شناسایی مولکولی ژن‌های TEM و CTX در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جداشده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های شهر ایرانشهر

مهناز تقی مصلح[1]، لاله خواجه کریم‌الدینی[2*]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران
۲. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۸)

چکیده

زمینه و هدف: کلبسیلاپنومونیه یک باکتری بیماریزای گرم منفی و عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی است. افزایش ظهور مقاومت به چند دارو در کلبسیلا پنومونیه گزینه‌های درمانی را برای این باکتری محدود کرده است. هدف این تحقیق شناسایی مولکولی ژن‌های TEM و CTX در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های شهر ایرانشهر می‌باشد.

روش تحقق: تعداد ۵۰ سویه کلبسیلا پنومونیه ظرف مدت ۶ ماه، از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های شهر ایرانشهر جمع آوری شد. ایزوله‌ها بر اساس تست‌های بیوشیمیایی به عنوان کلبسیلا پنومونیه شناسایی شدند. تست حساسیت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن انجام گردید. جهت شناسایی مولکولی ژن‌های TEM و CTX، PCR انجام گردید.

یافته‌ها: براساس نتایج PCR از تعداد ۴۳ (۸۶٪) نمونه که به طور فنوتیپی دارای آنزیم‌های ESBL بودند، تعداد ۲۰(۴۷٪) ایزوله دارای ژن CTX، ۸ مورد (۱۸٪) دارای ژن TEM، و ۱۵ مورد (۳۴٪) دارای هر دو ژن CTX و TEM بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه شیوع بالایی($p<0/05$) از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو و تولید کننده ESBL را در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه نشان می دهد که این امر بر سیاست‌های مناسب برای کنترل عفونت تاکید دارد.

کلیدواژگان

CTX، PCR، TEM، کلبسیلا پنومونیه، مقاومت آنتی بیوتیکی.

* نویسنده مسئول، رایانامه: laleh.khajehkarimaldini@gmail.com

مقدمه

جنس کلبسیلا شامل باکتری‌های گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، غیرمتحرک و از خانواده انتروباکتریاسه هستند. این باکتری‌ها به عنوان پاتوژن فرصت طلب و عامل عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی می‌باشند[۱]. از جمله عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌توان به پنومونی، عفونت‌های ادراری، سپتی سمی، عفونت زخم، عفونت‌های تنفسی آبسه‌های کبدی و مننژیت اشاره کرد[۲]. گونه‌های کلبسیلا انتشار وسیعی داشته و توانایی رشد در شرایط نامساعد محیطی را نیز دارند. در این جنس کلبسیلا پنومونیه مهم ترین گونه بیماری زا است که عامل ایجادکننده عفونت‌های مجرای ادراری و داخل شکمی و نیز پنومونی در بیماران بستری با اختلال در سیستم ایمنی می‌باشد و بعد از اشریشیاکلی در ایجاد عفونت‌های خونی در جایگاه دوم قرار دارد[۳]. از سال ۱۹۸۴ کلبسیلا پنومونیه به عنوان عامل عفونت‌های اکتسابی بیمارستانی و حامل مقاومت‌های چند گانه شناخته شده است[۴]. نتایج مطالعات در کشورهایی مانند یونان، فرانسه، نروژ، سوئد و انگلستان شیوعی بالای ۱۰/۸ درصد را در میان سویه‌های کلبسیلا جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی نشان می دهد[۵]. بروز مقاومت دارویی در میان باکتری‌های پاتوژن موجب شده تا روزانه افراد زیادی در سراسر جهان قربانی بیماری‌های عفونی گردند[۶]. تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های بیماریزای شایع جهت درمان علیه یک پاتوژن خاص حائزاهمیت است[۷]. استراتژی‌های مختلفی توسط باکتری‌ها به کار گرفته می‌شود تا از اثرات زیانبار آنتی بیوتیک‌ها مصون بمانند، یکی از این مکانیسم‌ها که در باکتری‌های گرم منفی علیه آنتی بیوتیک‌ها به کار گرفته می‌شود تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی (Beta-Lactamase enzymes) است[۸]. به دنبال رشد روزافزون ارگانیسم‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف امروزه شاهد گزارش‌های متعددی مبنی بر شیوع گسترده آن‌ها در بخش‌های مراقبت ویژه هستیم که این امر غالباً به دلیل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها و داروهای بتالاکتام وسیع الطیف دراین بخش می باشد[۹]. اولین مورد ESBL در سال ۱۹۸۰ در اروپا و بعد از آن در آمریکا و پس از معرفی نسل سوم سفالوسپورین‌ها گزارش شد. از مهمترین ESBLهایی که مورد بررسی قرار گرفته اند TEM و CTX می‌باشند[TEM۱۱۰] در سال ۱۹۶۰ به عنوان اولین آنزیم بتالاکتامازی در باکتری‌های گرم منفی که انتقال آن به واسطه پلاسمید صورت می‌گیرد، از کشت خون یک بیمار به نام Temoniera در یونان مورد شناسایی قرار گرفت. با جایگزینی اسیدهای آمینه مختلف در جایگاه فعال این آنزیم، انواع مختلفی از بتالاکتاماز TEM1 به وجود آمد تا جایی که تا کنون بیش از ۱۰۰ نوع آنزیم TEM موردشناسایی قرار گرفته‌اند. شیوع این آنزیم‌ها در نواحی مختلف متفاوت گزارش شده است[CTXM۱۱][1] نیز گروهی دیگر ازESBLها هستند که اولین بار در سال ۱۹۸۹ در کشور آلمان شناسایی شدند و بر اساس تغییرات توالی آمینواسیدی به پنج گروه CTX M1، CTX M2، CTXM8، CTXM9 و CTXM25 تقسیم‌بندی می‌شوند [۱۲و۱۳]. عموماً اعضای خانواده CTX-M، سفوتاکسیم و سفتریاکسون را بهتر از سفتازیدیم هیدرولیز می‌کنند. آن‌ها به وسیله تازوباکتام بیشتر از اسیدکلاوولانیک مهار می‌شوند[۱۴]. ماهیت متحرک بودن ژن‌های ESBL می‌تواند به انتشار آن‌ها دامن زده و سبب ایجاد ایزوله‌هایی شود که به طور همزمان چندین ژن مقاومت را حمل می کنند. عفونت با پاتوژن‌های تولیدکننده ESBL اغلب همراه با شکست درمان،

