ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of Genetic Pattern and Determination of oqxA Gene Expression Levels among Clinical Isolates of Klebsiella Pneumoniae Strains

Ali Hashemi[1],
Fatemeh Fallah[2],
Arezou Taherpour[3],
Hossein Goudarzi[2],
Soroor Erfanimanesh[4],
Elahe Taki[4]

[1] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
[4] MSc Student in Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received July 26, 2014 ; Accepted December 1, 2014)

Abstract

Background and purpose: The increasing emergence of multidrug resistance among *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates has limited the therapeutic options in treatment of infections caused by these bacteria. The beta-lactamases, efflux pumps and porins constitute the major defense mechanisms of antibiotic resistance of these bacteria. The aims of the present study were detection of OqxA and OqxB genes, evaluation of expression level of OqxA efflux pump and also determining the genetic basis of resistant *K. pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Mofid and Taleghani hospitals during 2011-2012.

Materials and methods: This study was conducted in 100 *K. pneumoniae* isolates from Taleghani and Mofid hospitals in Tehran, Iran. Antibiotic susceptibility tests were performed by Kirby-Bauer disc diffusion and Broth Microdilution methods according to CLSI guidelines. Detection of extended spectrum beta-lactamases was done by a kit developed by MAST group. The Modified Hodge Test (MHT) was used to identify carbapenemase production among the isolates. The OqxA and OqxB genes were detected by PCR and sequencing methods and oqxA gene expression was analyzed using real-time RT–PCR. PFGE typing was then performed for further analysis of the resistant isolates.

Results: Among 100 *K. pneumoniae* isolates, 5(5%) were KPC positive and 48(48%) were ESBL positive. In this study, fosfomycin, colistin and tigecycline were found more effective than other antibiotics. The prevalence of both oqxA and oqxB genes detected among the *K. pneumoniae* isolates was 50 (50%). RT–PCR revealed higher expression (2.3-fold) in isolates with reduced susceptibility to Ciprofloxacin. Isolates belonged to three clusters and some of them belong to a particular clone.

Conclusion: The prevalence of antibiotic resistance genes identified in this study highlights the need for more infection control measures including antibacterial management and identification of resistant isolates.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, β-Lactamases, efflux pumps, antibiotic resistance

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(119): 48-61 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۹ آذر سال ۱۳۹۳ (۶۱-۴۸)

بررسی الگوی ژنتیکی و نقش پمپ OqxA در ایزوله های کلینیکی کلبسیلا پنومونیه

علی هاشمی[۱]
فاطمه فلاح[۲]
آرزو طاهرپور[۳]
حسین گودرزی[۲]
سرور عرفانی منش[۴]
الهه تاکی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: افزایش ظهور مقاومت چند دارویی در بین ایزوله‌های بیمارستانی کلبسیلا پنومونیه، گزینه‌های درمانی را برای درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این باکتری محدود کرده است که در این میان بتالاکتامازها و پمپ‌های ترشحی به عنوان یکی از اصلی‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک ها در این باکتری محسوب می‌شوند. لذا هدف از این مطالعه، شناسایی بتالاکتامازها، تشخیص ژن‌های پلاسمیدی OqxB, OqxA، تعیین میزان بیان پمپ OqxA و بررسی الگوی ژنتیکی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در میان ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های مفید و طالقانی می باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی بر روی ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های مفید و طالقانی انجام شده است. تست های حساسیت ضد میکروبی با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث بر اساس رهنمودهای Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) انجام گردید. شناسایی بتالاکتامازهای با طیف وسیع با استفاده از کیت شرکت MAST و کارباپنمازهای کلبسیلا پنومونیه با استفاده از روش Modified Hodge Test (MHT) انجام شد. پمپ‌های OqxAB با استفاده از روش‌های PCR و Sequencing تشخیص داده شدند و بیان ژن OqxA با استفاده از تکنیک Real-Time RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تایپینگ نمونه‌های مقاوم نیز از روش PFGE استفاده گردید.

یافته‌ها: از ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۴۸ (۴۸ درصد) دارای بتالاکتاماز با طیف وسیع و ۵ (۵ درصد) دارای کارباپنماز (KPC) بودند. در این مطالعه فسفومایسین، کلیستین و تیجیسیکلین بهترین اثر را داشتند. شیوع پمپ‌های OqxA و OqxB در سویه های کلبسیلا پنومونیه ۵۰ (۵۰ درصد) بود و میزان بیان پمپ OqxA در نمونه‌های با کاهش حساسیت به سیپروفلوکساسین در حدود ۲/۳ برابر بیش‌تر از نمونه‌های حساس به سیپروفلوکساسین بود. نمونه‌ها مربوط به سه خوشه اصلی بود که در بین آن ها بعضی از ایزوله ها مربوط به یک کلون بودند.

استنتاج: شیوع ژن های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در این مطالعه موجب نگرانی است، از این رو برای کنترل عفونت و جلوگیری از گسترش باکتری های مقاوم به دارو، نیاز به مدیریت دقیق در تجویز دارو و شناسایی ایزوله‌های مقاوم می‌باشد.

واژه های کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتاماز، پمپ‌های ترشحی، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یکی از موارد مهم عفونت‌های اکتسابی از جامعه و بیمارستان است. این باکتری یکی از شایع ترین پاتوژن‌های بیمارستانی است که میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا می‌باشد و باعث انواع مختلفی از

مولف مسئول: علی هاشمی- تهران: ولنجک، بلوار دانشجو، خیابان کودک یار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، طبقه هفتم، گروه میکروب شناسی
E-mail:hashemi1388@yahoo.com

۱. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. استاد، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۴. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۵/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۷/۲۲ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۹/۱۰

