Short Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 5 (November - December)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Molecular Diagnostic of Drug Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Isolates Containing SHV, PER and VEB Genes in Samples Collected from Patients in Tehran

Zahra Kohanrooz Bijarpas*, Saeid Zaker Bostanabad, Farzaneh Tafvizi

Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2018/10/01
Accepted: 2018/12/25
Available online: 2018/12/25

Article Subject:
Antibiotic Resistance

IJMM 2018; 12(5): 363-370

Corresponding author:

Zahra Kohanrooz Bijarpas
MSc in Genetics, Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email:
zahra.kohan21@yahoo.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Extended-spectrum beta-lactamase of SHV, PER and VEB types are considered as important and widely increasing resistance mechanisms to beta-lactamases in gram- negative pathogens. Also *K. pneumonia* species are able to produce extended-spectrum beta- lactamase (ESBLs). The aim of this study was to detect the prevalence of SHV, PER and VEB genes in ESBLs producing *Klebsiella pneumoniae* isolates which were collected from patients of different regions of Tehran city between January 2017 to January 2018 using PCR method.

Materials and Methods: In this analytical- descriptive study, antibacterial susceptibility of 176 *K. pneumonia* isolates were defined to Cefepime, Ampicillin, Gentamicin, Cefalotine, Ceftazidime, Ciprofloxacin, Imipenem, Cefotaxime and Nitrofurantoin using disk diffusion method. In addition, confirmatory test for detecting ESBLs phenotypes was performed using Cefotaxime-Clavulanic acid combination disk. The presence of SHV, PER and VEB genes were assessed using PCR.

Results and Conclusion: Confirmatory phenotypic test showed that 56.81% of the isolates were ESBL positive. The prevalence of SHV, PER and VEB genes in *K. pneumonia* isolates was 34%, 13% and 17% respectively. In this study, the most resistance rate was observed to ampicillin (89%) and the lowest resistance rate was observed to imipenem (7%). High frequency of SHV, PER and VEB genes in ESBL producing isolates, indicates that these enzymes play important roles in resistance to beta lactam containing anti biotics. Therefore, proper infection control tools and appropriate therapeutic approaches in different parts of the hospitals are necessary to prevent their spread.

Keywords: *Klebsiella pneumonia*, Extended-spectrum beta-lactamase, bla SHV, bla PER and bla VEB genes.

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Kohanrooz Bijarpas Z, Zaker S, Tafvizi F. Molecular Diagnostic of Drug Resistant Klebsiella Pneumoniae Isolates Containing SHV, PER and VEB Genes in Samples Collected from Patients in Tehran . Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (5) :363-370

مقالهٔ کوتاه

مجلهٔ میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ ـ شمارهٔ ۵ ـ آذر ـ دی ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

تشخیص مولکولی *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به دارو طبق شناسایی ژن‌های *PER*، *SHV* و *VEB* در نمونه‌های جداشده از بیماران شهر تهران

زهرا کهن‌روز بیجارپس*، سعید ذاکر بستان‌آباد، فرزانه تفویضی

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۰۹

پذیرش:۱۳۹۷/۱۰/۰۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۰/۰

موضوع:

مقاومت پادزیستی (آنتی بیوتیکی)

IJMM1397;12(5): 363-370

نویسندهٔ مسئول:

زهرا کهن روز بیجارپس

کارشناس ارشد ژنتیک،گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، تهران، ایران

پست الکترونیک:

zahra.kohan21@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: تولید بتالاکتامازهای SHV,PER و VEB در سراسر جهان به‌عنوان یک مکانیسم مهم مقاومت در مقابل بتالاکتام‌ها در پاتوژن‌های گرم منفی به‌ویژه *کلبسیلا پنومونیه* شناخته شده و به‌سرعت در حال افزایش است.

هدف از این مطالعه، تعیین حضور ژن‌های *SHV,PER* و *VEB* در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مولد ESBL ایزوله‌شده از بیمارستان‌های شهر تهران از دی‌ماه ۱۳۹۵ تا دی‌ماه ۱۳۹۶ به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) است.

مواد و روش کار: در این مطالعه ۱۷۶جدایهٔ *کلبسیلا پنومونیه* جداسازی و با آزمون‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، سفالوتین، سفتازیدیم، ایمی‌پنم، سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم و نیتروفورانتوئین به روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های فوق به‌وسیلهٔ آزمون تأییدی دیسک‌های ترکیبی سفوتاکسیم ـ کلاولانیک اسید، به‌منظور شناسایی ESBL مطالعه شد. سپس در سویه‌های مولد ESBL، وجود ژن‌های *SHV,PER* و *VEB* با روش مولکولی PCR بررسی شد.