1. CefoTaXime Munich: which stands for ‘active on CefoTaXime, first isolated in Munich’

طولانی تر شدن زمان بستری، نرخ بالای مرگ و میر و هزینه‌های بالای درمان همراه است[۱۵]. شناسایی ژن‌های شایع مولد ESBLها از قبیل TEM و CTX با استفاده از روش‌های مولکولی در باکتری‌های تولیدکننده ESBL و بررسی الگوی مقاومت دارویی آن‌ها می‌تواند اطلاعات مفیدی در رابطه با اپیدمیولوژی و درمان ضد میکروبی منطقی در مقابل ارگانیسم‌های تولیدکننده ESBL فراهم سازد[۱۶]. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) یکی از روش‌های ملکولی است که می‌توان به عنوان یک روش دقیق و حساس استفاده کرد. با توجه به حساسیت تشخیصی بالا، PCR به عنوان روشی مناسب می‌باشد. بنابراین لازم است که شیوع باکتری‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف در هر منطقه ای مشخص شود تا تدابیر درستی برای درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این ارگانیسم‌های مقاوم به کار رود[۱۷]. هدف این مطالعه شناسایی هویت مولکولی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی درایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های شهر ایرانشهر می‌باشد.

روش تحقیق

این مطالعه به صورت توصیفی- مقطعی در سال ۱۳۹۶ در یک دوره ۶ ماهه، جمعاً بر روی ۵۰ نمونه هدفمند جدا شده از ترشحات دستگاه تنفسی بیماران در شهر ایرانشهر انجام گرفت. نمونه گیری از افراد، پس از مشخص نمودن هدف مطالعه برای آن‌ها و کسب رضایت کتبی آگاهانه از هر یک از افراد تحت مطالعه، صورت پذیرفت (کد اخلاق: IR. KMU. REC. 1397. 61) ایزوله‌ها بر اساس تست‌های بیوشیمیایی به عنوان کلبسیلا پنومونیه شناسایی شدند. پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، کلنی‌هایی که ویژگی‌های کلبسیلا پنومونیه را داشتند، تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل TSI ، SIM، MR-VP، سیترات و اوره صورت گرفت و باکتری کلبسیلا پنومونیه جداسازی شد. محیط کشت‌های مصرفی از شرکت (Merck آلمان و Himedia هند) خریداری گردید.

تست حساسیت آنتی بیوتیکی

حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری‌های جدا شده به روش دیسک دیفیوژن براساس دستورالعمل CLSI سال ۲۰۱۷ انجام شد وآنتی بیوتیک‌های مورد استفاده شامل دیسک‌های ایمی پنم(10 µg) ، سفتازیدیم(µg 30)، سفوتاکسیم(30 µg)، سفتریاکسون(30 µg)، سیپروفلوکساسین(5 µg) ، آمیکاسین(30 µg) ، آزترونام (30 µg)، سفالوتین (30 µg) بودند که از شرکت Himedia هند خریداری شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، ایزوله‌های مولد ESBL از طریق ایجادهاله عدم رشد به میزان حداقل ۵ میلی متر یا بیشتر در اطراف دیسک‌های سفتازیدیم کلاولانیک اسید یا سفوتاکسیم کلاولانیک اسید مشخص گردیدند.

