مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۷، شماره۵، آذر و دی ۱۴۰۱(شماره پی در پی ۱۵۴)

ارزیابی فراوانی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در ایزوله‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه مقاوم به دارو به روش فنوتیپی و ژنوتیپی

مهسا هراتی، فرشته قندهاری*، مژگان قیاسیان

گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۱/۰۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: گزارش‌های متعددی در رابطه با افزایش و شیوع رو به رشد ارگانیسم‌های مولد ESBLs از مناطق مختلف در کشور وجود دارد. با توجه به اینکه کلبسیلاپنومونیه درصد قابل توجهی از عفونت‌های بیمارستانی را شامل می‌شود، بنابراین شناخت الگوی مقاومت وحساسیت این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام در درمان و کنترل عفونت‌های ناشی از این باکتری نقش بسزایی دارد ، لذا هدف از این مطالعه تعیین ارزیابی فراوانی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در ایزوله‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه مقاوم به دارو به روش فنوتیپی وژنوتیپی بود.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی ـ توصیفی که در سال ۱۳۹۸ انجام شد، ۱۰۰ سویه *کلبسیلا* پنومونیه جدا شده از نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری از بیمارستان الزهرا(س) اصفهان تهیه گردید. شناسایی و تأیید سویه‌های کلبسیلا پنومونیه با استفاده از آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی انجام گرفت. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن بر اساس معیار CLSI بررسی شد. برای انجام تست تأیید فنوتیپی سویه‌های تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، از روش دیسک ترکیبی بر اساس معیار CLSI استفاده شد. تست PCR با پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی blaSHV و *bla TEM* انجام گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک طرفه وتی مستقل تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از بین ۱۰۰ ایزوله مربوط به عفونت ادراری، ۳۳ ایزوله حداقل به ٤ آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم(۳۸ درصد) و کم‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کوتریماکسازول(۲۲ درصد) بود. نتایج دیسک ترکیبی نشان داد که ۱۰ ایزوله(۸٦/۸ درصد) مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف هستند. از این تعداد ۷ ایزوله(۷۰ درصد) واجد ژن SHV و ۳ ایزوله دیگر هیچ کدام از دو ژن TEM و SHV را نداشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از فراوانی بیشتر ESBLsها و هم‌چنین شیوع بیشتر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های *کلبسیلاپنومونیه* جدا شده از عفونت ادراری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *کلبسیلا* پنومونی، عفونت ادراری، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف ، روش فنوتایپی وژنوتایپی

***نویسنده مسئول: فرشته قندهاری،** اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی

Email:fe_gh_2010@yahoo.com

مقدمه

عفونت مجاری ادراری(UTI) از نظر شیوع دومین نوع عفونت باکتریایی پس از عفونت مجاری تنفسی می‌باشد که میزان بروز آن در جنس مؤنث بسیار بیشتر از جنس مذکر است. UTI عفونت‌های مکرر و پیچیده‌ای هستند که در بیماران سالخورده، در بیمارانی با سیستم ایمنی تضعیف شده، در طی مراحل انسداد دستگاه ادراری و افرادی که تحت درمان با آنتی‌بیوتیک قرار دارند، ممکن است بروز کند. شایع‌ترین اشکال بالینی عفونت مجاری ادراری شامل؛ پیلونفریت، سیستیت و باکتریوری بدون علامت می‌باشند. طبق بررسی‌های انجام شده *کلبسیلا* پنومونیه پنجمین عامل شایع در ایجاد UTI بیمارستانی است(۱).

