(مقالۀ پژوهشی)

بررسی ژن‌های بتالاکتامازی *bla-CTX-M-15* و *bla-AmpC (FOX)* در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر اصفهان

آرمان رستم زاد[1*]، علی یار پادروند[2]

۱- استادیار گروه زیست شناسی.

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی.

۱و۲-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

*نویسندۀ مسؤول:

آرمان رستم زاد؛ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۱۸۸۴۱۲۹۰۵

Email: arostamzad381@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام در میان ایزوله‌های بالینی، در بیشتر موارد ناشی از آنزیم‌های بتالاکتامازی است. هدف این مطالعه بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی وبررسی میزان ژن‌های بتالاکتامازی *blaCTX-M-15* و *blaFOXM* در نمونه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بیمارستان‌های شهر اصفهان بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی، در طی یک دوره یک ساله از شهریور ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ تعداد ۸۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بسری در بیمارستان های الزهرا و غرضی تهران جدا شد. این سویه ها بوسیله تست‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی تشخیص داده شدند و الگوی مقاومت آنها نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک مختلف با روش آگار دیسک دیفیوژن مشخص گردید, و سویه‌های تولید کننده آنزیم‌های بتالاکتامازی، با روش های فنوتیپی و دیسک ترکیبی شناسایی گردیدند. و میزان ژن‌های بتالاکتامازی *blaCTX-M-15* و *blaFOXM* در آنها به روش PCR تعیین گردید.

یافته‌ها: نتیجه آنتی بیوگرام نشان داد که بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول به میزان ۵۵ درصد و کمترین میزان مقاومت نسبت به ایمی پنم به میزان ۷/۵ درصد بود. از تعداد ۸۰ نمونه مورد بررسی، ۳۱ ایزوله (۳۸/۷۵٪) از طریق تست تایید فنوتیپی و دیسک ترکیبی بعنوان مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف شناخته شدند. نتایج حاصل از PCR نشان داد که تعداد ۱۷ ایزوله (۳۲/۷٪) دارای ژن *blaCTX-M-15* و ۹ ایزوله (۱۷/۳٪) دارای ژن *blaFOX* بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش میزان بالای آنزیم های ESBL را در میان جدایه های کلبسیلا نشان داد، از این رو برای کنترل عفونت و جلوگیری از گسترش مقاومت در میان نمونه های کلینیکی، مدیریت صحیح درمان ضروری می‌باشد.

کلید واژگان: کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتاماز وسیع الطیف.

دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۵/۱۱ دریافت مقالۀ اصلاح‌شده: ۱۳۹۵/۱۰/۱۲ اعلام قبولی: ۱۳۹۵/۱۱/۱۶

مقدمه

ظهور مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در میان سویه های بیماریزا به ویژه در میان مراکز درمانی و بیمارستان‌ها به یک معضل بزرگ در رابطه با سلامت همگانی تبدیل شده است(۱و۲). از آنجایی که بسیاری از مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی توسط پلاسمیدهای قابل انتقال بین سویه‌های مختلف منتقل می‌شوند، بررسی مقاومت باکتری‌های ایجاد کننده عفونت در بخش‌های مختلف بیمارستان، یکی از مهم‌ترین مسائل در تمام دنیا جهت ترسیم پروتکل‌های درمانی و فرایند پیشگیری می‌باشد (۳).

باکتری‌های ایجاد کننده عفونت در بخش‌های مختلف بیمارستانی غالباً الگوی مقاومت گسترده‌ای از خود نشان می‌دهند و عامل افزایش مرگ و میر بیماران، به ویژه در بخش مراقبت های ویژه (ICU)می‌باشند (۴). برخی از باکتری‌ها قادر به تولید آنزیم‌هایی هستند که منجر به تغییر و یا تخریب ساختار شیمیایی آنتی‌بیوتیک‌ها و در نهایت سبب غیر فعال شدن آنتی‌بیوتیک‌ها و بروز فنوتیپ مقاوم از می‌شود سوی باکتری‌ها. بهترین مثال از این نوع مقاومت‌ها، آنزیم‌های بتالاکتامازی بوده که از طریق هیدرولیز حلقه بتالاکتام، منجر به غیر فعال شدن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شوند (۱ و ۲).

امروزه کاربرد روزافزون داروهای ضد میکروبی از جمله آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورینی منجر به ظهور دسته دیگری از ژن‌های بتالاکتامازی شده که در مقایسه با بتالاکتامازهای اولیه (*TEM2*، *TEM1* و *SHV*) طیف فعالیت بیشتری دارند که می‌توان آن‌ها را تحت عنوان کلی بتالاکتامازهای وسیع الطیف (Extended ESBLs =Spectrum Beta Lactamases) نامید(۵ و ۶). تولیدآنزیم های وسیع الطیف برای اولین بار درسال ۱۹۸۳ در اروپا گزارش شد اما طولی نکشید که بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در ایالات متحده آمریکا و آسیا شناسایی شدند (۷). بیشتر ژن‌های ESBL بر روی پلاسمید کد می‌شوند و اغلب بر روی ترانسپوزون و اینتگرون واقع شده‌اند. بنابراین ژن‌های کد کننده ESBLs به راحتی در بین باکتری‌ها منتقل می‌شوند (۸).

