رهیافت‌های نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۳ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۴

Journal homepage: https://sanad.iau.ir/journal/nacms

تعیین الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی درایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از موارد کلینیکی شهرستان شهرکرد

فاطمه خداوردی پور[1*] ، فاطمه مومبینی[2]، خاتم امین الرعایائی [3]

۱.گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. گروه زیست شناسی، واحد مسجد سلیمان، دانشگاه آزاد اسلامی، مسجد سلیمان، ایران.

۳.کارشناسی ارشد تغذیه دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

چکیده

بخش عمده ای از نمونه‌های بالینی توسط گونه‌های کلبسیلا آلوده می شود. مقاومت دارویی کلبسیلا روز به روز افزوده می‌شود و بنابراین انجام تست‌های مقاومت دارویی، قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک، ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه تعیین الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جد اشده از موارد کلینیکی شهرستان شهرکرد می‌باشد. مطالعه حاضر روی ۹۰ سویه *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از ۵۰۰۰ نمونه کلینیکی از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرکرد انجام شد. با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و تکنیک مولکولی بر اساس ردیابی ژن *16srRNA* همه ایزوله‌ها تایید و مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها با استفاده از روش روش دیسک دیفیوژن بررسی شد. ردیابی ژن‌های (*tet B, aac(3)IIa،tet A،qnr* و*sul1*) در حضور پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت. از ۹۰ ایزوله مورد بررسی، بیشترین مقاومت میکروبی به پنی سیلین (۹۳/۷۵ درصد) و بیشترین حساسیت نسبت به ونکومایسین (۱۰۰درصد) برآوردگردید. ژن *aac (3)IIa* (کد کننده مقاومت به جنتامایسین) با فراوانی ۸۳/۳۳ درصد و ژن *qnr* (کد کننده ی مقاومت به سیپروفلوکساسین) با فراوانی ۱۶/۱۶ درصد، بیشترین و کمترین ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی ردیابی شده در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* بودند. از آن‌جا که *کلبسیلا پنومونیه* دارای مقاومت چندگانه یک خطر جدی برای بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های شهرکرد است، بنابراین نظارت بر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و تعیین ایزوله‌های مقاوم به داروها می‌تواند از توسعه مقاومت در باکتری‌ها جلوگیری کند.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:

دریافت:۱۴۰۴/۰۷/۱۴

پذیرش:۱۴۰۴/۰۹/۱۴

چاپ: تابستان ۱۴۰۴

DOI:
doi.org/10.82415/nacms.1404.1220263

کلمات کلیدی:

ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی، *کلبسیلاپنومونیه، عفونت* ، بیمارستانی.