استخراجDNA

پس از تعیین ایزوله‌هایی که از نظر فنوتیپی مثبت بودند، DNA نمونه‌های شناسایی شده با استفاده از کیت Oiagen, Hilden (Germany) استخراج گردید.

آزمون PCR

تستPCR با کیت(Master mix شرکتTakara، ژاپن) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر گردیده است[۱۸]. جهت انجام PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در لوله‌های اپندروف از مخلوط کردن ۱۴/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۳ میکرولیتر از DNA باکتری با غلظت ۵۰ نانوگرم، (10 pmol) ۱ میکرولیتر از هر یک پرایمرهای رفت و

برگشتی(جدول ۱) و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد و همچنین واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر(peqStar 96 HPL Gradient) برای ژن CTX و TEM طبق برنامه (جدول ۲ و۳) انجام گردید. استانداردهای کنترل مثبت مورد استفاده در این پژوهش عبارت بودند از سویه‌های ATCC 700603 برای ژن CTX و ATCC 43816 برای ژن TEM و کنترل منفی سویه اشرشیا کلی ATCC 25922 بود[۱۸].

پس از انجام آزمایش PCR محصولات PCR، در ژل آگارز ۱/۵٪ در بافر x1 TBE به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ الکتروفورز شد و براساس باندی که محصولات PCR در دستگاه Gel documentation مشاهده شد، مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱- پرایمرهای به کار رفته در PCR [۱۸]

پرایمر	توالی الیگونوکلئوتیدی	اندازه محصول (باز)
TEM	TEM F 5'- GAGTATTCAACATTTCCGTGTC - 3' TEM R 5'- TAATCAGTGAGGCACCTATCTC - 3'	۸۰۰
CTX	CTX-MU1 5'- ATGTGCAGTACCAGTAAGGT- 3' CTX-MU2 5'- TGGGTAAAGTAGGTCACCAGA - 3'	۵۹۴

جدول ۲- برنامه درجه حرارت و زمان جهت PCR ژن CTX

نام مرحله	درجه حرارت	مدت زمان	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	۹۴°C	۵ دقیقه	۱
واسرشت ثانویه	۹۴°C	۴۵ ثانیه	۳۰
اتصال پرایمرها	۵۶°C	۳۵ ثانیه	
گسترش اولیه	۷۲°C	۴۵ ثانیه	
گسترش نهایی	۷۲°C	۵ دقیقه	۱

جدول ۳- برنامه درجه حرارت و زمان جهت PCR ژن TEM

نام مرحله	درجه حرارت	مدت زمان	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	۹۴°C	۵ دقیقه	۱
واسرشت ثانویه	۹۴°C	۴۵ ثانیه	۳۵
اتصال پرایمرها	۶۰°C	۴۵ ثانیه	
گسترش اولیه	۷۲°C	۶۰ ثانیه	
گسترش نهایی	۷۲°C	۵ دقیقه	۱

جدول ٤- درصد مقاومت ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه علیه آنتی‌های مختلف

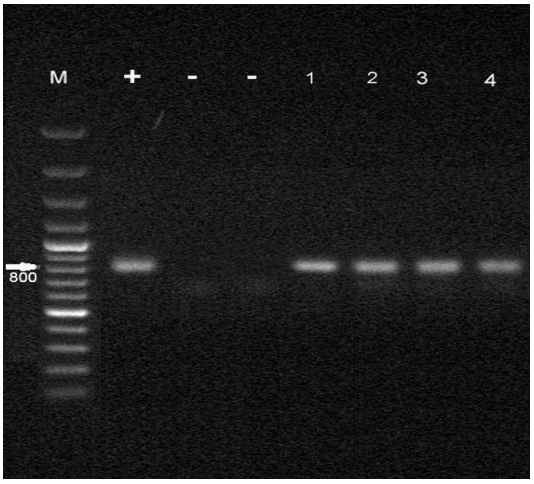
آنتی بیوتیک	حساس	نیمه حساس	مقاوم	کلبسیلا دارای ESBL	کلبسیلا فاقد ESBL	سطح معنی‌داری
ایمی پنم	٪ ۸۶/۴	٪ ۴/۱	٪ ۹/۴	٪ ۱۴/۲	٪ ۰/۰	۰/۰۰۱
آزترونام	٪ ۴۷/۸	٪ ۰/۰	٪ ۵۲/۱	٪ ۷۳/۹	٪ ۰/۰	۰/۰۰۰
آمیکاسین	٪ ۷۲/۹	٪ ۱۰/۱	٪ ۱۶/۹	٪ ۳۰/۴	٪ ۰/۰	۰/۰۰۵
سفالوتین	٪ ۳۹/۳	٪ ۱/۴	٪ ۵۹/۲	٪ ۹۶/۶	٪ ۱۷/۵	۰/۰۰۳
سفتازیدیم	٪ ۴۵/۰۵	٪ ۰/۰	٪ ۵۴/۸۵	٪ ۹۳/۷	٪ ۰/۰	۰/۰۰۰
سفتریاکسون	٪ ۴۳	٪ ۰/۰	٪ ۵۶/۹	٪ ۹۶/۳	٪ ۵/۱	۰/۰۰۰
سفوتاکسیم	٪ ۳۶/۲۵	٪ ۳/۲	٪ ۶۰/۴۵	٪ ۹۶/۸	٪ ۸/۳	۰/۰۰۰
سیپروفلوکساسین	٪ ۸۳/۹	٪ ۳/۸	٪ ۱۲/۲	٪ ۲۹/۵	٪ ۰/۰	۰/۰۰۴