اخیراً برخی سویه‌های باکتریایی به ویژه در اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه شناسایی شده‌اند که مولد یک سفالوسپورینار از خانواده بتالاکتاماز به نام *AmpC* می‌باشند(۹ و ۱۰). بتالاکتامازهای *AmpC* شامل *ACC*، *MIR*، *MOX*، *ACT*، *FOX* و *CMY* می‌باشند. ژن‌های *MOX*، *FOX* و *ACT* باعث مقاومت به سفالوسپورین‌هایی نظیر سفتازیدیم، سفوتاکسیم و آزترونام می‌شوند، از این رو باعث افزایش هزینه درمان، طول مدت بستری و مرگ و میر می‌شوند(۱۱). بتالاکتامازهای *AmpC* عموماً کروموزومی بوده اما به واسطه عناصر ژنتیکی متحرک به ویژه پلاسمید به راحتی بین ارگانیسم‌های دیگر منتشر شده و از آنجا که در برابر مهارکنندگان بتالاکتامازی به ویژه کلاوولانیک اسید مقاوم می‌باشند، منجر به اختلال در نتیجه تست تاییدی و گزارش منفی کاذب ESBLs می‌گردند. از این رو تشخیص فنوتیپی میکروارگانیسم‌های مولد *AmpC* و ESBLs دشوار است (۹ و ۱۰). لذا استفاده از روش‌های مولکولی در کنار روش‌های فنوتیپی ضروری است. هدف از این مطالعه، بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری شده در بخش های مختلف بیمارستان های الزهرا و دکتر غرضی شهر اصفهان و نیز میزان تولید ژن‌های بتالاکتامازی وسیع الطیف ***blaCTX-M-15*** و***blaFOX*** در این جدایه ها بود.

روش بررسی

نمونه گیری

این مطالعه که به مدت یک سال و از شهریور ۱۳۹۳ تا شهریور ۱۳۹۴ طول کشید تعداد ۸۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* از بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های الزهرا و دکتر غرضی شهر اصفهان

جدا سازی شد. نمونه های بالینی مختلف شامل ادرار، تراشه، زخم، کاتتر، ترشحات چشم، مایع پلور، مایع اطراف قلب و مایع مغزی-نخاعی از بیماران بستری شده در بخش‌های مختلف بیمارستان با کشت مثبت از نظر کلبسیلا پنومونیه، به صورت هفتگی جمع‌آوری و در کمترین زمان، نمونه‌ها را در شرایط استریل با زنجیره سرد به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه ایلام منتقل تا مورد آزمایشات تشخیصی قرار گیرند(۴).

جداسازی و تشخیص ایزوله‌ها

ایزوله‌ها جهت تشخیص، بر روی محیط‌های بلادآگار و مک کانکی آگار به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه گذاری شدند. سپس کلنی‌های رشد یافته، با انجام تست های بیوشیمیایی و افتراقی شامل کشت در محیط TSI، SIM ، سیمون‌سیترات، MRVP، کاتالاز و اکسیداز تعیین هویت شدند (تمامی محیط ها از شرکت Merck آلمان تهیه شدند). پرگنه‌هایی که دارای واکنش VP، سیترات، کاتالاز، اوره آز ، لاکتوز، گلوکز مثبت بودند و واکنش MR، اندول، حرکت، اکسیداز، و تولید سولفید هیدروژن منفی بودند انتخاب و جهت انجام مطالعات تکمیلی در داخل محیط تریپتیکس سوی براث (TSB) حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در ۲۰ – درجه نگهداری شدند(۸).

بررسی الگوی مقاومت دارویی

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی تمامی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه طبق دستورالعمل (CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute) با استفاده از روش انتشار دیسک (روش کربی- باوئر) و با آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم (۳۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفتریاکسون (۳۰µg)، تتراسایکلین (۳۰µg)، کلرآمفنیکل (۳۰µg)، سفالوتین (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، کوتریموکسازول (۲۵µg) و ایمی‌پنم (۱۰µg) تعیین گردید. تمامی دیسک ها از شرکت CONDA اسپانیا خریداری گردید. به طور خلاصه از کلنی‌های موجود در گلیسرول استوک برداشته شد و بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند، سپس از یک کلنی برداشت و بر روی محیط لوریا برتانی کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه ، با استفاده از سرم فیزیولوژی، از سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند تهیه گردید. یک سواپ استریل نمونه باکتریایی بروی محیط مولر هینتون آگار (شرکت مرک آلمان) به روش چمنی کشت داده شد، سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به فاصله ۱۵ میلی‌متر از لبه پلیت و ۲۴ میلی‌متر از یکدیکر در سطح پلیت قرار داده شد و به انکوباتور ۳۵ درجه انتقال و نتایج پس از ۱۸-۱۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج طبق دستورالعمل (CLSI) بصورت حساس، مقاوم و نیمه حساس گزارش شدند (۱۲). در ادامه ایزوله‌ها از نظر حضور ESBLs با روش Combined Disk مورد بررسی قرار گرفتند. از سویه های *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 به عنوان کنترل مثبت و *E.coli* ATCC25922 به عنوان کنترل منفی استفاده شد(۱۲و۱۰).

تایید فنوتیپی سویه های مولدESBL

جهت تایید باکتری‌های مولد ESBL با توجه به دستورالعمل (CLSI) از روش دیسک ترکیبی استفاده شد. پس از انجام آنتی‌بیوگرام، تمام ایزوله‌هایی که حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام نیمه حساس یا مقاوم بودند، جهت تایید ایزوله‌های مولد ESBLs با استفاده از دیسک‌های ترکیبی سفوتاکسیم + کلاوولانیک اسید و سفتازیدیم + کلاوولانیک اسید مورد آزمایش قرار گرفتند، به این صورت که بر روی محیط مولر هینتون آگار دیسک سفتازیدیم را با فاصله ۲۰ میلی‌متر از دیسک سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید، دیسک سفوتاکسیم به فاصله ۲۰ میلی‌متر از دیسک سفوتاکسیم/کلاوولانیک اسید (ساخت شرکت CONDA اسپانیا) قرار داده شدند. پس از انکوباسیون در ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶-۱۸ ساعت، سویه‌هایی که در آنها قطر هاله ممانعت از رشد دیسک سفالوسپورین همراه کلاوولانیک

اسید نسبت به دیسک سفالوسپورین فاقد کلاوولانیک اسید بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر بود به عنوان باکتری‌های مولد ESBL در نظر گرفته شدند (۱۴و۱۳).