یافته‌ها و نتیجه‌گیری: در تست فنوتیپی تأییدی ۵۶/۸۱درصد جدایه‌ها مولد ESBL بودند و فراوانی ژن *SHV* برابر ۳۴درصد بود. در این پژوهش بیشترین میزان مقاومت، نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۸۹درصد) و کمترین درصد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ایمی‌پنم (۷درصد) مشاهده شد. ژن بتالاکتاماز *SHV* شیوع بالایی در جدایه‌های مولد ESBL دارد؛ لذا اعمال ابزارهای مناسب کنترل عفونت و راهکارهای مناسب درمانی در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های مورد مطالعه برای جلوگیری از انتشار آنها ضروری است.

کلمات کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه*، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، ژن *bla SHV*، *bla PER*، *bla VEB* واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفادهٔ علمی از این مقاله برای مجلهٔ میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

کلبسیلاپنومونیه یکی از عوامل مهم عفونت‌های اکتسابی از جامعه و بیمارستان است. این باکتری یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی است که میزان مرگ‌ومیر ناشی از آن زیاد است. افزایش ظهور مقاومت چندداروییی در جدایه‌های بیمارستانی *کلبسیلاپنومونیه*، گزینه‌های درمانی را برای عفونت‌های ایجادشده به‌وسیلهٔ این باکتری محدود کرده است (۱). آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بهترین گزینه برای درمان بسیاری از عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها هستند؛ آنها به‌دلیل سمیت پایین برای سلول‌های یوکاریوتی، طیف اثر گسترده و اثر ضدمیکروبی قوی، از پرمصرف‌ترین گروه‌های آنتی‌بیوتیکی دردسترس هستند. بین انواع مختلف مکانیسم‌های مقاومت در باکتری‌ها، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز مؤثر علیه سفالوسپورین‌های نسل سوم به‌ویژه سفتازیدیم، سفپودوکسیم و سفوتاکسیم، از نظر بالینی اهمیت خاصی دارد که به این آنزیم‌ها ESBLs

(Expanded spectrum β- lactamase) گفته می‌شود (۲). ظهور مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام اغلب مربوط به حضور پلاسمید در سویه‌های تولیدکنندهٔ پنی‌سیلیناز است که به‌سرعت بین جدایه‌های بالینی انتشار می‌یابد (۳). فراوان‌ترین و مهم‌ترین مکانیسم مقاومت به داروهای بتالاکتام، به‌واسطهٔ تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده بتالاکتام‌ها است. درواقع این آنزیم‌ها که سرین پروتئاز هستند، با اتصال به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و با ایجاد پیوند کووالان و با تخریب پیوند آمیدی موجب غیرفعال شدن این داروها می‌شوند. آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری‌ها بسیار متنوع هستند و در پاسخ به فشار انتخابی آنتی بیوتیک، دائما در حال موتاسیون و یا جایگزینی اسیدهای آمینه به‌ویژه در جایگاه فعال آنزیم هستند؛ به‌طوری که باعث ظهور انواع جدیدی از بتالاکتامازهای با طیف گسترده (ESBL) شده‌اند (۴). ژن پیش سازبتالاکتاماز *SHV* (Sulfhydryl variable) ممکن است به‌صورت یک ژن کروموزومی در کلبسیلا ظاهر شده و سپس از راه‌های مختلف ژنتیکی به پلاسمیدها منتقل و از آن طریق بین گونه‌های دیگر انتروباکتریاسه پخش شده باشد؛ به‌طوری که آنالیز ترادف ژنومی کلبسیلا پنومونیه تأییدکنندهٔ منشأ کروموزومی bl aSHV است (۵،۶). آنزیم بتالاکتاماز PER (*Pseudomonas* extended resistant) هم روی کروموزوم باکتری و هم روی پلاسمید یافت شده و در باکتری‌های مختلفی گزارش شده است. همچنین این آنزیم روی عناصر انتقال‌دادنی واقع شده و قادر به هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها است و فعالیت آن از طریق کلاولانیک اسید نیز مهار می‌شود. آنزیم PER می‌تواند سفالوسپورین‌های نسل چهارم را به‌جز سفتازیدیم و سفوتاکسیم هیدرولیز کند (۷). آنزیم بتالاکتاماز VEB (Vietnam extended-spectrum Betalactamas) نیز برای اولین بار روی پلاسمید و اینتگرون جدایه‌های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا* از یک نوزاد ۴ماهه ویتنامی شناسایی شد که متعلق به بتالاکتاماز وسیع‌الطیف است. این آنزیم در تایلند، کویت، هند و چین نیز گزارش شده است و به نظر می‌رسد احتمالا منشأ آنزیم‌های بتالاکتامازی VEB بیماران آسیایی باشد (۸،۹). با توجه به اهمیت *کلبسیلاهای پنومونیه* مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در عفونت‌های بیمارستانی این امر مشکلی جدی برای بخش سلامت کشور است و بیماران را نیز در بیمارستان‌های سراسر جهان تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. با دستیابی به اطلاعات مربوط به فراوانی ژنوتیپ‌های فوق در *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به بتالاکتاماز جداشده از نمونه‌های بالینی و انتقال این اطلاعات به جامعهٔ پزشکی، می‌توان به پزشکان دست‌اندرکار درمان این قبیل بیماران در راستای تجویز صحیح و مناسب آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر کمک کرده و درنتیجه ضمن جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم به بتالاکتامازها، به درمان مؤثرتر و قطعی عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها دست یافت. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی جدایه‌های مولد ESBL، تعیین الگوی مقاومت دارویی و شناسایی ژن‌های مسئول آن در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* به‌دست‌آمده از مراجعان به بیمارستان‌های لولاگر، بقیه‌الله، بعثت، مسیح دانشوری و آزمایشگاه مسعود در شهر تهران از دی‌ماه ۱۳۹۵تا دی‌ماه ۱۳۹۶ انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک دورهٔ یک‌ساله از دی‌ماه ۱۳۹۵ تا دی‌ماه ۱۳۹۶، ۲۷۰ نمونهٔ بالینی ادرار، خون و خلط از بیمارستان‌های لولاگر، بقیه‌الله، بعثت، مسیح دانشوری و آزمایشگاه مسعود در تهران جمع‌آوری شد.