عفونت‌ها بـه ویـژه در نـوزادان موجـب پنومـونی، سـپتی سمی، اسهال، ایجاد آبسه در کبد، اندوفتالمیت، مننژیت، عفونت‌های ادراری و باکتریمی می‌گردد(۱). افزایش ظهور مقاومـت چنـد داروئـی در بـین ایزولـه‌هـای بیمارسـتانی کلبسـیلا پنومونیـه، گزینـه‌هـای درمـانی را بـرای درمـان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این باکتری محـدود کـرده است. بیش تر ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چنـدین دارو (MDR) می‌باشند(۲). در بین مکانیسم‌های مقاومت بـه آنتـی‌بیوتیـک، بتالاکتامازهـا بـه عنـوان دفـاع اصـلی باکتری‌های گرم منفی به ویژه کلبسیلا پنومونیه در مقابل آنتی بیوتیک‌های گـروه بتالاکتـام محسـوب مـی‌شـوند. بتالاکتامازها بر طبق نظر Ambler,Bush-Jacoby بـه چهـار گروه تقسیم می‌شوند. باکتری‌هـای دارای بتالاکتامـاز بـا طیف وسیع Extended-Spectrum-Beta-Lactamases (ESBLs) بـه بسـیاری از آنتـی بیوتیـک‌هـا از جملـه پنی‌سیلین‌ها، سفالسـپورین‌هـای نسـل اول، دوم و سـوم و آزترونـام (بـه جـز سفامایسـین‌هـا و کاربـاپنم‌هـا) مقـاوم هستند. این آنزیم‌ها به وسیله کلاولانات مهار می‌شوند و در خـانواده انتروباکتریاسـه، سـودوموناس و اسـینتوباکتر بامانی دیده شده‌اند. بر طبـق طبقـه‌بنـدی Bush–Jacoby این آنزیم‌ها در گروه 2be (آنزیم‌های کلاس A) و بعضی دیگر در کلاس 2d (آنزیم‌های کـلاس D) قـرار دارنـد. ژن‌های کدکننده این آنزیم‌هـا بـر روی عناصـر ژنتیکـی متحرک از قبیل پلاسمید یا کروموزوم قـرار دارنـد(۱،۲). از دیگر آنزیم‌ها که در کلبسیلا پنومونیه دیده شـده اسـت، *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) می‌باشد که باعـث هیـدرولیز داروهـای بتالاکتـام شـامل مونوباکتام‌ها، کارباپنم‌ها و سفالوسـپورین هـا نسـل سـوم می‌شود. ژن تولیدکننده این آنزیم بر روی پلاسمید قـرار دارد و قادر به انتقال به بسیاری از بـاکتری‌هـا مـی‌باشـد. میـزان مـرگ و میـر در مـورد عفونـت‌هـای ایجـاد شـده توسـط بـاکتری‌هـای حـاوی آنـزیم KPC در حـدود ۵۰ درصد می‌باشد(۱،۳).

در بـین مکانیسـم‌هـای مقاومـت بـه آنتـی بیوتیـک، پمـپ‌هـای ترشـحی OqxAB موجـب مقاومـت بـه فلوروکینولـون‌هـا مـی‌شـوند. فلوروکینولـون‌هـا بـه طـور موثری بر علیه باکتری‌ها مورد اسـتفاده قـرار مـی‌گیرنـد. مقاومت به کینولون ها از طریق موتاسیون در کروموزوم صورت مـی‌گیـرد و در سـال ۱۹۹۸ مقاومـت بـه واسـطه پلاسـمید نیـز دیـده شـد. تـاکنون ۵ گـروه Qnr (QnrA, QnrB, QnrC, QnrD QnrS) شناسـایی شـده است. مقاومت به کینولون‌ها به واسطه پلاسمید از طریـق aac(6)-ib-cr (یک آمینوگلیکوزید اسیتیل ترانسـفرازکه موجب کاهش حساسیت به سیپروفلوکساسین می‌شود) و پمپ‌های QepA و OqxAB ایجاد می‌شود. OqxAB یک plasmid-encoded multidrug efflux pump است که جزوه RND family pump می باشـد و باعـث مقاومـت بـه olaquindox [N-(2-hydroxyethyl)-3-methyl-2-quinoxalinecarboxamide-1 ,4- di- N- oxide]، سیپروفلوکساسین، نوروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسـید، کلرامفنیکـل، بیوسـایدهای از قبیـل تریکلوسـان و کلروهگزیدین و هم‌چنین اتیدیوم بروماید مـی‌شـود کـه اولین بار در اشریشیاکلی جـدا شـده از خـوک شناسـایی شد(۶-۴). عناصر پلاسمیدی مقاومـت بـه کینولـون‌هـا در خانواده انتروباکتریاسه از جملـه کلبسـیلا پنومونیـه دیـده می‌شود. پمپ OqxAB از دو ژن OqxA و OqxB تشکلیل شـده اسـت کـه بـر روی پلاسـمید pOLA52 بـا وزن مولکولی ۵۲ کیلو دالتون قرار دارد و قابل انتقال به دیگر باکتری‌ها مـی‌باشـد. بـر روی پلاسـمیدهای (IncF-like) حمل کننده OqxAB، ژن‌های بتالاکتاماز با طیف وسیع و AmpC نیز دیده می‌شود. بیان بالای این پمپ‌ها باعـث مقاومت باکتری‌ها به فلوروکینولـون‌هـا مـی‌شـود کـه بـا استفاده از روش Real-Time PCR می‌تـوان میـزان بیـان آن‌هـا را تعیـین کـرد(۵،۴). لـذا هـدف از ایـن مطالعـه، شناسـایی بتالاکتامازهـا، تشـخیص ژن‌هـای پلاسـمیدی OqxA,OqxB، تعیین میزان بیان پمپ OqxA و بررسـی الگوی ژنتیکی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیـک در میـان ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیـه جـدا شـده از بیمـاران

بستری در بیمارستان‌های مفید و طالقانی می‌باشد، که برای اولین بار در ایران صورت می گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

در این پژوهش سویه‌های مشکوک به کلبسیلا پنومونیه از بیماران بستری در بیمارستان‌های مفید و طالقانی در سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری شد. پس از انتقال نمونه‌های مشکوک به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، شناسایی تاییدی آن‌ها با روش‌های استاندارد و افتراقی میکروبیولوژی انجام شد. درمجموع ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری گردید(۷).

جداسازی و تشخیص ایزوله ها

برای تایید، نمونه‌ها بر روی محیط کشت EMB، مک کانکی آگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. بعد از انکوباسیون از کلنی‌های مشکوک به کلبسیلا پنومونیه لام مستقیم تهیه کرده و در صورت دیدن باسیل‌های گرم منفی، کارهای تشخیصی زیر انجام شد: از تست‌های مرسوم آزمایشگاهی شامل تست اکسیداز، کشت در محیط‌های TSI، SIM، MR، VP، لیزین دکربوکسیلاز، سیترات و اوره استفاده گردید(۷).