افزایش ظهور مقاومت دارویی در جدایه های بیمارستانی کلبسیلا پنومونیه گزینه‌های درمانی را برای عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این باکتری محدود نموده است.بهترین گزینه جهت درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این باکتری آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به دلیل سمیت پایین برای سلول‌های یوکاریوتی‌ــ طیف اثرگسترده و اثر ضدمیکروبی قوی هستند. مهم‌ترین مکانیسم ایجاد مقاومت نسبت به این داروها تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشد. این آنزیم‌ها با اتصال به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و با تخریب پیوند آمیدی باعث غیرفعال شدن این داروها می‌شوند.این آنزیم‌ها متنوع بوده و در پاسخ به فشارانتخابی آنتی‌بیوتیک ها مرتب در حال موتاسیون و یا جایگزینی اسیدهای آمینه به ویژه در جایگاه فعال آنزیم هستند و این امر منجر به ظهور طیف جدیدی از بتالاکتامازها با طیف گسترده (ESBLs) شده است(۲). این دسته از آنزیم‌ها قادر هستند سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف از جمله؛ سفتریاکسون، سفوتاکسیم و سفتازیدیم را تجزیه کنند و براساس عملکری به ٤ گروه اصلی A تا D تقسیم می‌شوند. در این تقسیم‌بندی آنزیم‌های TEM و SHV که در گروه A قراردارند، به طور وسیع در کلبسیلا پنومونیه گزارش شده‌اند و سبب هیدرولیز آمپی‌سیلین، اکساسیلین، سفالوتین وسفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف می‌شوند. ژن تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف کمابیش برروی پلاسمیدها واقع شده‌اند که مقاومت متقاطع نسبت به کلاس‌های دیگر آنتی‌بیوتیک را ممکن می‌سازد که این امر موجب محدودیت در انتخاب درمانی آنتی‌بیوتیک صحیح می‌شود(۳). این ژن‌ها می‌توانند به سویه‌های مختلف یک جنس یا جنس‌های مختلف از انتروباکتریاسه‌ها انتقال یابند. بنا بر این بررسی الگوی مقاومت دارویی و شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز شایع که امروزه یکی از دلایل اصلی مقاومت این باکتری است ضروری می‌باشد. لذا هدف از این مطالعه تعیین ارزیابی فراوانی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در ایزوله‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه مقاوم به دارو به روش فنوتیپی وژنوتیپی بود.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی که در سال ۱۳۹۸ بر روی ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه انجام شد، ایزوله‌ها از نمونه ادرار بیماران بستری در بیمارستان آموزشی اصفهان جدا شدند. نمونه‌های ادراری مربوط به بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری بود که شمارش کلنی آنها معادل یا بیشتر از ده هزار باکتری بود. جهت تعیین هویت باکتری‌های یاد شده از رنگ‌آمیزی گرم، کشت در محیط‌های کشت مک کانکی آگار و انجام تست‌های افتراقی MR، VP، SIM، TSI، سیترات و اوره استفاده شد، کلیه محیط‌های کشت مصرفی متعلق به شرکت مرک آلمان بود. ایزوله‌ها بعد از تعیین هویت در محیط کشت تریپتیکاز سوی براث(شرکت Merck) حاوی ٤٠ درصد گلیسرول و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و ذخیره شد.

طبق دستورالعمل ارایه شده از طرف CLSI شناسایی سویه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به روش فنوتیپی در دو مرحله انجام می‌شود.

مرحله اول تست غربالگری اولیه: مقاوت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون(CRO: ۳۰ میکرو گرم)، سفوتاکسیم(CTX: ۳۰ میکرو گرم)، سفتازدیم (CAZ: ۳۰ میکرو گرم)، سفپیم(FEP: ۳۰ میکرو گرم)، ایمی‌پنم (IPM: ۳۰ میکرو گرم)، کوتریماکسازول(SXT: ۷۵/۲۳/۲۵/۱ میکرو گرم)(تهیه شده از شرکت پادتن طب) به روش انتشار از دیسک وبراساس دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاهی بالینی(CLSI) انجام شد(٤).

مرحله دوم تست تأییدی فنوتیپی: .جهت شناسایی فنوتیپی آنزیم‌های ESBLS از روش دیسک ترکیبی استفاده شد. دیسک‌های سفتازیدیم سفوتاکسیم با غلظت ۳۰ میکروگرم به تنهایی و همراه با کلاوولانیک اسید(۱۰ میکروگرم) تهیه شده از شرکت پادتن طب به فاصله ۲ سانتی‌متر از یکدیگر بر روی محیط کشت تلقیح شده قرار داده شد. طبق دستورالعمل شرکت سازنده افزایش بیش از ٥ میلی‌متری در قطر هاله عدم رشد در حضور دیسک حاوی کلاوولانیک اسید همراه با سفالوسپورین به عنوان ESBLS تأیید شد. از سویه اشرشیاکلی ATCC25922 وکلبسیلا پنومونیه ATCC700603 جهت کنترل کیفی آنتی بیوگرام استفاده شد(٥).

ایزوله‌های تولید کننده ESBLS جهت شناسایی بتالاکتامازهای SHV و TEM به روش PCR بررسی شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است(٥). پرایمرها از شرکت سینا کلون ژن تهیه شد.

این واکنش در حجم شامل؛ بیست و پنج میکرولیتر، دو و نیم میکرولیتر، هفتاد و پنج صدم، میکرولیتر، نیم میکرولیتر، یک میکرولیتر، یک میکرولیتر، بیست و پنج صدم میکرولیتر و نوزده میکرولیتر آب دیونیزه طبق شرایط دمایی و زمانی موجود در جدول ۲ انجام گرفت(دستگاه ترموسایکلر برای ۳۵ سیکل تنظیم شد). محصول PCR بر روی ژل

آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. جهت اطمینان از صحت انجام PCR از سویه اشرشیا کلی ATCC (۲۵۹۲۲) به عنوان کنترل منفی و کلبسیلا نمونیه ATCC (۷۰۰۶۳) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری پارامتریک تی مستقل وآنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

از ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه تعداد ٦٧ ایزوله (٦٧ درصد) متعلق به افراد مؤنث و ۳۳ ایزوله(۳۳ درصد) متعلق به افراد مذکر بود. بیشترین فراوانی ایزوله‌ها مربوط به گروه‌های سنی ٤٠ تا ٨٠ سال است(جمعاً ۷۳ درصد). در این مطالعه جهت بررسی ارتباط بین متغیر سن و متغیرهای وابسته، بیماران از لحاظ سنی و بر اساس درصد فراوانی نمونه، به سه گروه طبقه‌بندی شدند. به طوری که در هر سه گروه تعداد مشخصی از بیماران حضور داشته باشند. گروه‌های سنی عبارتند از؛ گروه سنی زیر ۳۰ سال(۱۸ درصد)، بین ۳۱ تا ٦٠ سال(٤١ درصد) و بیشتر از ٦١ سال(٤١ درصد)(نمودار۱).