جداسازی و تشخیص ایزوله‌ها: برای تأیید، نمونه‌های بالینی روی دو محیط پایهٔ بلاد آگار و مک کانگی آگار (شرکت سیگما) کشت داده شدند و پس از رشد مجدد پاساژ داده شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. بعد از انکوباسیون از کلنی‌های مشکوک به *کلبسیلاپنومونیه* لام مستقیم تهیه، و در صورت مشاهدهٔ باسیل‌های گرم منفی، اقدامات تشخیصی زیر انجام شد: از آزمون‌های مرسوم آزمایشگاهی شامل تست اکسیداز، کشت در محیط‌های MR-VP(Methyl Red-Voges Proskauer broth) ، SIM (Simmons Citrate agar)،TSI (Triple Sugar Iron Agar)، لیزین دکربوکسیلاز، محیط‌های سیترات و اوره استفاده شد. سپس باکتری‌های جداسازی‌شده بعد از تشخیص، به‌منظور نگهداری طولانی‌مدت ابتدا در محیط LB broth (شرکت سیگما) کشت داده شده و بعد از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس، در گلیسرول ۵۰درصد تا زمان انجام آزمون‌های بعدی در فریزر ۷۰- درجهٔ سلسیوس ذخیره شدند (۱۰).

تعیین باکتری‌های مولد بتالاکتاماز با طیف وسیع (ESBL): برای شناسایی باکتری‌های مولد ESBL از روش دیسک ترکیبی Combination Disk (CD) محصول شرکت MAST انگلستان با توجه به دستورالعمل CLSI استفاده شد با استفاده از دو دیسک سفوتاکسیم TES (Confirmatory) ۳۰میکروگرمی، (سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید ۳۰ و ۱۰میکروگرمی) آزمایش انجام

و افزایش بیش از ۵ میلی‌متری در قطر هالهٔ رشدنیافتگی در حضور کلاونیک اسید به‌عنوان ESBL تأیید شد (۱۰).

بررسی حساسیت دارویی به روش انتشار از دیسک: مقاومت دارویی سویه‌های جداشده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های (سفپیم، آمپی‌سیلین، جنتامیسین، سفالوتین، سفتازیدیم، ایمی‌پنم، سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم، نیتروفورانتوئین) براساس رهنمودهای CLSI به روش انتشار دیسک درآگار (Disk) Diffusion انجام شد. ذکر این نکته لازم است که از سویهٔ استاندارد E.*coli* ATCC25922 به‌عنوان سویهٔ کنترل منفی و سویهٔ استاندارد *Klebsiella pneumonia* ATCC700603 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۱).

