شوند (۵, ۶). از طرفی کاربانپم‌هایی مانند ایمی پنم، مروپنم و ارتاپنم بهترین درمان در عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مولد بتالاکتاماز های وسیع الطیف هستند. اما متاسفانه با افزایش استفاده از این آنتی بیوتیک‌ها شمار باکتری‌های مقاوم نیز افزایش یافته است. از مهم‌ترین مکانیزم‌های مقاومتی علیه کاربانپم تولید کارباپنماز است که KPC و VIM از شایع‌ترین آن‌ها در انتروباکتریاسه‌ها هستند. امروزه تقریبا ۲۰ ٪ از عفونت‌های کلبسیلاپنومونیه در بخش‌های مراقبت ویژه در ایالات متحده شامل سویه‌های غیر حساس به نسل سوم سفالوسپورین‌ها است که علت اصلی این امر کسب پلاسمیدهای حاوی ژن‌های کدکننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف (ESBL) بوده است و از آنجایی که این پلاسمیدها اغلب حامل ژن های مقاومت دیگری مانند ژن‌های کارباپنمازی نیز هستند (۷)، درمان عفونت‌های جدی اعضای انتروباکتریاسه تولیدکننده ESBL، نیازمند توجه ویژه است.

لذا با توجه به افزایش روبه رشد این سویه‌های ESBL و کارباپنمازها و اهمیت زخم‌های سوختگی در کلینیک‌ها، مطالعه حاضر به منظور بررسی وجود ژن‌های کد کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) و کارباپنماز در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از زخم های سوختگی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شهید مطهری تهران انجام شد.

مواد و روشها

دراین مطالعه توصیفی-مقطعی (cross-sectional)، تعداد ۱۰۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه از افراد با زخم سوختگی که به مرکز سوانح و سوختگی شهید مطهری در تهران در سال ۹۶-۹۵ مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شد. آزمون‌های بیوشیمیایی تکمیلی از قبیل SIM، TSI، اوره و سیترات و لیزین دکربوکسیلاز برای تایید این نمونه ها انجام شد. پس از تعیین گونه و سویه، جدایه‌های مورد نظر از نظر نوع مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش استاندارد Disk-diffusion (Kirby-Bauer 1966) مورد بررسی قرار گرفتند (۸). دیسک‌های مورد استفاده در این مطالعه (Mast Co., UK) شامل آمپی سیلین (µg ۱۰)، جنتامایسین (µg ۱۰)، سفتازیدیم (µg ۳۰)، سفپیم (µg ۳۰)، آموکسی سیلین- کلاوولانیک اسید (µg ۲۰/۱۰) و ایمی پنم (µg ۱۰) بودند. در این روش، سوسپانسیونی از باکتری با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سپس از این سوسپانسیون در سطح پلیت‌های مولر هینتون آگار به صورت Pour Plate کشت انجام شد و دیسک ها در سطح پلیت‌ها قرار داده شدند. پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، قطر هاله ممانعت از رشد (Zone of inhibition) برحسب میلی متر با استفاده از خط کش اندازه گیری شد و نتایج به صورت Resistant، Susceptible و Intermediate ثبت شدند. در هر بار انجام آنتی بیوگرام کنترل E. coli ATCC 25922 استفاده شد.

به منظور شناسایی باکتری های تولیدکننده ESBLs، در ابتدا آزمون غربالگری طبق دستورالعمل CLSI,2017 و با استفاده از دیسک آنتی بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفپیم انجام شد (۸). برای انجام این کار ابتدا برای تمام باکتری‌ها، هاله عدم رشد مربوط به هر یک از این آنتی بیوتیک‌ها اندازه گیری شد. اگر اندازه هاله عدم رشد هر یک از این آنتی بیوتیک‌ها برای سویه ها مطابق جدول ۱ بود، تست‌های تأییدی برای آنها انجام شد.

