Original Article

Phenotypic and Genotypic Assessment of ESBL Production in Klebsiella pneumoniae Isolates from Kermanshah Medical Centers (Iran)

Alisha Akya[1], Parisa Nejat[2], Azam Elahi[2*], Roya Chegene Lorestani[2], Mansour Rezaei[3]

[1]*Department of Microbiology, Nosocomial Infection Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.*

[3]*Department of Biostatistics, Faculty of Health, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Azam Elahi, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

Email:
azamelahi202@yahoo.com

Received: 11 Aug, 2016

Accepted: 14 Sep, 2016

Abstract

Background and Objectives: The acquisition of extended spectrum β-Lactamases (ESBL) has made *Klebsiella pneumoniae* resistant to various types of antibiotics. The aim of this research was to determine the antibiotic resistance pattern and the frequency of *TEM*, *SHV*, *CTX-M*, and *PER* genes in *K. pneumonia strains* isolated from Kermanshah medical centers.

Methods: In this analytical cross-sectional study, a total of 165 different samples of patients, were collected from three hospitals (Imam Reza, Imam Khomaini, and Taleghani) and a medical diagnostic laboratory (Reference laboratory) in Kermanshah city during 2014-2015. Among them, 100 isolates of *K. pneumoniae* were confirmed using API-20E kit. Antibiotic susceptibility test was performed by disk diffusion method and phenotypic screening test for ESBL production, was performed by combination disc. After extraction of bacterial genome, *CTX-M* genes *(CTX-M-1* and *CTX-M-9* groups), *TEM*, *PER*, and *SHV* were examined by PCR. Then, a number of PCR products were sequenced and analyzed using BLAST software.

Results: Forty percent of the isolates were ESBL-producing and were 100% resistant to third generation of cephalosporins. The isolates of ICU and burn ward patients had a high prevalence of ESBL. The frequency of *TEM*, *CTX-M-1*, *CTX-M*, and *SHV* genes, were 28%, 32%, 35%, and 83%, respectively, but *PER* and *CTX-M-9* group genes, were not found among the isolates.

Conclusion: The results of this study indicated that the dissemination of ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates, has increased in the isolates from inpatients and outpatients in Kermanshah. Therefore, it can be concluded that multidrug resistant isolates have increased, especially in wards, where patients are hospitalized for a long time. Therefore, identification of ESBL-producing *K. pneumoniae* strains in medical diagnostic laboratories, seems necessary.

Keywords: *Klebsiella pneumonia*; beta-Lactamases; beta-lactamase CTX-M-2, *Klebsiella pneumonia*; beta-lactamase TEM-102, *Klebsiella pneumonia*; SHV.

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره یازدهم، شماره نهم، آذر ۹۶
صفحه ۶۱ الی ۶۹

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی تولید ESBL در بین ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*، از مراکز پزشکی کرمانشاه

علیشا اکیا[۱]، پریسا نجات[۲]، اعظم الهی[۲*]، رؤیا چگنه لرستانی[۲]، منصور رضایی[۳]

[۱]گروه میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

[۲]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

[۳]گروه آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
اعظم الهی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
azamelahi202@ yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۰

تاریخ پذیرش:۹۵/۶/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: کسب آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده (ESBL)، *کلبسیلا پنومونیه* را به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم کرده است. این تحقیق با هدف شناسایی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های *TEM*، *SHV*، *CTX-M* و *PER* در *کلبسیلا پنومونیه*‌های جداشده از مراکز پزشکی کرمانشاه انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی – تحلیلی، تعداد ۱۶۵ نمونه مختلف بیماران در ۳ بیمارستان (امام خمینی، طالقانی و امام رضا) و یک آزمایشگاه تشخیص طبی (آزمایشگاه رفرنس) شهر کرمانشاه در سال ۱۳۹۴-۱۳۹۳ جمع‌آوری شد. از میان آنها، ۱۰۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* به‌وسیله کیت API-20E تأیید گردید. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش Disk diffusion و آزمایش فنوتیپی غربالگری ESBL به روش دیسک ترکیبی انجام شد. پس از استخراج ژنوم باکتری‌ها، ژن‌های *CTX-M* (گروه *CTX-M-1*، *CTX-M-9*)، *TEM*، *PER* و *SHV* با PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. سپس تعدادی از محصولات PCR سیکونس شده و به‌وسیله نرم‌افزار BLAST بررسی شدند.