جدول ۱: توالی پرایمرها جهت شناسایی ژنوتیپی باکتری‌های تولید کنندهESBLS

ژن هدف	طول قطعه(**bp**)	پرایمر	(۳ ← ۵) توالی
bla_{TEM}	٤٤٥	TEM- F	۳TAAAGTTCTGCTATGTGGCG ۵′
	٤٤٥	TEM-R	۳′ ATCGTTGTCAGAAGTAAGTTG ۵′
bla_{SHV}	٦٢٨	SHV-F	۳′TCGGGCCGCGTAGGCATGAT ۵′
	٦٢٨	SHV-R	۳′AGCAGGGCGACAATCCCGCG ۵′

جدول ۲: برنامه دمایی و زمانی دستگاه ترموسایکلر

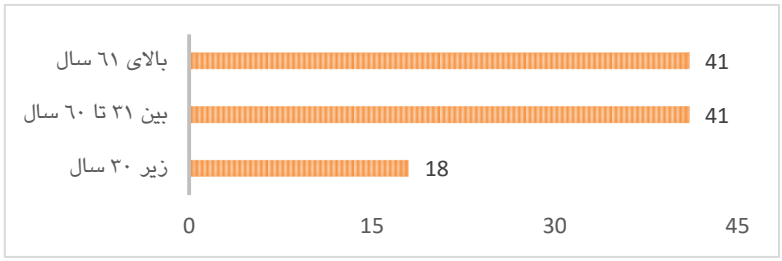
	دما	زمان	سیکل
Initial denaturation	۹٤ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه	۱
Denaturation	۹٤ درجه سانتی‌گراد	۳۰ دقیقه	۳۵
Annealing	٥٤درجه سانتی‌گراد	۳۰ دقیقه	
Extension	۷۲درجه سانتی‌گراد	٤٥ دقیقه	
Final extension	۷۲درجه سانتی‌گراد	٥دقیقه	۱

میزان مقاومت ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی عبارتند از؛ سفتریاکسون(CRO): ۳۵ ایزوله (۳۵ درصد) مقاوم، ۱۶ ایزوله (۱۶ درصد) نیمه‌حساس و ۴۹ ایزوله(۴۹ درصد) حساس: نسبت به دیسک آنتی‌بیوتیکی سفوتاکسیم (CTX): ۳۸ ایزوله(۳۸ درصد) مقاوم، ۲۲ ایزوله(۲۲ درصد) نیمه‌حساس و ۴۰ ایزوله(۴۰ درصد) حساس، نسبت به دیسک آنتی‌بیوتیکی سفتازدیم (CAZ): ۳۴ ایزوله(۳۴ درصد) مقاوم، ۱۰ ایزوله(۱۰ درصد) نیمه‌حساس و ۵۶ ایزوله(۵۶ درصد) حساس مشاهده شدند؛ نسبت به دیسک آنتی‌بیوتیکی سفپیم (FEP): ۲۷ ایزوله(۲۷ درصد) مقاوم، ۷ ایزوله(۷ درصد) نیمه‌حساس و ۶۶ ایزوله (۶۶ درصد) حساس بودند، هم‌چنین نسبت به دیسک آنتی‌بیوتیکی ایمی‌پنم(IPM): ۳۱ ایزوله(۳۱ درصد) مقاوم، ۷ ایزوله (۷ درصد) نیمه‌حساس و ۶۲ ایزوله (۶۲ درصد) حساس و نسبت به دیسک آنتی‌بیوتیک کوتریماکسازول (SXT): تعداد ۲۲ ایزوله مقاوم(۲۲ درصد)، ۸ ایزوله(۸ درصد) نیمه‌حساس و ۷۰ ایزوله (۷۰ درصد) حساس بودند(نمودار ۲) .