بررسی الگوی مقاومت دارویی

مقاومت دارویی سویه‌های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک‌های (ایمی پنم، مروپنم، آزترونام، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون، تیجیسیکلین، فسفومایسین، دوریپنم، ارتاپنم، کلیستین، سفپیم، جنتامایسین، آمیکاسین، پیپراسیلین، پیپراسیلین/ تازوباکتام، تتراسیکلین، آمپی سیلین، سفپودوکسیم) به روش انتشار دیسک در آگار (Disk Diffusion) انجام شد. به طور خلاصه، چند کلنی از کشت ۲۴ ساعته باکتری از محیط نوترین آگار برداشته و در ۰/۹ درصد محلول نمکی حل شده تا به غلظت نیم مک فارلند برسد، سپس مقدار مشخصی از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده را برداشته و بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار کشت دادیم. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی را با فاصله مناسب روی محیط قرار داده و پلیت‌های را برای مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دادیم. سپس نتایج را با استفاده از پروتکل CLSI بررسی کردیم(۸).

تعیین الگوی حساسیت سویه‌ها توسط MIC به روش میکرودایلوشن براث:

ابتدا رقت‌های مختلفی از هر آنتی‌بیوتیک (ایمی پنم، مروپنم، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفپیم،آمپی‌سیلین و پیپراسیلین/ تازوباکتام) را بر طبق CLSI آماده می کنیم و سپس از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر داخل هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای می‌ریزیم. در مرحله بعد از هر باکتری که قبلا کشت داده بودیم و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفته بود، نیم مک فارلند تهیه می کنیم و سپس از هر سوسپانسیون نیم مک فارلند هر باکتری، رقت ۱:۲۰ تهیه کرده و مقدار ۱۰ میکرولیتر داخل هر چاهک می‌ریزم. یک لاین به عنوان کنترل منفی که در واقع محلول آنتی‌بیوتیک به همراه محیط مولر هینتون براث می‌باشد و یک لاین دیگر به عنوان کنترل مثبت که در واقع *E.Coli* ATCC25922 می‌باشد، قرار دادیم(۸).

تعیین باکتری های تولید کننده بتالاکتاماز با طیف وسیع (ESBL)

جهت شناسایی باکتری‌های حاوی ESBL از روش Combined Test با توجه به دستورالعمل CLSI استفاده شد. به این صورت که بر روی محیط مولر هینتون آگار دیسک سفتازیدم را به فاصله ۳۰ میلی‌متر از دیسک سفتازیدیم/ کلاولانیک اسید، دیسک سفوتاکسیم به فاصله ۳۰ میلی‌متر از دیسک سفوتاکسیم/ کلاولانیک اسید و دیسک سفپودوکسیم به فاصله ۳۰میلی‌متر از دیسک

سفپودوکسیم/ کلاولانیک اسید (MAST انگلیس) قرار داده شد. ایزوله‌هایی که قطر هاله ممانعت از رشد دیسک سفالوسپورین همراه کلاوونیک اسید نسبت به دیسک سفالوسپورین فاقد کلاولانیک اسید بیش‌تر یا مساوی ۵ میلی‌متر بود، به عنوان باکتری‌های تولیدکننده ESBL در نظر گرفته شدند. از کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع به عنوان سوش کنترل مثبت استفاده گردید(۹،۱۰).

تعیین باکتری‌های تولیدکننده (KPC

برای غربالگری سویه‌های تولیدکننده آنزیم KPC، از روش Modified Hodge Test استفاده شد. این روش در چند مرحله انجام می‌شود: ابتدا از سویه استاندارد *E.Coli* ATCC 25922 نیم مک فارلند تهیه می‌کنیم. در مرحله دوم از نیم مک فارلند رقت ۱:۱۰ تهیه می‌کنیم. در مرحله سوم با استفاده از سواب از محلول ۱:۱۰ بر روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح می‌کنیم. در مرحله چهارم یک دیسک ۱۰ میکروگرمی ارتاپنم در مرکز محیط قرار می‌دهیم. در مرحله پنجم از باکتری مشکوک و کنترل‌های مثبت و منفی به صورت مستقیم، از لبه دیسک تا انتها با سواب تلقیح می‌کنیم و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ قرار می‌دهیم. در صورتی که بین کنترل مثبت و نمونه مشکوک هاله‌ای شبیه به گل شبدر ایجاد شود، تست مثبت در نظر گرفته می‌شود(۷).

انجام روش‌های PCR, Sequencing برای شناسایی ژن های OqxA, OqxB

استخراج DNA: با استفاده از کیت استخراج شرکت (Bionner Company,Cat.No.K-3030-1) انجام گرفت. انجام PCR برای ژن‌های OqxA,OqxB برای تکثیر ناحیه درونی ژن‌های نامبرده شده، مجموعه‌ای از پرایمرها مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرها با اطلاعات توالی نوکلئوتیدی موجود در Gene Bank (blast) چک گردید (جدول شماره ۱). PCR بر اساس شرایط جدول شماره ۲ انجام شد.

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرها برای تکثیر ژن های OqxA,OqxB

نام پرایمر	ژن شناسایی شده	سکانس ژن	اندازه محصولBP
OqxA-F OqxA-R	OqxA	5'-CTCGGCGCGATGATGCT-3' 5'-CCACTCTTCACGGGAGACGA-3	۳۹۲
OqxB-F OqxB-R	OqxB	5'-TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC-3 5'-CTCGGCCATTTTGGCGCGTA-3'	۵۱۲

جدول شماره۲: شرایط مورد استفاده برای‌انجام PCR ژن‌های OqxAB

Factor	Tempreture(ºC)		Time	
مرحله	OqxA	OqxB	OqxA	OqxB
Initial denaturation	۹۴	۹۴	5 min	5 min
Denaturation	۹۴	۹۴	60s	60s
Anealing	۵۷	۵۹	60 s	60 s
Extention	۷۲	۷۲	60 s	60 s
Final extention	۷۲	۷۲	5min	5min
Cycle	۳۶	۳۶		

از 2x MasterMix شرکت سیناکلون (CAT.NO.: PR8252C) برای انجام PCR استفاده شد. بدین ترتیب که ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس، ۱ میکرولیتر از پرایمر Forward، ۱ میکرولیتر از پرایمر Reverse، ۳ میکرولیتر از DNA و ۷/۵ میکرولیتر آب تزریقی اضافه گردید. پرایمرهای مورد استفاده با غلظت ۱۰ پیکومول بود.

انجام الکتروفورز برای ژن های OqxA ,OqxB

محصولات PCR را بر روی ژل آگاروز ۱ درصد با بافر (TBE) Tris-borate EDTA الکتروفورز شده وسپس ژل را با اتیدیوم بروماید ($0.5\ \mu g\ ml^{-1}$) رنگ گردید. پس از پایان الکتروفورز، ژل با دستگاه (Gel doc) و در طول موج 280nm از نظر وجود باندهای هدف در کنار مارکر مولکولی و کنترل مثبت و منفی مورد بررسی قرار گرفت.