بررسی فراوانی ژن‌های *SHV*، *PER* و *VEB*: در این مطالعه استخراج DNA به روش جوشاندن صورت گرفت و برای انجام واکنش PCR استفاده شد (۱۲). این واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر Mastermix از شرکت امپلیکون، ۸ میکرولیتر (Dnase free Deionized Water)، ۱میکرولیتر DNA template (۳۰۰نانوگرم بر میکرولیتر)، ۱میکرولیتر پرایمر رفت‌وبرگشت (۱۰پیکامول) طبق شرایط دمایی و زمانی ارائه‌شده در جدول ۲ انجام گرفت. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای طراحی‌شده با نرم‌افزار Primer3 و Gen Runner در جدول ۱ و شرایط دمایی و زمانی ترموسایکلر در جدول ۲ ارائه شده است. محصول به‌دست‌آمده از PCR روی ژل آگارز ۱/۵درصد الکتروفورز شد؛ سپس وجود باند در دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت. برای اطمینان از صحت انجام آزمایش، از *کلبسیلاپنومونیه* ATCC 700603 تهیه‌شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی تهران به‌عنوان کنترل مثبت برای ژن *SHV* و سویهٔ استاندارد *اسینتوباکتر بومانی* ATCC19606 به‌عنوان کنترل مثبت برای ژن‌های *VEB* و *PER* استفاده شد. سویهٔ استاندارد *اشریشیاکلی* ATCC25922 به‌عنوان کنترل منفی برای واکنش PCR به‌کار رفت.

جدول ۱. اطلاعات پرایمرها

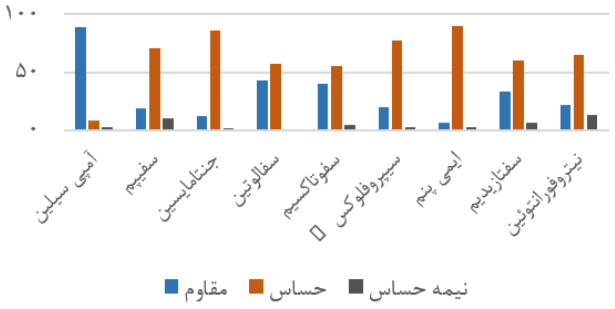
نام پرایمر	توالی	طول قطعه	دمای TM
SHV	F: 5'- GAAAAACACCTTGCCGACGG -3' R: 5'- ATTTGCTGATTTCGCTCGGC -3'	۵۰۳bp	۵۸/۴
PER	F: 5'- TTGATGTTTATGCCGCGTGC -3' R: 5'- TTCAAAACCGGCGAGAATGC -3'	۵۰۰bp	۵۸/۴
VEB	F: 5'- CAACCCCAACAGCGATGAAC -3' R: 5'- ACCCCAACATCATTAGTGGCT -3'	۲۲۳bp	۵۹/۴

جدول ۲. اطلاعات دمایی و زمانی دستگاه ترموسایکلر

ردیف	مراحل	درجهٔ حرارت (c°)			زمان		
		SHV	VEB	PER	SHV	VEB	PER
۱	Initial denaturation	۹۴	۹۴	۹۴	۵ Min	۵ Min	۵ Min
۲	Denaturation	۹۴	۹۴	۹۴	۳۰ S	۳۰ S	۳۰ S
۳	Annealing	۵۸/۴	۵۹/۴	۵۸/۴	۲۵ S	۲۵ S	۴۰ S
۴	Extension	۷۲	۷۲	۷۲	۳۰ S	۲۵ S	۳۰ S
۵	Final extension	۷۲	۷۲	۷۲	۵ Min	۵ Min	۵ Min
۶	Cycle number	۴۰ دور					