یافته‌ها: ۴۰٪ از ایزوله‌ها، تولیدکننده ESBL بودند و ۱۰۰٪ نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم مقاوم بودند. ایزوله‌های بیماران بستری در ICU و بخش سوختگی، شیوع بالایی از ESBL داشتند. فراوانی ژن‌های، *TEM*، *CTX-M-1*، *CTX-M* و *SHV* به ترتیب ۲۸٪، ۳۲٪، ۳۵٪ و ۸۳٪ بود، اما ژن‌های *PER* و گروه *CTX-M-9* در ایزوله‌ها یافت نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد انتشار ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده بتالاکتامازهای طیف گسترده، در ایزوله‌های بیماران بستری و سرپایی در کرمانشاه افزایش یافته است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت ایزوله‌هایی با مقاومت چند دارویی، به‌ویژه در بخش‌هایی‌که بیماران به مدت طولانی بستری هستند افزایش داشته است. از این‌رو شناسایی کلبسیلا پنومونیه‌های تولیدکننده ESBL در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، ضروری به‌نظر می‌رسد.

کلید واژه‌ها: *کلبسیلا پنومونیه*؛ بتالاکتامازها؛ بتالاکتاماز سی تی ایکس- ام،۲ کلبسیلا پنومونیه؛ بتالاکتاماز تی ای ام ۱۰۲، *کلبسیلا پنومونیه*؛ اس اچ وی.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Akya A, Nejat P, Elahi A, Chegene Lorestani R, Rezaei M. Phenotypic and genotypic assessment of esbl production in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kermanshah Medical Centers (Iran). Qom Univ Med Sci J 2017;11(9):52-60. [Full Text in Persian]

مقدمه

یکی از مهم‌ترین مکانیسم باکتری‌های گرم منفی، ازجمله *کلبسیلا پنومونیه (K. pneumoniae)* در ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی می‌باشد (۱). آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از قبیل سفالوسپورین‌ها در طیف گسترده‌ای (اکسی ایمینو سفالسپورین‌ها) تولید شده تا بتوانند در برابر فعالیت‌های هیدرولیزی بتالاکتامازها مقاوم باشند. اما با استفاده گسترده از آنها و فشار انتخابی بر باکتری‌ها، بتالاکتامازهای جدیدتری به‌وجود آمدند که نسبت به این داروها مقاوم شده و دسته جدیدی از این آنزیم‌ها به‌نام بتالاکتامازهای طیف گسترده (Lactamases- Extended spectrum β , ESBL) را ایجاد کردند (۲). این عوامل به‌طور عمده بر روی پلاسمیدها قرار دارند و این امر سبب تسهیل گسترش آنها در باکتری‌ها می‌شود (۳). امروزه، انتشار بتالاکتامازهای در طیف گسترده مختلف رو به‌فزونی است و در بسیاری از باکتری‌ها مانند *K. pneumoniae* گسترش یافته‌اند (۴).

آنزیم‌های ESBL دارای انواع مختلفی از جمله *TEM*، *SHV*، *CTX-M* و *PER* هستند (۵). *TEM*، یکی از اولین بتالاکتاماز پلاسمیدی موجود در باکتری‌های گرم منفی است که سبب مقاومت به پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌های اولیه نظیر سفالوتین می‌گردد (۴).

اغلب بتالاکتامازهای نوع *TEM* در *K. pneumoniae* یافت می‌شوند (۶). ژن پیش‌ساز بتالاکتامازهای خانواده *SHV* ممکن است به‌صورت کروموزومی از سویه‌های کلبسیلا مشتق شده، سپس به پلاسمیدها منتقل گردد و در بین گونه‌های دیگر خانواده انتروباکتریاسه پخش شده باشد (۷). *CTX-M*، یکی از شایع‌ترین آنزیم‌های ESBL است (۵). با بررسی فیلوژنیک، آنزیم‌های *CTX-M* به پنج گروه اصلی شامل:

CTX-M-9, CTX-M-8, CTX-M-2, CTX-M-*1* و *CTX-M-25* تقسیم می‌شوند. در این میان، گروه *CTX-M-1* خود شامل *CTX-M-1*، *CTX-M-3*، *CTX-M-10*، *CTX-M-12* و گروه *CTX-M-9* شامل *CTX-M-9*، *CTX-M-13*، *CTX-M-14*، *CTX-M-16*، *CTX-M-17*، *CTX-M-19* و *CTX-M-21* می‌باشند (۵).