* نویسنده مسئول *Email*

fatemeh75.khodaverdi@gmail.com

مقدمه

سویه‌های کلبسیلا پاتوژن‌های فرصت طلبی از خانواده انتروباکتریاسه هستند که موجب سپتی سمی، باکتریمی، انتریت نوزادان، مننژیت و عفونت‌های دستگاه ادراری و بافت-های نرم می‌شوند (۱). *کلبسیلا پنومونیه* یکی از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد و هم‌چنین این باکتری‌ها از علل مهم عفونت‌های اکتسابی در جامعه و بیمارستان محسوب می‌شوند. مقاومت ضد میکروبی همواره به عنوان یک مشکل جدی برای سلامت انسان مطرح بوده است (۴-۲). از این رو سازمان بهداشت جهانی سال ۲۰۱۱ را به عنوان سال مقاومت آنتی بیوتیکی نامید. هم‌چنین این سازمان در نظر گرفتن موارد مهمی مانند ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی، استفاده صحیح از آنتی بیوتیک‌ها، فروش آنتی بیوتیک‌ها فقط با نسخه پزشک و پیشگیری و کنترل عفونت را جهت کنترل و جلوگیری از مقاومت آنتی بیوتیکی به دولت‌ها توصیه نموده است (۵). استفاده مداوم از آنتی بیوتیک‌ها و فشار انتخابی ناشی از این عوامل باعث بروز مقاومت‌هایی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها و باکتری‌های گرم منفی به‌ویژه *کلبسیلا پنومونیه* گردیده است (۶). مقاومت علیه آنتی بیوتیک‌ها به وسیله مکانیسم‌های غیرژنتیکی (غیرفعال سازی آنزیماتیک دارو، تغییر سایت هدف ریبوزوم، کاهش نفوذ پذیری و پس زدگی دارو) و مکانیسم‌های ژنتیکی (کانژوگاسیون، ترانسفورماسیون و ترانس داکسیون) ایجاد می‌شود (۷). ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک *tetA* و *tetB* (مقاومت به تتراسایکلین)، *qnr* (مقاومت به فلوروکینولون ها)، *aac(3) IIa* (مقاومت به جنتامایسین) و ژن *sul1* (مقاومت به سولفانامیدها) اخیراً در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مشاهده شده که این ژن‌ها عملکردهای متفاوتی را انجام می‌دهند. مقاومت فلوروکینولون‌ها با واسطه ی پلاسمیدی می‌باشد که سبب کد کردن پروتئینی می‌گردد که باعث محافظت DNA ژیراز در برابر فلوئوروکینولون‌ها می‌شود (۹-۸). در حقیقت در مطالعات اپیدمیولوژیکی در ارتباط با گسترش ژن *qnr* نشان داده است که ایزوله‌های مثبت از نظر *qnr* غالبا ESBL را هم بیان می-کنند. بنابراین تشخیص ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* با ویرولانس بالا به منظور استفاده صحیح از آنتی بیوتیک‌ها برای درمان مؤثر ضروری است (۱۲-۱۰). هدف از این تحقیق ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف از جمله ژن‌های *tetA* و *tetB* (مقاومت به تتراسایکلین)، *qnr* (مقاومت به فلوروکینولون-ها)، *aac(3) IIa* (مقاومت به جنتامایسین) و ژن *sul1* (مقاومت به سولفانامیدها با تکنیک PCR چندگانه در سویه-های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از مواردکلینیکی شهرستان شهرکرد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری و جداسازی *کلبسیلا پنومونیه*

در این مطالعه مقطعی از بین ۵۰۰۰ نمونه کلینیکی از افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد تعداد ۹۰ ایزوله از باکتری *کلبسیلا پنومونیه* جدا گردید. نمونه‌های مورد بررسی شامل ادرار، ترشحات چرکی چشم، ترشحات زخم، ترشحات ریه و نمونه کشت خون بودند. به منظور شناسایی باکتری نمونه مورد نظر بر روی محیط‌های بلاد آگار، سالمونلا شیگلا آگار و مک‌کانکی آگار کشت داده شد. کلنی‌های رشد یافته از نظر رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل چگونگی تخمیر قندها در محیط سه قندی آهن دار[1] مک کانکی، ائوزین‌متیلن‌بلو هم چنین دکربوکسیلاسیون اسید آمینهٔ لایزین در محیط لایزین آیرون آگار[2] تولید اندول، عدم حرکت در محیط SIM و واکنش در محیط MRVP Broth، رشد در محیط سیمون سیترات و اوره آگار و در نهایت بررسی نتایج با استفاده از جداول استاندارد شناسایی گردیدند. در جدول (۱) تست‌های بیوشیمیایی مورد استفاده برای شناسایی باکتری *کلبسیلا پنومونیه* نشان داده شده است. در این تحقیق از *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

جدول (۱): تست‌های بیوشیمیایی مورد استفاده برای شناسایی *کلبسیلا پنومونیه*

نوع باکتری	نوع تست						
	تولید اندول	متیل رد	ووژس پروسکائر	سیترات	H_2S	اوره	لیزین دکربوکسیلاز
کلبسیلا پنومونیه	–	–	+	+	+	+	+

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها از روش کربی- بایر[3] بر طبق دستورالعمل CLSI (مندرج در راهنمای ارائه شده توسط شرکت پادتن طب) استفاده شد (۱۳).

