تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سروتیپ‌های مختلف *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از عفونت‌های بیمارستانی در شهر زرین‌شهر

زهره پاکنژاد[۱]، حسن ممتاز[۲*]، الهه تاجبخش[۳]

۱. کارشناسی‌ارشد میکروبیولوژیدانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹)

چکیده

سابقه و هدف: *کلبسیلا پنومونیه* از شایع‌ترین باکتری‌های گرم‌منفی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های دستگاه ادراری است که در چند سال اخیر به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های انسانی و دامی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌است. هدف از این مطالعه، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در شایع‌ترین تیپ‌های کپسولی این باکتری در شهرستان زرین‌شهر اصفهان بود.

مواد و روش کار: ۲۹ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌های ادراری در بیماران بستری شده در بخش‌های مختلف بیمارستان زرین‌شهر در تابستان ۱۳۹۵ تا تابستان ۱۳۹۶ انتخاب و پس از تایید فنوتیپی و ژنوتیپی و تعیین تیپ‌های کپسولی در آن‌ها، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌ها با استفاده از روش دیسک دیفوژن (Kirby-Bauer) طبق معیار CLSI بر روی محیط کشت مولر هینتون نسبت به ۱۳ آنتی‌بیوتیک تعیین گردید. فراوانی حضور ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی شامل ژن‌های*tetA*، *cmlA*، *Cat1*، *blaSHV*، *sul1*، *aac(3)-IV*، *aadA 1*، *qnr*و*CITM*، *dfrA1*، *tetB* در جدایه‌ها با استفاده از روش PCR تعیین شد.

نتایج و نتیجه‌گیری: تیپ K_2 با ۵۱/۷۴ درصد فراوانی شایع‌ترین سروتیپ کپسولی شناخته شده در جدایه‌ها بود. تمام جدایه‌های مورد بررسی دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه بودند و علاوه بر پنی‌سیلین، بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها نسبت به تتراسایکلین (۹۳/۱۰ درصد) و کم‌ترین میزان مربوط به کلرامفنیکل (۳/۴۴ درصد) بود. ژن‌های *tetA* و *sul1* به ترتیب با فراوانی ۷۵/۸۶ و ۷۲/۴۱ درصد شایع‌ترین و دو ژن *cat1* و *cmlA* به ترتیب با فراوانی ۶/۸۹ و ۱۰/۳۴ درصد نادرترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری بودند.

کلیدواژگان

تیپ‌های کپسولی، زرین‌شهر، عفونت دستگاه ادراری، *کلبسیلا پنومونیه*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی.

* نویسنده مسئول، رایانامه: hamomtaz@yahoo.com

مقدمه

عفونت بیمارستانی به عفونتی اطلاق می شود که بیمار در زمان بستری بودن به آن دچار نبوده و در دوره کمون آن هم نبوده باشد و پس از پذیرش بیمار در بیمارستان یا طی دوره‌ای مشخص پس از ترخیص بیمار رخ می‌دهد (۲و۱).

عفونت مجاری ادراری، یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در بیماران بستری در بیمارستان و بیماران سرپایی می‌باشد (۳). حضور بیش از $۱۰^{۵}$ واحد تشکیل دهنده کلنی ازیک باکتری، در هر میلی‌متر از نمونه ادرار، بیانگر عفونت ادراری است. سویه‌های *کلبسیلا* به ویژه *کلبسیلا پنومونیه*، از عمده‌ترین باکتری‌های عامل عفونت مجاری ادراری می‌باشند (۴). باکتری‌های جنس *کلبسیلا* پاتوژن‌های فرصت‌طلبی از خانواده *انتروباکتریاسه* هستند که مسئول ۱۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند و اغلب موجب سپتی‌سمی، باکتریمی، آنتریت نوزادان، مننژیت و عفونت‌های دستگاه ادراری و بافت‌های نرم به‌ویژه در نوزادان می‌شوند (۵). بیشتر سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* دارای مارکر K هستند که مارکرهای K1 و K2 و هم‌چنین K54 و K57 اهمیت بیشتری در ایجاد مقاومت به فاگوسیت‌ها و ایجاد آبسه‌های کبدی در مقایسه با سایر جدایه‌ها نشان می‌دهند (۵).

استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث بروز مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های گرم منفی به‌ویژه *کلبسیلا پنومونیه* گردیده‌است (۶). مقاومت بالای *کلبسیلاها* به آنتی‌بیوتیک‌ها و گسترش سریع آن‌ها در بخش‌های مختلف بیمارستان مشکلات عمده‌ای را در درمان ایجاد کرده و سپتی‌سمی و مرگ بیماران را موجب شده‌است(۷). برخی از ارگانیسم‌ها به‌طور ذاتی به تعداد یا تمامی عوامل ضدمیکروبی مقاوم هستند و برخی از ارگانیسم‌ها با مکانیسم‌های موتاسیون و انتشار ژن‌های مقاومت از ارگانیسم‌های مقاوم به سایر ارگانیسم‌ها مقاوم می‌شوند (۸). عامل اصلی بروز این مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی حضور یک‌سری ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی از جمله ژن‌های کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (*SHV* و *TEM* و *CITM*)، سولفانامیدها (*sul1*، *sul2* و *int1*)، جنتامایسین (*aac(3)-IV*)، سفالوتین (*blaSHV*)، استرپتومایسین (*strA*، *strB* و *aadA1*)، تتراسایکیلین (*tetA-tetE* و *tetG*)، تری متوپریم (*dfrA1*، *dfrA13*، *dfr7* و *dfr17*)، فلورکوئینولون (*qnr*) و کلرامفنیکل (*catI-catIII* و *cmlA*) می‌باشد (۹).

با توجه به شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *کلبسیلا پنومونیه* و گسترش عفونت‌های بیمارستانی ناشی از آن، در این تحقیق جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* از موارد عفونت‌های ادراری در بیماران بستری جداسازی و الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۹ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* از عفونت‌های دستگاه ادراری از بیماران بستری در بیمارستان شهر زرین‌شهر اصفهان در فاصله زمانی خرداد ۱۳۹۵تا خرداد ۱۳۹۶ انتخاب گردید.

کشت و شناسایی باکتری‌ها

جهت تایید فنوتیپی جدایه های اخذ شده، جدایه ها در کنار شعله بر روی محیط ائوزین-متیلن بلو آگار (Himedia، هند) کشت و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های لاکتوز مثبت موکوئیدی انتخاب و رنگ‌آمیزی گرم روی آن‌ها انجام شد. کلنی‌های موکوئیدی واجد باسیل‌های کوتاه گرم‌منفی هم‌زمان در محیط های

سه قندی آهن‌دار Triple Sugar Iron Agar (TSI) (Himedia، هند) و Sulfide Indole Motility (SIM) (Himedia، هند) کشت و به روش IMViC آزمایش شدند. جدایه‌های واجد واکنش ++-- در آزمایش IMViC که دارای واکنش اسید/اسید در محیط TSI و غیرمتحرک بودند به عنوان جدایه کلبسیلا پنومونیه انتخاب و جهت مطالعات بعدی و انجام آزمایش مولکولی در محیط Tryptic Soy Broth (TSB) (Merk، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA ژنومی از جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* رشد یافته در محیط TSB از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط TSB در یک میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۰دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. پس از سانتریفوژ نمونه‌ها در ۱۴۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه، مایع رویی به عنوان منبع DNA جدا و تا انجام PCR، در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۰).

PCR

جهت تایید قطعی وجود جدایه‌های مورد مطالعه آزمایش PCR، با استفاده از زوج پرایمرهای ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT و TTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTTC، جهت ردیابی ژن *16s-23s ITS*، انجام شد. برنامه حرارتی مورد استفاده در این مرحله شامل یک سیکل ۹۴درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. وجود قطعه ۱۳۰ جفت بازی تکثیر یافته در این واکنش نشان‌گر وجود *کلبسیلا پنومونیه* در جدایه‌های مورد مطالعه بود (۱۱).

جهت شناسایی شایع‌ترین تیپ‌های کپسولی در *کلبسیلا پنومونیه* شامل تیپ‌های K_{54}، K_5، K_2، K_1 و K_{57} از واکنش PCR چندگانه‌ای از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ با شرایط PCR ذکر شده در جدول ۳ در قالب PCR چندگانه استفاده شد:

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تعیین تیپ‌های کپسولی در *کلبسیلا پنومونیه* (۱۲).

