



بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از موارد کلینیکی در شهرستان اصفهان

حسین خدابنده شهرکی^{۱*}، سارا باقری کاکش^۲

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفیت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

چکیده	اطلاعات مقاله
مقاومت دارویی کلبسیلا روز به روز افزوده می شود و بنابراین انجام تست های مقاومت دارویی، قبل از تجویز آنتی بیوتیک، ضروری به نظر می رسد. هدف از این مطالعه تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از موارد کلینیکی شهرستان اصفهان می باشد. مطالعه حاضر روی ۹۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه های کلینیکی از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه های تشخیص طبی شهرستان اصفهان انجام شد. با استفاده از روش های بیوشیمیایی و تکنیک مولکولی بر اساس ردیابی ژن <i>16srRNA</i> همه ی سویه ها تایید و مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و روش مولکولی بر اساس ژن های <i>sul1</i> و <i>tet B, aac (3)IIa, tet A, qnr</i> بررسی شدند. از ۹۰ سویه ی مورد بررسی الگوی مقاومت ضد میکروبی بیشترین مقاومت میکروبی به پنی سیلین (۹۳/۷۵ درصد) و بیشترین حساسیت نسبت به وانکومايسين (۱۰۰ درصد) برآورد گردید. ژن <i>aac (3)IIa</i> (کد کننده مقاومت به جنتامایسین) با فراوانی ۸۳/۳۳٪ و ژن <i>qnr</i> (کد کننده مقاومت به سیپروفلوکساسین) با فراوانی ۱۶/۱۶ درصد بیشترین و کمترین ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی ردیابی شده در سویه های کلبسیلا پنومونیه بودند. کلبسیلا پنومونیه دارای مقاومت چندگانه یک خطر جدی برای بیماران مراجعه کننده به بیمارستان است، بنابراین نظارت بر مصرف آنتی بیوتیک ها و تعیین سویه های مقاوم به داروها می تواند از توسعه مقاومت در باکتری ها جلوگیری کند.	تاریخچه مقاله: دریافت: پذیرش: چاپ: DOI: کلمات کلیدی: مقاومت آنتی-بیوتیکی، کلبسیلا پنومونیه، ژن های مقاومت * نویسنده مسئول: Email: h.khodabandehshahraki@iau.ir

مقدمه

کلبسیلاها پاتوژنهای فرصت طلبی از خانواده انتروباکتریاسه هستند که موجب سپتی سمی، باکتری می، انتريت نوزادان، مننژیت و عفونت های دستگاه ادراری و بافت های نرم می شوند (۱). کلبسیلا پنومونیه یکی از عوامل شایع عفونت های بیمارستانی می باشد و هم چنین این باکتری ها از علل مهم عفونت های اکتسابی در جامعه و بیمارستان محسوب می شوند (۲،۳). مقاومت ضد میکروبی همواره به عنوان یک مشکل جدی برای سلامت انسان مطرح بوده است (۴). از این رو سازمان بهداشت جهانی سال ۲۰۱۱ را به عنوان سال مقاومت آنتی بیوتیکی نامید. هم چنین این سازمان در نظر گرفتن موارد مهمی مانند ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی، استفاده صحیح از آنتی بیوتیک ها، فروش آنتی بیوتیک ها فقط با نسخه پزشک و پیشگیری و کنترل عفونت را جهت کنترل و جلوگیری از مقاومت آنتی بیوتیکی به دولت ها توصیه نموده است (۵). استفاده مداوم از آنتی بیوتیک ها و فشار انتخابی ناشی از این عوامل باعث بروز مقاومت هایی نسبت به آنتی بیوتیک ها و باکتری های گرم منفی به ویژه کلبسیلا پنومونیه گردیده است (۶).

مقاومت علیه آنتی بیوتیک ها به وسیله مکانیسم های غیرژنتیکی (غیرفعال سازی آنزیماتیک دارو، تغییر سایت هدف ریبوزوم، کاهش نفوذ پذیری و پس زدگی دارو) و مکانیسم های ژنتیکی (کنزوگاسیون، ترانسفورماسیون و ترانس داکشن) ایجاد می شود (۷). ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک *tetA* و *tetB* (مقاومت به تتراسایکلین)، *qnr* (مقاومت به فلوروکینولون ها)، *Iia* *aac(3)* (مقاومت به جنتامایسین) و ژن *sul1* (مقاومت به سولفانامید ها) اخیراً در سوبه های کلبسیلا پنومونیه مشاهده شده که این ژن ها عملکردهای متفاوتی را انجام می دهند. مقاومت فلوروکینولون ها با واسطه پلاسמידی (*qnrA*) می باشد که سبب کد کردن پروتئینی می گردد که باعث محافظت DNA