PER، یک آنزیم ESBL کلینیکال مهم با فعالیت قوی است که می‌تواند به‌طور مؤثری پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها را هیدرولیز کند (۸). این آنزیم ابتدا در جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *اسینتوباکتر* از ترکیه شناسایی شد (۹).

درمان ایزوله‌های *K. pneumoniae* تولیدکننده ESBL، به‌ویژه در ارتباط با عفونت‌های بیمارستانی مشکل شده است (۱۰). آگاهی از انتشار این باکتری‌ها و الگوی مقاومت آنها در هر منطقه؛ حتی مرکز درمانی لازم است (۱۲،۱۱). هدف از این تحقیق شناسایی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های ESBL در کلبسیلا پنومونیه‌های جداشده از مراکز درمانی کرمانشاه بود.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی - تحلیلی، ۱۶۵ نمونه غیرتکراری مشکوک به *K. pneumoniae* از نمونه‌های مختلف بیماران در ۳ بیمارستان {(امام خمینی، طالقانی و امام رضا (ع)) و یک آزمایشگاه تشخیص طبی (آزمایشگاه رفرنس)} شهر کرمانشاه در سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۳ جمع‌آوری شد. با استفاده از روش‌های باکتری‌شناسی، تست‌های افتراقی و در نهایت، کیت API-E20 (بیومریکس، ساخت فرانسه)؛ تعداد ۱۰۰ ایزوله به‌عنوان *K. pneumoniae* شناسایی گردید.

از باکتری *E. Coli* ATCC 25922، به‌منظور کنترل کیفی استفاده شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها برای ۱۱ آنتی‌بیوتیک از ۴ گروه آنتی‌بیوتیکی بتالاکتام شامل پنی‌سیلین‌ها {(آمپی‌سیلین و پیپراسیلین - تازوباکتام (۳۰ میکروگرم)، سفالوسپورین‌ها (سفازولین، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم) و سفپودوکسیم (۱۰ میکروگرم)، مونوباکتام {آزترئونام (۳۰ میکروگرم)}، کارباپنم‌ها {ارتاپنم، مروپنم، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم) (شرکت مست، انگلستان)} با استفاده از روش انتشار دیسک (Disk diffusion) و براساس جداول CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) تعیین گردید (۱۳).

ابتدا آزمون غربالگری اولیه ESBL با استفاده از اندازه هاله عدم رشد برای دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفپودوکسیم و آزترونام انجام شد، سپس مطابق

جدول CLSI برای موارد مثبت، تست تأییدی PCT (Phenotypic Confirmatory Test) با روش انتشار دیسک و با استفاده از دیسک‌های سفوتاکسیم و سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) در مجاورت دیسک مرکب آنها کلاولانیک اسید (۱۰ میکروگرم) (شرکت مست، انگلستان) در محیط مولر هینتون آگار (شرکت مرک، آلمان) انجام گرفت (۱۳). درصورتی‌که قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف دیسک ترکیبی، حداقل ۵ میلی‌متر و یا بیشتر از قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک منفرد همان آنتی‌بیوتیک بود، به‌عنوان سویه مولد بتالاکتامازهای دامنه گسترده در نظر گرفته می‌شد (۱۳). از سویه‌های استاندارد *K. pneumoniae* ATCC 600703 و *E. coli* ATCC 25922 به‌ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت و منفی سویه‌های مولد بتالاکتاماز دامنه گسترده استفاده گردید.