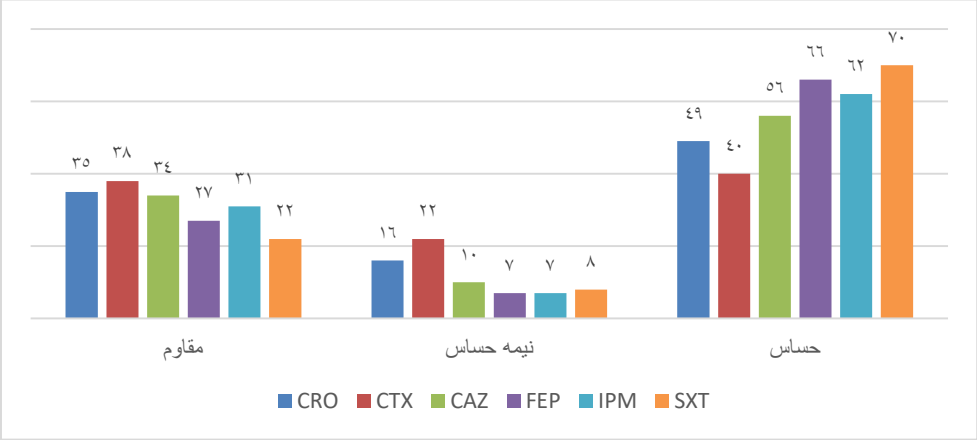
توزیع فراوانی میزان حساسیت ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به تفکیک جنسیت و سن بیماران با استفاده از آزمون نسبت درست نمایی بررسی شد. نتایج نشان داد که هیچ رابطه‌ای بین میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با جنسیت و سن بیماران وجود ندارد(p>۰/۰۵).

نتایج تست غربالگری اولیه برای شناسایی ایزوله‌های مولد ESBLs نشان داد از بین ۱۰۰ ایزوله در این مطالعه، ۳۳ ایزوله(۳۳ درصد) حداقل به چهار آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. به طوری که، ۲۱ ایزوله از ۳۳ ایزوله مقاوم(۶۳/۶ درصد)، زن و مابقی مرد بودند. هم‌چنین سن بیماران در ۴ ایزوله(۱۲/۱ درصد) زیر ۳۰ سال با میانگین سن ۲/۵ ± ۲۷/۳ سال، ۱۵ ایزوله(۴۵/۵ درصد) بین ۳۱ تا ۶۰ سال با میانگین ۱۰/۰ ± ۴۹/۷ سال و ۱۴ ایزوله(۴۲/۴ درصد) بالای ۶۱ سال(میانگین سن: ۶/۵ ± ۷۵/۱ سال بودند. از میان ۳۳ نمونه مقاوم به نماینده‌های سفالوسپورین پس از انجام تست تأییدی دیسک‌های ترکیبی ۱۰ ایزوله(۸۶/۸ درصد) به عنوان باکتری‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) شناسایی شدند.

از ۱۰ سویه‌ی *کلبسیلاپنومونیه* ESBLs، تعداد ۷ ایزوله(۷۰ درصد) واجد ژن bla SHV و در مابقی هیچ‌کدام از ژن‌های bla TEM و bla SHV حضور نداشت که از آن‌ها تعداد ایزوله‌های زن ۵ ایزوله(۸۳/۳ درصد) واجد ژن bla SHV و یک ایزوله (۱۶/۷ درصد) هیچ‌کدام از ژن‌ها را نداشتند(شکل ۱). هم‌چنین نتیجه آزمون نسبت درست‌نمایی، نشان داد که رابطه‌ای بین جنسیت بیماران و حضور ژن‌ها وجود نداشت(p>۰/۰۵) (نمودار ۳).