ژیراز در برابر فلوروکینولون ها می شود. بعد از آن دو ژن دیگر مولد مقاومت موسوم به *qnrB* و *qnrS* مورد شناسایی قرار گرفت که ۴۰ درصد و ۵۹ درصد از اسیدهای آمینه مورد شناسایی آن ها با *qnrA* مشترک بود (۸،۹). در حقیقت در مطالعات اپیدمیولوژیکی در ارتباط با گسترش ژن *qnr* نشان داده است که سوبه های مثبت از نظر *qnr* غالباً ESBL را هم بیان می کنند. بنابراین تشخیص ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک ها در سوبه های کلبسیلا پنومونیه با ویروالانس بالا به منظور استفاده صحیح از آنتی بیوتیک ها برای درمان مؤثر ضروری است (۱۰-۱۲). هدف از این تحقیق ردیابی ژن های کد کننده مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف از جمله ژن های مقاومت به ژن های *tetA* و *tetB* (مقاومت به تتراسایکلین)، *qnr* (مقاومت به فلوروکینولون ها)، *aac(3)* *Iia* (مقاومت به جنتامایسین) و ژن *sul1* (مقاومت به سولفانامید ها) با تکنیک مولتی پلکس PCR در سوبه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از موارد کلینیکی شهرستان اصفهان می باشد.

مواد و روش ها

۱. نمونه گیری و جداسازی کلبسیلا پنومونیه

تعداد ۵۰۰۰ نمونه (ادرار، ترشحات چرکی چشم، ترشحات زخم، ترشحات ریه و نمونه کشت خون) از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه های تشخیص طبی اصفهان اخذ گردید. این مطالعه مقطعی انجام شده در سال ۱۳۹۸ صورت گرفت. نمونه ها روی محیط مک کانکی آگار و بلاد آگار (مرک، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی آمیزی گرم و تست های بیوشیمیایی افتراقی شامل چگونگی تخمیر قندها در محیط EMB، TSI، دکریوکسیلاسیون اسید آمینه ی لایزین در محیط لایزین آیرون آگار، تولید اندول، عدم حرکت در محیط SIM و واکنش در محیط MRVP broth، رشد در محیط سیمون سترات و اوره آگار

بررسی و در نهایت بررسی نتایج با استفاده از جداول استاندارد شناسایی گردیدند.

۲. آزمایشات مولکولی

به منظور تأیید قطعی وجود کلبسیلا پنومونیه در نمونه های کشت داده شده و ردیابی ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه ها، از واکنش زنجیره ای پلیمرز استفاده شد. در این راستا ابتدا DNA ژنومی باکتری های با استفاده از روش بویلینگ، استخراج و در دو مرحله آزمایش PCR روی DNA تخلیص شده انجام گرفت:

در مرحله اول حضور قطعی کلبسیلا پنومونیه در سویه ها با ردیابی ژن کد کننده 16srRNA باکتری با استفاده از

زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ انجام گرفت. در این مرحله واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر واجد ۳۰ میلی مول KCl، ۱۰ میلی مول Tris-HCl، ۲۵۰ میکرومول dNTP (سیناژن، ایران)، ۱،۵ میلی مول MgCl2، ۲ میکرولیتر از زوج پرایمرهای R و F، ۱ واحد آنزیم DNATaq پلیمرز (سیناژن، ایران) و ۵ میکرولیتر از DNA هر نمونه تنظیم و با برنامه حرارتی ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه یک سیکل، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مستر سایکلر گرادینت (اپندرف، آلمان) انجام گرفت.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن 16srRNA در سویه های کلبسیلا پنومونیه

ژن	توالی پرایمر (۵-۳)	bp اندازه محصول)
16srRNA	F ATT TGA AGA GGT TGC AAA CGA T R TTC ACT CTG AAG TTT TCT TGT TT C	۱۳۰

افزودن ۱ میکرولیتر از پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۱۴ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت Accupower PCR PreMix (BioNEER) انجام گرفت. برنامه دمایی برای انجام واکنش PCR برای ژن های مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است.