انجام Sequencing

پس از انجام PCR محصول آن را راند کرده و با استفاده از کیت، باندهای ژن مورد نظر را استخراج کرده و برای تایید سویه های حاوی ژن‌های فوق از روش Sequencing استفاده کردیم. نمونه ها برای انجام تعیین توالی به شرکت Bioneer کشور کره جنوبی ارسال شد و سپس نتایج با استفاده از نرم‌افزار Chromas 1.45 و Blast در NCBI مورد بررسی قرار گرفت(۱۱).

انجام روش Real-Time PCR

استخراج RNA با استفاده از کیت شرکت سیناکلون (RNX-Plus Solution, SinaClon, Iran) انجام شد. در مرحله بعد تیمار RNA استخراج شده با آنزیم DNase شرکت فرمنتاز صورت گرفت. ساخت cDNA با استفاده از کیت شرکت اینترون (CAT. NO.: 25081) انجام گردید و سپس با استفاده از پرایمرهای Real-Time PCR و CDNA نمونه‌ها روش RT-PCR انجام شد تا از اختصاصیت پرایمرهای OqxA و rpoB و هم‌چنین به دست آوردن دمای مناسب Annealing اطمینان حاصل کرد. از MasterMix 2x شرکت سیناکلون (CAT. NO.: PR8252C) برای انجام RT-PCR استفاده شد. در مرحله بعد Real-Time PCR با استفاده کیت شرکت اینویتروژن SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal (Invitrogen, Cat.No. 11762-100) و پرایمرهای جدول شماره ۳ انجام گردید.

جدول شماره ۳. توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real-Time PCR

نام پرایمر	ژن شناسایی شده	سکانس ژن	اندازه محصول BP
OqxA-F OqxA-R	OqxA	5'-GGCAAGAGCCAAAACGCAGG-3' 5'-GGGGCGGTCACTTTGGTGAA-3	۲۰۱
RpoB-F RpoB-R	rpoB	AACGTCGTATCTCCGCACTC CGATACGGCGTCTCAAGGAA	۱۹۶

برای محاسبه میزان بیان ژنی و رسم نمودارهای مربوطه از نرم افزار Rest استفاده شد.

پالس فیلد ژل الکتروفورزیس Pulse Field Gel (PFGE) Electrophoresis

ابتدا سویه‌ها در محیط مایع LB کشت و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس پلاک‌ها تهیه گردید. برای هضم آنزیمی از آنزیم Xba1 (Cat.NO. EN-143S) استفاده گردید. ۱۰۰ میلی‌لیتر از آگارز ۱ درصد (محصول Invitrogen) تهیه گردید و داخل سینی ژل ریخته شد و پس از سرد شدن ژل، پلاک‌ها داخل چاهک‌های ژل قرار گرفت. تانک الکتروفورز توسط ۲ لیتر از بافر 0.5X TBE پر کرده و بعد از قرار دادن ژل در داخل تانک الکتروفورز، برنامه توسط دستگاه CHEF-DR III System (Bio-Rad) اجرا شد. بعد از ۱۸ ساعت، ژل در محلول اتیدیوم بروماید ۳۰ µl g/ml به مدت ۴۵ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید و بعد از ۳۰ دقیقه رنگ بری در آب مقطر توسط دستگاه ترانسلومیناتور (Bio-Doc) از ژل عکس تهیه شد. الگوی ژنتیکی سویه‌ها با استفاده از نرم افزار ژل کامپیر II نسخه ۶/۵ (GelCompar 6.5) متعلق به شرکت بلژیکی Applied Maths انجام شد. بررسی میزان تشابه با استفاده از ضریب دایس (Dice coefficient) و بررسی میزان شباهت ماتریکس خوشه‌ها با استفاده از روش UPGAMA محاسبه شد.

روش‌های تجزیه و تحلیل داده ها

داده‌ها وارد نرم افزار MINITAB13 شد. بررسی فراوانی و توزیع نسبی متغیرها با استفاده از این نرم افزارها انجام گرفت. در این مطالعه از روش UPGMA برای تجزیه و تحلیل و ترسیم درخت فیلوژنی استفاده شد.

یافته ها

از اسفند ماه سال ۱۳۹۱ تا اسفند ماه سال ۱۳۹۲، صد ایزوله کلبسیلا پنومونیه جدا شد که در این میان، ۵۵ (۵۵ درصد) ایزوله‌ها از بیمارستان طالقانی و ۴۵ (۴۵ درصد) ایزوله‌ها از بیمارستان مفید بود که ۵۷ (۵۷ درصد) از مردان و ۴۳ (۴۳ درصد) از خانم‌ها جدا شده بود.

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام

الگوی مقاومت دارویی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده درجدول شماره ۴ و حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) در جدول شماره ۵ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از شناسایی آنزیم ها

نتایج حاصل از شناسایی بتالاکتاماز با طیف وسیع

از ۱۰۰ ایزوله کلبسیلاپنومونیه جدا شده از بیماران،

۴۸ (۴۸ درصد) درصد از ایزوله‌ها با استفاده از دیسک سفوتاکسیم و سفتازیدیم به تنهایی و در ترکیب با کلاولانیک اسید دارای بتالاکتاماز با طیف وسیع بودند که در این میان ۲۸ ایزوله مربوط به بیمارستان طالقانی و ۲۰ ایزوله از بیماران بستری در بیمارستان مفید جدا شد.