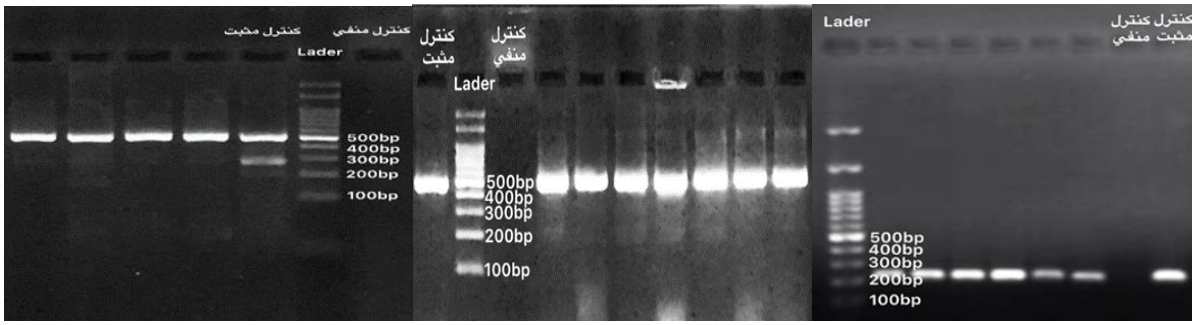
یافته‌ها و بحث

با وجود تلاش‌های بسیاری که برای ریشه‌کنی بیماری‌های عفونی صورت گرفته است، تغییر رفتار میکروارگانیسم‌ها از جنبه‌های مختلف موجب شده ریشه‌کنی بسیاری از این عوامل میکروبی با موفقیت کافی همراه نباشد و حتی با ظهور و شیوع جدایه‌های جدید، منجر به افزایش بیماری‌های عفونی شود (۱۳)؛ به‌طوری که با وجود اقداماتی که تاکنون برای تولید مواد ضدمیکروبی وسیع‌الطیف انجام شده است، کماکان موضوع بروز و شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، به‌خصوص مقاومت باکتری‌های گرم منفی یکی از موانع اساسی برای درمان قطعی بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود (۱۴). در مطالعهٔ حاضر از مجموع ۲۷۰ نمونهٔ بالینی (ادرار، خون، خلط)، ۲۴۰ جدایهٔ گرم منفی گزارش شد. ۱۷۶ جدایهٔ *کلبسیلا پنومونیه* از مجموع ۲۴۰ جدایهٔ گرم منفی دریافت‌شده از مناطق مختلف شهر تهران در آزمایشگاه میکروب‌شناسی با انجام آزمایش‌های میکروب‌شناسی و بیوشیمیایی تأیید شدند. از این بیماران درمجموع ۸۶ جدایه از نمونهٔ ادرار، ۱۴ جدایه از نمونهٔ خون و ۷۶ جدایه از نمونهٔ خلط جمع‌آوری شدند. با بررسی اطلاعات بیماران مشخص شد که ۲۴ نفر (۱۳/۶۴درصد) از بیماران، مرد و ۱۵۲ نفر (۸۶/۳۶درصد) از بیماران، زن بودند. از ۱۷۶ جدایهٔ *کلبسیلا پنومونیه* ۱۰۰ جدایهٔ (۵۶/۸۱درصد) توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز را داشتند. شیوع تیپ‌های مختلف ESBL در جدایه‌های بالینی کشورهای مختلف و حتی بیمارستان‌های موجود در یک منطقه می‌تواند متفاوت باشد که این به تأثیرات متقابل میزبان و باکتری و همچنین انتقال ژنتیکی بین باکتری‌ها بستگی دارد. آمارها در شهرهای ایران متفاوت گزارش شده است. در کرمانشاه (سال ۲۰۱۴) ۴۵درصد (۱۵)، تهران (سال ۲۰۱۵) ۴۸درصد (۱۶)، در مطالعهٔ Dehghan و همکاران (۲۰۱۷) ۳۲/۸درصد (۱۷)، همچنین در دیگر نقاط جهان از جمله کرهٔجنوبی (سال ۲۰۱۰) ۲۶/۵درصد، اندونزی (سال۲۰۱۰) ۲۳/۷درصد، چین (سال ۲۰۰۹) ۳۳/۴درصد (۱۰)، ایزوله‌ها از نظر تولید ESBL مثبت بودند. به نظر می‌رسد تنوع در الگوی مصرف و تجویز داروهای بتالاکتام و نحوهٔ به‌کارگیری ابزارهای کنترل عفونت در بخش‌های مختلف بیمارستان دلایل عمدهٔ تنوع در میزان شیوع ارگانیسم‌های تولیدکننده ESBL در مناطق جغرافیایی متفاوت است. جدایه‌های تولیدکننده ESBL به‌طور خاص می‌توانند به‌راحتی ژن‌های مقاومت را به‌وسیلهٔ پلاسمید از طریق انتقال افقی منتقل کنند و باعث ایجاد عفونت‌های بیمارستانی شوند (۱۸). در این پژوهش بیشترین میزان مقاومت باکتری، نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۸۹درصد) و کمترین درصد مقاومت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم (۷درصد) مشاهده شد (نمودار ۱).