جدول ۱. معیارهای غربالگری جهت شناسایی ارگانیسم های مولد ESBL بر اساس دستورالعمل NCCLS

آنتی بیوتیک	قطر هاله عدم رشد(mm)
سفتازیدیم	≤۲۲
سفوتاکسیم	≤۲۷
سفپیم	≤۲۵

در آزمون تاییدی از روش دیسک‌های ترکیبی (Combination Disk Method) استفاده شد. برای این منظور از سفتازیدیم-کلاولانیک اسید µg ۳۰/۱۰ و سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید µg ۳۰/۱۰ و سفپیم – کلاولانیک µg ۳۰/۱۰ با روش Disk-diffusion استفاده شد. افزایش mm ۵ ≤قطر هاله دیسک‌های ترکیبی یا کلاولانیک

جدول ۲. توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

پرایمر	توالی پرایمر (′3→′5)	اندازه محصول (bp)	دمای انلینگ (درجه سانتی‌گراد)	رفرنس
bla SHV	F: ATGCGTTATATTCGCCTGTG R:TGCTTTGTTATTCGGGCCAA	۷۴۷	۵۴	(۹)
bla TEM	F:TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA R:ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	۵۴۵	۶۰	(۹)
bla CTX-M	F:ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC R:TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGGG	۴۹۳	۵۸	(۹)
bla VEB	F: GCGTTATGAAATTTCCGATTG R: CAACATCATTAGTGGCTGCTG	۳۲۳	۵۴	(۱۰)
bla GES	F: ATGCGCTTCATTCACGCAC R: CTATTTGTCCGTGCTCAGG	۲۶۵	۵۵	(۱۰)
bla PER	F: GCCTGACGATCTGGAACC R: GATACTGCACCTGATCATC	۱۸۰	۵۵	(۱۰)
bla OXA	F: CTGTTGTTTGGGTTTCGCAAG R: CTTGGCTTTTATGCTTGATG	۶۵۷	۵۳	(۱۰)
bla KPC	F: ATGTCACTGTATCGCCGTCTAGT R: CGTTGACGCCCAATCC	۸۷۰	۵۶	(۱۱)

F: forward; R: reverse

اسید نسبت به دیسک‌های فاقد این آنتی بیوتیک نشان دهنده این است که باکتری از گروه باکتری‌های تولیدکننده ESBL است. در این آزمایش به عنوان شاهد از سوش اشریشیاکلی ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و از سوش کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 به عنوان کنترل مثبت دارای آنزیم ESBLاستفاده شد. در مرحله بعد، DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراج DNA (Roche) و پروتکل همراه با کیت استخراج شد.

جدول ۳. مقادیر و موارد به کار رفته جهت تهیه مخلوط واکنش PCR

Volume	PCR Mixture Components
2.5 µl	PCR Buffer (10X)
1-2 µl	MgCl2 (25 mM)
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Primer Forward (10 pmol/µl)
1 µl	Primer Reverse (10 pmol/µl)
0.1 µl	Taq DNA Polymerase (5U/µl)
Variable	Template DNA
Variable	ddH2O
25 µl	Total volume

به منظور تکثیر ژن‌های بتالاکتامازی SHV، TEM، CTX-M، VEB، GES، PER، OXA و KPC در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه، ابتدا پرایمرها از مقالات موجود استخراج و پس از Bast کردن در پایگاه داده‌ها NCBI و حصول اطمینان از مناسب بودن آنها، انتخاب شدند. پس از آماده سازی پرایمرها و بهینه نمودن شرایط PCR برای هر ژن، مخلوط واکنش (PCR Mixture) PCR تهیه شد (جدول‌های ۲ و ۳) و با استفاده از سیکل حرارتی ذکر شده (جدول ۴) در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) تکثیر این ژن‌ها انجام گرفت.

جدول ۴. برنامه بدست آمده جهت انجام واکنش PCR

Steps	Temperature	Time
Initial Denaturation	94˚C	5 min
Denaturation	94˚C	1 min
Annealing	بر اساس جدول۲	1 min
Extension	72˚C	1 min
Final Extension	72˚C	5 min

پس از انجام PCR بر روی DNA حاصل از نمونه‌ها، محصولات تکثیر شده در PCR جهت مشاهده قطعات DNA، بر روی آگاروز ۱ درصد با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شدند. برای مشاهده و تصویربرداری محصولات PCR الکتروفورز شده در ژل مربوطه از سیستم Gel documentation استفاده شد. در نهایت با استفاده از DNA الگو که حاوی قطعاتی با وزن مولکولی مشخص است، محصول شناسایی شد.