سروتیپ کپسولی	پرایمر	توالی(5'-3')	اندازه قطعه (bp)
K1	MagAF1 MagAR1	GGTGCTCTTTACATCATTGC GCAATGGCCATTTGCGTTAG	۱۲۸۳
K2	K2wzy-F1 K2wzy-R1	GACCCGATATTCATACTTGACAGAG CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC	۶۴۱
K5	K5wzxF360 K5wzxR639	TGGTAGTGATGCTCGCGA CCTGAACCCACCCCAATC	۲۸۰
K54	wzxK54F wzxK54R	CATTAGCTCAGTGGTTGGCT GCTTGACAAACACCATAGCAG	۸۸۱
K57	wzyK57F wzyK57R	CTCAGGGCTAGAAGTGTCAT CACTAACCCAGAAAGTCGAG	۱۰۳۷

در این مرحله واکنش PCR چندگانه‌ای در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۲ میلی‌مول $Mgcl_2$، ۱۵۰ میکرومول dNTP Mix، ۰/۵ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R مربوط به هر تیپ، ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۴ میکرولیتر از DNA مربوط به هر جدایه تنظیم و از برنامه حرارتی زیر استفاده شد. یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴

درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

به منظور ردیابی انواع ژن‌های کدکننده مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام، فلوروکینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسیکلین‌ها، کلرامفنیکل و سولفانامیدها از پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۲ با شرایط PCR ذکر شده در جدول ۳ در قالب PCR چندگانه استفاده شد:

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های کدکننده‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *کلبسیلا پنومونیه* (۱۲).

اندازه محصول (جفت باز)	توالی پرایمر	نام ژن	مقاومت آنتی بیوتیکی
۴۴۷	TATCCAGCTAAGCGCGAACT ATTTGCCGACTACCTTGGTC	*aadA1*	استرپتومایسین
۲۸۶	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	*aac(3)-IV*	جنتامایسین
۸۲۲	TTCGGCATTCTGAATCTCAC ATGATCTAACCCTCGGTCTC	*sul1*	سولفانامید
۷۶۸	TCGCCTGTGTATTATCTCCC CGCAGATAAATCACCACAATG	*blaSHV*	سفالوتین
۵۴۷	AGTTGCTCAATGTACCTATAAC TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	*Cat1*	کلرامفنیکل
۶۹۸	CCGCCACGGTGTTGTTGTTATC CACCTTGCCTGCCCATCATTAG	*cmlA*	کلرامفنیکل
۵۷۷	GGTTCACTCGAACGACGTCA CTGTCCGACAAGTTGCATGA	*tetA*	تتراسیکلین
۶۳۴	CCTCAGCTTCTCAACGCGTG GCACCTTGCTGATGACTCTT	*tetB*	تتراسیکلین
۳۶۷	GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC	*dfrA1*	تری متوپریم
۴۶۲	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	*CITM*	آمپی سیلین

جدول ۳- شرایط PCR چند گانه‌ای مورد استفاده جهت ردیابی شایع‌ترین ژهای کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه*

ژن	برنامه PCR	حجم PCR (50 µL)
aadA1, aac(3)-IV, sul1, blaSHV, cat1, cmlA	1 cycle: 94 0C ---------- 8 min. 32 cycle: 95 0C ---------- 60 s 55 0C ---------- 70 s 72 0C ---------- 2 min 1 cycle: 72 0C ---------- 8 min	۵ میکرولیتر PCR buffer 10X ۲/۵ میلی مول $Mgcl_2$ ۲۰۰ میکرو مول dNTP ۰/۵ میکرو مول از پرایمرهای F, R ۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase ۵ میکرولیتر الگو DNA
tetA, tetB, dfrA1, blaCITM	1 cycle: 94 0C ---------- 8 min. 32 cycle: 95 0C ---------- 60 s 55 0C ---------- 70 s 72 0C ---------- 2 min 1 cycle: 72 0C ---------- 8 min	۵ میکرولیتر PCR buffer 10X ۲/۵ میلی مول $Mgcl_2$ ۲۰۰ میکرو مول dNTP ۰/۵ میکرو مول از پرایمرهای F, R ۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase ۵ میکرولیتر الگو DNA
qnr	1 cycle: 94 0C ---------- 6 min. 32 cycle: 95 0C ---------- 60 s 55 0C ---------- 70 s 72 0C ---------- 70 s 1 cycle: 72 0C ---------- 5 min	۵ میکرولیتر PCR buffer 10X ۲/۵ میلی مول $Mgcl_2$ ۲۰۰ میکرو مول dNTP ۰/۵ میکرو مول از پرایمرهای F, R ۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase ۵ میکرولیتر الگو DNA

الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد واجد محلول رنگی DNA Safe Stain (سیناژن-ایران) در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاس ـ لیتوانی) با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت حدوداً ۱ ساعت انجام گرفت. ژل مورد نظر با دستگاه قرائت کننده ژل (Gel Documentation) مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

به منظور تعیین الگوی فنوتیپی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش انتشار دیسکی ساده (آنتی‌بیوگرام) طبق معیار(۲۰۱۷) CLSI استفاده شد (۱۳). جدایه‌های مورد مطالعه به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد در دیسک مایع TSB کشت داده شدند. پس از رشد باکتری، کدورتی معادل استاندارد نیم‌مک‌فارلند(1.5×10^8 CFU/ml) باکتری) از هر جدایه در محیطTSB تهیه و با استفاده از سواپ استریل به صورت کاملا متراکم روی محیط جامد مولر هینتون آگار (Himedia، هند) کشت داده شدند.

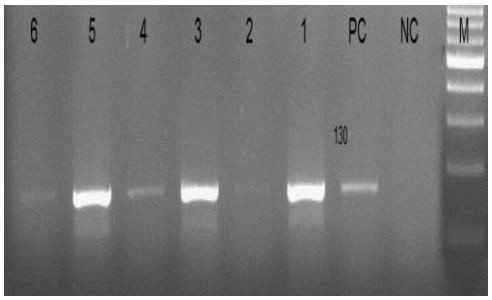
تست آنتی‌بیوگرام در حضور دیسک‌های سفتریاکسون (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۳۰µg)، سفازولین (۳۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، سفتازیدیم (۳۰µg)، ایمی پنم (۱۰µg)، سفپیم (۳۰µg)، تیکارسیلین (۷۵ µg) و جنتامایسین (۱۰µg)، ساخت شرکت پادتن طب ایران انجام شد. در این آزمایش از سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603 به عنوان کنترل کیفی انجام آزمایش استفاده شد.

جهت تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات حاصل از نتایج از نرم افزار آماری SPSS ver.18 و مدل آماری دقیق فیشر (Fisher's exact test) استفاده شد. در این آنالیز ($p < 0.05$) به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

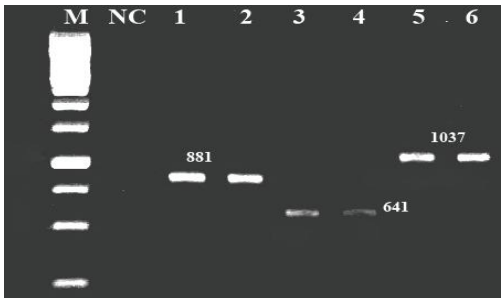
در این مطالعه ۲۹جدایه *کلبسیلا پنومونیه*جدا شده از عفونت‌های ادراری در بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان زرین‌شهر اصفهان مورد بررسی قرار گرفت.

پس از تایید فنوتیپی، جدایه‌های مورد مطالعه جهت تایید مولکولی به روش PCR با ردیابی ژن *16s-23s ITS* آزمایش شدند (تصویر ۱).



شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *16s-23s ITS* در جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* (ستون M = مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون NC= نمونه کنترل منفی، ستون PC= نمونه کنترل مثبت، ستون های 6-1= جدایه های مورد مطالعه واجد قطعه ۱۳۰ جفت بازی DNA).

شایع‌ترین تیپ‌های کپسولی در *کلبسیلا پنومونیه* شامل تیپ‌های K_1، K_2، K_5، K_{54} و K_{57} در ۲۹ جدایه مورد مطالعه ردیابی شدند (تصویر ۲)، که همان‌گونه که در جدول۴ آورده شده است هر ۵ تیپ مورد مطالعه در جدایه‌ها ردیابی شد، اما تیپ K_2 با فراوانی ۵۱/۷۲ درصد شایع‌ترین تیپ شناسایی شده در این جدایه‌ها بود.