ژنوم باکتری‌ها با روش جوشانیدن (boiling)، استخراج و عمل PCR با پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد بررسی انجام شد (شرکت سیناکلون، تهران) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای به‌کار رفته و اندازه محصولات آن

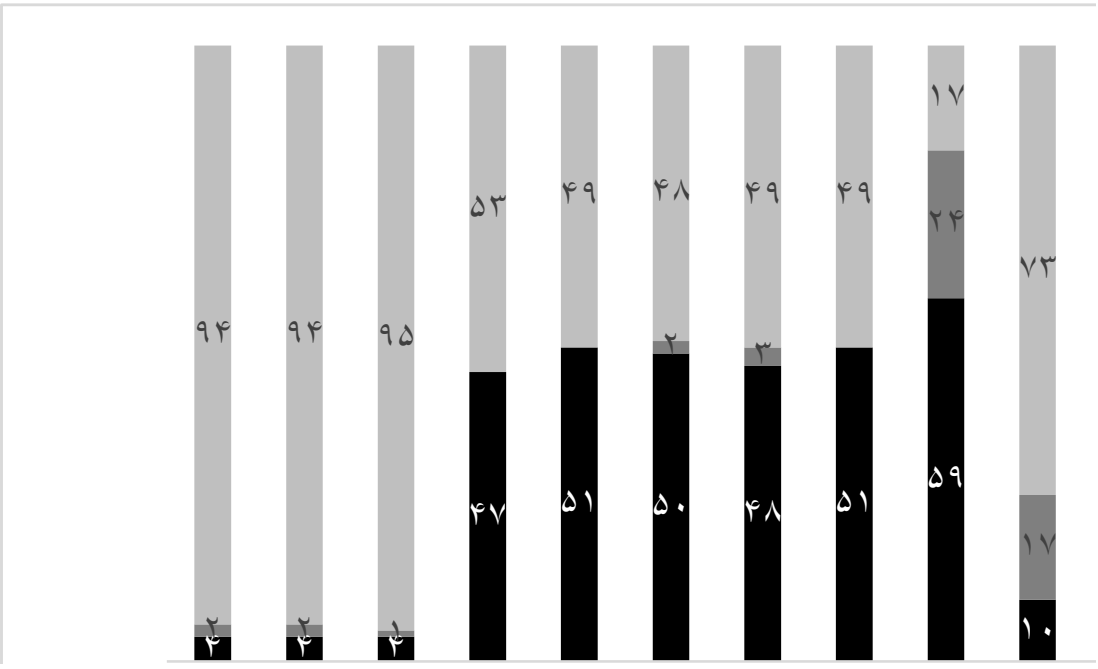
پرایمر	توالی پرایمر (5́→ 3́)	اندازه محصول (bp)	منبع
CTX-M	F:TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA R:CGATATCGTTGGTGGTGCCAT	۵۴۴	(۱۴)
CTX-M-1 group	F:CTCACGCTGTTGTTAGGAA R:ACGGCTTTCTGCCTTAGGTT	۷۸۰	(۱۵)
CTX-M-9 group	F:ATGGTGACAAAGAGAGTGCA R:CCCTTCGGCGATGATTCTC	۸۶۳	(۱۶)
TEM	F:AGTGCTGCCATAACCATGAGTG R:CTGACTCCCCGTCGTGTAGATA	۴۳۱	(۱۷)
SHV	F:ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC R:TTTATGGCGTTACCTTTGACC	۹۲۸	(۱۸)
PER	F:TGGGCTTAGGGCAGAAAG R:GAATACCTGGGCTCCGATAA	۶۰۷	(۱۹)

برای همه ۱۰۰ ایزوله *K. Pneumoniae*، واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل محلول Master Mix با غلظت 2X (شرکت سیناکلون، تهران)، حاوی HotStar Taq DNA Polymerase (۱۲/۵ میکرولیتر)، بافر PCR، مخلوط $MgCl_2$ (۱/۵ میلی‌مولار) و dNTPs، آب مقطر ۲بار تقطیر(۷/۵ میکرولیتر)، پرایمر رفت‌وبرگشت (هرکدام ۱ میکرولیتر) و DNA (۳ میکرولیتر) انجام شد. از ایزوله‌های مشخص حاوی ژن‌های فوق موجود در آزمایشگاه به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای هر ژن، دو محصول PCR سیکونس شد (پیشگام، تهران) و توالی‌های به‌دست‌آمده در نرم‌افزار BLAST بررسی شدند.