یافته‌ها

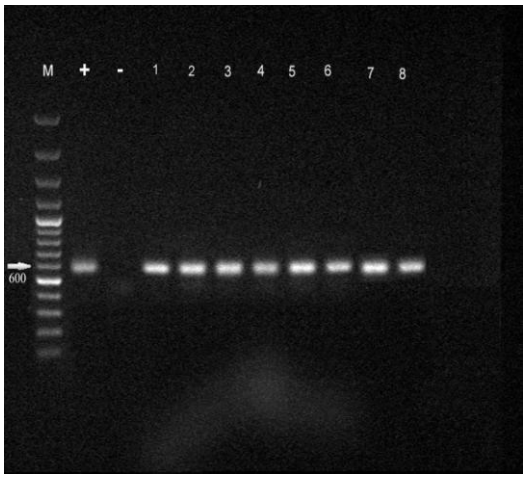
در این مطالعه نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که موثرترین آنتی بیوتیک علیه ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه آنتی بیوتیک ایمی پنم می‌باشد بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (۶۰/۴۵٪) می‌باشد. همچنین مقاومت به آنتی بیوتیک‌های آزترونام، سفالوتین، سفتریاکسون، سفتازیدیم (۵۰٪ ≤) در سطح بالایی می‌باشد و آنتی بیوتیک‌های نظیر آمیکاسین و سیپروفلوکساسین، آنتی‌بیوتیک‌های موثری علیه ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه بودند (شکل۱). جدول ۳ جزئیات بدست آمده از نتایج آنتی بیوگرام را نشان می‌دهد. نتایج دیسک‌های ترکیبی جهت شناسایی فنوتیپی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه نشان دادند که تعداد ۴۳ (۸۶٪) نمونه به طور فنوتیپی دارای آنزیم‌های ESBL بودند.

براساس نتایج PCR از تعداد ۴۳ (۸۶٪) نمونه که به طور فنوتیپی دارای آنزیم‌های ESBL، تعداد ۲۰(۴۷٪) سویه دارای ژن‌های CTX، ۸ مورد (۱۸٪) دارای ژن TEM، و ۱۵ مورد (۳۴٪) دارای هر دو ژن CTX و TEM بودند (شکل ۲ و ۳).

شکل ۱- نتایج بدست آمده از ارزیابی فنوتیپی مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها به روش دیسک دیفیوژن آگار



شکل ۲- ژل آگاروز حاوی قطعه 800 pb تکثیر شده ژن TEM. از چپ به راست : M مارکر یا لدر (100bp DNA ladder)، کنترل مثبت (کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603)، کنترل منفی (اشرشیا کلی ATCC 25922) نمونه‌های شماره ۱و۲و۳و۴ از لحاظ حضور ژن TEM مثبت اعلام گردید.



شکل ۳- ژل آگاروز حاوی قطعه 600 pb تکثیر شده ژن CTX. از چپ به راست : M مارکر یا لدر (DNA ladder 100bp شرکت سیناژن)، کنترل مثبت (کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603)، کنترل منفی (اشرشیا کلی ATCC 25922) نمونه‌های شماره ۱و۲و۳و۴و۵و۶ و ۷ و ۸ از لحاظ حضور ژن CTX مثبت اعلام گردید.

بحث

کلبسیلا پنومونیه از باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که از نظر کلینیکی نقش مهمی در ایجاد عفونت بیمارستانی و عفونت مجاری ادراری ایفا می‌کند. متاسفانه مصرف بی رویه‌ی آنتی بیوتیک‌ها در دهه‌های

اخیر موجب افزایش ظهور سویه‌های مقاوم با مقاومت چندگانه‌ی دارویی در باکتر ی‌های روده ای گرم منفی از جمله کلبسیلا پنومونیه شده است، به طوری که این باکتری‌ها با تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف یا ESBL نسبت به آنتی بیوتیک‌هایی نظیر سفالوسپورین، پنی سیلین، سیپروفلوکساسین و سفوتاکسیم مقاومت نشان می‌دهند و وجود ژن کد کننده ی آنزیم‌های بتالاکتامازی و انتقال آن در بین باکتری‌های گرم منفی روده‌ای یک تهدید بزرگ برای مصرف‌کنندگان سفالوسپورین‌های با طیف وسیع به شمار می‌آیند[۱۸]. در این مطالعه مقاومت به آنتی بیوتیک‌های آزترونام، سفالوتین، سفتریاکسون، سفتازیدیم در سطح بالایی وجود داشت که مقاومت به این چهار آنتی بیوتیک بالای ۵۰٪ بود که در آینده می‌تواند این مقاومت‌ها بیشتر شده و ایجاد مشکلاتی در درمان کند، از طرفی حدود ۹۰٪ سویه‌ها به ایمی پنم حساس بودند. مطالعات زیادی در ایران انجام شده است که تایید کننده نتایج بدست آمده از این مطالعه می‌باشد.