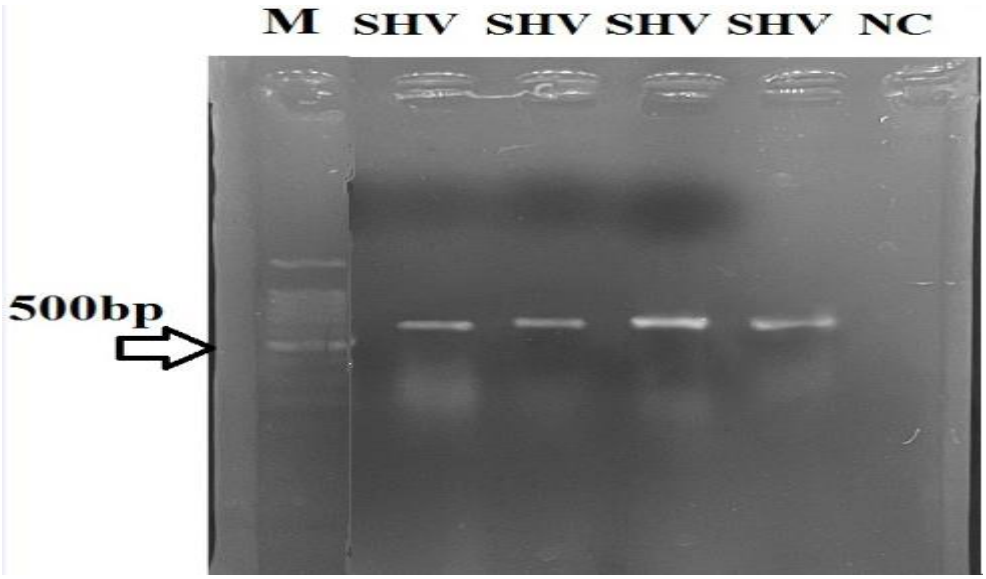


نمودار ۱: توزیع فراوانی ایزوله‌ها برحسب گروه‌های سنی

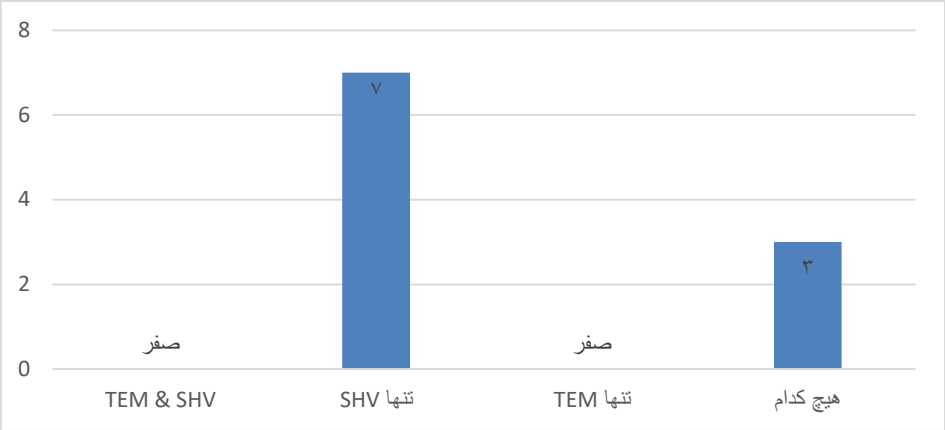


نمودار ۲: توزیع فراوانی نتیجه آنتی‌بیوگرام سویه‌های *کلبسیلا* پنومونیه به تفکیک میزان مقاومت

.



شکل ۱: محصول PCR ژن SHV(bp٦٢٨), نمونه ۱: مارکر ژنی ۱۰۰ bp ونمونه ۵,٤,٣,٢ واجد ژن SHV



نمودار ۳: فراوانی شیوع ژن های بتالاکتامازی TEM و SHV در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

بحث

کلبسیلا پنومونیه قادر به تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از جمله آنزیم‌های TEM و SHV می‌باشد که سبب مقاومت بالای آن در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شود. با توجه به این که این باکتری درصد قابل توجهی از عفونت‌های بیمارستانی و خارج بیمارستانی را شامل می‌شود، بنابراین شناخت الگوی مقاومت وحساسیت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در درمان و کنترل عفونت‌های ناشی از این باکتری نقش بسزایی دارد(۲)، لذا هدف از این مطالعه تعیین ارزیابی فراوانی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در ایزوله‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه مقاوم به دارو به روش فنوتیپی وژنوتیپی بود.

افزایش شیوع میکروارگانیسم‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله باکتری‌های گرم منفی تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف یکی از موانع اساسی جهت درمان قطعی بیماری‌های عفونی محسوب می‌شوند(۷). از عوامل مهم ایجاد مقاومت و انتشار باکتری‌های مقاوم تجویز بیش از حد دارو، تجویز دوزهای ناکافی – درمان نامناسب و تشخیص اشتباه عامل ایجاد کننده عفونت به وسیله آزمایشگاه و متعاقب آن انتخاب آنتی‌بیوتیک نامناسب برای درمان است(۹ و ۸).

در این مطالعه از ۱۰۰ ایزوله کلبسیلاپنومونیه جدا شده تعداد ٦٧ بیمار(٦٧ درصد) زن و ۳۳ درصد مرد بودند. بیشترین فراوانی ایزوله‌ها مربوط به گروه‌های سنی ٤٠ تا ٨٠ سال بود. مقایسه نتایج پژوهش حاضر با نتایج سایر پژوهشگران نشان می‌دهد که که باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه، شایع‌ترین عامل ایجاد عفونت ادراری هستند. به طور مشابهی ملازاده و همکاران، میرزایی و همکاران، خسروی و همکاران، فراوانی کلبسیلا پنومونیه را در نمونه‌های ادراری به ترتیب برابر؛ ۳۲/۱ درصد، ۳۵ درصد و ۲۵/۵۳ درصد گزارش نمودند که این نتایج در راستای پژوهش حاضر است. هم‌چنین مقایسه