در مرحله دوم ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی شامل ژن های *tetA* و *tetB* (مقاومت به تتراسیکلین)، *qnr* (مقاومت به فلوروکینولون ها)، *aac (3)IIa* (مقاومت به جنتامایسین) و ژن *sul1* (مقاومت به سولفونامیدها) به روش PCR چندگانه ای با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۳ به شرح زیر انجام گرفت:

واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر برای ژن های *tetA* و *aac (3)IIa* شامل ۲ میکرولیتر از پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۳ میکرولیتر آب مقطر، برای ژن- های *tetB* و *qnr* در حجم ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۲ میکرولیتر از پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۱۳ میکرولیتر آب مقطر و ژن *sul1* در حجم ۲۰ میکرولیتر با

جدول ۲: برنامه دمایی برای انجام واکنش PCR برای ژنهای مختلف

نام ژن	برنامه واکنش زنجیره ای پلی مرارز
<i>tetA</i> و <i>aac(3)IIa</i>	1 cycle: 94°C ----- 5 min cycle: 30 94°C ----- 15 s 55°C ----- 60 s 72°C ----- 60 s 1 cycle: 72°C ----- 5 min
<i>tetB</i> , <i>qnr</i>	1 cycle: 95°C ----- 5 min. 30 cycle: 95°C ----- 30 s 55°C ----- 60 s 72°C ----- 60 s 1 cycle: 72°C ----- 5 min
<i>Sul1</i>	1 cycle: 94°C ----- 5 min. 34 cycle: 94°C ----- 60 s 65°C ----- 60 s 72°C ----- 90 s 1 cycle: 72°C ----- 8 min

جدول ۳: پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژنهای کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های کلبسیلا پنومونیه

منبع	دمای انلینگ	اندازه جفت باز	توالی	ژن مقاومتی	آنتی بیوتیک
۱۳	۵۵	۸۸۸	GTGAAACCCAACATACCCC GAAGGCAAGCAGGATGTAG	<i>tetA</i>	تتراسایکلین
۱۳	۵۵	۷۷۴	CCTTATCATGCCAGTCTTGC ACTGCCGTTTTTTCGCC	<i>tetB</i>	تتراسایکلین
۱۴	۵۵	۵۱۶	ATTTCTCACGCCAGGATTTG GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	<i>Qnr</i>	فلوروکینولون
۱۳	۵۵	۷۴۰	CGGAAGGCAATAACGGAG TCGAACAGGTAGCACTGAG	<i>aac(3)I Ia</i>	جنتامایسین
۱۵	۶۵	۴۳۳	CGGCGTGGGCTACCTGAACG GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	<i>Sul1</i>	سولفونامیدها

وجود رابطه آماری معنی دار بین دو فاکتور مورد مطالعه در نظر گرفته شد.

نتایج

در این تحقیق از ۹۰ نمونه مورد بررسی ۵۵ نمونه متعلق به جنسیت زن (۶۱ درصد) و ۳۵ نمونه متعلق به جنسیت مرد (۳۹ درصد) بود. در آزمایش آنتی بیوگرام جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های کلبسیلا پنومونیه از آنتی بیوتیک های معمول در درمان عفونت های انسانی استفاده شد که این نتایج بر حسب جنسیت در جدول ۴ و ۵ نشان داده شده است. در این آزمایش مقاومت نسبت به پنی سیلین ۹۳/۷۵ درصد گزارش شد. در حالی که میزان حساسیت آن ها به وانکومايسين ۱۰۰ درصد بود. در تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون کای دو بین جنسیت و آنتی بیوتیک های کانامایسن، تتراسایکلین، نالیدیسیک اسید، کوتریموکسازول، سفالوتین و نیتروفرانتین رابطه ی آماری معنی داری مشاهده نگردید ($P\text{-value} > 0/05$). هم چنین با استفاده از آزمون دقیق فیشر بین جنسیت و آنتی بیوتیک های آمیکایسین، ایمپی پنم، جنتامایسین و سفتریکسون رابطه ی آماری معنی دار مشاهده نگردید ($P\text{-value} > 0/05$). اما بین جنسیت و آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین طبق آزمون دقیق فیشر رابطه ی آماری معنی دار مشاهده گردید ($P\text{-value} < 0/05$).

بعد از انجام آزمایشات PCR، محصول PCR روی ژل ۲ درصد آگارز واجد اتیديوم بروماید در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز، آلمان) الکتروفورز و نتیجه با دستگاه تصویر بردار از ژل (انگلستان، Uviteck) مورد بررسی قرار گرفت.

۳. آزمایش آنتی بیوگرام

به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های کلبسیلا پنومونیه از روش کربی بائر طبق دستورالعمل CLSI و سویه استاندارد در این تحقیق از کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای این منظور باکتری های جدا شده به مدت ۲۴ ساعت در محیط جامد مولر هینتون آگار (های مدیا، هند) در حضور دیسک های آنتی بیوتیکی دیسک های آنتی بیوتیک در این آزمایش شامل: سفتریاکسون (30 CRO)، تتراسیکلین (30 TE)، ایمپی پنم (10 IPM)، سیپروفلوکساسین (5 CP)، نورفلوکساسین (10 NOR)، سفالوتین (CF)، نالیدیسیک اسید (30 NA)، نیتروفرانتین (300 FM)، کوتریموکسازول (SXT)، آمیکایسین (30 AN)، جنتامایسین (10 GM)، کانامایسین (30 K) و سفپیم (30 FEP)، آموکسی سیلین (10 AM) از شرکت پادتن طب- ایران مورد استفاده قرار گرفتند (شرکت پادتن طب، ایران) در دمای ۳۷ درجه کشت و با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد، مقاومت میکروبی نسبت به آنتی بیوتیک های مورد نظر تعیین و ثبت گردید (۱۶).