یافته‌ها

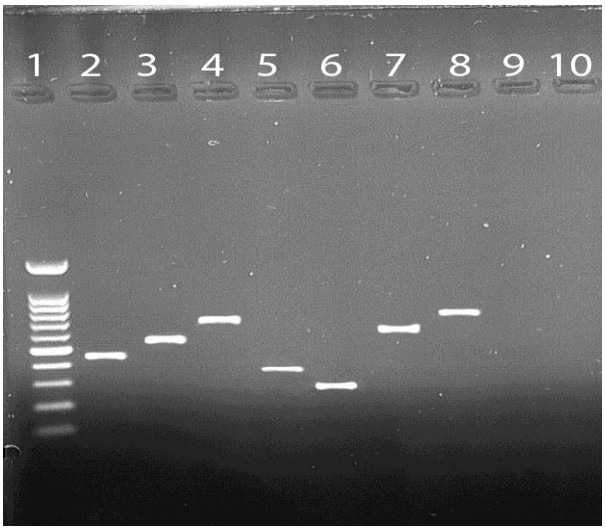
تمامی ۱۰۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه از نظر تست اکسیداز و تولید گاز سولفید هیدروژن مثبت، تست لیزین دکربوکسیلاز، اوره آز، اندول و حرکت منفی، اما سیترات مثبت بودند و قادر بودند در محیط مک کانکی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد رشد کنند.

نتایج حاصل از تست آنتی بیوگرام به روش کربی– بائر بر روی نمونه‌ها نشان داد که بیشترین مقاومت به ترتیب در برابر آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین (۹۳ درصد) و آموکسی سیلین کلاولانیک اسید (۵۳ درصد) و بیشترین حساسیت به ترتیب در

برابـر آنتی بیوتیـک‌های جنتامایسـین و ایمی پنم (۹۳ درصد) و سفتازیدیم (۸۰ درصد) بود (جدول ۵). نتایج به دست آمده به روش Combination Disk Method به منظور تعیین سویه‌های تولید کننده ESBL نشان داد که ۲۳ ایزوله از مجموع ۱۰۰ ایزوله ESBL مثبت هستند.

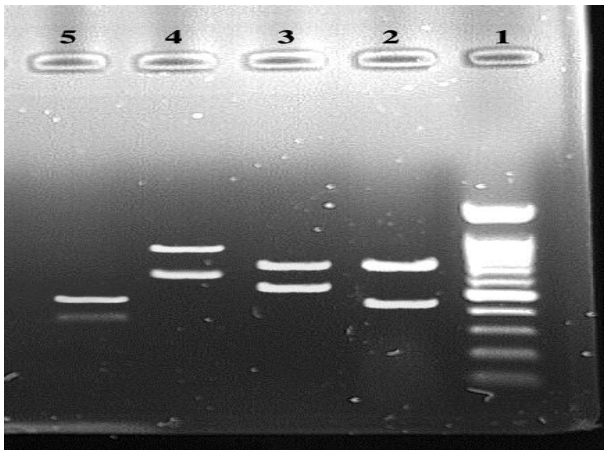
جدول ۵. نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های جداشده

	کلبسیلا پنومونیه (تعداد:۱۰۰)			
آنتی بیوتیک	(µg/disc)	مقاوم (٪)	نیمه حساس (٪)	حساس (٪)
آمپی سیلین	۱۰	۹۳	۷	۰
جنتامیسین	۱۰	۰	۷	۹۳
سفتازیدیم	۳۰	۲۰	۰	۸۰
سفپیم	۳۰	۲۰	۰	۸۰
آموکسی سیلین- کلاولانیک اسید	۲۰/۱۰	۵۳	۴۰	۷
ایمی پنم	۵	۷	۰	۹۳



شکل ۱. عکس مربوط به ژن های تولید کننده ESBL بر روی ژل الکتروفورز. از سمت چپ چاهک اول مربوط به لدر bp ۱۰۰وچاهک دوم مربوط به ژن bla_{CTX-M} (bp ۴۹۳) و چاهک سوم مربوط به ژن bla_{TEM} (bp ۵۴۵) و چاهک چهارم مربوط به ژن bla_{SHV} (bp ۷۴۷) و چاهک پنجم مربوط به ژن bla_{VEB} (bp ۳۲۳) و چاهک ششم مربوط به ژن bla_{GES} (bp ۲۶۵) و چاهک هفتم مربوط به ژن bla_{OXA} (bp ۶۵۷)و چاهک هشتم مربوط به ژن bla_{KPC} (bp ۸۷۰) و چاهک هشتم مربوط به ژن bla_{PER} که در هیچ یک از نمونه ها مشاهده نشد و چاهک دهم که مربوط به کنترل منفی است.