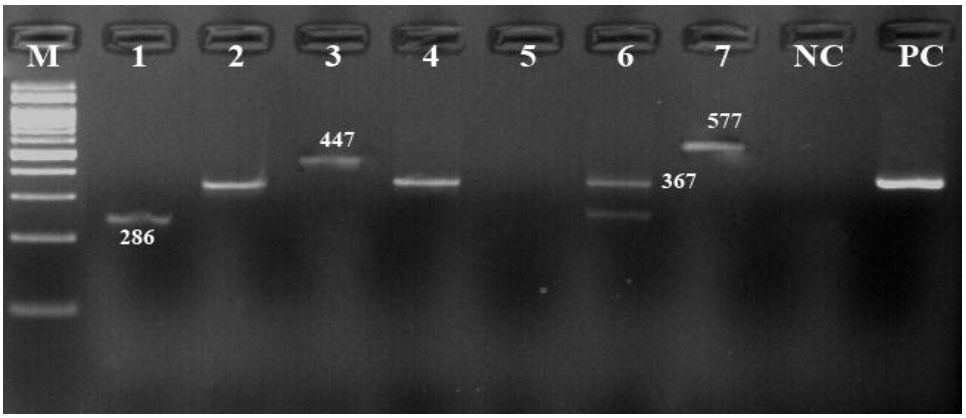
شکل ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی تعدادی از تیپ های کپسولی در جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* (ستون M = مارکر ۱ کیلو بازی DNA، ستون NC= نمونه کنترل منفی، ستون های 6-1= جدایه های مورد مطالعه واجد قطعه ۶۴۱ جفت بازی DNA مربوط به تیپ K2، قطعه ۸۸۱ جفت بازی DNA مربوط به تیپ K54، قطعه ۱۰۳۷ جفت بازی DNA مربوط به تیپ K57).

جدول ٤-تیپ‌های کپسولی شناخته شده در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری

Capsule type	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	Total
K_1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
K_2	+	+	–	–	–	+	+	+	+	–	–	+	–	–	–	–	+	–	+	+	+	–	–	–	+	+	+	+	–	15
K_5	–	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	+	10
K_{54}	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	3
K_{57}	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	2

در آنالیز نتایج حاصل از جدول فوق اختلاف آماری معنی‌داری (P=0.0433) بین دو تیپ K_2 و K_5 با سایر تیپ‌های کپسولی مشاهده شد.

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها و تیپ‌های کپسولی *کلبسیلا پنومونیه* به دو روش مولکولی و آنتی‌بیوگرام ارزیابی گردید که در قسمت مولکولی حضور۱۰ ژن کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک (*aadA1*، *aac(3)-IV*، *sul1*، *blaSHV*، *Cat1*، *cmlA*، *tetA*، *tetB*، *dfrA1* و *blaCITM*) به روش PCR در جدایه‌ها ردیابی شد (تصویر ۳)، که نتایج حاصله نشان داد که ژن‌های *tetA* (۷۵/۸۶ درصد) و *Sul1* (۷۲/۴۱ درصد) شایع‌ترین و دو ژن *Cat1* (۶/۸۹ درصد) و *cmlA* (۱۰/۳۴ درصد) نادرترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های مورد مطالعه بودند.



شکل ۳- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی تعدادی از ژن های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* (ستون M = مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون NC= نمونه کنترل منفی، ستون PC= نمونه کنترل مثبت، ستون های 7-1= جدایه های مورد مطالعه واجد قطعه ۲۸۶ جفت بازی DNA مربوط به ژن *aac(3)-IV*، قطعه ۳۶۷ جفت بازی DNA مربوط به ژن *dfrA1*، قطعه ٤٤٧ جفت بازی DNA مربوط به ژن *aadA1*، قطعه ۵۷۷ جفت بازی DNA مربوط به ژن *tetA*).