۴. تجزیه و تحلیل آماری

داده های حاصل از مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ver 19 و مدل های آماری کای اسکوار و دقیق فیشر مورد ارزیابی قرار گرفت. در این راستا وجود ($P < 0.05$) به عنوان

جدول ۴: نتایج مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه

ردیف	آنتی بیوتیک	مقاوم	حد واسط	حساس
۱	پنی سیلین	درصد	۹۳/۷۵	۶/۲۵
		تعداد	۷۵	۵
۲	اگزاسیلین	درصد	۸۱/۲۵	۶/۲۵
		تعداد	۶۵	۱۰
۳	کوآتریموکسازول	درصد	۵۶/۲۵	۲۵
		تعداد	۴۵	۱۵
۴	تتراسایکلین	درصد	۵۶/۲۵	۶/۲۵
		تعداد	۴۵	۳۰
۵	اریترومایسین	درصد	۵۲/۵	۱۲/۵
		تعداد	۴۲	۲۸
۶	کلوزاکسایلین	درصد	۳۵	۵۵/۵
		تعداد	۲۸	۴۴
۷	سیپروفلوکساسین	درصد	۳۲/۵	۱۲/۵
		تعداد	۲۶	۴۴
۸	جنتامایسین	درصد	۲۵	۱۸/۷۵
		تعداد	۲۵	۴۰
۹	سفتازیدیم	درصد	۱۴	۲۵
		تعداد	۱۲	۴۸
۱۰	سفالوتین	درصد	۱۲/۵	۳۱/۲۵
		تعداد	۱۰	۴۵
۱۱	آموکسی کلاو	درصد	۱/۲۵	۱۲/۵
		تعداد	۹	۶۱
۱۲	ریفامپین	درصد	۶/۲۵	۳/۳
		تعداد	۵	۷۲
۱۳	سفالکسین	درصد	۲/۵	۱۲/۵
		تعداد	۲	۶۸
۱۴	وانکومایسین	درصد	۰	۶/۲۵
		تعداد	۰	۷۵

جدول ۵: مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های کلبسیلا پنومونیه بر حسب جنسیت

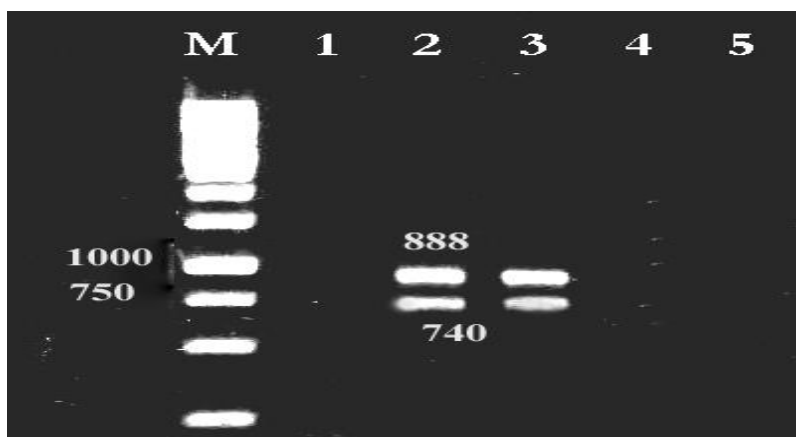
آنتی بیوتیک	جنسیت				p-value		
	R	S	I	R	S	I	
Amoxiciline (AM)	۳۴ (۲۷/۷۷٪)	۰	۰	۵۴ (۶۰٪)	۱ (۱/۱۱٪)	۱ (۱/۱۱٪)	
Amikaycine (AN)	۱۱	۲۳	۳	۱۸	۳۴	۱	*۰/۵۲۵
Kanamycine (K)	۱۷	۱۱	۷	۲۴	۱۲	۱۹	۰/۲۹۳
Tetracycline (TE)	۱۴	۱۳	۸	۲۵	۲۱	۹	۰/۷۳
Nalidixic Acid (NA)	۹	۲۴	۲	۱۳	۳۶	۶	۰/۶۹۸
Cotrimoxazol (SXT)	۱۱	۲۳	۱	۲۲	۳۲	۱	۰/۶۹۴
Ciprofloxacin (CP)	۴	۲۹	۲	۲	۵۱	۲	*۰/۰۰۰
Cephalothin (CF)	۲۰	۱۳	۲	۲۸	۲۳	۴	۰/۸۳۹
Norfeloxacine (NOR)	۱۰	۲۴	۱	۵	۴۸	۲	*۰/۰۲۱
Ceftriaxon (CRO)	۱۵	۳۰	۲	۲۲	۱۸	۳	*۰/۰۸۷
Nitroforntein (FM)	۱۴	۱۴	۷	۲۳	۱۷	۱۵	۰/۶۰۹
Imipenem (IMP)	۳	۳۲	۰	۱	۵۲	۲	*۰/۲۹۵
Gentamycine (GM)	۱۰	۲۴	۱	۱۴	۴۱	۰	*۰/۸۰۹