نمودار ۱. نتایج تست حساسیت دارویی

دو مطالعهٔ انجام‌شده در ایران که Moradi (۲۰۱۵) و Sarshar (۲۰۱۴) انجام دادند و با نتایج تحقیق حاضر همسو است، نشان داد در شهر کرمان بیشترین مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۹۲/۵درصد) و مؤثرترین آنتی‌بیوتیک علیه *کلبسیلا پنومونیه* آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم با حساسیت (۸۹درصد) است (۱۹). همچنین در کرمانشاه (سال۲۰۱۴) بیشترین و کمترین مقاومت باکتری به‌ترتیب به آمپی‌سیلین و آنتی‌بیوتیک‌های گروه کارباپنم مربوط است (۱۵). در مطالعات انجام‌شده در ایران و خارج از ایران، کمترین مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم و بیشترین مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین گزارش شد که همسو با مطالعهٔ حاضر است. تفاوت در میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در مطالعات پیشین، می‌تواند به‌دلیل تفاوت در نوع درمان بیماران موردمطالعه بوده باشد که مصرف زیاد برخی آنتی‌بیوتیک‌ها در آنها باعث افزایش چشمگیر مقاومت به این نوع آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. در این تحقیق، انتظار می‌رود علت بالابودن مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به مکانیسم‌های دیگری از جمله پمپ‌های ترشحی، تشکیل بیوفیلم و نیز تغییر در پورین‌ها نیز باشد که باید بررسی شود (۲۰). در مطالعهٔ حاضر، نتایج PCR ژن‌ها روی ۱۰۰ جدایهٔ *کلبسیلا پنومونیه مولد* ESBL مشخص شد که درمجموع ۳۴جدایه (۳۴درصد) ژن SHV، ۱۳جدایه (۱۳درصد) ژن *PER* و ۱۷جدایه (۱۷درصد) ژن *VEB* داشتند (شکل ۱،۲،۳).



شکل ۱. برخی از نمونه‌های حاوی ژن *SHV* ؛ شکل ۲. برخی از نمونه‌های حاوی ژن *PER* ؛ شکل۳. برخی از نمونه‌های حاوی ژن *VEB*

در مطالعه‌ای در آرژانتین (۲۰۰۳) ۲۳/۰۸درصد (۲۱)، در تحقیق Nasehi (۲۰۱۰) ۷/۵ درصد (۲۲)، در تحقیق Dehghan (۲۰۱۷) در سویهٔ *کلبسیلا* صفر درصد، در سویهٔ *اشریشیاکلی* ۲/۱درصد شیوع ژن *PER* گزارش شد (۱۷). در مطالعهٔ Jiang (۲۰۰۶) ۳۸/۶درصد (۲۳)، در مطالعهٔ Latifpour (۲۰۱۵) ۰/۸درصد (۲۴)، در مطالعهٔ Dehghan (۲۰۱۷) در جدایه‌های *کلبسیلا* ۸/۶درصد در جدایهٔ *اشریشیاکلی* ۱۷/۲درصد، شیوع ژن *VEB* گزارش شد (۱۷). به نظر می‌رسد که دو ژن *blaPER* و *blaVEB*در حال انتقال از سویه‌های مختلف به سویهٔ *کلبسیلا پنومونیه* است که روند صعودی در مطالعهٔ حاضر مشاهده شد. براساس مطالعات انجام‌شده روی ژن *blaSHV* در شهرهای ایران روند روبه‌افزایشی مشاهده شد. در مطالعه‌ای در قزوین (۲۰۱۳) ۲۲/۷درصد (۱۰)، تهران (۲۰۱۵) ۶۲/۵درصد (۱۶)، ترکیه (۲۰۱۰) ۲۱/۸درصد (۲۵)، از سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* را حاوی ژن *SHV* گزارش کردند. گفتنی است ژنوم استخراج‌شده حاوی Total DNA است چون ژن‌های موردمطالعه هم در کروموزوم و هم در پلاسمید باکتری حضور دارند و پرایمرها به ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی متصل می‌شوند. حساسیت پایین PCR در مطالعهٔ حاضر می‌تواند به‌علت تغییر در غلظت آگارز و یا تکثیر ژن‌های غیراختصاصی باشد؛ چون محصول PCR ژن‌های موردمطالعه نسبت به ژن‌های دیگر که از طریق پرایمر تکثیر شدند، بسیار بیشتر بود و هدف این مطالعه فقط تشخیص حضور ژن‌های موردمطالعه بود. به همین خاطر از باندهای غیراختصاصی خیلی کم‌رنگ صرف‌نظر شد. اختلافات در میزان شیوع *SHV*, *PER* و *VEB*در ایران و کشورهای دیگر ممکن است به‌دلیل میزان و روش تجویز دارو، میزان مراقبت‌های بهداشتی و کنترل انتشار سویه‌های مقاوم در مناطق مختلف باشد. این نتایج نشان می‌دهد این ژن‌ها روی عناصر ژنتیکی قرار دارند و توانایی انتقال به دیگر باکتری‌ها را دارند. گفتنی است مسئلهٔ بروز مقاومت‌های متعدد در باکتری، به چرخش جغرافیایی و اپی‌ژنتیک نیز وابستگی دارد و در به‌دست‌آوردن پلاسمیدهای متعدد در نوع بروز مقاومت‌ها بی‌تأثیر نیست (۲۶). از طرفی ممکن است در این پلاسمیدها به‌طور هم‌زمان، ژن مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها (مثل آمینوگلیکوزیدها) قرار گیرد و مقاومت هم‌زمان باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها را ایجاد کند که در این صورت داروهای مناسب برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها بسیار محدود خواهد شد که از دلایل مهم نگرانی گسترش سویه‌های ESBL است (۲۷). لذا اختلاف در فراوانی ژن‌های مقاومت را باید در حضور سایر ژن‌های مولد مقاومت جستجو کرد که در مناطق مختلف از وفور متفاوتی برخوردارند که باعث تفاوت فنوتیپی و ژنوتیپی در سطح سویه‌های مقاوم این باکتری می‌شود. به‌علاوه تنوع روش‌های ژنوتیپی مورداستفاده در تحقیقات مختلف نیز می‌تواند از دلایل این اختلاف نتایج باشد. به نظر می‌رسد مصرف خودسرانه و بیش‌ازحد دارو به‌ویژه در محیط بیمارستان، از سویی با افزایش مقاومت دارویی و فرایند کنژوگاسیون روبه‌رو است که در انتقال ژن‌های بتالاکتامازهای پلاسمیدی نقش اساسی دارد و به رشد فزاینده و مقاومت‌های دارویی می‌انجامد؛ از سوی دیگر در انتقال مقاومت بین سویه‌های بیمارستانی و جامعه دخیل بوده که یک معضل جدی روبه‌افزایش است. تغییر در استراتژی مصرف آنتی‌بیوتیک و استفاده از ابزارهای کنترل عفونت در بخش‌هایی که بیماران در آن به‌مدت طولانی بستری می‌شوند از عوامل مهمی هستند که می‌تواند در کنترل انتشار ارگانیسم‌های تولیدکننده ESBL ایفای نقش کند. یافته‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه بر ضرورت اتخاذ راهکارهای عملی دربارهٔ تجویز منطقی داروها، ضرورت تجهیز آزمایشگاه‌ها به روش‌های تشخیصی (فنوتیپی، تکنیک‌های مولکولی، ...) برای شناسایی و تعیین نوع مقاومت ژنتیکی، برآورد