تهیه کدورت استاندارد نیم مک فارلند

برای تهیه کدورت استاندارد نیم مک فارلند مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول ۱/۱۷۵ درصد کلرور باریم را به اسید

[1] Triple Sugar Iron Agar(TSI)
[2] Lysine Iron Agar (LIA)
[3] Kirby Bauer

سولفوریک ۱درصد اضافه کرده. این محلول به مدت ۶ ماه در دمای اتاق و در تاریکی قابل نگهداری است. هنگام مصرف باید در لوله‌ای که هم قطر سوسپانسیون میکروبی است تهیه گردد (۱۳).

تهیه سوسپانسیون میکروبی

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی مقداری از کلونی مورد آزمایش را در لوله حاوی محیط کشت TSB کشت داده و به مدت ۱تا۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده تا زمانی که کدورت آن به اندازه کدورت لوله استاندارد نیم مک فارلند برسد. درآن هنگام مورد استفاده قرار خواهد گرفت. باید توجه داشت اگر سوسپانسیون رقیق باشد، قطر هاله عدم رشد بزرگ تر و اگر غلیظ تر از استاندارد باشد، قطر هاله عدم رشد کمتر خواهد شد.

دیسک‌های آنتی بیوتیک در این آزمایش شامل: کوتریموکسازول(تری متو پریم+سولفامتوکسازول) (SXT)، سفتریاکسون (CRO30)، نیتروفورانتئین (FM300)، سفالوتین (CF30)، نالیدیکسیک اسید (NA30)، نورفلوکساسین (NOR)، تتراسایکلین (TE30)، ایمی‌پنم (IPM10)، جنتامایسین (GM10)، آمیکایسین (NA) و سیپروفلوکساسین (CRO) ازشرکت پادتن طب– ایران مورد استفاده قرار گرفتند (۱۳).

آزمایش آنتی بیوگرام

برای انجام آنتی بیوگرام طبق دستورالعمل CLSI تعداد ۳ تا ۴ کلنی ازباکتری مورد نظر را برداشته و به محیط TSB انتقال داده و به مدت۱تا ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرارداده تا کدورتی معادل نیم مک فارلند حاصل شود سپس با استفاده از سواپ استریل از باکتری برداشته و به صورت فشرده بر روی محیط مولر هینتون کشت انجام شد و دیسک‌های مورد نظر با حفظ فاصله روی آن قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد، بر اساس اندازه هاله‌های ممانعت از رشد، براساس جدول شرکت پادتن طب نتایج ثبت شد (۱۳).

آزمایشات مولکولی

به منظور تائید قطعی وجود *کلبسیلا پنومونیه* در نمونه های کشت داده شده و ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌ها، از واکنش زنجیره ای پلیمراز استفاده شد. در این راستا ابتدا DNA ژنومی باکتری‌ها با استفاده از روش بویلینگ، استخراج شد و کیفیت و کمیت DNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت.

تأیید ایزوله‌ها با استفاده از PCR

بعد از استخراج DNA با استفاده از زوج پرایمرهای طراحی شده مربوط به ژن *16srRNA کلبسیلا پنومونیه* که در جدول ۲ نشان داده شده است، به تشخیص قطعی ایزوله‌ها پرداخته شد.

جدول(۲): توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*

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

آزمایش PCR به منظور تشخیص قطعی *کلبسیلا پنومونیه* با استفاده از کیت Accupower PCR PreMix ساخت BioNEER در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۲ میکرولیتر از پرایمرهای R، F و ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۳ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت انجام گرفت. ترکیبات موجود در کیت در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول (۳): اجزای کیت Accupower PCR PreMix

Component	µl ۲۰ Reaction
Taq DNA Polymerase	۱ U
Each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTp)	۲۵۰ µM
Tris-HCl (pH=9)	۱۰ mM
KCl	۳۰ mM
MgCl2	۱/۵ mM

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *16srRNA* به صورت زیر بود:

۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه. مشاهده باند ۱۳۰ جفت بازی نشان دهنده مثبت بودن آزمون می‌باشد (۱۴).