از مولتی پلکس PCR ژن های کد کننده ی مقاومت آنتی- بیوتیکی در سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت- های انسانی در تصاویر ۱ تا ۳ قابل مشاهده می باشند.

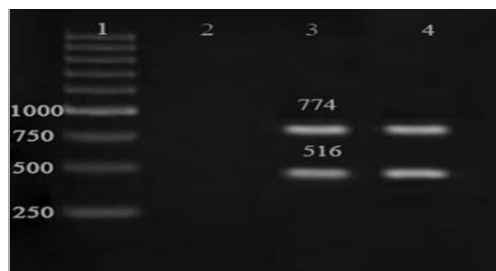
جهت ردیابی برخی از ژن های کد کننده مقاومت آنتی- بیوتیکی از جمله ژن های کد کننده مقاومت به کینولون ها، تتراسایکلین، کوتریماکسازول و جنتامایسین از آزمایش PCR چندانگانه استفاده شد که همان گونه که در جدول ۶، مشهود است، شایع ترین ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های مورد مطالعه ژن *aac(3)IIa* با ۸۳/۳۳ درصد فراوانی و نادرترین آن ها ژن کد کننده مقاومت به سیپروفلوکساسین (*qnr*) ۱۶/۱۶٪ بود. همچنین با توجه به آزمون مربع کای در ژن های مورد بررسی بین مقاومت با دیسک و مقاومت به روش PCR رابطه آماری معنی داری مشاهده گردید ($p\text{-value} < 0/05$). نتایج الکتروفورز حاصل

جدول ۶: فراوانی ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه

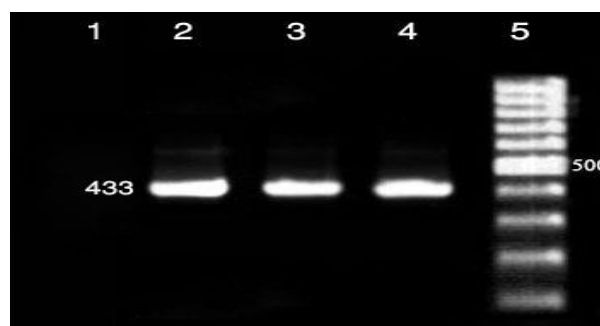
نوع ژن	آنتی بیوتیک	مقاومت با دیسک	مقاومت به روش تشخیص مولکولی
<i>tet A</i>	تتراسایکلین	۳۹ ۴۳٪/۳۰	۳۱ ۷۹٪/۴۸
<i>tet B</i>	تتراسایکلین	۳۹ ۴۳٪/۳۰	۲۵ ۶۴٪/۱۰
<i>qnr</i>	نالیدیکسیک اسید	۲۲ ۲۲٪/۴۰	۴ ۱۸٪/۱۸
<i>qnr</i>	نورفلوکساسین	۱۵ ۱۶٪/۷۰	۳ ۲۰٪
<i>qnr</i>	سپروفلوکساسین	۶ ۶٪/۷۰	۱ ۱۶٪/۱۶
<i>sul 1</i>	سولفونامیدها	۳۳ ۲۶٪/۷۰	۱۵ ۴۵٪/۴۵
<i>aac (3)IIa</i>	جنتامایسین	۲۴ ۲۶٪/۷۰	۲۰ ۸۳٪/۳۳



تصویر ۱. الکتروفورز محصول PCR ژنهای *tetA* و *aac(3)IIa* ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز. ستون ۱ کنترل منفی. ستونهای ۲ و ۳ باند ۸۸۸ جفت بازی مربوط به ژن *tetA*. ستونهای ۴ و ۵: نمونه های منفی



تصویر ۲. الکتروفورز محصول PCR ژنهای *tetB* و *qnr* ستون ۱: مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی فرمنتاز. ستون ۲: کنترل منفی. ستونهای ۳ و ۴: باند ۷۷۴ جفت بازی مربوط به ژن *tetB* و باند ۵۱۶ جفت بازی مربوط به ژن *qnr*



تصویر ۳. الکتروفورز محصول PCR ژن *sul1* ستون ۵: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز. ستونهای ۲-۴: باند ۴۳۳ جفت بازی مربوط به ژن *sul1*. ستون ۱: کنترل منفی

بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از موارد کلینیکی شهرستان اصفهان با روش های دیسک دیفیوژن و مولکولی انجام گرفت.