داده‌های حاصل از نتایج آزمایش‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار Excel، SPSS نسخه ۲۱ و آزمون کای‌اسکولر (برای بررسی ارتباط مقاومت ایزوله‌ها با ژن‌ها) تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، کمتر یا مساوی ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از ۱۰۰ نمونه *K. pneumoniae*، ۷۰٪ ایزوله‌ها از ۳ بیمارستان و ۳۰٪ ایزوله‌ها از نمونه‌های آزمایشگاه جداسازی شدند. ایزوله‌ها از نمونه‌های ادرار (۵۸ نمونه)، سوختگی (۱۶ نمونه)، تراشه (۱۴ نمونه)، خون (۵ نمونه)، مایع آسیت (۳ نمونه)، زخم (۲ نمونه)، تخت پانسمان سوختگی (۱ نمونه) و تخت برانکارد (۱ نمونه) به‌دست آمد. همچنین از مجموع بیماران: ۵۹ نفر زن، ۳۹ نفر مرد و ۲ نمونه مربوط به تخت بیماران یکی از بیمارستان‌ها بود. میانگین سنی بیماران ۲/۲۶±۳۹/۵ سال، حداکثر سن ۸۵ سال و حداقل سن یک‌ماه بود. نتایج تست سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی در نمودار شماره ۱ و ۲ آورده شده است.



نمودار شماره ۱: درصد مقاومت ۱۰۰ ایزوله *K. Pneumoniae*

نمودار شماره ۲: درصد مقاومت ایزوله‌های ESBL مثبت *K. Pneumoniae*

درمجموع، میزان شیوع جدایه‌های تولیدکننده ESBL، ۴۰ ایزوله (۴۰٪) بود که در این میان، ۳۸ ایزوله (۵۴/۳٪) از نمونه‌های بیمارستانی و ۲ ایزوله (۶/۶٪) از نمونه‌های آزمایشگاهی جدا شد که از این نظر بین بیماران بستری و سرپایی، ارتباط معنی‌داری وجود داشت (p=۰/۰۰۱).

ایزوله‌های بیماران بستری در ICU و بخش سوختگی، بیشترین تعداد تولید ESBL را داشتند (جدول شماره ۲). میزان مقاومت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها (بجز آمپی‌سیلین و کارباپنم‌ها)، به‌طور معنی‌داری (p= ۰/۰۰۱) در جدایه‌های مولد ESBL بیشتر از جدایه‌های فاقد ESBL بود.

جدول شماره ۲: ارتباط فنوتیپی و ژنوتیپی و فراوانی ژن‌های ESBL در ایزوله‌های *K. pneumonia*: به تفکیک بخش‌های بیمارستانی

بخش بستری	فنوتیپ ESBL		ژن‌های ESBL			
	منفی	مثبت	SHV	TEM	CTX-M-1 group	CTX-M
ICU	۷	۱۴	۱۸	۱۱	۱۴	۱۴
سوختگی	۵	۱۱	۹	۸	۳	۶
داخلی	۳	۴	۶	۰	۴	۴
اورژانس	۰	۵	۳	۰	۱	۱
عفونی	۳	۱	۳	۲	۲	۲
سایر	۰	۳	۳	۴	۳	۳
سرپایی	٤۲	۲	۴۱	۳	۵	۵
جمع	۶۰	۴۰	۸۳	۲۸	۳۲	۳۵

از ۱۰۰ جدایه مورد بررسی، ژن CTX-M کلی در ۳۵ ایزوله یافت شد. در این میان، ۳۳ ایزوله در بررسی فنوتیپی، ESBL مثبت و یک نمونه منفی بود. ژن CTX-M-1 group نیز در ۳۲ جدایه مشاهده گردید. در بین موارد ESBL مثبت، ۷۷/۵٪ دارای ژن *CTX-M-1* group بودند. البته یک نمونه براساس معیارهای اسکرین‌کننده CLSI، تولیدکننده ESBL نبود. در ۲۸ نمونه، ژن *TEM* دیده شد که ۲ نمونه براساس بررسی فنوتیپی ESBL منفی بود. همچنین در ۸۳ ایزوله، ژن *SHV* یافت شد که برطبق بررسی فنوتیپی ESBL، ۸۰ مورد مثبت و ۳ مورد منفی بود. ژن‌های *CTX-M-9* group و *PER* در هیچ‌یک از ایزوله‌ها یافت نشد. لازم به ذکر است ۱۹٪ از جدایه‌ها حاوی هر سه ژن *CTX-M*، *TEM* و*SHV*، ۲۹٪ دارای هر دو ژن*SHV* و *CTX-M*، ۲۲٪ حاوی هر دو ژن *TEM* و *CTX-M* و ۲۱٪ دارای هر دو ژن *SHV* و *TEM* با هم بودند. نتایج توالی‌یابی، درستی ژن‌های تکثیریافته را تأیید کرد. علاوه بر این، *CTX-M-1* group با *CTX-M-15* و محصول توالی‌یابی‌شده ژن *SHV* با *SHV-2* و *SHV-11* مشابه بود.