تعیین فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*

در راستای ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی شامل ژن‌های، *tetA* و *tetB* (مقاومت به تتراسیکلین)، *qnr* (مقاومت به فلوروکینولون ها)، *aac(3)-IIa* (مقاومت به جنتامایسین) و ژن *sul1* (مقاومت به

سولفونامید ها) از زوج پرایمر های معرفی شده در جدول ۴ استفاده شد. آزمایش PCR به منظور ردیابی ژن‌های *tetA* و *aac (3)IIa* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* با استفاده از کیت Accupower PCR PreMix ساخت BioNEER در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۲ میکرولیتر از پرایمرهای F و R و ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۳ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت Accupower PCR PreMix انجام گرفت (۱۶،۱۵).

جدول (۴): پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*

آنتی بیوتیک	ژن مقاومت	توالی	اندازه (جفت باز)
Tetracycline	*tetA*	GTGAAACCCAACATACCCC GAAGGCAAGCAGGATGTAG	۸۸۸
Tetracycline	*tetB*	CCTTATCATGCCAGTCTTGC ACTGCCGTTTTTTCGCC	۷۷۴
Fluoroquinolone	*qnr*	ATTTCTCACGCCAGGATTTG GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	۵۱۶
Gentamicin	*aac (3)IIa*	CGGAAGGCAATAACGGAG TCGAACAGGTAGCACTGAG	۷۴۰
Sulfonamide	*Sul1*	CGGCGTGGGCTACCTGAACG GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	۴۳۳

آزمون Multiplex PCR برای ردیابی ژن‌های *tetB* و *qnr*

آزمایش PCR به منظور ردیابی ژن‌های *tetB* و *qnr* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* با استفاده از کیت Accupower PCR PreMix ساخت BioNEER در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۲ میکرولیتر از پرایمرهای F ، R و ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۳ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت Accupower PCR PreMix انجام گرفت.

آزمون PCR برای ردیابی ژن *Sul1*

آزمایش PCR به منظور ردیابی ژن *Sul1* در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* با استفاده از کیت Accupower PCR PreMix ساخت BioNEER در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۱ میکرولیتر از پرایمرهای F و R و ۵ میکرولیتر از DNA الگو و۱۴ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت Accupower PCR PreMix انجام گرفت. . برنامه دمایی برای انجام واکنش PCR برای ژن‌های مختلف در جدول ۵ نشان داده شده است (۱۷).

جدول (۵): برنامه دمایی برای انجام واکنش PCR برای ژن‌های مورد بررسی

	برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی مراز
aac (3)IIa و *tetA*	۱ سیکل ۵ دقیقه -------- ۹۴ ۳۰ سیکل ۱۵ ثانیه -------- ۹۴ ۶۰ ثانیه -------- ۵۵ ۶۰ ثانیه -------- ۷۲ ۱ سیکل ۵ دقیقه -------- ۷۲
tetB, qnr	۱ سیکل ۵ دقیقه -------- ۹۴ ۳۰ سیکل ۱۵ ثانیه -------- ۹۴ ۵۰ ثانیه -------- ۵۶ ۶۰ ثانیه -------- ۷۲ ۱ سیکل ۵ دقیقه -------- ۷۲
Sul1	۱ سیکل ۵ دقیقه -------- ۹۴ ۳۰ سیکل ۲۰ ثانیه -------- ۹۴ ۶۰ ثانیه -------- ۵۹ ۶۰ ثانیه -------- ۷۲ ۱ سیکل ۶ دقیقه -------- ۷۲

بعد از انجام آزمایشات PCR، محصول PCR روی ژل ۱درصد آگارز واجد اتیدیوم 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

تجزیه و تحلیل آماری

داده های حاصل از مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری $Spss_{ver\ 19}$ و مدل های آماری کای اسکوئر و دقیق فیشر مورد ارزیابی قرار گرفت. در این راستا وجود

($P<0.05$) به عنوان وجود رابطه آماری معنی دار بین دو فاکتور مورد مطالعه در نظر گرفته شد.