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر اساس الگوهای درمانی که در مناطق مختلف صورت می‌گیرد، متفاوت است. به عنوان مثال در مطالعه ی ما بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۹۳/۷۵ درصد) و بیشترین حساسیت نسبت به وانکومایسین (۱۰۰ درصد) بود. در تحقیق انجام شده توسط سلطان دلal و همکاران که به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های کلبسیلا جدا شده از نمونه‌های بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی (ره) بر روی ۳۰۰ ایزوله کلبسیلا صورت گرفت، آنتی‌بیوتیک‌های ایمپنم، آمیکاسین، سفتازیدیم و نالیدیکسیک اسید به عنوان داروهای

مؤثر شناخته شدند زیرا سویه‌های جمع آوری شده، حساسیت خوبی نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دادند، به طوری که این حساسیت برای آمیکاسین حدود ۹۹ درصد و سفتازیدیم، نالیدیکسیک اسید و ایمپنم ۹۸ درصد گزارش گردید ولی در تحقیق ما مقاومت به آمیکاسین ۳۲/۲ درصد و مقاومت به نالیدیکسیک اسید ۲۲/۴ درصد گزارش گردید. که با نتایج حاصل از تحقیق ما متفاوت می‌باشد (۱۷). در حالی که نتایج به دست آمده در اردن توسط آل شارا و همکاران با نتایج تقریباً مشابه می‌باشد، به طوری که مقاومت به آمیکاسین ۳۸ درصد، سفتازیدیم ۵۷ درصد و نالیدیکسیک اسید ۳۳/۶ درصد بوده است ولی ایمپنم هم‌چنان به عنوان یک آنتی‌بیوتیک مؤثر در درمان عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه با ۹۰/۹ درصد اثردهی داشته است (۱۸).

جلال‌پور و همکاران در مطالعه‌ای به تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد

بتالاكتامازهای وسیع‌الطیف جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری‌پیدا شدند. در این تحقیق از ۳۷۸ نمونه بررسی شده، فراوانی بتالاكتامازهای وسیع‌الطیف در سوبه‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری و سرپایی به ترتیب ۶۴ و ۲۲ درصد گزارش گردید. در این تحقیق مقاومت در برابر آمپی‌سیلین، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفپیم، آمیکاسین، ایمپنم، سیپروفلوکسازین، کوتریموکسازول و نیتروفرانتویین به ترتیب ۹۰/۵ درصد، ۶۵ درصد، ۵۷/۱ درصد، ۶۰ درصد، ۳۱/۶ درصد، صفر درصد، ۳۵ درصد، ۷۸/۶ درصد و ۲۵/۹ درصد گزارش گردید (۱۹). در مطالعه‌ی کیزیگیل و همکاران در ترکیه بر روی تعداد ۹۹ ایزوله کلبسیلا در سال ۲۰۰۵ حساسیت ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق مشخص گردید که ۱۰۰ درصد نمونه‌ها به مروپنم حساس و ۲۵/۹ به سیپروفلوکسازین حساسیت دارند (۲۰). در بررسی خلف و همکاران در ایتوپی در ۲۰ نمونه‌ی بتالاكتامازهای وسیع‌الطیف ۴ نمونه (۲۰ درصد) از نمونه‌ها دارای ژن مقاومت SHV و ۱۶ نمونه (۸۰ درصد) نمونه‌ها دارای SHV و CTX بودند (۲۱). در مطالعه‌ی چانگ و همکاران در ژاپن تقریباً ۵۰ درصد نمونه‌های به دست آمده به صورت بتالاكتامازهای وسیع‌الطیف گزارش گردیده است و دارای ژن‌های مقاومت بودند (۲۲).