بحث

در مطالعه حاضر، مقاومت ۱۰۰٪ نسبت به سفالوسپورین‌ها در بین ایزوله‌های *K. pneumoniae* تولیدکننده ESBL، در مراکز کرمانشاه، یک نگرانی بزرگ بود که می‌تواند نقش درمانی این آنتی‌بیوتیک‌ها را به میزان زیادی محدود کند. در مطالعات داخلی نیز میزان مقاومت به سفالوسپورین‌ها در بین ایزوله‌های تولیدکننده ESBL به‌طور متوسط، بالای ۸۰٪ گزارش شده است (۲۲-۲۰). کارباپنم‌ها و آمینوگلیکوزیدها معمولاً برای ایزوله‌های تولیدکننده ESBL به‌صورت همزمان تجویز می‌شوند (۲۱)، و خوشبختانه ایزوله‌های ESBL مثبت، حساسیت بالایی به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم نشان داده‌اند که با اکثر مطالعات انجام‌شده در ایران مطابقت دارد (۲۳،۲۱،۸). ولی از طرفی، کاهش حساسیت به کارباپنم‌ها در تعدادی از ایزوله‌های فاقد ESBL نیز مشاهده شده که ممکن است مکانیسم‌های دیگری ازجمله وجود ژن‌های کارباپنمازی در ایجاد این مقاومت نقش داشته باشند. در مطالعه حاضر تمام جدایه‌های تولیدکننده ESBL نسبت به سفوتاکسیم و سفتازیدیم مقاوم بودند، درحالی‌که در یک مطالعه (بین سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۸۵) در تهران، ۸۴٪ جدایه‌های تولیدکننده ESBL نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و سفتازیدیم مقاومت نشان دادند (۲۳).

در مطالعات مختلف، میزان شیوع جدایه‌های تولیدکننده ESBL در شهرهای مختلف ایران (بین سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۸۳)، از ۸۳- ۳۳٪ متفاوت گزارش شده است (۸) (۲۹-۲۰). طی تحقیقی که در سال‌های ۲۰۰۳-۱۹۹۷ انجام گرفت، به‌طور میانگین ۳۰٪ ایزوله‌های *K. pneumoniae* با منشأ بیمارستانی، تولیدکننده ESBL بودند (۳۰). فراوانی ESBL در کشورهای مختلف از ۸۵٪ در روسیه، ۶۶/۷٪ در هند، ۵۷/۸٪ در ترکیه، ۴۱٪ در امارات، ۱۷٪ در موارد سرپایی، ۲۸٪ در بیماران بستری در کویت و ۲۶٪ در عربستان سعودی، متفاوت بوده است (۲۱،۳). 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.

شیوع بالای آنزیم‌های ESBL در بین ایزوله‌های بیمارستانی احتمالاً به‌علت افزایش مصرف سفالوسپورین‌های نسل سوم و انتشار پلاسمیدهای مقاوم در بین ایزوله‌های باکتریایی در محیط بیمارستان‌ها می‌باشد (۲۱). این نتایج مؤید خطر جدی افزایش شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های بیمارستانی و افزایش مرگ ومیر ناشی از این عفونت‌ها بوده (۱)، که در نتیجه نیاز به سیستم نظارت مستمر و اقدامات مؤثر کنترل عفونت ضرورت دارد. لازم به ذکر است بیش از نیمی از ایزوله‌های تولیدکننده ESBLs از بخش ICU و سوختگی بوده که به‌نظر می‌رسد بستری طولانی‌مدت بیماران و شدت بیماری، به‌کارگیری ابزارهای تهاجمی و مواجه طولانی با طیف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها در این بخش‌ها، ازجمله عوامل مؤثر در شیوع قابل‌توجه این ایزوله‌های مقاوم می‌باشند. همچنین این ایزوله‌ها غالباً از نمونه‌های ادرار، بافت سوختگی و تراشه جداسازی شده‌اند که به‌نظر می‌رسد به‌کارگیری ابزارهای تهاجمی در طی پروسه درمانی این بیماران، ازجمله تراشه و کاتتر ادراری می‌تواند در انتشار آنها نقش داشته باشد.