نتایج بیانگر آن است که ٦٠ درصد از عفونت دستگاه ادراری را زنان به خود اختصاص داده‌اند(١٢ـ١٠). نتایج پژوهش حاضر هم‌چنین نشان داد که افزایش سن به صورت نسبی باعث افزایش احتمال ابتلا به عفونت ادراری می‌شود که با یافته‌های محققانی چون نیکول و همکاران، شفر و همکاران، هم‌خوانی دارد که دلیل این امر می‌تواند این باشد که احتمالاً افزایش سن در معرض خطر ابتلا قرار گرفتن را افزایش می‌دهد و هم‌چنین افزایش سن منجر به کاهش قدرت سیستم ایمنی بدن می‌شود(١٥ـ١٣). نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی در پژوهش حاضر نشان داد که بیشترین مقاومت باکتری کلبسیلاپنومونیه نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم(٣٨ ایزوله ـ ٣٨ درصد) و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کوتریماکسازول(٢٢ ایزوله٢٢ درصد) بود. مقایسه نتایج پژوهش حاضر با سایر پژوهش‌ها نشان می‌دهد که باکتری الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی متفاوتی را نشان می‌دهد(١٨ـ١٦). اختلاف مشاهده شده در این نتایج با سایر پژوهش‌ها می‌تواند مربوط به الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک، منطقه جغرافیایی، تفاوت در الگوی مقاومت در مناطق مختلف و مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک در کشور ما باشد. هم‌چنین بالا بودن میزان مقاومت سویه‌های مقاوم به بعضی آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دهنده مصرف بی رویه این آنتی‌بیوتیک در کشور است. نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر از ٣٣ سویه کلبسیلاپنومونیه شناسایی شده در مرحله فنوتیپی که نسبت به چهار آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند، ١٠ ایزوله(٨/٨٦ درصد)، به دنبال آزمون تأییدی تولید کننده بتالاکتامار وسیع‌الطیف(ESBLs) بودند. بررسی مولکولی سویه‌های مورد آزمایش از نظر وجود ژن‌های بتالاکتامار blaSHV و bla TEM نشان داد که ٧ ایزوله(٧٠ درصد) واجد ژن blaSHV و ٣ ایزوله بالینی هیچ‌کدام از دو ژن bla TEM و SHVbla را نداشتند. که از تعداد ایزوله‌های زن ٥ ایزوله(٨٣/٣ درصد) واجد ژن blaSHV و یک ایزوله(١٦/٧ درصد) هیچ‌کدام از ژن‌ها را نداشتند. رنجبر و همکاران از بین ٧٦ نمونه کلبسیلا جمع‌آوری شده از بیماران سرپایی مبتلا به عفونت ادراری، در بین جدایه‌های ESBL مثبت به این نتیجه رسیدند که، blaCTX- M با (٦٤/٥ درصد) شایع‌ترین ژن بود و پس از آن blaSHV (٥٤/٨ درصد) و blaTEM (٤١/٩ درصد) به ترتیب بیشترین درصد فراوانی را داشتند(١٩). جلالی و همکاران از بین ٢٥ درصد جدایه‌های کلبسیلا پنمونیه از بیماران با عفونت ادراری 50 درصد ژن blaTEM و ٢ درصد blaSHV را تعیین کردند(٢٠). پیشتیوان و همکاران در طی یافته‌های به دست آمده از روش PCR Multiplex نشان دادند که در ایزوله‌های اشرشیاکلی تولیدکننده ESBL، (٨١ درصد)blaTEM، (١٦/٢ درصد)blaSHV و (٣٢/٤ درصد) ژن blaCTX-M بودند و در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه(٦٤/٧ درصد) blaTEM، (٣٥/٢ درصد)blaSHV و (٤١/١ درصد) ژن blaCTX-M گزارش شد(٢١). در مطالعه یزدان ستاد و همکاران شیوع ژن blaTEM ، blaCTX-M و blaSHV در میان ٥٠ جدایه ESBLs مثبت

بـه ترتیـب ۲۵(۵۰ درصـد)، ۱۵(۳۰ درصـد) و ۳۵(۷۰ درصد) بود. ژن blaTEM و blaSHV به طور هـم‌زمـان در ۲۵ جدایه(۵۰ درصد) مشاهده شد(۲۲). مقایسه این نتایج نشان مـی‌دهـد کـه میـزان ESBL در سـویه‌هـای ایزوله شده از کشورهای مختلـف و هـم‌چنـین در یـک کشور از یک بیمارستان تا بیمارسـتان دیگـر متفـاوت می‌باشند کـه ایـن مسـئله بسـتگی بـه سیسـتم کنتـرل عفونت و نحوه‌ی درمان بیمـاران آن بیمارسـتان دارد. در تمام این نتایج فراوانی ژن‌ها بالاتر از فراوانـی ژن-های ما بود که علت تفاوت می‌تواند به تعداد نمونـه‌هـا، مراکـز بیمارسـتانی شـرایط جغرافیـایی و هـم‌چنـین روش‌های بررسی متفـاوت PCR باشـد. آنتـی‌بیوتیـک مـورد اسـتفاده در هـر بیمارسـتان ومرکـز درمـانی می‌تواند توزیع ژنوتیپ‌های مقاومت را تحت تأثیر قرار دهد. با توجه به این که بـیش از نیمـی از ایزولـه‌هـای حاوی آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف واجد ژن‌های کـد کننده بتالاکتامـازیTEM و SHV بودنـد، لازم اسـت در پژوهش‌های بعدی سایر ژن‌های مسئول فنوتیپ ESBL مانند نیز بررسی شود.