میزان شیوع سویه‌های مقاوم باکتری‌ها اتخاذ تدابیر لازم برای درمان بیماران و کنترل مقاومت در باکتری‌ها تأکید می‌کند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از پرسنل محترم و زحمت‌کش گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند و پرسنل محترم مرکز تحقیقات بیولوژی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله کمال تشکر را داریم.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Amraei S, Eslami G, Taherpour A, Goudarzi H, Hashemi A. Detection of FOX, MOX, and ACT Genes in ESBL-producing Klebsiella pneumoniae Strains. Iranian journal of health sciences. 2014; 24(118): 11-20.
2. .Hassan SA, Jamal SA, Kamal M. Occurrence of multidrug resistant and ESBL producing E. coli causing urinary tract infections. Journal of Basic & Applied Sciences. 2011; 7(1).
3. Far N, Moghaddam N. Phenotypic and molecular detection of PER extended spectrum β-lactamases in urinary Enterobacteriaceae isolates in Mashhad. Journal of North Khorasan University of Medical. 2012; 4(1): 87-93. https://doi.org/10.29252/jnkums.4.1.87
4. Alsultan A, Hamouda A, Evans B, Amyes S. Acinetobacter baumannii: emergence of four strains with novel bla OXA-51-like genes in patients with diabetes mellitus. Journal of Chemotherapy. 2009; 21(3): 290-5. https://doi.org/10.1179/joc.2009.21.3.290
5. Miranda G, Castro N, Leanos B, Valenzuela A, Garza-Ramos U, Rojas T, et al. Clonal and horizontal dissemination of Klebsiella pneumoniae expressing SHV-5 extended-spectrum β-lactamase in a Mexican pediatric hospital. Avicenna J Clin Microbiol Infect. 2004; 42(1): 30-5. https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.30-35.2004
6. Livermore D. Defining an extended-spectrum β-lactamase. Clinical Microbiology and Infection. 2008; 14: 3-10. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01857.x
7. Pasterán F, Rapoport M, Petroni A, Faccone D, Corso A, Galas M, et al. Emergence of PER-2 and VEB-1a in Acinetobacter baumannii strains in the Americas. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(9): 3222-4. https://doi.org/10.1128/AAC.00284-06
8. Girlich D, Naas T, Leelaporn A, Poirel L, Fennewald M, Nordmann P. Nosocomial Spread of the Integron-Located veb-1—Like Cassette Encoding an Extended-Spectrum β-Lactamase in Pseudomonas aeruginosa in Thailand. Clin Infect Dis. 2002; 34(5): 603-11. https://doi.org/10.1086/338786
9. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β-lactamase encoded by an Escherichia coli integron gene. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(3): 573-81. https://doi.org/10.1128/AAC.43.3.573
10. Peymani A, Moeini Rad M, Naserpour Farivar T, Sanikhani R, Javadi A, Pahlavan AA. In SHV and TEM isolates, the prevalence of broad-spectrum B-lactamases and Klebsiella pneumoniae genotypes isolated from clinical specimens collected from Qazvin's hospitals. Iranian Journal of Infectious Diseases. 2013; 15(60): 15-20.
11. Stamdards A. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved Standards CLSI. 2010; M100-S20.
12. Yazdi M, Nazemi A, Mir IM, Khataminejad MR, Sharifi S, BABAI KM. PREVALENCE OF SHV/CTX-M/TEM (ESBL) BETA-LACTAMASE RESISTANCE GENES IN ESCHEsRICHIA COLI ISOLATED FROM URINARY TRACT INFECTIONS IN TEHRAN, IRAN. 2010.
13. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010; 74(3): 417-33. https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10
14. Yagi T, Wachino J-i, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. Avicenna journal Clinical Microbiology and Infection. 2005; 43(6): 2551-8. https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2551-2558.2005
15. Sarshar MHF, Akya A. The frequency of extended spectrum β-lactamase genes of SHV-2a, SHV-5 and SHV-12 in clinical isolates of klebsiella pneumoniae isolated from Kermanshah medical centers in 2014. Majallah-i dānishgāh-i ʿulūm-i pizishkī-i Arāk. 2016; 19(2): 59-67.
16. Hashemi A, Fallah F, Taherpour A, Goudarzi H, Tarashi S, Erfanimanesh S, et al. Detection of