در مطالعه حاضر، شیوع ژن *CTX-M* در جدایه‌های *K. pneumoniae* تولیدکننده ESBL، بیشتر از سایر مطالعات انجام‌شده در ایران بود، به‌طوری‌که در مطالعات قبلی از ۶۲-۲۳٪ گزارش شده است (۲۱) (۲۷-۲۵). آنچه مسلم است رشد همزمان و همسوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بیشتر به‌واسطه آنزیم *CTX-M* در سطح جهان و ایران می‌باشد که اهمیت مطالعات جامع و برنامه‌های کنترل گسترش مقاومت را نشان می‌دهد. در طی بررسی‌هایی که در سال‌های اخیر در ایران انجام شده، *CTX-M-1* group شایع‌تر بوده است (۲۷،۲۶،۲۱). همچنین در دو مطالعه دیگر، *CTX-M-9* group یافت نشد (۲۷،۲۱)، که با نتیجه مطالعه حاضر همخوانی داشت. هرچند در یک مطالعه انجام‌شده در تهران، *CTX-M-9* با شیوع بسیار پایین (۱/۷٪)، گزارش گردید (۲۸).

در بیشتر مطالعات، ژن‌های *TEM* و *SHV* به ترتیب کمترین و بیشترین میزان شیوع را در بین ایزوله‌های *K. pneumoniae* داشته‌اند (۲۵،۲۱،۸)، که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت.

در مطالعاتی نیز شیوع ژن *SHV* در بین جدایه‌های *K. pneumoniae* کمتر از نتیجه این پژوهش بوده است (۲۱). همچنین روش توالی‌یابی نشان داد دو جدایه که از نظر فنوتیپی ESBL منفی هستند دارای ژن *SHV-11* می‌باشند. *SHV-11* یک واریانت از *SHV-1* یا *SHV-3* است که در برابر سفالوسپورین‌ها، طیف گسترده مقاومت ایجاد نمی‌کند و به جای لوسین در اسیدآمینه ۳۵، گلوتامین دارد (۷).

در مطالعه حاضر، درصد قابل‌توجهی از جدایه‌های بررسی‌شده دارای چندین ژن مسئول تولید ESBL بودند که مشابه این نتیجه در مطالعات دیگری که در داخل کشور انجام شده نیز گزارش شده است (۲۱). افزایش میزان جدایه‌هایی که چندین آنزیم ESBL دارند، می‌تواند نشان‌دهنده انتشار ژن‌های مقاوم در بین ایزوله‌ها و گسترش ایزوله‌های تولیدکننده چندین آنزیم ESBL باشد (۴).

نتیجه‌گیری

با توجه به انتشار جدایه‌های *K. pneumoniae* تولیدکننده بتالاکتامازهای طیف گسترده در ایزوله‌های بیماران بستری و سرپایی در کرمانشاه، تغییر در استراتژی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و استفاده از ابزارهای مناسب کنترل عفونت در بخش‌هایی که به‌ویژه بیماران به مدت طولانی بستری می‌شوند، اهمیت دارد. لذا شناسایی کلبسیلا پنومونیه‌های تولیدکننده ESBL در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه خانم پریسا نجات دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی استخراج شده و به‌وسیله دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (با کد ۹۲۰۳۱) حمایت مالی شده است. بدین وسیله از کارکنان آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی کرمانشاه تقدیر و تشکر می‌گردد.

References:

1. Fallah F, Hakemi Vala M, Hashemi A, Shams S. Emergence of novel Plasmid-mediated Beta-lactamase in Klebsiella pneumonia. Qom Univ Med Sci J 2012;6(4):104-16. [Full Text in Persian]

2. Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, classification and epidemiology. Curr Issues Mol Bio 2015;17:11-21.

3. Aladag MO, Durak Y. Investigation of some antibiotic susceptibility plasmid profiles and ESBL characteristic of Klebsiella pneumoniae isolated from urinary system infection. World Appl Sci J 2009;6(5):630-6.

4. Lin CF, Hsu SK, Chen CH, Huang JR, Lo HH. Genotypic detection and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a regional hospital in central Taiwan. J Med Microl 2010;59(Pt 6):665-71.

5. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: The CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(1):1-14.

6. Sharma J, Sharma M, Ray P. Detection of TEM & SHV genes in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates in a tertiary care hospital from India. Indian J Med Res 2010;132:332-6.

7. Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother 1999 Sep;44(3):309-18.

8. Nasehi L, Shah CF, Nikbin V, Nematzadeh S. PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae isolated from Tehran, Iran. Iran J Basic Med Sci 2010;13(3):111-8.

9. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. J Antimicrob Chemother 2005;56(1):52-9.

10. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. Int J Med Microbiol 2010;300(6):371-9.

11. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. Clin Microbiol Rev 2005;18(4):657-86.

12. Poirel L, Fortineau N, Nordmann P. International transfer of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae from Iraq to France. Antimicrob Agents Chemother 2011;55(4):1821-2.

13. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-second informational supplement M100-S22. Wayne, PA, USA: CLSI; 2012.

14. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Russian hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(12):3724-32.

15. Kim J, Lim YM, Jeong YS, Seol SY. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14, and CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae clinical isolates in Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005;49(4):1572-5.

16. Lopes AC, Veras DL, Lima AM, Melo Rde C, Ayala J. bla(CTX-M-2) and bla(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010;105(2):163-7.

17. Kim U, Jeon S, Rhie H, Lee B, Park M, Lee H, et al. Rapid Detection of Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL) for Enterobacteriaceae by use of a Multiplex PCR-based Method. Infect Chemother 2009;41(3):181-4.

18. Yao F, Qian Y, Chen S, Wang P, Huang Y. Incidence of extended-spectrum beta-lactamases and characterization of integrons in extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolated in Shantou, China. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2007;39(7):527-32.

19. Sechi LA, Karadenizli A, Deriu A, Zanetti S, Kolayli F, Balikci E, et al. PER-1 type beta-lactamase production in Acinetobacter baumannii is related to cell adhesion. Med Sci Monit 2004;10(6):180-4.

20. Barakzahi M, Hormozi B, Rashki A, Rashki Ghalehnoo Z. Prevalence of extended spectrum β-Lactamase in Klebsiella pneumonia. Avicenna J Clin Microb Infec 2014;1(3): e22934.

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

22. Mehrgan H, Rahbar M, Arab-Halvaii Z. High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. J Infect Dev Ctries 2010;4(3):132-8.

23. Feizabadi MM, Etemadi G, Yadegarinia D, Rahmati M, Shabanpoor S, Bokaei S. Antibiotic-resistance patterns and frequency of extended-spectrum beta-lactamase-producing isolates of Klebsiella pneumoniae in Tehran. Med Sci Monit 2006;12(11):BR362-5.

24. Ahangarzadeh Rezaee M, Langarizadeh N, Aghazadeh M. First report of class 1 and class 2 integrons in multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae isolates from northwest Iran. Jpn J Infect Dis 2012;65(3):256-9.

25. Ghafourian S, Sekawi Z, Neela V, Khosravi A, Rahbar M, Sadeghifard N. Incidence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in patients with urinary tract infection. Sao Paulo Med J 2012;130(1):37-43.

26. Hashemi A, Fallah F, Erfanimanesh S, Hamedani P, Alimehr S, Goudarzi H. Detection of beta -Lactamases and Outer membrane porins among Klebsiella pneumoniae strains isolated in Iran. Scientifica 2014;2014:726179.

27. Nematzadeh S, Shahcheraghi F, Feizabadi MM, Nikbin VS, Nasehi L. Molecular characterization of CTX-Mbeta-lactamases among Klebsiella pneumoniae isolated from patients at Tehran hospitals. Indian J Med Microbiol 2011;29(3):254-7.

28. Bameri Z, Chitsaz M, Oulia P. Detection of CTX-M-β lactamases in isolated Klebsiella pneumonia. Iran J Pathol 2010;5(3):137-42.

29. Shahcheraghi F, Moezi H, Feizabadi MM. Distribution of TEM and SHV beta-lactamase genes among Klebsiella pneumoniae strains isolated from patients in Tehran. Med Sci Monit 2007;13(11):247-50.

30. Turner PJ. Extended-spectrum beta-lactamases. Clin Infect Dis 2005 Aug 15;41 Suppl 4:S273-5.