در مطالعه ای که توکل و ممتاز در تهران در سال ۱۳۹۳ انجام دادند بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مربوط به آنتی بیوتیک تتراسایکلین بود. تنها ۲ درصد از ایزوله‌ها نسبت به جنتامایسین و ایمی پنم مقاوم بودند. که این امر نشان می‌دهد در حال حاضر این دو آنتی بیوتیک داروهای موثر بر کلبسیلا پنومونیه می باشند[۱۹].

همچنین در مطالعه ای که توسط آرچین و همکاران در شیراز در سال ۱۳۹۲ انجام شد بیشترین درصد مقاومت نسبت به آمپی سیلین ۱۰۰ درصد و میزان حساسیت ایزوله‌ها به ایمی پنم ۱/۶۶ درصد بود[۲۰]. این نتایج با نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر مطابقت دارد که می‌تواند ناشی از قرابت این گونه ها در این مناطق باشد.

در مطالعه ای که مشعوف و همکاران در همدان در سال ۲۰۱۴ انجام دادند، موثرترین آنتی بیوتیک علیه ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه آنتی بیوتیک ایمی پنم اعلام شد[۲۱]. همچنین در مطالعه ای که توسط فیض آبادی و همکاران در تهران در سال ۲۰۱۰ انجام شد تمامی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به آنتی بیوتیک ایمی پنم حساس بودند و مقاومت به سیپروفلوکساسین و افلوکساسین در سطح پایینی وجود داشت اما مقاومت به سفالوسپورین‌ها در سطح بالایی وجود داشت[۲۲]. با اینکه مقاومت به آنتی بیوتیک ایمی پنم در اکثر مطالعات بسیار پایین می‌باشد اما باید توجه داشت از مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک در درمان جلوگیری شود تا مقاومت به این آنتی بیوتیک افزایش نیابد.

در مطالعات Amin و همکاران (۲۰۱۲) در کشور پاکستان[۲۳]، Al-shara و همکاران(۲۰۱۱) در اردن[۲۴]، Ishii و همکاران (۲۰۰۵) در کشور ژاپن[۲۵]، و Bratu و همکاران (۲۰۰۵) در آمریکا نیز آنتی بیوتیک ایمی پنم به عنوان یک آنتی بیوتیک موثر در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری کلبسیلا پنومونیه معرفی شده است[۲۶].

جزایری و همکاران میزان مقاومت سویه‌های کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین را در شهر سمنان ۹۲/۶٪ گزارش نمودند[۲۷]. در تحقیقی که به وسیله پیروزی و همکاران بر روی باکتری کلبسیلا پنومونیه در شهر اصفهان انجام شد، مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک آمیکاسین را ۵۳/۵٪ گزارش نمودند[۲۸]. این نتایج با نتایج حاصل از مطالعه حاضر تفاوت زیادی دارد که این اختلاف می‌تواند ناشی از عوامل اپیدمیولوژیکی، شرایط جغرافیایی، معیارهای کنترل عفونت در بیمارستان و نحوه تجویز آنتی بیوتیک باشد.

حضورESBL در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه در شهرستان ایرانشهر بالا بوده که این امر نشان دهنده اهمیت درمان آنتی بیوتیکی منطقی، جلوگیری از