نتایج

پس از تأیید باکتری با استفاده از آزمون‌های میکروبیولوژی و مولکولی، حساسیت باکتری‌های ایزوله شده به آنتی بیوتیک‌های کوتریموکسازول (تری متو پریم+سولفامتوکسازول) (SXT)، سفتریاکسون (CRO30)، نیتروفورانتوئین (FM300)، سفالوتین (CF30)، نالیدیکسیک اسید (NA30)، نورفلوکساسین (NOR)، تتراسایکلین (TE30)، ایمیپنم (IPM10)، جنتامایسین (GM10) و سیپروفلوکساسین (CP)، آمیکایسین (AN) و سفپیم (Fp) از شرکت پادتن طب ایران مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین مقاومت نسبت به آموکسی سیلین ۹۷/۸ درصد و کمترین مقاومت نسبت به ایمیپنم ۴/۴ درصد گزارش شده است. نتایج در جدول ۶ نشان داده شده است.

جدول(۶): تعداد و درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در ۹۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از موارد کلینیکی

ردیف	آنتی بیوتیک		مقاوم	حد واسط	حساس
۱	آموکسی‌سیلین	درصد	۹۷/۸	۱/۱	۱/۱
		تعداد	۸۸	۱	۱
۲	نالیدیکسیک‌اسید	درصد	۲۴/۴	۹	۶۶/۶
		تعداد	۲۲	۸	۶۰
۳	نیتروفورانتوئین	درصد	۴۱/۱	۲۴/۵	۳۴/۴
		تعداد	۳۷	۲۲	۳۱
۴	ایمی‌پنم	درصد	۴/۴	۲/۲	۹۳/۴
		تعداد	۴	۲	۸۴
۵	سفپیم	درصد	۳۴/۴	۳/۳	۶۲/۲
		تعداد	۳۱	۳	۵۶
	تتراسایکلین	درصد	۴۳/۳	۱۸/۸	۳۷/۹

۶		تعداد	۳۹	۱۷	۳۴
۷	کوتریموکسازول	درصد	۳۶/۷	۲/۲	۶۱/۱
		تعداد	۳۳	۲	۵۵
۸	سیپروفلوکساسین	درصد	۶/۷	۴/۴	۸۸/۹
		تعداد	۶	۴	۸۰
۹	کانامایسین	درصد	۴۵/۵	۲۸/۹	۲۵/۶
		تعداد	۴۱	۲۶	۲۳
۱۰	سفتریاکسون	درصد	۴۱/۱	۵/۵	۵۳/۴
		تعداد	۳۷	۵	۴۸
۱۱	سفالوتین	درصد	۵۳/۳	۶/۷	۴۰
		تعداد	۴۸	۶	۳۶
۱۲	نورفلوکساسین	درصد	۱۶/۷	۳/۳	۸۰
		تعداد	۱۵	۳	۷۲
۱۳	آمیکاسین	درصد	۳۲/۲	۴/۵	۶۳/۳
		تعداد	۲۹	۴	۵۷
۱۴	جنتامایسین	درصد	۲۶/۷	۱/۱	۷۲/۲
		تعداد	۲۴	۱	۶۵

در تجزیه و تحلیل آماری با توجه به آزمون کای دو بین نوع آنتی بیوتیک‌ها و مقاومت آنتی بیوتیک رابطه معنی دار آماری مشاهده گردید (P-value < 0/05). 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.

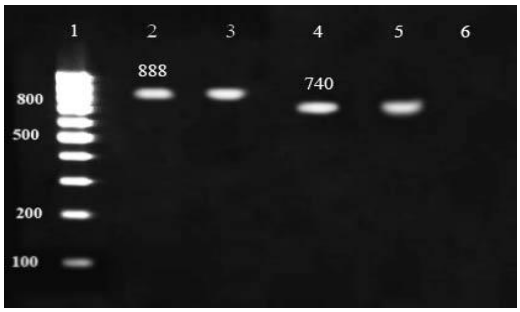
نتایج مربوط به فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*

توزیع انواع ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از موارد کلینیکی به روش PCR ردیابی گردید. ژن *qnr* برای شناسایی مقاومت آنتی بیوتیکی در آنتی بیوتیک های کینولون‌ها شامل نالیدیکسیک اسید، نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین

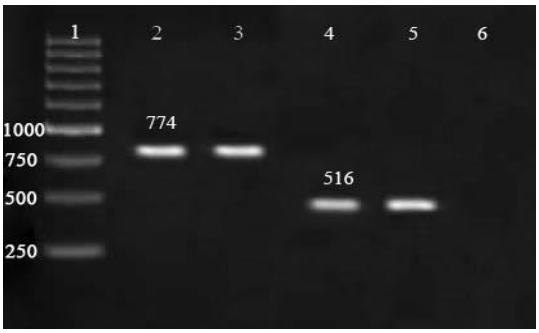
استفاده شد، ژن *tet A* و *tet B* به منظور بررسی مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک تتراسیکلین، ژن *sul 1* برای ارزیابی مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک کوتریموکسازول و از ژن *aac(3)IIa* جهت بررسی مقاومت نسبت به جنتامایسین به‌کار رفتند. از ۳۹ ایزوله مقاوم به تتراسایکلین، ژن tetA در ۳۱ ایزوله (۷۹/۴۸ درصد) و ژن tetB در ۲۵ ایزوله (۶۴/۱۰ درصد) مشاهده شد. از ۲۲ ایزوله مقاوم به نالیدیکسیک اسید، ژن qnr در ۴ ایزوله (۱۸/۱۸درصد) گزارش گردید. همچنین از ۱۳ ایزوله مقاوم به نورفلوکساسین، ژن qnr در ۳ ایزوله (۲۰ درصد) و از ۶ ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین، ژن qnr در ۱ ایزوله(۱۶/۶۶ درصد) مشاهده شد. در میان ۳۳ ایزوله مقاوم به کوتریموکسازول، ژن sul1 در ۷ ایزوله (۲۱/۲۱ درصد) و از ۲۴ ایزوله مقاوم به جنتامایسین، ژن aac(3)-IIa در ۲۰ ایزوله (۸۳/۳۳ درصد) گزارش گردید.نتایج در جدول ۷ و شکل های ۳-۱ نشان داده شده است.

جدول (۷): فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*

نوع ژن	آنتی بیوتیک	مقاومت با دیسک	مقاومت به روش تشخیص مولکولی
tet A	تتراسایکلین	۳۹ ٪ ۴۳/۳۰	۳۱ ٪ ۷۹/۴۸
tet B	تتراسایکلین	۳۹ ٪ ۴۳/۳۰	۲۵ ٪ ۶۴/۱۰
qnr	نالیدیکسیک اسید	۲۲ ٪ ۲۲/۴۰	۴ ٪ ۱۸/۱۸
qnr	نورفلوکساسین	۱۵ ٪ ۱۶/۷۰	۳ ٪ ۲۰
qnr	سیپروفلوکساسین	۶ ٪ ۶/۷۰	۱ ٪ ۱۶/۶۶
sul 1	سولفونامیدها	۳۳ ٪ ۳۶/۷۰	۱۵ ٪ ۴۵/۴۵
aac (3)IIa	جنتامایسین	۲۴ ٪ ۲۶/۷۰	۲۰ ٪ ۸۳/۳۳

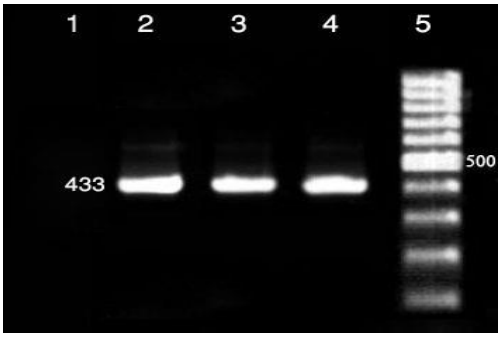


شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *tetA* و *aac (3)IIa*. ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز. ستون‌های ۲ و ۳ باند ۸۸۸ جفت بازی مربوط به ژن *tetA*. ستون های ۴ و ۵: باند ۷۴۰ جفت بازی مربوط به ژن *aac (3)IIa*. ستون ۶: کنترل منفی



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *tetB* و *qnr*

ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز. ستون های ۲ و ۳ باند ۷۷۴ جفت بازی مربوط به ژن *tetB*. ستون های ۴ و ۵: باند ۵۱۶ جفت بازی مربوط به ژن *qnr*. ستون ۶: کنترل منفی