لـذا پیشـنهاد مـی‌شـود بـا حـذف برخـی از آنتی‌بیوتیک‌های ناکارآمـد از خـط درمـان و جـایگزین کردن داروهای مکمل با خاصیت آنتی باکتریال مناسب تا حدودی از مقاومـت بـیش‌تـر بـاکتری‌هـا نسـبت بـه آنتی‌بیوتیک‌ها کاسته شود. در این خصوص مطالعه بر روی پـیش‌بینـی الگوهـای مقاومـت در حـوزه بیوانفورماتیـک و بررسـی نحـوه تولیـد و مصـرف داروهای آنتی‌باکتریال ترکیبی گیـاه و مـواد شـیمیایی در حـوزه داروسـازی قابـل توجـه و مـؤثر اسـت. در رابطه با این مطالعه شناسایی ژن‌هـای دیگـر ESBLs و هم‌چنین پژوهش‌های بیوانفورماتیک این ژن‌ها توصـیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

بر اساس مقایسه نتایج حاصل از ایـن مطالعـه با نتایج پژوهش‌هـای پیشـین در ایـران و سـایر نقـاط دنیا، علاوه بر تأیید شیوع بالای ژن‌های بتالاکتامـازی وافزایش مقاومت سویه های کلبسیلا پنومونیـه نسـبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از جمله سفالوسـپورین‌هـا این نتیجـه نیـز حاصـل شـد کـه الگـوی شـیوع انـواع ژن‌های بتالاکتاماز در منـاطق مختلـف ایـران و جهـان متفاوت است و نمی‌توان یک قـانون کلـی بـرای آن در نظـر گرفـت. امـا بـا توجـه بـه شـیوع بـالای ژن‌هـای بتالاکتامـازی در کلبسـیلاپنومونیه بـه عنـوان یکـی از عوامل ایجاد کننده عفونت‌های ادراری و مقاومت بـیش از حد به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها، یـافتن راه حـل مناسـب جهت پیش‌گیری و درمان به موقع ایـن بیمـاری بـرای جلوگیری از عوارض حاصل از این عفونت ها از جملـه مشکلات کلیوی یکی از ضروری‌ترین نیازهای جامعـه می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامـه کارشناسـی ارشـد رشـته میکـروب‌هـای بیمـاری‌زا بـا کـد اخـلاق IR.IAUFALA.REC.1399.017 دانشـــگاه آزاد اســـلامی فلاورجان می‌باشد که با حمایـت مـالی و معنـوی ایـن دانشگاه انجام شد.

REFERENCES

1.Asadpour L, Nahavandinejhad M. Frequency of extended spectrum beta lactamase producing multidrug resistant *Klebsiells pnemoniae* in urinary tract infections in Rasht. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences2017, 25(2):82-90.

2.Eftekhar F, Rastegar M, Golalipoor M, Mansoursamaei N. Detection of extended spectrum B-Lactamases in urinary Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Relation to blaSHV, blaTEM and blaCTX-M gene carriage. Iranian Journal of Public Health 2012; 41(3): 127.

3.Kotekani L, Kotigadde S. Virulence determinant and extended spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a tertiary care hospital, South India. Journal of Laboratory Physicians 2018; 10(2): 155-161.

4.Malik T, Naim A. Occurrence of esbls in clinical isolates of klebsiella species and comparative analysis of phenotypic detection methods. Anti-Infective Agents 2020; 18(3): 255-26.

5.GundranRS, Cardenio PA, Villanueva MA, Sison FB, Carolyn C, et al. Prevalence and distribution of bla CTX-M, bla SHV, bla TEM genes in extended-spectrum β-lactamase-producing E. coli isolates from broiler farms in the Philippines. BMC Veterinary Research 2019; 15(1): 227.

6.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.

7.Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez MM, Costa N. Extended-spectrum-BLactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. Antimicrob Agent Chemother 2003; 47(9): 286-7.

8.Behroozi A, Rahbar M, Yousefi J. Frequency of extended spectrum beta lactamase (ESBLs)Producing Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae isolated from Urine in an Iranian.tertiary care hospital. African J Microbiology 2010; 4(9): 881-4.

9.Bush K. The ABCD's of *β*-lactamase nomenclature .Journal of Infection and Chemotherapy 2013; 19(4): 549-59.

10.Mollazadeh H, Emami SA, Hosseinzadeh H. Razi's Al-Hawi and saffron (Crocus sativus): a review. Iranian Jjournal of Basic Medical Sciences 2015;18(12): 1153-66.

11.Mirzaee M, Chitsaz M, Mansouri S. Detection of extended-spectrum beta-lactamase production in clinical isolates of *escherichia coli* based on mics of ceftazidime, ceftriaxon and cefepim. Pajoohande 2008; 3(4): 335-45.

12.Khosravi AD, Montazeri EA, Ghorbani A, Parhizgari N. Bacterial urinary tract infection in renal transplant recipients and their antibiotic resistance pattern: A four-year study. Iranian Journal of Microbiology 2014; 6(2): 74-8.