گسترش این سویه‌ها در بیمارستان‌ها و درک پیامدهای بالینی ناشی از عفونت با ارگانیسم‌های مولدESBL می‌باشد. مطالعات و گزارش‌های متعددی در خصوص افزایش و شیوع رو به رشد ارگانیسم‌های مولد ESBL مناطق مختلف در کشور وجود دارد. به نحوی که افزایش شیوع ارگانیسم‌های مولدESBL باعث ایجاد نگرانی شده است. در مطالعات مختلف، میزان شیوع جدایه‌های تولیدکننده ESBL در شهرهای مختلف ایران (بین سال‌های ۱۳۹۳- ۱۳۸۳)، از ۸۳-۳۳٪ متفاوت گزارش شده است. طی تحقیقی که در سال‌های ۲۰۰۳-۱۹۹۷ انجام گرفت، به طور میانگین ۳۰٪ ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه با منشا بیمارستانی، تولیدکننده ESBL بودند[۲۹]. بر اساس نتایج حاصل از پژوهش میرصالحیان و همکاران در سال ۲۰۰۶ در ایران مشخص گردید ۷۶/۷۴٪ درصد از گونه‌های کلبسیلا جداسازی شده از بخش‌های مراقبت ویژه مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بوده اند[۳۰]. در مطالعه اکیا و همکاران در سال ۱۳۹۶ مشخص گردید ۴۰٪ از ایزوله‌ها، تولیدکننده ESBL بودند. فراوانی ESBL در کشورهای مختلف از ۸۵٪ درروسیه، ۶۶/۷٪ در هند، ۵۷/۸٪ در ترکیه متفاوت بوده است[۲۹]. مقایسه این نتایج نشان می‌دهد شیوع تولید ESBL در کشورهای مختلف، همچنین در یک کشور از یک شهر به شهر دیگر؛ حتی در زمان‌های مختلف در یک نقطه، متفاوت است و از دلایل ایجاد این تفاوت‌ها می توان به شرایط جغرافیایی، شیوه زندگی و نحوه تجویز آنتی بیوتیک اشاره کرد.

معمولا حضور ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی عامل اصلی بروز مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های باکتری است. نتایج PCR برای شناسایی ژن‌های ایجادکننده مقاومت آنتی بیوتیکی در ۵۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه نشان داد که در مجموع از تعداد ۴۳ (۸۶٪) نمونه که به طور فنوتیپی دارای آنزیم‌های ESBL، تعداد ۲۰(۴۷٪) سویه دارای ژن‌های CTX، ۸ مورد (۱۸٪) دارای ژن TEM، و ۱۵ مورد (۳۴٪) دارای هر دو ژن CTX و TEM بودند.

در مطالعه آهنجان و همکاران که در سال ۱۳۹۳ در شهرستان ساری انجام گردید فراوانی ژن‌های TEM و CTX به ترتیب ۵۵ و ۴۵ درصد تعیین گردید که میزان شیوع ژن TEM نسبت به مطالعه حاضر بسیار بالاتر است[۱۸]. همچنین مطالعه ای که توسط مزیانی و همکاران در سال ۱۳۸۶ در تهران صورت گرفت ۶۰ درصد ایزوله‌ها حاوی ژن TEM بودند[۳۱]. در مطالعه مسجدیان ۸۶/۴ درصد نمونه‌ها ژن TEM را داشتند. مقایسه نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با مطالعات مذکور نشان دهنده شیوع بالای تیپ آنزیمی TEM در دیگر نقاط کشور است[۳۲]. بنابراین ضروری است که برای شناسایی این نوع از مقاومت از روش‌های مولکولی در کنار روش‌های فنوتیپی استفاده شود و باید تحقیقات مشابهی در نقاط مختلف کشور صورت گیرد تا ژنوتیپ‌های بتا لاکتامازی وسیع الطیف در نواحی جغرافیایی مختلف به دست آید.

در بین سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۳ برنامه SENTRY ناحیه آسیای آرام گزارش داد که ۲۵ درصد سویه‌ها دارای آنزیم CTX بودند[۲۰] در صورتی که در مطالعه حاضر ۴۷ درصد از سویه‌ها حاوی ژن CTX بودند. تعداد بتالاکتامازهای وسیع الطیف نوع CTX به سرعت در حال توسعه می‌باشند. آن‌ها در برخی نواحی جغرافیایی شناسایی شده اند و امروزه از متداول ترین نوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سرتاسر جهان محسوب می‌شوند.

سروش و قانع در سال ۱۳۹۶ در تهران مطالعه ای با هدف شناسایی مولکولی بتالاکتامازهای TEM و CTX در کلبسیلا پنومونیه انجام دادند که نتایج نشان داد از بین ژن‌های تولیدکننده ESBL، CTX (۵۵/۳ درصد) شایع ترین ژن بود و بعد از آن TEM (۴۱/۵ درصد) و ۲۱/۶ درصد ایزوله‌ها ژن‌های TEM و CTX

را با هم داشتند که تا حدودی با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد[۳۳].

در مطالعه سرو آزاد و همکاران (۱۳۹۵) مشخص گردید ۳۵/۰۵ درصد جدایه‌ها دارای ژن CTX و ۹/۲۷ درصد از نمونه‌ها دارای ژن TEM بودند[۳۴].

وفایی و همکاران نیز در سال ۱۳۹۱ در تهران، میزان مقاومت به آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف و شیوع ژن CTX را بر روی ۵۰۰ نمونه کلینیکی مورد بررسی قرار دادند که طبق یافته‌های آن‌ها، ۲۰ درصد نمونه‌ها مولد ESBL و ۱۹ درصد از نمونه‌ها حاصل ژن کد نند بتالاکتامازی CTX بودند[۳۵].