تائید فنوتیپی سویه های مولد بتالاکتاماز AMPC

برای تائید فنوتیپی سویه های مولد AMPC از روش حساسیت به سفوکسیتین و عدم حساسیت به کلاولانیک اسید استفاده شد و سویه های با قطر هاله ممانعت از رشد کمتر از ۱۸ میلی متر بعنوان سویه های احتمالی مولد *blaAmpC* انتخاب شدند (۱۵).

آماده سازی نمونه‌ها جهت بررسی مولکولی

استخراج DNA

استخراج DNA تمامی سویه ها با استفاده از کیت یکتا تجهیز آزما (Lot:BDC20114113 Cat:YT9001), بر اساس دستور العمل شرکت سازنده کیت انجام شد، و DNA استخراج شده از باکتری ها به عنوان DNA الگو در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

پرایمرها: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه از شرکت سیناژن خریداری شدند و دارای مشخصات موجود در جدول ۱ می‌باشند (۱۶).

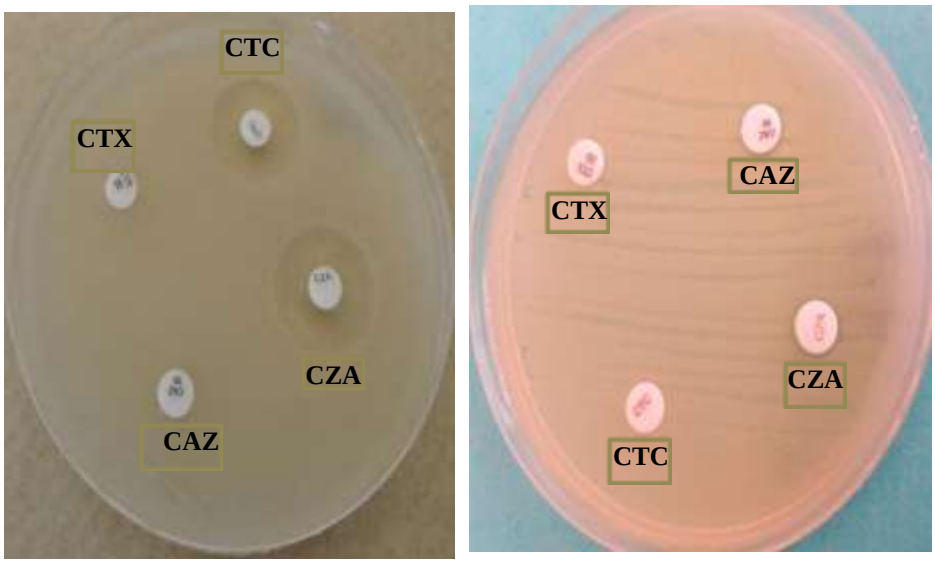
واکنش PCR

شرایط PCR برای بررسی وجود ژن های *blaCTX-M-15* و *blaFOXM* بصورت زیر بود : مخلوط نهایی واکنش با حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۰/۱ میلی مول از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتربافر PCR 1X ، میزان ۱/۵ میلی مول MgCl2 ، ۰/۲ میلی مول dNTPs ، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase(Cinna Gene) ،بود که حجم نهایی با آب دیونیزه استریل به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد.برنامه دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf master cycler 5530, Germany) نیز به این صورت تنظیم شد که:برای ژن blaCTX-M-15 واسرشتگی اولیه (Initial denaturation step) در ۹۵ درجه سانتی گراد بمدت ۵ دقیقه، سپس۳۵ چرخه شامل واسرشتگی DNA (denaturationدر ۹۵ درجه برای ۲ دقیقه، اتصال (Primer annealing)در۵۴ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه، تکثیر (Primer extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه و تکثیر نهایی (Final extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۱۰ دقیقه(۱۶). در مورد ژن FOXM شرایط دقیقا مشابه بود بجز دمای اتصال که دمای ۵۸ درجه سانتی گراد بمدت ۱ دقیقه تعیین گردید(۱۶).

الکتروفورز

الکتروفورز محصولات PCR در ژل ۱/۵ درصد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با ولتاژ (90V) به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز، به منظور بررسی و عکس‌برداری ژل را در دستگاه U.V illuminator (EEC, England) قرار داده و از ژل عکس گرفته شد.برای تعیین اندازه محصولات از یک نشانگر مولکولی (DNA ladder) ۱۰۰ جفت بازی (Gene Ruler^{TM} Fermentaz) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده ها و نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶ برنامه ویندوز) و نرم افزار Excel 2007 (Microsoft office) و آزمون آماری X^2 و ارزش P کمتر از ۰/۰۵ ($p\leq0.05$) از نظر آماری با اهمیت و معنادار در نظر گرفته شد.



شکل ۱: تشخیص فنوتیپی سویه های مولد ESBLs و FOXM .

سمت راست: نمونه دارای آنزیم FOXM شکل سمت چپ: نمونه دارای آنزیم ESBLs .CTX : سفوتاکسیم، CAZ: سفتازیدیم، CZA: کلاوولانیک اسید+سفتازیدیم، CTC: کلاوولانیک اسید+ سفوتاکسیم.