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

بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از موارد کلینیکی شهرستان شهرکرد با دو روش معمول آنتی بیوگرام و مولکولی انجام گرفت. مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف بر اساس الگوهای درمانی که در مناطق مختلف صورت می‌گیرد، متفاوت است. به عنوان مثال در مطالعه ی ما بیشترین مقاومت نسبت به آموکسی سیلین (۹۷/۸ درصد) و بیشترین حساسیت نسبت به ایمی‌پنم (۴/۴ درصد) بود. در تحقیقی که به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۳۰۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه‌های بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی (ره) صورت گرفت، آنتی بیوتیک‌های ایمی‌پنم، آمیکاسین، سفتازیدیم و نالیدیکسیک اسید به‌عنوان داروهای مؤثر شناخته شدند زیرا سویه‌های جمع آوری شده، حساسیت خوبی نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها نشان دادند، به طوری‌که این حساسیت برای آمیکاسین حدود ۹۹ درصد، سفتازیدیم، نالیدیکسیک اسید و ایمی پنم ۹۸ درصد گزارش گردید ولی در تحقیق ما مقاومت به آمیکایسین ۳۲/۲ درصد و مقاومت به نالیدیکسیک اسید ۲۲/۴ درصد گزارش گردید. که با نتایج حاصل از تحقیق ما متفاوت می‌باشد (۱۷). در حالی‌که نتایج به دست آمده در اردن توسط آل شارا و همکاران انجام شد، نتایج تقریباً مشابه با تحقیق ما بود، به طوری که مقاومت به امیکاسین ۳۸ درصد، سفتازیدیم ۵۷ درصد و نالیدیکسیک

اسید ۳۳/۶ درصد بوده است، ولی ایمی پنم هم‌چنان به عنوان یک آنتی بیوتیک 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 پنومونیه‌ی مولد* بتا لاکتامازهای وسیع‌الطیف جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری پرداختند. در این تحقیق از ۳۷۸ نمونه بررسی شده، فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سویه‌های *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، ایمی‌پنم، سیپروفلوکسازین، کوتریموکسازول و نیتروفورانتویین 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 درصدگزارش گردید (۱۹). در مطالعه‌ی کیزیگیل و همکاران در ترکیه بر روی تعداد ۹۹ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* در سال ۲۰۰۵ حساسیت ایزوله‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق مشخص گردید که ۱۰۰ درصد نمونه‌ها به مروپنم حساس و ۲۵/۹ به سیپروفلوکساسین حساسیت دارند (۲۰). در بررسی خلف و همکاران در اتیوپی در ۲۰ نمونه‌ی بتالاکتامازهای وسیع الطیف ۴ نمونه (۲۰ درصد) از نمونه‌ها دارای ژن مقاومت bla_{SHV} و ۱۶ نمونه (۸۰ درصد) نمونه‌ها دارای bla_{SHV} به صورت bla_{SHV} مثبت و CTX مثبت بودند (۲۱). در مطالعه‌ی چانگ و همکاران در ژاپن تقریباً ۵۰ درصد نمونه‌های به دست آمده به صورت بتالاکتامازهای وسیع الطیف گزارش گردیده است و دارای ژن‌های مقاومت بودند (۲۲).

در مورد دیگر آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه نیز نتایج مشابه یا متفاوتی با دیگر محققان از ایران یافت شد که این اختلافات می تواند ناشی از اختصاصات بومی هرمنطقه، 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 ایزوله های *کلبسیلا پنومونیه* مورد بررسی در مطالعه حاضر دارای مقاومت چندگانه به آنتی بیوتیک مختلف هستند که این خود خطر استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها را در سطح جامعه دو چندان می کند (۲۳).