جدول شماره ۴: نتایج تست حساسیت دارویی

Sensitive تعداد (درصد)	Intermediate تعداد (درصد)	Resistant تعداد (درصد)	Antibiotic
(۳۶)۳۶	(۸)۸	(۵۶)۵۶	Aztreonam (10 µg)
(۷۰)۷۰	(۱۰)۱۰	(۲۰)۲۰	Meropenem (10 µg)
(۶۰)۶۰	(۴)۴	(۳۶)۳۶	Gentamicin(10 µg)
(۴۰)۴۰	(۷)۷	(۵۳)۵۳	Ciprofloxacin (30 µg)
(۷۰)۷۰	(۴)۴	(۲۶)۲۶	Amikacin (30 µg)
(۷۰)۷۰	(۱۰)۱۰	(۲۰)۲۰	Imipenem(10 µg)
(۴۰)۴۰	(۳)۳	(۵۷)۵۷	Cefotaxime(30 µg)
(۵۳)۵۳	(۱۰)۱۰	(۳۷)۳۷	Cefepime(FEP, 30 µg)
(۴۳)۴۳	(۷)۷	(۵۰)۵۰	Tetracycline(TE,10 µg)
(۲۰)۲۰	(۷)۷	(۷۳)۷۳	Ampicillin(AMP,10 µg)
(۴۰)۴۰	(۳)۳	(۵۷)۵۷	Piperacillin(PIP,100 µg)
(۴۰)۴۰	(۴)۴	(۵۶)۵۶	Ceftriaxone(CRO,30 µg)
(۳۰)۳۰	(۶)۶	(۶۴)۶۴	Cefpodoxime(CPD,30µg)
(۵۶)۵۶	(۳۰)۳۰	(۵)۵	Tigecycline(TGC,15µg)
(۷۰)۷۰	(۱۰)۱۰	(۲۰)۲۰	Doripenem(DOR,10 µg)
(۷۰)۷۰	(۱۰)۱۰	(۲۰)۲۰	Ertapenem(ETP, 10 µg)
(۶۱)۶۱	(۱۰)۱۰	(۲۹)۲۹	Piperacillin/Tazobactam(PTZ,100/10µg)
(۸۵)۸۵	(۱۲)۱۲	(۳)۳	Fosfomycin/Trometamol(FOT, 200 µg)
(۴۰)۴۰	(۶)۶	(۵۴)۵۴	Ceftazidime (30 µg)
(۱۰۰)۱۰۰	(۰/۰)۰	(۰/۰)۰	Colistin(C0,10 µg)

جدول شماره ۵: نتایج حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد(MIC)

MIC(µg/ml)			Antibiotics
٪۹۰	٪۵۰	Range	
۳۲	۱	۰/۲۵ -۲۵۶	Meropenem
۱۶	۱	۰/۲۵ -۲۵۶	Imipenem
>۲۵۶	۶۴	۱ - >۲۵۶	Ceftazidime
>۲۵۶	۱۶	۰/۵ -> ۲۵۶	Ceftriaxone
>۲۵۶	۱۶	۰/۵ > ۲۵۶	Cefepime
>۲۵۶	۱۶	۰/۵ > ۲۵۶	cefotaxime
۱۲۸	۴	۰/۲۵ -۲۵۶	Piperacillin/Tazobactam
>۲۵۶	۲۵۶	۲ - >۲۵۶	Ampicillin

نتایج حاصل از شناسایی KPC

برای شناسایی آنزیم KPC از روش Modified Hodge Test(MHT) استفاده شد که ۵ (۵ درصد) ایزوله دارای آنزیم KPC بودند که در این میان ۳ ایزوله مربوط به بیمارستان طالقانی و ۲ ایزوله مربوط به بیمارستان مفید بود.

نتایج حاصل از PCR ژن‌های OqxA,OqxB

شیوع هر دو ژن در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه ۵۰ (۵۰ درصد) بود. توالی ژن oqxA ایزوله جدا شده از بیمارستان طالقانی با شماره KF547036 در بانک ژن ثبت شده است.

تفسیر نتایج حاصل از Real-Time PCR ژن OqxA

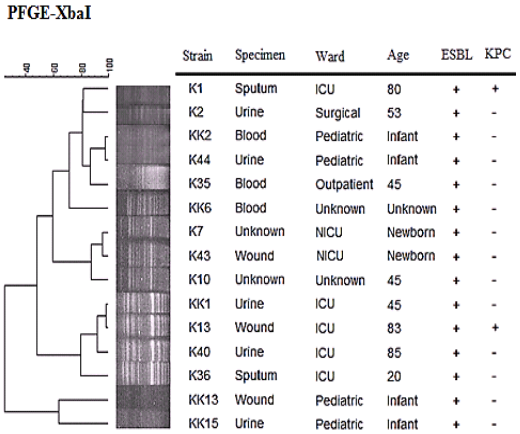
در مطالعه ما ۵۳ درصد از ایزوله‌ها مقاوم به سپروفلوکساسین، ۷درصد نیمه حساس و ۴۰ درصد ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین حساس بودند. بین مقاومت به سیپروفلوکساسین و حضور بعضی ژن‌ها ارتباط وجود دارد. برای تعیین این که آیا ژن OqxA نقشی در مقاومت به فلوروکینولون‌ها ایفا می‌کند یا نه، از روش Real-Time RT-PCR برای آنالیز بیان این ژن استفاده کردیم.

ما نمونه‌های حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع را به دو دسته گروه‌بندی کردیم. یک دسته که در مقابل دیسک ۵ میکروگرمی سیپروفلوکساسین از خود دارای هاله عدم رشدی بیش‌تر از ۳۳ میلی متر داشتند و هم‌چنین دارای MIC کم‌تر از ۰/۵ میکروگرم/ میلی‌گرم بودند (۱۰ ایزوله). دسته دوم که در مقابل دیسک ۵ میکروگرمی سیپروفلوکساسین دارای هاله عدم رشدی بیش‌تر از ۳۰ میلی‌متر داشتند و هم‌چنین دارای MIC بیش‌تر از ۰/۵ میکروگرم/ میلی‌گرم بودند (۱۰ ایزوله). نتایج RT-PCR نشان داد که سوش‌های که کاهش حساسیت به سیپروفلوکساسین داشتند، میزان بیان پمپ OqxA، ۲/۳ برابر بیش‌تر از ایزوله‌های بود که حساس به سیپروفلوکساسین بودند. میزان بیان ژن OqxA سویه استاندارد *K.pneumoniae* ATCC700603 ۱۶ برابر بیش‌تر از سویه استاندارد *K.pneumoniae* ATCC 27799 بود. در ضمن هیچ‌گونه ژن مقاومت به فلوروکینولون در این دو سویه وجود نداشت و با توجه به این که میزان MIC سیپروفلوکساسین برای ATCC 700603 و ATCC27799 به ترتیب ۰/۲۵ و۰/۰۳ می‌باشد، به درستی نقش

این پمپ در مقاومت به سیپروفلوکساسین مشخص می‌شود. در ضمن در مقایسه سوش استاندارد K. *K.pneumoniae* ATCC700603 نشان داده شد که میزان بیان ای پمپ بیش تر از ایزوله بالینی حساس به سیپروفلوکساسین بود.