یافته‌ها

از ۸۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی مختلف، تعداد ۴۴ نمونه (۵۵ درصد) از مردان و ۳۶ نمونه (۴۵ درصد) از زنان جمع آوری شد. بطور کلی بیشترین تعداد نمونه‌ها از ادرار، و کمترین تعداد نمونه‌ها از مایع پلور و پریکارد بدست آمد (جدول ۲).

نتایج آنتی بیوگرام ایزوله ها بروش انتشار دیسک:

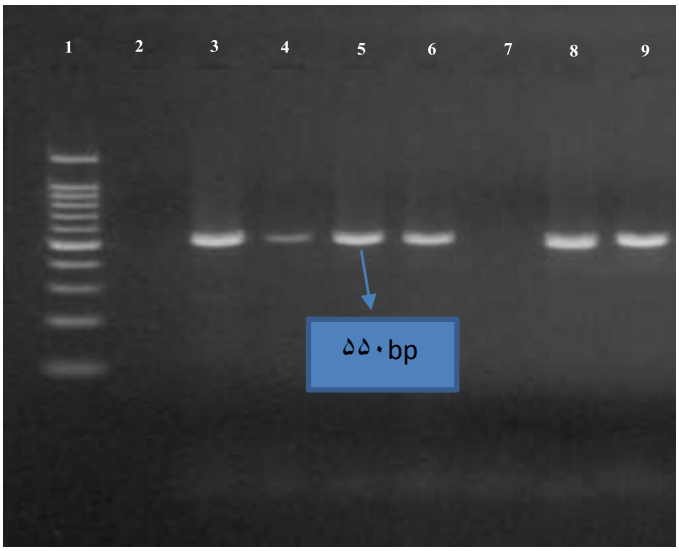
بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها نشان داد که کمترین و بیشترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک های ایمی پنم (۷/۵ درصد) و کوتریموکسازول (۵۵ درصد) بود. میزان مقاومت ایزوله ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها ی مورد مطالعه در (جدول۳) آورده شده است($pv\leq0.05$).

نتایج آزمون دیسک ترکیبی (Combined disk)

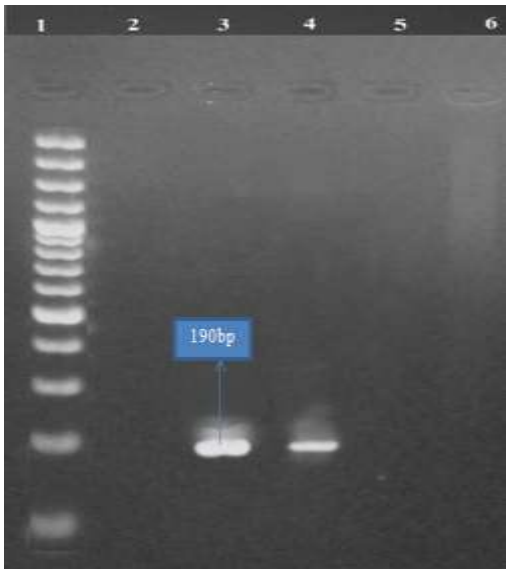
از مجموع ۸۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه کلا ۴۵ ایزوله به روش فنوتیپی بعنوان مولد ESBL شناخته شدندو ۳۵ ایزوله (۴۳/۷۵٪) نیز فاقد این دو ژن بودند. در آزمون دیسک ترکیبی تعداد ۳۱ ایزوله (۳۸/۷۵٪) به عنوان مولد ESBLs تایید شدند ($pv\leq0.001$). بررسی ایزوله‌های تولید کننده ESBL برحسب نمونه های بالینی نشان داد که: بیشترین تعداد ایزوله کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری شده مولدESBLs مربوط به تراشه با ۱۰ ایزوله (۱۲/۵٪) سپس ادرار با ۷ ایزوله (۸/۷۵٪) ، کاتتر ۵ ایزوله (۶/۲۵٪) ، زخم ۴ ایزوله (۵٪) ، مایع پلور ۳ ایزوله (۳/۷۵٪) ، مایع مغزی-نخاعی ۱ ایزوله (۱/۲۵٪) و مایع اطراف قلب ۱ ایزوله (۱/۲۵٪) ایزوله بود. در حالی که هیچ‌گونه ایزوله‌ی مولد ESBLs در نمونه‌های ترشحات چشم یافت نشد که نحوه توزیع آنزیم های مولد ESBL از نظر آماری اختلاف معنا داری را نشان میداد ($pv\leq0.65$). در جدول ۴ تعداد و درصد جدایه های مولد ژن های ESBL و *FOX-M-15* بر حسب بخش های مختلف بیمارستان آمده است. در بررسی فنوتیپی سویه های مولد *AMPC* تعداد ۱۰ ایزوله (۱۲/۵٪) بعنوان واجد این ژن شناخته شدند.

نتایج بررسی مولکولی ایزوله‌ها

در مجموع تعداد ۴۵ ایزوله ای که با روش دیسک ترکیبی به عنوان مولد ژن‌های بتالاکتامازی و *AMPC* شناخته شدندتعداد ۳۱ ایزوله (۷۵/ ۳۸٪) مولد ESBL و تعداد ۱۴ ایزوله (۱۷/۵) به عنوان مولد *AmpC* شناسایی شدند که این ایزوله ها جهت بررسی مولکولی انتخاب شدند. در آزمایش PCR، تعداد ۱۷ ایزوله (۳۲/۷٪) و تعداد ۹ ایزوله (۱۷/۳٪) به ترتیب حاوی ژن‌های *CTX-M-15* و *blaFOXM* بودند (شکل‌های ۲ و ۳).