جهت تعیین الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری از روش آنتی‌بیوگرام استفاده شد و مقاومت جدایه‌های مورد مطالعه به ۱۳ آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در درمان عفونت‌های بیمارستانی (که متناسب با نوع ژن‌های مورد مطالعه انتخاب شده‌اند) بررسی گردید که همان‌گونه که در جدول ۵ نشان داده شده هر ۲۹ جدایه مورد مطالعه حداقل به یک از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند و در این میان تنها یک جدایه (۳/۴۴ درصد) نسبت به کلرامفنیکل و هر ۲۹ جدایه نسبت به پنی‌سیلین مقاوم بودند. به جز این دو آنتی‌بیوتیک، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به تتراسایکلین (۹۳/۱۰ درصد) مشاهده شد.

جدول ۵- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری

تعداد جدایه	TE30	S10	C30	SXT	GM10	NFX5	CF30	CIP5	TMP5	F/M300	AM10	P10	E15
29	27	10	1	18	10	6	9	4	11	2	8	29	17

در آنالیز داده‌های حاصل از جدول فوق، اختلاف آماری معنی‌دار بین مقاومت به پنی‌سیلین، تتراسایکلین، کوتریموکسازول و اریترومایسین با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مشاهده شد (P=0.041). در جدول ۶ مقاومت آنتی‌بیوتیکی در تیپ‌های مختلف *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تست شده به تفکیک هر سروتیپ آورده شده است:

جدول ۶- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در تیپ‌های کپسولی شناخته شده در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری

Capsule Type	TE30	S10	C30	SXT	GM10	NFX5	CF30	CIP5	TMP5	F/M300	AM10	P10	E15
K_1(1)	1	–	–	1	–	1	1	–	1	–	1	1	–
K_2(15)	14	10	4	14	10	6	7	4	10	4	4	15	10
K_5(10)	8	2	1	8	6	3	2	3	4	2	4	10	4
K_{54}(3)	2	–	–	2	1	–	1	1	2	–	–	3	1
K_{57}(2)	2	–	–	1	1	–	–	–	–	–	1	2	–

بحث

در دنیا سالیانه ۱۵۰ میلیون نفر به عفونت های ادراری مبتلا می شوند و شیوع این عفونت ها در خانم‌ها ۱۰ برابر آقایان است.

یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در بیماران بستری در بیمارستان‌ها و هم‌چنین بیماران سرپایی، عفونت مجاری ادراری است (۱۴). عفونت مجاری ادراری عمدتا توسط باکتری‌های گرم‌منفی از جمله *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *پسودوموناس آئروژینوزا* و گونه‌های *پروتئوس* ایجاد می‌شود (۱۵). افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عوامل ایجاد کننده عفونت‌های دستگاه ادراری، نگرانی‌های بسیاری را در جهت درمان این دسته از عفونت‌ها به وجود آورده است (۱۶). سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان جدایه‌های کسب شده از جامعه و بیمارستان رو به افزایش است و این امر یک مشکل بزرگ و جهانی می‌باشد. ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند از طرق مختلف در بین جمعیت‌های باکتریایی منتقل شوند (۱۷). در این مطالعه به‌جز پنی‌سیلین، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بود و در همین راستا ژن *tetA* با فراوانی حضور ۷۵/۸۶ درصد شایع‌ترین ژن ردیابی شده بود.

بررسی نتایج حاصل از این مطالعه نشان‌دهنده افزایش رو به رشد میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد به طوری که میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله تتراسایکلین و کوتریموکسازول بسیار بیشتر از مطالعه انجام شده توسط هاشمی‌زاده و همکاران می‌باشد (۱۸). در مطالعه‌ای که توسط Rijavec در اسلووانیا (۲۰۰۶) انجام گرفت، بیش‌ترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل بود (۱۹) در مطالعه ما هر چند بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به تتراسایکلین تعیین شد، اما میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آمپی‌سیلین