نتایج حاصل از PFGE

با استفاده از هضم آنزیمی با Xba-1 در مجموع ۱۵ الگوی PFGE شناسایی شد که درون سه خوشه اصلی A,B,C تقسیم بندی شده‌اند. بزرگ ترین الگوی‌های PFGE در خوشه A مشاهده شد که شامل ایزوله‌های از بیمارستان طالقانی و مفید بود. خوشه‌های الگوی PFGE مرتبط با ایزوله‌های بود که حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع بودند. بسیاری از نمونه‌های مرتبط در خوشه گروه A علاوه بر بتالاکتاماز با طیف وسیع دارای آنزیم Amp-C هم بودند. ایزوله‌های KK2,K44، ایزوله‌های K7,K43، ایزوله‌های K13, KK1 دارای ارتباط نزدیک بودند.



نمودار شماره ۱: دندروگرام ۱۵ ایزوله تولید کننده بتالاکتاماز با طیف وسیع بر اساس نتایج PFGE

بحث

به کارگیری موثر از آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی برای تشخیص صحیح و جلوگیری از گسترش پاتوژن‌های مقاوم، موجب کاهش نیاز به استفاده از داروها می‌شود. کنترل عفونت برای بیماران بسیار سودمند و موجب کاهش میزان مرگ و میر در سرتاسر جهان می گردد. تجربه در آزمایشگاه میکروب‌شناسی برای تشخیص باکتری های مقاوم بسیار حیاتی است. بسیاری از باکتری‌ها ممکن است درست تشخیص داده نشوند و در تست‌های آزمایشگاهی به اشتباه مقاوم و یا حساس گزارش شوند که این امر، موجب آن می شود که بیماران داروهای نامناسب را دریافت و باعث انتقال باکتری‌ها به دیگر بیماران می‌شود. از این رو شناسایی باکتری‌های با مقاومت مخفی ضروری است. سنجش‌های مفید برای شناسایی مکانیسم‌های مقاومت مورد نیاز است. از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت می‌توان به بتالاکتامازها و پمپ‌های‌ترشحی نام برد(۷).

شناسایی باکتری‌های مقاوم و تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC)

در این تحقیق ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه، بیش‌ترین حساسیت را به آنتی‌بیوتیک‌های فسفومایسین و تیجیسیکلین را داشتند. در این مطالعه مقاومت به سفالسپورین‌ها از جمله سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفپیم و سفپودوکسیم به ترتیب ۵۴ درصد، ۵۷ درصد، ۵۶ درصد، ۳۷ درصد و ۶۴ درصد بودکه در میان سفالسپورین‌ها، سفپیم آنتی بیوتیک نسل چهارم بهترین اثر را داشت. علت اصلی مقاومت به سفالسپورین‌ها، بتالاکتامازهای با طیف وسیع می‌باشند که در میان نمونه‌های مقاوم به سفالسپورین‌ها مشاهده می شود. در تحقیقی که شاهچراغی و همکاران در سال ۲۰۰۷ در شهر تهران انجام دادند، ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۳۱ و ۳۲ درصد به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم بودند(۱۲). مقایسه میزان مقاومت در دو مطالعه نشان می دهد که به مرور زمان به علت مقاوم شدن باکتری ها، میزان مقاومت در سال ۲۰۱۳ افزایش یافته است. در این مطالعه ۳۶ درصد مقاوم به جنتامایسین و ۲۶ درصد مقاوم به آمیکاسین بودند.

مقاومت به آمینوگلیکوزیدها بیش تر به وسیله آنزیم‌های 16SRNA Methelayse صورت می‌گیرد که توسط ژن‌های RmtA,RmtB,RmtC و... کد می‌شوند(۱۳). هنوز بر روی این ژن‌ها در کلبسیلا پنومونیه کاری در ایران صورت نگرفته است. اما در مطالعه‌ای که بر روی این ژن‌ها در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا های ایزوله شده از بیمارستان مطهری تهران در سال ۲۰۱۳ انجام شد، مشخص گردید که این ژن‌ها عامل اصلی مقاومت باکتری‌ها به آمینوگلیکوزیدها هستند(۱۳). اما علت اصلی مقاومت به سیپروفلوکساسین ژن‌های Qnr, aac(6′)-Ib-cr, QepA هستند که باعث مقاومت باکتری‌ها به فلورکینولون‌ها می‌شوند. در مطالعه ما ۵۳ درصد از ایزوله‌ها مقاوم به سپروفلوکساسین بودند. در تحقیقی که فیض آبادی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در شهر تهران انجام دادند، یک ایزوله کلبسیلا پنومونیه مقاوم به ایمی پنم بود و ۴۴/۲ و ۲۵ درصد به ترتیب مقاوم به آمیکاسین و سیپروفلوکساسین بودند(۱۴). کارباپنم‌ها از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که در برابر ارگانیسم‌های $ESBL^{+}$ پایدارند. به عنوان مثال ایمی پنم در شرایط *invitro* بر روی بسیاری از این ارگانیسم‌ها مؤثر بوده است. در بین آنتی‌بیوتیک‌های تحت بررسی در این تحقیق نیز، تأثیر کارباپنم‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL بارز است. به‌طوری که تنها ۲۰ درصد از ایزوله‌های تحت بررسی مقاوم به آنتی‌بیوتیک کارباپنم بودند. استفاده از کارباپنم‌ها به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی در درمان عفونت‌های ناشی از ارگانیسم‌های واجد ESBL، در تحقیقات علمی دیگر نیز به اثبات رسیده است. به عنوان مثال، رستگار و همکاران در شهر تهران در سال ۲۰۱۳ از ۳۵ ایزوله کلبسیلا پنومونیه فقط ۱۹ (۵۴/۲۸ درصد) ایزوله مقاوم به ایمی پنم بودند(۱۵). هم‌چنین در مطالعه‌ای که شاهچراغی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در شهر تهران انجام دادند، ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه ۶/۳ درصد به مروپنم، ۳ درصد به ارتاپنم و ۱/۱ درصد مقاوم به ایمی پنم بودند(۱۶). میزان مقاومت در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده در تحقیق رستگار و همکاران از مطالعه ما بیش‌تر بود که علت آن را می‌توان در نوع نمونه مطرح کرد، چرا که نمونه‌های جدا شده از بیماران سوختگی مقاومت بیش‌تری دارند. این افراد ایمنی ضعیف شده‌ای دارند و مدت زیادی در بیمارستان بستری و تحت درمان قرار می‌گیرند. جای خوشبختی است که بتالاکتامازهای باکتریایی از جمله آنزیم‌های بتالاکتاماز با طیف وسیع (ESBLs) قادر به هیدرولیز داروهای ایمی‌پنم و مروپنم نیستند. ولی باید توجه داشته باشیم که حساسیت سویه‌ها نسبت به ایمی‌پنم و مروپنم نباید ما را در مصرف و تجویز بی رویهٔ این دارو ترغیب نماید، چه بسا این گونه اقدامات ممکن است باعث پیدایش و شیوع سوش‌های مقاوم به ایمی پنم و مروپنم شود، هم‌چنان که در سال‌های اخیر نیز گزارشاتی مبنی بر پیدایش سوش‌های مقاوم پسودوموناس و باکتری های دیگر در برابر ایمی پنم و مروپنم گزارش شده است.