شکل ۲: الگوی الکتروفورز محصولات PCR برای ژن *blaCTX-M-15* با وزن مولکولی ۵۵۰ جفت بازی: ردیف ۱ مارکر ۱۰۰bp، ردیف ۲ کنترل منفی *E.Coli* ATCC25922، ردیف ۳ کنترل مثبت *Klebsiella pneumoniae* ATCC70060، ردیف ، ۴، ۵، ۶، ۸ و ۹ دارای ژن *blaCTX-M-15*، ردیف ۷ فاقد ژن *blaCTX-M-15*



شکل۳ : الگوی الکتروفورز محصولات PCR برای ژن *FOXM* ۱۹۰bp: ۱= DNA مارکر با اندازه ۱۰۰ جفت باز، ۲= نمونه کنترل منفی، ۳= نمونه کنترل مثبت، ۴= نمونه واجد *FOXM* و نمونه های ۵و۶ مربوط به سویه های فاقد ژن *FOXM*.

جدول۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و اندازه محصول

Primer	Seq (5′-3′)	Product size
$bla_{CTX-M-15-F}$	CGCTTTGCGATGTGCAG	
$bla_{CTX-M-15-R}$	ACCGCGATATCGTTGGT	550bp
FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	
FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190bp

جدول ۲: درصد فراوانی ایزوله‌های جمع‌آوری شده از بیمارستان های اصفهان

نمونه بیمار	جنسیت		مجموع
	مرد	زن	
	تعداد (٪)	تعداد (٪)	تعداد (٪)
ادرار	۱۱ (۱۳/۷۵)	۱۶ (۲۰)	۲۷ (۳۳/۷۵)
تراشه	۱۴ (۱۷/۵)	۹ (۱۱/۲۵)	۲۳ (۲۸/۷۵)
زخم	۶ (۷/۵)	۴ (۵)	۱۰ (۱۲/۵)
کاتتر	۷ (۸/۷۵)	۲ (۲/۵)	۹ (۱۱/۲۵)
مایع مغزی-نخاعی	۳ (۳/۷۵)	۲ (۲/۵)	۵ (۶/۲۵)
ترشحات چشم	۱ (۱/۲۵)	۱ (۱/۲۵)	۲ (۲/۵)
مایع پلور	۰ (۰)	۲ (۲/۵)	۲ (۲/۵)
مایع اطراف قلب	۲ (۲/۵)	۰ (۰)	۲ (۲/۵)
مجموع	۴۴ (۵۵)	۳۶ (۴۵)	۸۰ (۱۰۰)

جدول ۳: توزیع فراوانی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه

دیسک آنتی بیوتیک	مقاوم	نیمه حساس	حساس
	تعداد(٪)	تعداد(٪)	تعداد(٪)
جنتامایسین (10 µg)	۲۱ (۲۶/۲۵)	۳ (۳/۷۵)	۵۶ (۷۰)
سیپروفلوکساسین (5 µg)	۳۰ (۳۷/۵)	۳ (۳/۷۵)	۴۷ (۵۸/۷۵)
تتراسایکلین(30 µg)	۲۴ (۳۰)	۶ (۷/۵)	۵۰ (۶۲/۵)
کلرامفنیکل(30 µg)	۲۲ (۲۷/۵)	۷ (۸/۷۵)	۵۱ (۶۳/۷۵)
ایمی پنم(10 µg)	۶ (۷/۵)	۱ (۱/۲۵)	۷۳ (۹۱/۲۵)
کوتریموکسازول(25 µg)	۴۴ (۵۵)	۰ (۰)	۳۶ (۴۵)
سفتریاکسون(30 µg)	۳۱ (۳۸/۷۵)	۱ (۱/۲۵)	۴۸ (۶۰)
سفتازیدیم(30 µg)	۲۹ (۳۶/۲۵)	۶ (۷/۵)	۴۵ (۵۶/۲۵)
سفوتاکسیم(30 µg)	۳۰ (۳۷/۵)	۴ (۵)	۴۶ (۵۷/۵)
سفالوتین(30 µg)	۲۷ (۳۳/۷۵)	۱۰ (۱۲/۵)	۴۳ (۵۳/۷۵)

جدول ۴: فراوانی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBLs بر حسب بخش‌های بیمارستانی

ESBLs	داخلی	جراحی	اورژانس	ICU	سرپایی	مجموع
	تعداد(٪)	تعداد(٪)	تعداد(٪)	تعداد(٪)	تعداد(٪)	تعداد(٪)
مثبت	(۷/۵)۶	(۷/۵)۶	(۵)۴	(۲۱/۲۵)۱۷	(۲/۵)۲	(۴۷/۵)۳۸
منفی	(۱۵)۱۲	(۷/۵)۶	(۱۳/۵۷)۱۱	(۶/۲۵)۵	(۱۳/۷۵)۱۱	(۵۲/۵)۴۲
مجموع	(۲۲/۵)۱۸	(۱۵)۱۲	(۱۸/۷۵)۱۵	(۲۷/۵)۲۲	(۱۶/۲۵)۱۳	(۱۰۰)۸۰

بحث

روش‌های مختلفی توسط باکتری‌ها به کار گرفته می‌شود تا از اثرات زیان‌بار آنتی‌بیوتیک‌ها مصون بمانند. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌هایی که در باکتریهای گرم منفی علیه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بکار گرفته می‌شود تولید آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامازی است. به طوری که این آنزیم‌ها با هیدرولیز حلقه بتالاکتام، منجر به غیر فعال شدن این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند (۱۷).