در مورد دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه نیز نتایج مشابه یا متفاوتی با دیگر محققان از ایران یافت شد که این اختلافات می‌تواند ناشی از اختصاصات بومی هر منطقه، روش به کار رفته جهت تعیین میزان حساسیت و عوامل دخیل در ایجاد مقاومت دارویی از جمله پلاسمیدهای قابل انتقال و ... باشد اما در مجموع تمام سوبه‌های کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی در مطالعه حاضر دارای مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک مختلف هستند که این خود خطر استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها را در سطح جامعه دو چندان می‌کند. در

بخش دیگر از این تحقیق ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سوبه‌های کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی قرار گرفتند و از روش PCR چندگانه جهت ردیابی ژن‌های مورد مطالعه استفاده شد که نتایج نشان داد ژن *aac (3)IIIa* (کد کننده مقاومت به جنتامایسین) با فراوانی ۸۳/۳۳ درصد و ژن *qnr* (کد کننده مقاومت به سیپروفلوکسازین) با فراوانی ۱۶/۱۶ درصد از سوبه‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت‌های انسانی وجود دارد.

سه ژن کد شونده به نام‌های *sul 1*، *sul 2* و *sul 3* شناخته شده است که باعث ایجاد مقاومت نسبت به سولفونامیدها در باکتری‌های پاتوژن می‌گردد. ژن *sul1* به طور عمده همراه با اینتگرون کلاس ۱ می‌باشد در حالی که *sul 2* بیشتر روی پلاسمیدهای ناسازگار متعلق به گروه *incQ* یا پلاسمیدهای کوچک که پلاسمیدهای *pBP1* نامیده می‌شوند قرار می‌گیرد. ممکن است این پلاسمیدها علاوه بر این ژن‌ها حامل ژن‌های مقاومت به دیگر گروه‌های آنتی‌بیوتیکی باشند. این پلاسمیدها به سهولت بین سوبه‌ها و گونه‌های مختلف از پاتوژن‌های روده‌ای منتقل می‌شوند (۲۶-۲۳). در تحقیق حاضر فراوانی ژن *sul 1* ۴۵/۴۵ درصد برآورد گردید که در تجزیه و تحلیل آماری با توجه آزمون کای دو بین ژن مقاومتی و آنتی‌بیوتیک رابطه معنی دار آماری مشاهده گردید ($P\text{-value} < 0/05$).

نتیجه گیری:

با توجه به مشاهده‌ی روز افزون مقاومت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها و تغییرات گسترده‌ی طیف اثر بخشی نسبت به داروها و جلوگیری از افزایش موارد مقاوم به دارو، ضرورت اجرای آزمون‌های حساسیت دارویی بسیار ضروری به نظر می‌رسد. شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری کلبسیلا پنومونیه عامل عفونت ادراری و هم چنین درصد بالای ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در افراد مورد مطالعه می‌تواند نشان دهنده‌ی مصرف بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها

باشد. باتوجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک-
ها تشخیص سریع و به موقع سویه‌های مقاوم به منظور انتخاب
گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت
امری ضروری به نظر می‌رسد.

مراجع

1. Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum-lactamases in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. Indian J Med Microbiol. 2004; 22(3):172-174.
2. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, Siu LK. *Klebsiella pneumoniae* outer Membrane Porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both Antimicrob Resistance and Virulence. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(4):1485-1493.
3. Luo Y, Yang J, Zhang Y, Ye L, Wang L, Guo L. Prevalence of β -lactamases and 16S rRNA Methylase Genes Amongst Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Carrying Plasmid-mediated Quinolone Resistance Determinants. Int J Antimicrob Agents. 2011; 37(4):352-355.
4. Green VL, Verma A, Owens RJ, Phillips SE, Carr SB. Structure of New Delhi Metallo- β -Lactamase 1 (NDM-1). Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2011; 67(10):1160-1164.
5. Lye DC, Kwa AL, Chlebicki P. Antimicrobial Resistance and Practical Solutions. Ann Acad Med Singapore. 2011; 40(4): 156-162.
6. Mustafa OA, Yusuf D. Investigation of some antibiotic susceptibility plasmid profiles and ESBL characteristic of *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary system infection. World Applied Sci J. 2009; 6(5):630-636.
7. Walker, Stuart T. Cocos stain-causing Gram-positive. In: Bahador A, Alikhani MY, Mansouri SH, Piri Dogahe H, Taheri Kalani M. Walkers Microbiology. Tehran: khosravi publications & Dibaj publications; 2007. p 151-93.
8. Lavilla S, Gonzalez-Lopez JJ, Sabate M, Garcia-Fernandez A, Larrosa MN, Bartolome RM, et al. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. J Antimicrob Chemother. 2008;61(2):291-295.
9. Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(5):1892-1897.
10. Garnier F, Raked N, Gassama A, Denis F, Ploy MC. Genetic environment of quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sul1*-type integron in the newly described *Salmonella enterica* serovar Keurmassar. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(9):3200-2.
11. Bouchakour M, Zerouali K, Gros Claude JD, Amarouch H, El Mdaghri N, Courvalin P, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae in Morocco. J Infect Dev Ctries. 2010; 4(12):779-803.
12. Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. Pathol Biol (Paris). 2006; 54(1):7-9.
13. Maynard C, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R, Masson L, Larivière S, Harel J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene

profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. J Clin Microbiol. 2004; 42 (12): 5444-52.