بر روی ۲۳ ایزوله‌ای که از نظر فنوتیپی تولید کننده آنزیم‌های بتالاکتاماز بودند، آزمایش PCR انجام شد. از میان این ۲۳ ایزوله، ۶ (۲۶/۸٪) ایزوله دارای ژن blashv، ۵ (۲۱/۷۳٪) ایزوله دارای ژن blaTEM، ۴ (۱۷/۳۹٪) ایزوله دارای ژن blaCTX-M۲، (۸/۶۹٪) ایزوله دارای ژن blaVEB1، ۲ (۸/۶۹٪) ایزوله دارای ژن blaGES، ۲ (۸/۶۹٪) ایزوله دارای ژن blaOXA-48 و ۱ (۴/۳۴٪) ایزوله دارای ژن blaKPC بودند و ژن blaPER در هیچ کدام از ایزوله ها مشاهده نشد (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۲. نتایج مالتی پلکسPCR ژن‌های تولید کننده ESBL بر روی ژل الکتروفورز. ۱ : لدر bp ۱۰۰, ۲ : مربوط به باند blaSHV با اندازه ۷۴۷ و blaCTX-m با اندازه ۳,۴۹۳ : مربوط به باند blaSHV با اندازه ۷۴۷ و blaTEM با اندازه۴,۵۴۵ : مربوط به باند blaOXA با اندازه ۶۵۷ و blaKPC با اندازه 870 ,و۵ : مربوط به باند blaVEB با اندازه ۳۲۳ و blaCTX-m با اندازه۴۹۳.

بحث

گسترش تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف یکی از خطرهای جدی در درمان عفونت‌های دارای مقاومت چندگانه است که از زمان کشف آنها در سال ۱۹۸۰ به سرعت در سطح جهان گسترش یافته‌اند و به عنوان یکی از معضلات بهداشت عمومی خود را نمایان ساخته است. شیوع ESBL در بین گونه‌های بالینی از یک کشور به کشور دیگر و از یک مؤسسه تا مؤسسه دیگر متفاوت است. در مطالعه حاضر کـه بـر روی ایزولـه‌های کلبسیلا پنومونیه جـدا شده از زخم سوختگی افراد مراجعه کننده به مرکز سوانح و سوختگی شهید مطهری در تهران صورت گرفت، از نظر مقاومت آنتی بیوتیکی، بـیشتـرین مقاومـت بـه ترتیـــب در برابـــر آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین (۹۳ ٪) و بیشتـــرین حساسیت در برابـر آنتی بیوتیـک‌های جنتامایسـین و ایمی پنم (۹۳ ٪) مشاهده شد. همچنین ۲۳ ایزوله (۲۳ ٪) از کـل نمونـه‌ها ESBL مثبت بودند. مطالعات مشابه زیادی در ایران

و سایر نقاط جهان در زمینه کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBLs صورت گرفته‌اند که از جمله آنها می‌توان به مطالعه صورت گرفته توسط فیض آبادی و همکارانش در تهران در سال ۱۳۸۹ بر روی ۱۰۴ نمونه کلبسیلا پنومونیه اشاره کرد. در مطالعه آنها ۷۲/۱ ٪ از نمونه-ها تولید کننده ESBLs بودند (۱۲).