در طول دو دهه گذشته آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام جدیدی تولید شده‌اند که به طور اختصاصی به عملکرد هیدرولیز کنندگی آنزیم‌های بتالاکتاماز مقاومت دارند. با وجود این گروه جدید از آنتی‌بیوتیک‌ها که برای درمان بیماران مورد استفاده قرار می‌گیرند، انواع جدیدی از آنزیم‌های بتالاکتامازی مانند ESBL ها و *AmpC* ظاهر شدند. به طوری که باکتری‌های گرم منفی به این وسیله می‌توانند مقاومت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها را کسب نمایند (۶).

هدف از این مطالعه بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری شده در بخش های مختلف بیمارستان های الزهرا و دکتر غرضی تهران و نیز بررسی میزان فراوانی ژن های *blaCTX-M15* و *blaFOXM* بود. دراین مطالعه تعداد ۳۱ ایزوله (۳۸/۷۵٪) با استفاده از دیسک ترکیبی تولید کننده ESBLs بودند. در حالی که مطالعه‌ی بینش و همکاران که در تبریز در سال ۱۳۸۷

صورت گرفت نشان داد که ۶۲/۹ درصد از نمونه‌های کلبسیلاپنومونیه دارای ESBLs بودند (۱۸). مطالعات دیگری در طی سال‌های گذشته در سراسر دنیا از جمله ایران در این زمینه انجام گرفته است که درصد و شیوع سویه‌های تولید کننده ESBLs در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه را این چنین گزارش کرده‌اند: بهروزی و همکاران سال ۲۰۱۰ در تهران ۱۲٪ (۱۹)، غفوریان و همکاران سال ۲۰۱۰ در ایلام ۵۹/۲٪ (۲۰)، علیزاده و همکاران سال ۱۳۹۲ در خرم‌آباد ۶۴/۱۸٪ (۲۱)، Udomsantisuk و همکاران سال ۲۰۱۱ در تایلند ۳۴/۵٪ (۲۲)، Shibl و همکاران سال ۲۰۱۳ در عربستان ۶۵٪ (۲۳)، Lal و همکاران سال ۲۰۰۷ در هندوستان ۸۶٪ (۲۴). به نظر می‌رسد آمارهای متفاوت ارائه شده در میزان شیوع سویه‌های تولید کننده ESBLs در مناطق مختلف، به میزان مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص سفتازیدیم و سفوتاکسیم، بستری شدن به مدت طولانی در بخش‌های مختلف، مانند داخلی، ICU و استفاده از ابزارهای پزشکی آلوده مانند کاتترهای وریدی و ادراری، عدم کنترل عفونت‌های بیمارستانی و... از عوامل مسبب بروز سوش‌های ESBLs مثبت هستند بستگی دارد (۲۴و۲۳و۲۲).

در ایران به دلیل گزارشات کمتر از عوارض جانبی سفالوسپورین‌های نسل سوم، این آنتی‌بیوتیک‌ها بیش از حد برای درمان بیماران تجویز می‌شوند در نتیجه مقاومت آنتی‌بیوتیکی به سفالوسپورین‌های نسل سوم در ایران در بسیاری از شهرها افزایش یافته است(۲۵). ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه در این مطالعه ۳۲/۱٪ به سفتازیدیم، ۳۷/۴٪ به سفوتاکسیم مقاوم بودند، در حالی که میزان مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در مطالعه امرایی و همکاران به ترتیب ۶۱٪، ۶۴٪ را نشان می‌دهد در نتیجه مطالعه ما نسبت به مطالعه امرایی و همکاران مقاومت کمتری را نشان می‌دهد(۲۵).

مقاومت به ایمی‌پنم که یک آنتی‌بیوتیک بیمارستانی درایران محسوب می‌شود و بدون تجویز پزشک مصرف نمی‌شود، در مطالعه حاضر ۷/۵ درصد بود در حالی که در مطالعه ژاپونی‌نژاد و همکاران در سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۰ ایزوله‌های مورد مطالعه ۸ درصد به ایمی پنم مقاوم بودند (۲۶). همچنین درمطالعه رستگار و همکاران در سال ۲۰۱۳ در شهر تهران ۵۴/۲۸٪ ایزوله‌ها مقاوم به ایمی‌پنم بودند (۲۷). در مطالعه حاضر در شهر اصفهان مقاومت مشابهی را نسبت به ایمی‌پنم در مقایسه با مطالعه ژاپونی‌نژاد و همکاران (۲۶) و بسیار کمتر از رستگار و همکاران (۲۷) را نشان می‌دهد.میزان مقاومت به ایمی‌پنم در این مطالعه می‌تواند به این دلیل باشد که چون کلبسیلا پنومونیه مقاومت بالایی به سفالوسپورین‌های نسل سوم را نشان می‌دهد در نتیجه پزشکان برای درمان بیماران به ناچار ایمی‌پنم را در خط درمان قرار داده‌اند. و با توجه به نتایج مطالعه رستگار و همکاران تجویز بیش از حد آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم برای درمان بیماران باعث افزایش مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک شده است.

در مطالعه‌ای که توسط علیزاده و همکاران در سال۱۳۹۲ بر روی فراوانی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف از نمونه‌های بالینی در خرم‌آباد انجام گرفت، میزان شیوع ژن‌های-*blaCTX-M-15*، ۷۸/۶۸ درصد، گزارش شد (۲۱). در صورتی که در این مطالعه میزان شیوع ژن *blaCTX-M-15* کاهش را نشان می‌دهد. در مطالعه‌ی دیگری توسط درخشان و همکاران در سال ۱۳۹۲ در تهران، از ۱۲۰ ایزوله مقاوم به سفوتاکسیم ۱۱۴ ایزوله دارای ژن‌های گروه -*blaCTX-M-15* بودند. تمام ژن‌های *blaCTX-M-15* به عنوان *blaCTX-M-15* شناسایی شدند (۲۸). که نسبت به مطالعه ما افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد و یک افزایش قابل توجه در یکی از زیر کلاس‌های خانواده ژنی *CTX-M* دارد و این امر می‌تواند بخاطر توانایی بالای این بتالاکتامازها در انتشار در بین میکروارگانیسم‌ها و مزیت‌های اکولوژیکی آن جهت حضور در جوامع اکولوژیک متفاوت باشد.