metallo-beta-lactamases, extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), outer membrane porins among Klebsiella pneumoniae strains isolated from hospitalized patients in Tehran. Journal of Zanjan University of Medical Sciences. 2015; 23(98): 89-102.

17. Dehghan F, Zolghadri N, Karmostaji A. Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in Hospital and Community Isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. Jundishapur J Microbiol. 2017. https://doi.org/10.5812/jjm.45678

18. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995; 8(4): 557-84. https://doi.org/10.1128/CMR.8.4.557

19. Moradi M, Norouzi A. Prevalence of bla-CTX-M, bla-SHV, and bla-TEM Genes and Comparison of Antibiotic Resistance Pattern in Extended-spectrum β-lactamase producing and non-producing groups of Klebsiella pneumoniae Isolated from Clinical Samples in Kerman Hospitals. JUMFS. 2016; 6(1): 120-8.

20. 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. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2017; 27(149): 79-87.

21. Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez M, Costa N, Korbenfeld D, et al. Extended-spectrum β-lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(9): 2864-7. https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2864-2867.2003

22. Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin VS, Nematzadeh S. PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae isolated from Tehran, Iran. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2010; 13(3): 111-18.

23. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum β-lactamases in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(9): 2990-5. https://doi.org/10.1128/AAC.01511-05

24. Latifpour M, Gholipour A, Damavandi MS. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates in nosocomial and community-acquired urinary tract infections. Jundishapur J Microbiol. 2016; 9(3). https://doi.org/10.5812/jjm.31179

25. Bali EB, Accedil L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum-lactamase produced by Escherichia coli, Acinobacter baumannii and Klebsiella isolates in a Turkish hospital. African Journal of Microbiology Research. 2010; 4(8): 650-4.

26. Shamlou N, Zaker Bostan Abad S, Mirnejad R. Molecular identification of genes of beta_lactamase(CTX_M)in Klebsiella pneumoniae isolates from Pation reffer to hospitals of tehran city. NCMBJ. 2018; 8(30): 10.

27. Babei kocheksaraei M, Nasrolahi A, Javid N, Shakeri F, Yazdi M, Ghaemi A. Frequency of Escherichia coli generating enzymes of Beta-lactamase in gorgan. Journal of Laboratory Sciences. 2012; 6(1): 51-8.