شناسایی بتالاکتاماز با طیف وسیع (ESBL)

بتالاکتامازهای با طیف وسیع (ESBLs) یکی ازعوامل موثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله خانواده سفالسپورین‌های وسیع طیف می‌باشند. میکروارگانیسم‌هایی که دارای این آنزیم‌ها هستند، باعث افزایش مقاومت دارویی و در نتیجه بیماری زایی در بین بیماران می‌گردند و جامعه را با خطر جدی مواجه خواهند کرد. بنابراین تشخیص صحیح آزمایشگاهی عامل عفونت و انتخاب آنتی بیوتیک مناسب، برای جلوگیری از شکست درمان بسیار حائز اهمیت است. متأسفانه در کشور ما بروز مقاومت‌های باکتریایی و عوامل دخیل در افزایش این قبیل مقاومت‌ها، آن‌چنان‌که شایسته است، مورد بررسی وتوجه قرار نگرفته است و لذا امروزه شاهد آن هستیم که عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه عفونت‌های مربوط به کلبسیلا پنومونیه آمار قابل توجهی را به خود اختصاص داده‌اند(۲). در

تحقیق انجام شده، ۵۶ درصد از ایزوله‌های جدا شده به آنتی‌بیوتیک آزترونام مقاوم بودند. ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتاماز با طیف وسیع از ۲۴ فرد بالغ و ۳۳ کودک و در مجموع ۴۸ (۴۸ درصد) در دو بیمارستان جدا شد. این مطالعه نقش آشکار کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتاماز با طیف وسیع را در بخش‌های کودکان تایید می‌کند. در مطالعه‌ای که منصوری و همکاران در شهر کرمان انجام دادند، ۵۵/۳ درصد از نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه و اشریشیاکلی دارای بتالاکتاماز با طیف وسیع بودند(۱۷). در مطالعه‌ای که غفوریان و همکاران در شهر ایلام انجام دادند، ۵۹/۲ درصد از نمونه های کلبسیلا پنومونیه دارای بتالاکتاماز با طیف وسیع بودند(۱۸). در مطالعه ای در ایتالیا، از ۱۳۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۳۷/۱ درصد از ایزوله‌ها دارای مقاومت چند دارویی و هم چنین تولید کننده بتالاکتاماز با طیف وسیع بودند. در مطالعه ای از کشور اسپانیا، نتایج نشان داد که ۱۳۳ بالغ و ۲۹ کودک با کلبسیلا پنومونیه تولید کننده بتالاکتاماز با طیف وسیع آلوده بودند(۷). درصد شیوع بتالاکتاماز با طیف وسیع در مطالعه ما بسیار شبیه به مطالعاتی است که در شهر ایلام و کرمان انجام شده است. استفاده گسترده از داروها ممکن است باعث تسهیل گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی شود و از این رو کنترل باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتاماز با طیف وسیع به ویژه در بخش‌های مرتبط با کودکان باید جزوه اولویت ها محسوب می‌شود.

شناسایی کاربا پنمازهای کلبسیلا پنومونیه (KPC)

اولین بار آنزیم‌های KPC در کشور آمریکا تشخیص داده شدند و بعد از آن در سرتاسر جهان گسترش یافتند(۲). در این مطالعه، ۳ نفر از بالغین و ۲ از کودکان آلوده به کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده KPC بودند. در مطالعات قبلی، رستگار و همکاران به صورت فنوتیپی این آنزیم‌ها را در بخش سوختگی بیمارستان مطهری تعیین کردند، ولی به صورت مولکولی هنوز در ایران و خاورمیانه این ژن شناسایی نشده است(۱۵). به نظر می‌رسد روش پیشنهادی CLSI علاوه بر شناسایی آنزیم KPC، دیگر آنزیم‌های گروه A بتالاکتاماز ها را نیز شناسایی می‌کند. بعضی از محققان برای شناسایی این آنزیم روش دیسک ترکیبی با استفاده از برونیک اسید را پیشنهاد کرده‌اند. مطالعه‌ای در کشور چین نشان داد که ۷۰/۶ درصد از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده آنزیم KPC بودند و ۵۰/۶ درصد از ایزوله‌ها علاوه بر آنزیم KPC، بتالاکتاماز با طیف وسیع هم تولید می‌کردند(۷). Virgincar و همکاران نشان دادند که دو بیمار مبتلا به عفونت ادراری آلوده به ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به دارو تولیدکننده KPC بودند. این ژن در قاره‌های اروپا و آمریکا دیده شده است(۱۹).

پمپ‌های OqxA و OqxB

OqxAB باعث مقاومت به Quinoxaline-di-N-oxide olaquindox (a quinoxaline) می‌شوند که اولین بار در اشریشیاکلی جدا شده از خوک مشاهده شد(۲۰). در بین ایزوله‌های مورد بررسی، ۵۳ درصد از سویه‌ها به سیپروفلوکساسین مقاوم و ۷ درصد هم کاهش حساسیت به این آنتی‌بیوتیک را داشتند. برای تعیین این که آیا پمپ‌های OqxA,OqxB در مقاومت به فلوروکینولون‌ها نقش دارند یا نه، از روش Real-Time RT-PCR برای مشخص کردن میزان بیان آن‌ها استفاده شد که به دو گروه ایزوله‌های بالینی حساس و نیمه حساس به سیپروفلوکساسین (هاله عدم رشد در اطراف دیسک سیپروفلوکساسین بیش‌تر از ۳۳ میلی‌متر و ایزوله‌های بالینی با هاله عدم رشد کم تر از ۳۰ میلی‌متر) تقسیم‌بندی شد. RT-PCR بیان ۲/۳ برابر بیش‌تر ایزوله‌های با کاهش حساسیت نسبت به ایزوله‌های حساس را نشان داد. هم‌چنین کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 دارای بیان ژن OqxA ۱۶ برابر بیش‌تر نسبت به سویه حساس ATCC27799 بود. این دو سویه دارای توالی اسید آمینه GyrA,ParC شبیه به (GenBank accession number NC009648)

هستند و هم چنین هر دو پورین Ompk36,Ompk35 در هر دو سویه وجود دارد. ما هم‌چنین هیچ‌گونه ژن مقاومت به فلوروکینولون‌ها را در این دو سویه مشاهده نکردیم. شیوع OqxAB در کشور کره جنوبی ۰/۴ درصد، در کشور سوئد ۱/۸ درصد و در چین ۷۶ درصد بود(۲۲،۲۱). میزان شیوع این ژن‌ها در مطالعه ما ۵۰ درصد بود که فقط از کشور چین کم‌تر بود(۲۲).