در قسمت دیگر از این تحقیق، ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مورد بررسی قرار گرفتند و از روش PCR چندگانه جهت ردیابی ژن های مورد مطالعه استفاده شد که نتایج نشان داد ژن $aac(3)IIa$ (کد کننده مقاومت به جنتامایسین) با فراوانی ۸۳/۳۳ درصد و ژن qnr (کد کننده مقاومت به سیپروفلوکساسین) با فراوانی ۱۶/۱۶ درصد از ایزوله‌های *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 یه 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 آنتی بیوتیکی باشند. این پلاسمیدها به سهولت بین سویه‌ها و گونه‌های مختلف از پاتوژن های روده ای منتقل می‌شوند (۲۶-۲۴). در تحقیق حاضر فراوانی ژن *sul 1* ۴۵/۴۵ درصد برآورد گردید که در تجزیه و تحلیل آماری با توجه آزمون کای بین دو ژن مقاومتی و آنتی بیوتیک رابطه معنی دار آماری مشاهده گردید *(P < 0/05)*. با توجه به مشاهده ی روز افزون مقاومت به برخی از آنتی بیوتیک‌ها و تغییرات گسترده ی 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 آنتی بیوتیکی در باکتری *کلبسیلا پنومونیه* عامل عفونت ادراری و هم‌چنین درصد بالای ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک در افراد مورد مطالعه می‌تواند نشان دهنده ی مصرف بی رویه ی آنتی بیوتیک‌ها باشد. باتوجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها تشخیص سریع و به موقع سویه‌های مقاوم به منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب وجلوگیری ازگسترش 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 Antimicrobial 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):352-325.

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. World Health Day 2011: Antimicrobial Resistance and Practical Solutions. Ann Acad Med Singapore. 2011; 40(4): 156-152.

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 Scin 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; 151-193.

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):3200-3202.

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): 7-19.

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): 5444-5452.

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. Kerrn 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.

17. Soltan dallal, Mm; Sharifi yazdi, Mk. Comparison of multiple antibiotic resistance patterns of Klebsiella bacteria groups causing urinary infections and determination of imipenem MIC in MDR strains. *J of Advances in Medical and Biomedical Research*, 2014; 6(4): 28-37.

18. Al Shara MA. Emerging Antimicrobial Resistance of *Klebsiella pneumonia* strains

Isolated from pediatric patients in Jordan. The New Iraqi Journal of Medicine 2011; 7(2): 29-32.

19. Jalalpoor, Sh. Antibiotic resistant pattern in ESBLs producer Klebsiella pneumoniae strains isolated of hospitalized and out patients acquired urinary tract infection. *J. of Isfahan Medical School*, 2011; 29(142): 695-706.

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 coliKlebsiella 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 b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a long-term study from Japan EurJ Clin Microbiol Infect Dis. 2001: 30 (1): 83–87.

23. Carattioli 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 1integron 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.

Determination of phenotypic and genotypic patterns of antibiotic resistance in Klebsiella pneumoniae isolates isolated from clinical cases in Shahrekord city

Fatemeh Khodaverdipour[1*], Fatemeh Mombini[2], Khatam Amin-or-Raiaei[3]

1.Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2.Department of Biology, Masjed Soleiman Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3.Master of Science in Animal Nutrition, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author: fatemeh75.khodaverdi@gmail.com

Abstract

A significant portion of clinical samples are contaminated with *Klebsiella* species. The antibiotic resistance of *Klebsiella* is increasing daily, making it essential to conduct antibiotic susceptibility tests prior to prescribing antibiotics. The aim of this study was to determine the phenotypic and genotypic patterns of antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from clinical cases in Shahrekord. This study was conducted on 90 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from 5,000 clinical samples collected from patients referred to diagnostic laboratories in Shahrekord. All isolates were confirmed using biochemical methods and molecular techniques based on the detection of the 16S rRNA gene, and their antibiotic resistance was assessed using the disk diffusion method. The presence of resistance genes *(qnr, tetA, tetB, aac(3)-IIa, and sul1)* was investigated using specific primers. Among the 90 isolates examined, the highest resistance was observed to penicillin (93.75%), while the highest sensitivity was to vancomycin (100%). The *aac(3)-IIa* gene (encoding resistance to gentamicin) was the most prevalent resistance gene, detected in 83.33% of isolates, while the *qnr* gene (encoding resistance to ciprofloxacin) was the least prevalent, detected in 16.16% of isolates. Given that *Klebsiella pneumoniae* with multidrug resistance poses a serious threat to patients admitted to hospitals in Shahrekord, monitoring antibiotic use and identifying resistant isolates can help prevent the development of bacterial resistance.

Keywords: Antibiotic resistance genes, Klebsiella pneumoniae, infection, hospital.