در مطالعه‌ی امرایی و همکاران در تهران که با هدف

تشخیص فنوتیپی بتالاکتاماز با طیف وسیع و شناسایی ژن‌های پلاسمیدی *ACT*, *MOX* و *FOX* در میان ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر تهران در سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۱ انجام گرفت از ۱۲۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه ۴۶ ایزوله (۳۸/۳۳ درصد) دارای ژن *FOX* بودند (۲۵). که نتایج حاصل از آن، با نتایج مطالعه اخیر مطابقت ندارد و مطالعه حاضر کاهش مقاومت قابل توجه را را نشان می‌دهد.

در مطالعه ژاپونی نژاد و همکاران در سال ۱۳۹۲ در اراک فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی *AmpC* به میزان ۱۹ درصد بود. ولی ژن *FOX* در هیچ کدام از ایزوله‌ها یافت نشد (۲۶). نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعه‌ی حاضر مطابقت ندارد، به نظر می‌رسد که این عدم تطابق به این دلیل باشد که اصفهان به عنوان یکی از کلان شهرهای ایران که دارای بیمارستان های بزرگتر و مجهزتری نسبت به دیگر شهرها باشد همواره پذیرای بیمارانی از دیگر استان های مجاور بوده و این مسئله می تواند باعث گسترش بیشتر مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های باکتریایی شود، چون عوامل اکولوژیک یکی از عوامل دخیل در گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی میتواند باشد.

نتیجه‌گیری

شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تولید ESBLs و *AmpC (FOX)* در شهر اصفهان، نشان دهنده نیازمند غربال‌گری نمونه‌های کلینیکی از نظر ESBLs و *AmpC (FOX)* توسط آزمایشگاه و انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب با قدرت ممانعت کنندگی بتالاکتامازی، و استفاده از داروهای ترکیبی مانند یک داروی بتالاکتام با یک آمینوگلیکوزید یا کینولون یا داروی مقاوم به بتالاکتاماز، جهت درمان می باشد. آگاهی پزشکان در ارتباط با میزان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در درمان موفقیت آمیز عفونت ها بسیار اهمیت دارد. آلودگی‌زدایی محیط و استریلیزاسیون صحیح محیط و وسایل بیمارستانی، رعایت بهداشت توسط پرسنل بیمارستان، نیز در جلوگیری از انتشار عفونت موثر است. در نهایت عدم خوددرمانی و یا درمان ناقص با آنتی‌بیوتیک‌ها، محدود نمودن استفاده از سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف از جمله راهکارهایی هستند که می‌توانند برای کنترل و پیشگیری از عفونت‌های ناشی از ارگانیسم‌های تولید کننده ESBLs و *AmpC (FOX)* به کار گرفته شوند.

منابع

1-Mulvey RM, and Simor EA. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? *Canadian Medical Association Journal* 2009; 180(4): 408-415.

2-Mendonc N, Manageiro V, Robin F. The Lys234Arg substitution in the enzyme SHV-72 is a determinant for resistance to clavulanic acid inhibition. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52(1): 1806-1811.

3-Garner J S.The Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1996; 17(1): 53-80.

4-Muto CA, Jernigan J A, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce J M. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multi-drug resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*.*Infection Control and Hospital Epidemiology* 2003;24(5): 362-86.

5-Silva J, Agullar C, Ayala G. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β-lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; 44(1): 997-1003.

6-Bradford A P. Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14(4): 933-51.

7-Jacoby A G, and Medeiros A A. More extended spectrum β-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1991; 35(9): 1697-1704.

8-Lin C F, Hsu S K, Chen C H, Huang J R, Lo H H .Genotypic detection and molecular epidemiology of extended-spectrum b-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a regional hospital in central Taiwan. *Journal of Medical Microbiology*, 2010; 59(6): 665-71.

9-Singhal S, Mathur T, Khan S. Evaluation of methods for AmpC β-lactamases in gram negative clinical isolates from tertiary care hospital. *Indian Journal of Medical Microbiology*.2005; 23(2): 120-124.