14. Soleimani-Asl Y, Zibaei M, Firoozeh. Detection of *qnrA* gene among quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Khorram Abad during 2011-2012. J Kashan Univ Med Sci. 2013; 7(5): 488-494.

15. Kern MB, Klemmensen T, Frimodt-Møller N, Espersen F. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. J Antimicrob Chemother. 2002; 50(3): 513-516.

16. Chen LF, Chopra T, Kaye KS. Pathogens resistant to antibacterial agents. Infect Dis Clin North Am. 2009; 23(4): 817-845.

۱۷. سلطان دلایل، م. میرعماد، ا. شریفی یزدی، م. ک. و یانس، س. تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های کلبسیلا جدا شده از نمونه‌های بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی (ره). مجله دانشکده‌ی پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران. دوره‌ی ۶، شماره ۴، ۱۳۹۱. ص ۲۸۱-۲۷۵.

18. Al Shara MA. Emerging Antimicrobial Resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains Isolated from pediatric patients in Jordan. The New Iraqi Journal of Medicine 2011; 7(2): 29-32.

۱۹. جلال پور، ش. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی β لاکتامازهای وسیع‌الطیف جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری. مجله دانشکده‌ی پزشکی اصفهان. سال بیست و نهم، شماره‌ی ۱۴۲، ۱۳۹۰، ص ۷۰۶-۶۹۵.

20. Kizirgil A, Demirdag K, Ozden M, Bulut Y, Yakupogullari Y, Toraman ZA. In

vitro activity of three different antimicrobial agents against ESBL producing *Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* blood isolates. Microb Res. 2005; 160 (2): 135-140.

21. Khalaf, NG. Eletreby, MM. Hanson. ND. Characterization of CTX-M ESBLs in *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Cairo. Egypt. BMC Infect Dis. 2009; 9(84):1-5.

22. Chong, Y. Yakushiji. H. Ito, Y. Kamimura. T. Clinical molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* in a long-term study from Japan. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001; 30 (1): 83-87.

23. Carattoli A. Resistance plasmide families in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2009; 53: 2227-2238.

24. Grape M, Farra A, Kronall G, Sundstrom L. Integrons and gene cassettes in clinical isolates of co trimoxazole resistant gram negative bacteria. Clin Microbiol Infect. 2005; 11(3): 185-192.

25. Trobos M, Jakobsen L, Olsen KE, et al. Prevalence of sulfonamide resistance and class 1 integron genes in *Escherichia coli* isolates obtained from broilers, broiler meat healthy humans and urinary infections in Denmark. J Antimicrob Agents. 2008; 32(3): 367-369.

26. Bean DC, Live more D, Hall LM. *E. coli*: implications for Plasmids imparting sulfonamide resistance in persistence. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(2): 1088-1093.

Investigation of the Antibiotic Resistance Pattern in *Klebsiella Pneumoniae* Strains Isolated from Clinical Cases in Isfahan City

Hossein Khodabandeh Shahraki^{1*}, Sara Bagheri Kakesh²

1. Department of Biology, SHK.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, ShK.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding Author: h.khodabandehshahraki@iau.ir

Abstract

Klebsiella drug resistance is increasing day by day and therefore, performing drug resistance tests before prescribing antibiotics seems essential. The aim of this study is to determine the antibiotic resistance pattern in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from clinical cases in Isfahan city. The present study was conducted on 90 *Klebsiella pneumoniae* isolates isolated from clinical samples from patients referred to medical diagnostic laboratories in Isfahan city. Using biochemical methods and molecular techniques based on *16srRNA* gene detection, all strains were confirmed and the antibiotic resistance of the isolates was investigated using the disk diffusion method and molecular methods based on (*qnr*, *tet A*, *tet B*, *aac (3)IIa* and *sul1*) genes. Of the 90 strains studied, the antimicrobial resistance pattern was estimated to be the highest microbial resistance to penicillin (93.75%) and the highest sensitivity to vancomycin (100%). The *aac(3)IIa* gene (encoding gentamicin resistance) with a frequency of 83.33% and the *qnr* gene (encoding ciprofloxacin resistance) with a frequency of 16.16% were the most and least frequently detected antibiotic resistance genes in *Klebsiella pneumoniae* strains. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* is a serious risk for patients visiting the hospital, so monitoring antibiotic use and identifying drug-resistant strains can prevent the development of resistance in bacteria.

Keywords: Antibiotic resistance, *Klebsiella pneumoniae*, Resistance genes