همچنین در بررسی‌های انجام شده در سال ۲۰۰۶ در کشور بولیوی انجام شده بود، میزان نمونه‌های مثبت برای ژن‌های TEM و CTX به ترتیب ۲۶/۱ و ۳۰/۴ درصد بوده است[۳۶].

گزارشات نشان داده است که میزان شیوع ژن‌های TEM و CTX در انتروباکتریاسه‌های جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان دوحه قطر بین سال‌های ۲۰۱۳- ۲۰۱۲ به ترتیب ۴۰/۴ و ۶۴/۱ درصد بوده است[۳۷].

آنچه مسلم است رشد همزمان و همسوی مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام بیشتر به واسطه آنزیم *CTX* در سطح جهان و ایران می‌باشد که اهمیت مطالعات جامع و برنامه‌های کنترل گسترش مقاومت را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

این نتایج مؤید خطر جدی افزایش شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در عفونت‌های بیمارستانی و افزایش مرگ ومیر ناشی از این عفونت‌ها بوده که بالا بودن میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در بین ارگانیسم‌های ایجادکننده عفونت‌های بالینی پیشنهادکننده بررسی مکانیسم‌های موثر در ایجاد مقاومت و بررسی فعالیت ضد میکروبی داروهای جدید در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند به روند درمان مؤثر این عفونت‌ها کمک نماید. در نتیجه نیاز به سیستم نظارت مستمر و اقدامات مؤثر کنترل عفونت ضرورت دارد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

منابع و مآخذ

1. Hadžić S, Čustović A, Smajlović J, Ahmetagić S. Distribution of nosocomial infections caused by Klebsiella pneumoniae ESBL strain. *J Environ Occup Sci*. 2012;1(3):141-6.
2. Patwardhan RB, Dhakephalkar PK, Niphadkar KB, Chopade BA. A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multiresistant Acinetobacter baumannii harbouring multiple plasmids. *Indian J. Med. Res*. 2008;128(2):178.
3. Levy I, Ovadia B, Erez E, Rinat S, Ashkenazi S, Birk E, Konisberger H, Vidne B, Dagan O. Nosocomial infections after cardiac surgery in infants and children: incidence and risk factors. *J Hosp Infect*. 2003;53(2):111-6.
4. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev*. 1998;11(4):589-603.
5. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 60(3): 470–82.
6. Thomas JG, Posey SP. Emergence of oral/dental microbiology. *Adv Adm Lab* 2009; 18(6): 35-8.
7. Silvestri L, van Saene H. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med*. 2010;363(15):1482-1486.
8. Tankhiwale SS, Jalgaonkar SV, Ahamad S, Hassani U. Evaluation of extended spectrum beta lactamase in urinary isolates. *Indian J Med Res*. 2004;120(6):553-6.
9. Galas M, Decousser JW, Breton N, Godard T, Allouch Py. College de bacteriology virology hygiene (colBVH) study group. Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended- spectrum beta lactamase producing Enterobacteriaceae in france. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(2): 786- 9.
10. Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. *J. Clin. Microbiol*. 1996;34(4):908-11.
11. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of bla CTX-M-type and bla PER-2 β-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother*. 2006;57(5):975-8.
12. Młynarczyk G1, Młynarczyk A, Bilewska A, Dukaczewska A, Goławski C, Kicman A, et all. Effectiveness of the method with cefpirome in detection of extended-spectrum beta-lactamases in different species of gramnegative bacilli. *Med Dosw Mikrobiol*. 2006; 58 (1): 59-65.
13. Sarvazad H, Darbouy M. Correlation of Antibiotic Resistance with SHV, CTX-M and TEM Extended-Spectrum Beta Lactamases Genes among Klebsiella pneumoniae Isolates from Patients in Kermanshah Hospitals. *J Ardabil Univ Med. Sci.* 2017;17(3):353-62.
14. Malloy AM, Campos JM. Extended-spectrum beta-lactamases: a brief clinical update. *Pediatr Infect Dis J*. 2011; 30(12): 1092–3.
15. Geyer CN, Hanson ND. Rapid PCR amplification protocols decrease the turn-around time for detection of antibiotic resistance genes in Gram-negative pathogens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013;77(2):113-7.
16. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005;18(4):657-86.
17. Prabha L. Arti KB. Occurrence of TEM, SHV gene in extended Spectram β-Lactamases (ESBLs) Producing Klebsiella SP. isolated from atertiary care hospital. *Indian J Med Res*. 2007;125:173-8.
18. Ahanjan M, Naderi F, Solimanii A. Prevalence of Beta-lactamases Genes and Antibiotic Resistance Pattern of Klebsiella pneumoniae Isolated from Teaching Hospitals, Sari, Iran, 2014. J. Mazandaran Univ. Med. Sci. 2017;27(149):79-87.

19. Tavakol M, Momtaz H. Determination of antibiotic resistance profile in Klebsiella pneumonia strains isolated from urinary tract infections of patients hospitalized in Peyambaran hospital (Tehran-Iran). *Fiyz*. 2017; 21(1):74-82.