از طرفی میر صالحیان و همکارانش گزارش دادند که تولید ESBLs در سویه کلبسیلا پنومونیه در تهران به ۷۶ ٪ رسیده است (۱۳). فراوانی ESBL در کشورهای مختلف از ۸۵ ٪ در روسیه، ۶۶/۷ ٪ در هند، ۵۷/۸ ٪ در ترکیه، ۴۱ ٪ در امارات، ۱۷ ٪ در موارد سرپایی، ۲۸ ٪ در بیماران بستری در کویت و ۲۶ ٪ در عربستان سعودی، متفاوت بوده است (۱۲, ۱۴). همچنین در این مطالعه فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی TEM و CTX و SHV در میان ایزوله‌های تولید کننده ESBLs طبق نتایج به دست آمده با روش PCR به ترتیب، ۵ (۲۱/۷۳ ٪) ایزوله، ۴ (۱۷/۳۹ ٪) ایزوله و ۶ (۲۶/۸ ٪) ایزوله گزارش شد. در مطالعه محمدمرادی و همکارانش در سال ۱۳۹۴، ۹۲/۵ ٪ از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین مقاوم بودند که مشابه نتیجه حاصل از مطالعه حاضر بود. میزان حساسیت به آنتی بیوتیک جنتامایسین تقریبا بالای ۶۰ ٪ بود. در مطالعه آنها ۵۳/۱ ٪ ایزوله‌ها آنزیم‌های ESBLs تولید می‌کردند. بعد از انجام PCR ۷۶/۷ ٪ سویه‌ها دارای ژن TEM -bla، ۹۲/۸ ٪ دارای bla -CTX-M و ۹۶/۴ ٪ دارای ژن SHV - bla بودند که تفاوت چشمگیری با مطالعه حاضر داشت. یکی از علل این تفاوت‌ها ممکن است منشا نمونه‌ها باشد. با توجه روند رو به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در کلبسیلا پنومونیه، امروزه کاربانم‌ها به عنوان خط نهایی درمانی استفاده می‌شوند، اما متاسفانه مقاومت در برابر این آنتی بیوتیک‌ها در حال افزایش است که این برای عفونت‌های بیمارستانی بسیار نگران کننده است. نتایج حاصل از مطالعه غلامرضا پور علی و همکارانش نشان داد که ۱۱/۷ درصد ایزوله‌ها به ایمی پنم مقاوم هستند که به عنوان دارویی که به عنوان آخرین خط درمانی جهت عفونت ناشی از باکتریهای گرم منفی استفاده می‌شود مقاومت نسبتا بالایی است (۱۵). در مطالعه Barakzahi و همکارانش در زاهدان میزان حساسیت به ایمی پنم و جنتامایسین به ترتیب ۵۲ ٪ و ۳۶ ٪ گزارش شد. در مقایسه با نتایج مطالعه ما، میزان حساسیت به این داروها در زاهدان بسیار پایین‌تر است که می‌تواند نشان دهنده آن باشد سویه‌های مقاوم در آنجا ممکن است به دلیل رفت و آمد بسیار مهاجران از کشورهای همسایه وارد شده باشند (۱۶).از جمله مواردی که در ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک‌های کاربانم دخیل است می‌توان به حضور ژن‌های کاربانمازی اشاره کرد که در این مطالعه تعدادی از آنها از جمله blaVEB1، blaGES، blaOXA-48، blaKPC و blaPER مورد بررسی قرار گرفت. فراوانی این ژن‌ها به ترتیب ۲ (۸/۶۹ ٪) ایزوله، ۲ (۸/۶۹ ٪) ایزوله، ۲ (۸/۶۹ ٪) ایزوله و ۱ (۴/۳۴ ٪) ایزوله بود و ژن blaPER در هیچ کدام از ایزوله‌ها مشاهده نشد. در مطالعه‌ای که در سال ۹۲ در شهرکرد توسط هاشمی زاده و همکارانش انجام شد، از ۱۸۰ مورد ایزوله کلبسیلا، ۲۲ مورد (۱۲/۲۲ درصد) دارای ژن blaKPC بودند (۱۷). در مقایسه مطالعه حاضر با مطالعه Bratuو همکارانش، برخلاف مطالعه ما، ۲۴ درصد سویه‌های کلبسیلا واجد این ژن بودند، همچنین میزان جداسازی سویه‌های کلبسیلا واجد ژن blaKPC در این مطالعه خیلی کمتر از مطالعه Castanheiraو همکارانش (۱۸) در آمریکای شمالی، آمریکای جنوبی و اروپا و مطالعه Chen و همکارانش (۱۹) در چین بود که میزان جداسازی سویه‌های کلبسیلای واجد ژن blaKPC را به ترتیب ۵۱ و ۷۳/۵ درصد گزارش کردند.