10-Hanson N D, and Sanders C C. Regulation of inducible AmpC β–lactamases expression among Entrobacteriaceae. *Current Pharmaceutical Design*, 2005; 5(1): 881-884.
11-Philippon A, Arlet G, Jacoby G A. Plasmid determined AmpC-type beta-lactamases . *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2002; 46(1): 1-11.
12-CLSI. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth in formaonal supplemented CLSI document M100-S20. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2013.
13-Jafari M, Fallah F, Borhan R S, Navidinia M, Karimi A, Hashemi A. The First Report of CMY, aac (6′)-Ib and 16S rRNA Methylase Genes Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Iran. *Archives of Pediatric Infectious Diseases* 2013; 1(3): 109-112.
14-Coudron P E, Moland E S, Thomson K S. Occurrence and detection of AmpC betalactamases among *Escherichia coli, Klebsiella pneumonia* and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38(5): 1791-6.
15-Soha A.H and Lamiaa A A. Occurrence and detection of AmpC b-lactamases among Enterobacteriaceae isolates from patients at Ain Shams University Hospital. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2015; 16(1): 239–244.
16-Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(6): 2153-62.
17-Li Q, Lee J Y, Castillo R, Hixon M S, Pujol C, Doppalapudi V R, Shepard H M, Wahl G M, Lobl T J, Chan M F. A novel antibacterial agent with broad-spectrum activity and enhanced potency against beta-lactamase producing strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002; 46(1): 1262-8.
18-Mirsalehian A, Akbari-nakhjavani F, Peymani A, Kazemi B, Jebal-Ameli F, Mirafshar S M. Prevalence of extended spectrum b-lactamase producing Entrobacteriaceae by phenotypic and genotypic methods in intensive care units in Tehran. *Iran Daru* 2008; 16(1):169-73.
19-Behroozi A, Rahbar M, Vand Yousefi J. Frequency of extended spectrum beta-lactamase (ESBLs) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella Pneumoniae* isolated from urine in an Iranian 1000-bed tertiary care hospital. *African Journal of Microbiology Research* 2010; 4(9): 881-884.
20-Ghafourian S, Bin S Z, Sadeghifard N. The prevalence of ESBLs producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in some major hospitals, Iran. *The Open Microbiology Journal* 2011; 5(2): 91-5.
21-Alizadeh H, Moemeni R, Doulatshah L. Frequency of *Klebsiella Pneumoniae* isolates producing ESBL enzymes from clinical specimens. *Journal of laboratory Science* 2014; 1(1):64-71.
22-Udomsantisuk N, Nunthapisud P. Molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase among clinical isolates *E.coli* and *Klebsiella Pneumoniae*. *Journal of the Medical Association of Thailand* 2011; 94(12): 1504-12.
23-Shibl A, Al-Agamy M, Memish Z, Senok A, Khader S A, Assiri A. The emergence of OXA-48- and NDM-1 positive *Klebsiella Pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. *International Journal of Infectious Diseases* 2013; 17(12): 1130-3.
24-Lal P, Kapi A, Das B K, Sood S. Occurrence of TEM and SHV gene in extended-spectrum beta lactamases (ESBLS), producing *Klebsiella* Sp. Isolated from a tertiary care hospital. *Indian Journal of Medical Research* 2007; 125(2): 173-8.
25-Amraei Sh, Eslami G, Taherpour A, Godarzi H, Hashemi A. Molecular diagnosis of FOX, MOX and ACT genes in beta lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* species. *Mazandaran medical science Journal* 2014; 11(8): 11-20.
26-Japoni Negad A, Mousavifard N, Safari M, Kazemeian H, Tabibneghad M, Amoozandeh N A, Abtahi H, Ghaznavirad A. Frequency of betalactamases enzymes genes encoding mediated by plasmid in clinical isolates in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Medical Science in Isfahan*. 2013; 249:1285-1295.
27-Rastegar L A, Azimi L, Rahbar M, Fallah F, Alaghehbandan R. Phenotypic detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase among burns patients: first report from Iran. *Burns* 2013; 39(1): 174-6.
28-Darakhshan S. Genotyping of PRGE, MLVA and evaluation of genetical diversity in bla CTM-M1 in *Klebsiella pneumoniae*. 179-183 (Persian).

Evaluation of *Bla-CTX-M-15* and *Bla-AMPC(FOX)* Beta Lactamase Genes in *Klebsiella Pneumoniae* Isolates Isolated from Patients in Isfahan City Hospitals

Arman Rostam Zad[1*], Ali Yar Padervand[2]

1-Assistant of Biology.
2-MSC Student Biology.

1,2-Department of Biology, Faculty of Sciences, Ilam University, Ilam, Iran.

**Corresponding author:*
Arman Rostamzad, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ilam University, Ilam, Iran..
Tel: +989188412905
Email: arostamzad381@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Resistance to beta lactam antibiotics resulted from betalactamases enzyme production The aims of this study were to determine the antibiotic resistance pattern in *Klebsiella pneumonia* isolates and frequency of *blaCTX-M-15* and *blaAMPC* in clinical specimen isolated from hospitals in Isfahan City.

Subjects and Methods: In this cross-sectional study we evaluated 80 *Klebsiella pneumonia* isolates from September 2014 to September 2015, isolated from patients at Alzahra and Gharazi hospitals in Isfahan city, Iran. Samples were identified using routine microbiological and biochemical tests. The antibiotic resistance pattern of isolates to 10 different antibiotics has done by disk diffusion method and ESBL producing strains were characterized by phenotypic method, combination disk and frequency of *blaCTX-M-15* and *blaFOX* genes were characterized by polymerase chain reaction (PCR) for detection.

Results: The antibiogram result showed that, the highest rate of resistant (55%) was related to Co-trimoxazole and the lowest rate of resistant was related to Imipenem (7.5%), among 80 specimens, 31 isolates (38.75%) were detected as ESBL producing by phonotypic and double disk tests, and results of PCR showed that, 17 isolates (32.7%) were consist of *blaCTX-M-15* gene and 9 isolates (17.3%) were consist of *blaFOXM* gene.

Conclusion: Our data showed the high rate of ESBL enzymes among *Klebsiella* isolates. Therefore, for infection control and preventing of distribution of resistant among clinical isolates, correct management of treatment is necessary.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Extended Spectrum Beta Lactamases**.**

►*Please cite this paper as:*
Rostamzad A, Yar Padervand A. Evaluation of BlaCTX-M-15 and BlaAMPC(FOX) Beta Lactamase Genes in Klebsiella Pneumoniae Isolates Isolated from Patients in Isfahan City Hospitals. Jundishapur Sci Med J 2017;15(6):733-744.

Received: Augr 1, 2016 **Revised: Jan 1, 2017** **Accepted: Feb 4, 2017**