13.Nicolle LE. Urinary tract infections in the older adult. Clinics in Geriatric Medicine 2016; 32(3): 523-38.

14.Schaeffer AJ, Nicolle LE. Urinary tract infections in older men. New England Journal of Medicine 2016; 374(6): 562-71.

15.Levant S, Chari K, Defrances CJ. Hospitalizations for patients aged 85 and over in the United states, 2000-2010. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention National Center for Health Statistics 2015; 182: 1-8.

16.Bengoechea JA, Sa Pessoa J. Klebsiella pneumoniae infection biology: living to Counteract Host defences. FEMS Microbiology Reviews 2019; 43(2): 123-44.

17.Barakzahi M, Hormozi B, Rashki A, Ghalehnoo ZR. Prevalence of extended spectrum β-Lactamase in *Klebsiella pneumonia* isolates in a teaching hospital of Zahedan City, Iran. Avicenna Journal of Clinical Microbiology Infection 2014;1(3): 30.

18.Malekjamshidi MR, Zandi H, Eftekhar F. Prevalence of extended-spectrum β-lactamase and integron gene carriage in multidrug-resistant *klebsiella* species isolated from outpatients in Yazd, Iran. Iranian Journal of Medical Sciences 2020; 45(1): 23-31.

19.Ranjbar R, Memariani H, Sorouri R. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from children with urinary tract infections. Arch Pediatr Infect Dis 2017; 5(2): e39000.
20.Jalali Dizage L, Nahaei MR, Sadegi J. Study of Antibiotic Susceptibility Pattern and Frequency of Extended Spectrum β-lactamases Genes TEM and SHV in Urinary Tract Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Tabriz. Journal of Ardabil University of Medical Sciences,2019. 19(3): 301-310[Google Scholar].
21.Pishtiwan AH, Khadija KM. Prevalence of blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M Genes among ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolated from Thalassemia Patients in Erbil, Iraq. Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases 2019; 11(1): e2019041.
22.Yazdansetad S, Alkhudhairy MK, Najafpour R, Farajtabrizi E, Al-Mosawi RM, Saki M, et al. Preliminary survey of extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) in nosocomial uropathogen *Klebsiella pneumoniae* in north-central Iran. Heliyon 2019; 5(9): e02349.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Evaluation of the Frequency of Broad-Spectrum Beta-Lactamases in Urinary Isolates of Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* by Genotypic and Phenotypic Methods

Herati M, Ghandahari F*, Qalazian M

Department of Microbiology, Flaverjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Received: 11 May 2022 Accepted: 12 Sep 2022

Abstract:

Background & aim: There are several reports regarding the increase and growing prevalence of ESBLs producing organisms from different regions in the country. Considering that *Klebsiella pneumoniae* includes a significant percentage of hospital infections, therefore, knowing the pattern of resistance and sensitivity of this bacterium to beta-lactam antibiotics plays a significant role in the treatment and control of infections caused by this bacterium. As a result, the aim of the present study was to determine and evaluate the frequency of beta-lactamases The broad spectrum of *Klebsiella pneumoniae* urinary isolates was drug-resistant by genotypic and phenotypic methods.

Methods: In the present cross-sectional descriptive study conducted in 2018, 100 strains of *Klebsiella pneumoniae* were isolated from urine samples of patients with urinary tract infection from Al-Zahra Hospital, Isfahan. *Klebsiella pneumoniae* strains were identified and confirmed using standard biochemical tests. Antibiotic sensitivity pattern was investigated by disk diffusion method based on CLSI criteria. To perform the phenotypic verification test of broad-spectrum β-lactamase producing strains, the combined disc method was used based on CLSI criteria. PCR test was done with specific primers to identify blaSHV and bla TEM. The collected data were analyzed using one-way and independent one-way analysis of variance statistical tests.

Results: Among 100 isolates related to urinary tract infection, 33 isolates indicated resistance to at least 4 antibiotics, the highest resistance to cefotaxime antibiotic (38%) and the least antibiotic resistance to cotrimaxazole (22%). The results of combined disk indicated that 10 isolates (86.8%) were broad-spectrum β-lactamase producers. Among them, 7 isolates (70%) had the SHV gene and the other 3 isolates did not have any of the TEM and SHV genes.

Conclusion: The results indicated a higher frequency of ESBLs and correspondingly a higher prevalence of antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* bacteria isolated from urinary tract infections.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, urinary infection, broad-spectrum beta-lactamases, genotypic and phenotypic methods

*Corresponding author: **Ghandahari F,** Department of Microbiology, Flowerjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
Email: fe_gh_2010@yahoo.com

Please cite this article as follows: Herati M, Ghandahari F, Qalazian M. Evaluation of the Frequency of Broad-Spectrum Beta-Lactamases in Urinary Isolates of Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* by Genotypic and Phenotypic Methods. Armaghane-danesh 2022; 27(5): 578-589.