Duarte و همکارانش در سال ۲۰۰۳ شیوع ژن بتالاکتاماز GES-1 را در باکتری کلبسیلا پنومونیه در بیمارستان دانشگاه شهر لیسبون پرتغال مورد بررسی قرار دادند و در مطالعه آنها تمامی ایزوله‌ها دارای ژن GES-1 بودند (۲۰). در مطالعه قلی پور و همکارانش از ۴۵ ایزوله کلبسیلای جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی شهرکرد، فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز OXA-10 و PER به ترتیب ۹۰ و ۳۳ درصد بود (۲۱). در مطالعه عالیشا آکیا و همکارانش مشابه مطالعه حاضر، ژن‌های PER در هیچ کدام از ایزوله ها یافت نشد. در مطالعه صورت گرفته توسط آتنا امیری و همکارانش در کاشان میزان مقاومت به آمپی سیلین، سفتازیدیم و سفوتاکسیم به ترتیب ۹۲ ٪، ۶۷ ٪ و ۶۴ ٪ بود. همچنین ۳۵٪ (۳۵ مورد) ایزوله‌ها تولید کننده ESBL بودند. شیوع ژن blaCTX-M و blaRER در ایزوله‌های کلبسیلا به ترتیب ۲۸٪ و ۹٪ بود. میزان مقاومت و تعداد سویه‌های تولید کننده ESBL در این مطالعه در مقایسه با مطالعه ما از میزان برخورداری بالاتر بود (۲۲). در مطالعه صورت گرفته توسط Pattarachai Kiratisin و همکارانش در تایلند، ۹۹/۲ ٪ ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBL بودند که ۷۱/۷ ٪ آنها دارای ژن blaTEM، ۸۷/۴ ٪ دارای ژن blaSHV، ۱۰/۲ دارای ژن VEB-1 و ۱۱/۸ ٪ دارای ژن OXA-10 بودند. ژن‌های blaPER و blaGES در هیچ کدام از سویه‌ها یافت نشدند (۲۳).

بررسی و مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعه سایر محققان دارای مشابهات و تفاوت‌هایی است و به طور کلی مطالعات و گزارش‌های متعددی در خصوص افزایش و شیوع رو به رشد ارگانیسم‌های مولد ESBLs از مناطق مختلف در کشور وجود دارد

(۲۶-۲۴)، به نحوی که افزایش شیوع ارگانیسم‌های مولد ESBLs باعث ایجاد نگرانی شده است. استفاده زیاد و نامناسب از آنتی بیوتیک‌ها، طول مدت بستری شدن بیمار در بیمارستان، شیوه درمان و روش مورد استفاده برای شناسایی ارگانیسم‌های مولد ESBLs می‌تواند دلیل تفاوت در درصدهای گزارش شده باشد (۲۷, ۲۸). درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌های مولد این آنزیم‌ها بسیار مشکل است، چون از یک سو مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین‌ها مشاهده می‌شود و از سوی دیگر بسیاری از ژن‌های ESBL برروی پلاسمیدهای بزرگی (بیش از ۱۰۰کیلو باز) قرار دارد که هم زمان حامل ژن‌های مقاومت به سایر عوامل ضد میکروبی مثل آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، سولفونامیدها وتتراسایکلین نیز است (۲۹). لذا انتشار این عناصر به سادگی از یک سویه به سویه دیگر صورت گرفته و می‌تواند به سادگی باعث انتشار مقاومت در بیمارستان یا هر محیط دیگر درمانی شوند. لذا توصیه می‌شود که در کنار تست‌های آنتی بیوگرام برای تشخیص مقاومت، تست‌های تکمیلی جهت تشخیص بتالاکتامازهای وسیع الطیف نیز انجام پذیرد تا بدین وسیله هم کمک قابل توجهی به پزشکان در تشخیص نوع آنتی بیوتیک موثر تجویزی و متقابلا کاهش طول دوره بیماری شود و از سوی دیگر، هزینه‌های درمان از طریق کاهش انتشار سوش‌های مقاوم به درمان باکتری ها کاهش یابد.

REFERENCES

1. Afkhamzadeh A, Majidi F, Ahmadi C. Risk factors for nosocomial infections among burn patients hospitalized in Tohid hospital, Sanandaj, Kurdistan Iran. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences 2016;59:225-32. [In Persian]

2. Groohi B, Alaghehbandan R, Lari AR. Analysis of 1089 burn patients in province of Kurdistan, Iran. Burns 2002;28:569-74.

3. Askarian M, Vakili M, Kabir G. Results of a hospital waste survey in private hospitals in Fars province, Iran. Waste Manag 2004;24:347-52.

4. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. Int J Med Microbiol 2010;300:371-9.

5. Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin VS, Nematzadeh S. PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae isolated from Tehran, Iran. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2010;13:111-8.

6. Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired Acinetobacter baumannii infection in a teaching hospital. J Hosp Infect 2003;54:39-45.

7. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. Am J Med 2006;34:S20-S8.

8. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis 2009;49:1749-55.

9. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. APMIS 2007;115:1400-8.

10. Zhou CC, Irani RA, Zhang Y, Blackwell SC, Mi T, Wen J, et al. Angiotensin receptor agonistic autoantibody–mediated tumor necrosis factor-α induction contributes to increased soluble endoglin production in preeclampsia. Circulation 2010;12:436-44.

11. Eftekhar F, Naseh Z. Extended-spectrum β-lactamase and carbapenemase production among burn and non-burn clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. Iran J Microbiol 2015;7:144.

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

13. Decré D, Gachot B, Lucet JC, Arlet G, Bergogne-Bérézin E, Régnier B. Clinical and bacteriologic epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of Klebsiella pneumoniae in a medical intensive care unit. Clin Infect Dis 1998;27:834-44.

14. Hussain A, Mirza IA, Ikra A, Sattar A, Ali S, Khan IU. In vitro sensitivity of chloramphenicol against extended spectrum beta lactamase producing gram negative bacteria. Infectious Diseases Journal of Pakistan 2012;4:503.

15. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. APMIS 2007;115:1400-8.

16. Barakzahi M, Hormozi B, Rashki A, Ghalehnoo ZR. Prevalence of extended spectrum β-Lactamase in Klebsiella pneumonia isolates in a teaching hospital of Zahedan City, Iran. Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection 2014;1:e22934.

17. Mirnejhad R, Hashemizadeh FS, Zamanzad B, Jahandideh S, Ansari N, Gholipour A, et al. Identification of KPC-producing Klebsiella pneumoniae in clinical samples in Iran. Yafte Journal of Medical Sciences 2013;15:105-14. [In Persian]

18. Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase-and metallo-β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:570-3.

19. Chen S, Hu F, Xu X, Liu Y, Wu W, Zhu D, et al. High prevalence of KPC-2-type carbapenemase coupled with CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in a teaching hospital in China. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:2493-4.

20. Duarte A, Boavida F, Grosso F, Correia M, Lito L, Cristino JM, et al. Outbreak of GES-1 β-lactamase-producing multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae in a university hospital in Lisbon, Portugal. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:1481-2.

21. Latifpour M, Gholipour A, Damavandi M S. The study of antibiotic resistance of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella strains isolated from urinary tract infections in teaching Hospitals in Shahrekord . J Shahrekord Univ Med Sci 2016; 18:45-53. [In Persian]

22. Amiri A, Firoozeh F, Moniri R, Zibaei M. Prevalence of CTX-M-type and PER extended-spectrum β-lactamases among Klebsiella spp. isolated from clinical specimens in the Teaching Hospital of Kashan, Iran. Iranian Red Cres Med J 2016;18:e22260. [In Persian]

23. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2818-24.

24. Mansouri S, Neyestanaki DK, Shokoohi M, Halimi S, Beigverdi R, Rezagholezadeh F, et al. Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs types of β-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli producing Extended Spectrum β-lactamases in Kerman, Iran. Jundishapur J Microbiol 2014;7:e8756.

25. Moghaddam MN, Beidokhti MH, Jamehdar SA, Ghahraman M. Genetic properties of blaCTX-M and blaPER β-lactamase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae by polymerase chain reaction. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2014;17:378.

26. Ghasemi Y, Archin T, Kargar M, Mohkam M. A simple multiplex PCR for assessing prevalence of extended-spectrum β-lactamases producing Klebsiella pneumoniae in Intensive Care Units of a referral hospital in Shiraz, Iran. Asian Pac J Trop Med 2013;6:703-8.

27. Franiczek R, Dolna I, Krzyzanowska B, Szufnarowski K, Kowalska-Krochmal B. Conjugative transfer of multiresistance plasmids from ESBL-positive Escherichia coli and Klebsiella spp. clinical isolates to Escherichia coli strain K12 C600. Adv Clin Exp Med 2007;16:239.

28. Bali EB, Accedil L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum-lactamase produced by Escherichia coli, Acinobacter baumannii and Klebsiella isolates in a Turkish hospital. African J Microbiol Res 2010;4:650-4.

29. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum β-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Inf 2003;47:273-95.