۲۷/۵۸ درصد و نسبت به کلرامفنیکل ۳/۴۴ درصد بود و کلرامفنیکل کمترین میزان مقاومت نسبت به آن وجود داشت. یکی از دلایل این اختلاف ممنوعیت مصرف کلرامفنیکل در دامپزشکی است و احتمالا به دلیل عدم مصرف این آنتی‌بیوتیک، مقاومت نسبت به آن پایین می‌باشد. به‌جز دو آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و نیتروفورانتوئین، کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مربوط به دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و انروفلوکساسین بود که مخصوصا سیپروفلوکساسین به عنوان یکی از داروهای اصلی درمان عفونت‌های دستگاه ادراری تجویز می‌شود. در مطالعه سلطان دلال و همکاران در شهر تهران (۲۰)، Amin و همکاران در کشور پاکستان (۲۱)، Ishii در کشور ژاپن (۲۲) و Al-shara و همکاران در اردن (۲۳) آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و ایمی‌پنم به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های موثر در درمان عفونت‌های ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* معرفی شده‌اند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ در چین انجام شد، ایمی‌پنم و جنتامایسین به عنوان موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها و سفوتاکسیم با ۹۶/۸ درصد مقاومت، کم اثرترین آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های *کلبسیلایی* گزارش شد که با نتایج حاصل از مطالعه ما هم‌خوانی ندارد (۲۴).

سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان عوامل ایجاد کننده عفونت‌های دستگاه ادراری از کشوری به کشور دیگر متغیر است که از دلایل این تفاوت می‌توان به شرایط جغرافیایی، نوع شیوه زندگی و نحوه تجویز آنتی‌بیوتیک در هر کشور و منطقه اشاره کرد.

حضور ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی، اصلی‌ترین دلیل بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های باکتریایی است. نتایج PCR مربوط به ردیابی تعدادی از ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۲۹ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری نشان داد که ۷۵/۸۶ درصد از جدایه‌ها، حامل ژن *tetA* و ۴۸/۲۷ درصد از آن‌ها واجد ژن *tetB* بودند.

درمطالعه‌ای در ایران که برروی ۱۲۱ جدایه *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد پاپیلونفریت و التهاب مثانه، انجام گرفت، ژن‌های کدکننده مقاومت به جنتامایسین (۹۶/۷ درصد)، داروهای بتالاکتام (۹۰/۳ و ۸۸/۷ درصد) و تتراسایکلین (۸۲/۸ درصد) بیشترین فراوانی را در جدایه‌های مورد مطالعه داشتند (۲۵). در مطالعه‌ای در بیمارستان‌های ترکیه (۲۰۰۵)، ژن‌های *SHV-1* و *SHV-5*، شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت به داروهای بتالاکتام در جدایه‌های *انتروباکتریاسه* مولد بتالاکتاماز بودند (۲۶). در مطالعه خورشیدی و همکاران (۱۳۸۸) در کاشان، از ۳۲ *کلبسیلا* مورد بررسی، ۵۰ درصد حامل ژن *SHV-5* و ۳۷/۵ درصد واجد ژن *TEM-1* بودند (۲۷).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان‌گر مقاومت بالای جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از جمله تتراسایکلین بود که علت آن مصرف بی رویه این آنتی‌بیوتیک در پزشکی و دامپزشکی است. همچنین، شیوع ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بیماران، بیان‌گر انتشار گسترده سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در بیمارستان می‌باشد. بدیهی است افزایش بی‌رویه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و متعاقب آن گسترش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در جامعه، منجر به ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو می‌گردد. لذا توصیه می‌گردد که از مصرف بی‌مورد و خودسرانه آنتی‌بیوتیک خودداری شود ودارو براساس نتایج آنتی‌بیوگرام تجویز گردد.