20. Archin T, Afzalian E, Kargar M, Ghasemi Y. Molecular identification of shv, tem, ctx-m β lactamases genes and antibiotics resistance pattern of k. pneumoniae isolates collected from icu patients of namazi hospital, shiraz, iran. *Armaghane Danesh Bimonthly Journal*. 2014;18(10):816-25.

21. Mashouf RY, Alijani P, Saidijam M, Alikhani MY, Rashidi H. Study of antibiotic resistance pattern and phenotypic detection of ESBLs in Klebsiella pneumoniae strains isolated from clinical samples and determination of minimum inhibitory concentrations of imipenem and ceftazidim antibiotics. *Sci. J. Hamadan Univ. Med. Sci*. 2014; 20(4):295-302.

22. Feizabadi MM, Mahamadi-Yeganeh S, Mirsalehian A, Mirafshar SM, Mahboobi M, Nili F, Yadegarinia D. Genetic characterization of ESBL producing strains of Klebsiella pneumoniae from Tehran hospitals. *J. Infect. Dev. Countries*. 2010; 4(10):609-15.

23. Amin A. ghumro PB, Hussain S, Hameed A. Prev-alence of antibiotic resistance among clinical isolates of Klebsiella pneumoniae isolated from a tertiary care Hospital in Pakistan. *Malaysian J Microbiol*. 2009; 5:81-6.

24. Al Shara MA. Emerging antimicrobial resistance of klebsiella pneumonia strains isolated from pediatric patients in jordan. *New Iraqi J Med*. 2011; 7(2):29-32.

25. Ishii Y, Alba J, Kimura S, Shiroto K, Yamaguchi K. Evaluation of antimicrobial activity of β-lactam antibiotics using Etest against clinical isolates from 60 medical centres in Japan. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2005; 25(4):296-301.

26. Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, et al. Carbapenemaseproducing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(1): 128–32.

27. Langharizadeh N, Ahangharzadeh Rezai M, Aghazadeh M, Hasani A. Comparison of the prevalence of drug resistance in Klebsiella pneumoniae Urinary Tract Infection children and adults with educational health centers of Tabriz. *Biol Sci J Islamic Azad Uni, Zanjan Branch*. 2010; 12(4): 9-17. (Full Text in Persian).

28. Pirouzi A, Jafari M, Kargar M, Mohsenzadeh M, Feizabadi MM, Afkari R. Molecular Detection of Simultaneous Occurrence of Antibiotic-and Heavy Metal-Resistance in Klebsiella Pneumoniae Isolated from Urinary Tract Infection. *J. Isfahan Med. Sch*. 2012;30(186).

29. Rezaei M. Phenotypic and Genotypic Assessment of ESBL Production in Klebsiella pneumoniae Isolates from Kermanshah Medical Centers (Iran). *Majallah-i Dānishgāh-i ʻUlūm-i Pizishkī-i Qum*. 2017;11(9):61-9.

30. Mirsalehian A, Nakhjavani F. Prevalence of ESBLs producing Enterobacteria in intensive care units. Proceeding of the 8 th National Congress of Microbiology. Isfahan*: Isfahan University*; 2006.

31. Hosseini-Mazinani SM, Eftekhar F, Milani M, Ghandili S. Characterization of β-Lactamases from Urinary Isolates of Escherichia coli in Tehran. *Iran. Biomed. J.* 2007; 11(2):95-9.

32. Masjedian GF, Valehi F, Talebi RL, Rastegar LA. Moulecular evaluation of resistance to espanded antibiotics in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. *Iran J Med Microbiol*. 2007; 1(2):27-34.

33. Soroush Z, Ghane M. Molecular identification of CTX-M, TEM and SHV Î²-lactamases in â Klebsiella pneumoniae isolated from respiratory system of patients in the ICU of educational hospitals in Tehran. *Feyz*. 2017; 21(3):232-9.

34. Sarvazad H, Darbouy M. Correlation of Antibiotic Resistance with SHV, CTX-M and TEM Extended-Spectrum Beta Lactamases Genes among Klebsiella pneumoniae Isolates from Patients in Kermanshah Hospitals. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2017 Oct 15; 17(3):353-62.

35. Vafaei S, Mirnejad R, Amirmozafari N. Determining the Patterns of Antimicrobial Susceptibility and the Distribution of blaCTX-M Genes in Strains of Acinetobacter Baumannii Isolated from Clinical Samples. *J. Isfahan Med. Sch*. 2013; 31(252).

36. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clonal lineages. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2013; 41(1):11-9.

37. Ahmed MA, Bansal D, Acharya A, Elmi AA, Hamid JM, Ahmed AM, Chandra P, Ibrahim E, Sultan AA, Doiphode S, Bilal NE. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from intensive care units at Hamad Medical Corporation, Qatar. *Antimicrob. Resist Infect. Control*. 2016; 5(1):4.