منابع و مآخذ

1. Kim JM, Park ES, Jeong JS, Kim KM, Kim JM, Oh HS, Yoon SW, Chang HS, Chang KH, Lee SI, Lee MS, Song JH, Kang MW, Park SC, Choe KW, Pai CH. Multicenter surveillance study for nosocomial infections in major hospitals in Korea. Nosocomial Infection Surveillance Committee of the Korean Society for Nosocomial Infection Control. Am J Infect Control. 2000; 28(6): 454-8.
2. Larypoor M, Frsad S. Evaluation of nosocomial infections in one of hospitals of Qom, 2008. Iran J Med Microbiol. 2011; 5(3): 7-17. [In Persian]
3. Ronald AR, Pattullo AL. The natural history of urinary infection in adults. Med Clin North Am. 1991; 75(2): 299-312.
4. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(4): 657-86.
5. 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): 352-5.
6. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem?.Clin Microbiol Infect. 2008; 14(4): 295–7.
7. Gootz, TD. The global problem of antibiotic resistance. Crit Rev Immunol. 2010; 30(1): 79-93.
8. Jalalpoor SH, Kasra Kermanshahi R, Nouhi AS, Zarkesh Isfahani H. Comparing the frequency of β-lactamase enzyme in isolated nosocomial infectious bacteria. JRMS. 2009; 8(3): 203-14.
9. Lapierre L, Cornejo J, Borie C, Toro C, San Martín B. Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and class 2 integrons in commensal strains of *Escherichia coli* isolated from poultry and swine. Microb Drug Resist. 2008; 14(4): 265-72.
10. Shahrani,M, Dehkordi,FS, Momtaz,H.Characterization of Escherichia coli virulence genes, pathotypes a nd antibiotic resistanceproperties in diarrheic calves in Iran. Biol Res. 2014; 47: 28.
11. Liu Y, Liu C, Zheng W, Zhang X, Yu J, Gao Q, Hou Y, Huang X. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S–23S internal transcribed spacer. Int J Food Microbiol. 2008; 125: 230–5.
12. 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). Feyz. 2017; 21(1): 74-82.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; 20th informational supplement. CLSI/NCCLS M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute,Wayne, Pa, 2017.
14. Ronald AR, Pattullo AL. The natural history of urinary infection in adults. Med Clin North Am. 1991; 75(2): 299-312.
15. Bergus G. Urinary tract infections in pregnancy. In: Yankowitz J, Niebyl JR, editors. Drug Therapy in pregnancy. 3th ed, Piladelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
16. Gholipour A, Soleimani N, Shokri D, Mobasherizadeh S, Kardi M, Baradaran A. Phenotypic and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase produced by *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates in an educational hospital. Jundishapur J Microbiol. 2014; 7(10): e11758.
17. White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 2658–61.

18. Gulsun S, Oguzoglu N, Inan A, Ceran N. The virulence factors and antibiotic sensitivities of *Escherichia coli* isolated from recurrent urinary tract infections. Saudi Med J. 2005; 26: 1755–58.

19. Tariq N, Jaffery T, Ayub R, Alam AY, Javid MH, Shafique S. Frequency and antimicrobial susceptibility of aerobic bacterial vaginal isolates. J Coll Physicians Surg Pak. 2006; 16: 196–99.

20. Soltan Dalal MM, Miremadi SA, Sharify Yazdi MK, Rastegar Lari A, Rajabi Z. Antimicrobial resistance trends of *Klebsiella* Spp. isolated from patients in Imam Khomeini Hospital. Payavard. 2012; 6(4): 275-81.

21. Amin A, Ghumro PB, Hussain S, Hameed A. Prevalence of antibiotic resistance among clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* isolated from a Tertiary Care Hospital in Pakistan. Mala J Microbiol. 2009; 5(2): 81-6.

22. Ishii Y, Alba J, Kimura S, Shirito K, Yamaguchi K. Evolution of antimicrobial activity of Blactam antibiotics using E-test against clinical isolates from 60 medical centers in Japan. J Antimicrob Agent. 2005; 25(4): 296-301.

23. Al Shara MA. Emerging Antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumonia* strains Isolates from Pediatric Patients in Jordan. Iraqi J Med. 2011; 7(2): 29-32.

24. Du J, Li P, Liu H, Lü D, Liang H, Dou Y. Phenotypic and molecular characterization of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university teaching hospital, China. PloS one 2014; 9(4): e95181.

25. Dormanesh B, Mirnejad R, Khodaverdi Dariyan E, Momtaz H, Yahaghi E, Safarpour Dehkordi F, Pilevarzade M. Characterization and study the antibiotic resistance of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pediatrics with pyelonephritis and cystitis in Iran. Iran J Med Microbiol. 2013; 7(2): 27-39

26. Machado E, Coque TM, Canton R, Novais A, Sousa JC, Baquero F, Peixe L. Portuguese Resistance Study Group. High diversity of extended-spectrum betalactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. J Antimicrob Chemother. 2007; 60(6): 1370-74.

27. Khorshidi A, Moazen Z, Rohani M, Moniri R, Shagari GH. Prevalence of *TEM* and *SHV1* genes in *Kelebsiella pneumoniea* with ESBL. Militarymed J. 2009; 3(11): 149-53. [In Persian]