Olaquindox در کشور چین برای استفاده ممنوع شده است و برای پرندگان هم در غلظت بسیار کم مورد استفاده قرار می‌گیرد. ژن‌های OqxAB هم بر روی پلاسمید و هم بر روی کروموزوم قرار دارد و می‌تواند به راحتی به دیگر باکتری‌ها منتقل شود(۲۳). در مطالعه ما بیش‌تر ایزوله‌های دارای این پمپ‌ها، هم چنین دارای CTX-M-15 بودند که هم زمان باعث مقاومت به سفالسپورین‌ها و فلوروکینولون‌ها می‌شوند. در مطالعه‌ای که توسط Liu و همکاران در سال ۲۰۱۲ در کشور چین بر روی ۲۱۵ نمونه حاوی پمپ‌های oqxAB انجام شد، ۱۷۷ (۸۲/۳ درصد) از سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند و شیوع این پمپ‌ها در ایزوله‌های حساس به سیپروفلوکساسین ۳۰/۹ درصد و در ایزوله‌های مقاوم ۴۷/۶ بود(۲۴). در مطالعه‌ای که در توسط Liu و همکاران در سال ۲۰۱۱ در کشور چین بر روی نمونه‌های اشریشیاکلی انجام شد، یک ایزوله اشریشیاکلی هم زمان دارای ژن‌های CTX-M و OqxAB بودند(۲۵). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ در کشورکره جنوبی بر روی نمونه‌های اشریشیاکلی جدا شده از انسان‌ها انجام شد، اولین بار این ژن‌ها را بر روی پلاسمید pOLA52 با اندازه ۵۲ کیلو دالتون مشاهده کردند(۲۵). در مطالعه‌ای که توسط Rodríguez-Martínez و همکاران در سال ۲۰۱۳ در کشور اسپانیا بر روی ۱۱۴ ایزوله حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع انجام شد، با استفاده از روش PCR,Sequencing به ترتیب ۷۶ و ۷۵ درصد حاوی پمپ oqxA وoqxB بودند. با استفاده از روش Real-Time RT-PCR میزان بیان ژن OqxA در نمونه‌های با کاهش حساسیت به سیپروفلوکساسین چهار برابر بیش تر از ایزوله‌های حساس به این آنتی‌بیوتیک بود و در ضمن میزان بیان این پمپ در سویه استاندارد ATCC 700603 هیجده برابر بیش تر از سویه استاندارد ATCC 27799 بود(۶).

بررسی نتایج حاصل از PFGE

تکنیک PFGE برای دسترسی به ارتباط ژنتیکی بین سویه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. با استفاده از هضم آنزیمی با Xba-1 در مجموع ۱۵ الگوی PFGE شناسایی شد که درون سه خوشه اصلی A,B,C تقسیم‌بندی شده‌اند. بزرگ‌ترین الگوی‌های PFGE در شاخه A مشاهده شد که شامل ایزوله‌های از بیمارستان طالقانی و مفید بود. شاخه‌های الگوی PFGE مرتبط با ایزوله‌هایی بود که حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع بودند. بسیاری از نمونه‌های مرتبط در شاخه گروه A علاوه بر بتالاکتاماز با طیف وسیع دارای آنزیم Amp-C هم بودند. ایزوله‌های KK2 باK44، ایزوله‌های K7باK43، ایزوله‌هایK13 با KK1 دارای ارتباط نزدیک بودند. هر چهار ایزوله‌ای که از بخش ICU بیمارستان طالقانی جدا شده بود، در خوشه B قرار گرفتند و دارای ارتباط کلونی نزدیکی بودند و هم‌چنین دو نمونه‌ای که از بخش NICU بیمارستان طالقانی جدا شده بود، دارای ارتباط نزدیکی بودند که احتمالاً آلودگی بخش را نشان می‌دهد. هر ۱۵ ایزوله ای که مورد بررسی قرار گرفتند، به کارباپنم‌ها از جمله ایمی پنم، مروپنم، ارتاپنم و دوری پنم و هم‌چنین به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند.

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به ویژه در بیمارستان کودکان مفید بالا بود. پزشکان باید در تجویز دارو دقت لازم را داشته باشند و نمونه مورد نظر را برای انجام تست آنتی‌بیوگرام به آزمایشگاه ارسال کنند تا بهترین گزینه دارویی برای بیمار مورد استفاده قرار گیرد. کارشناسان آزمایشگاه باید بر روی نمونه مورد نظر تست آنتی‌بیوگرام انجام دهند و در ضمن باید بتوانند

مکانیسم‌های مقاومت به داروها، که مهم‌ترین آن ها بتالاکتامازها می‌باشد، را شناسایی و به پزشکان اطلاع دهند. پرسنل آزمایشگاه و پرستاران و کسانی که با بیماران در بیمارستان در تماس هستند، باید برای وجود این ایزوله‌های مقاوم مورد بررسی قرار گیرند تا در صورتی که به این باکتری‌ها آلوده هستند، درمان شوند. در صورت مشاهده عفونت بیمارستانی، باید از مکان‌های مختلف بخش‌ها و هم‌چنین بیماران نمونه‌گیری انجام گیرد تا منبع آلودگی پیدا شود. در مطالعه حاضر شیوع بتالاکتامازهای با طیف وسیع بالا بود که لازم است پزشکان به بیماران آلوده بهترین دارو ر تجویز کنند و کارشناسان آزمایشگاه نمونه‌های مقاوم به دارو را از لحاظ وجود بتالاکتامازها مورد بررسی قرار دهند. مطالعه ما اولین گزارش از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه حاوی پمپ‌های ترشحی OqxAB بود که اولین بار در حیوانات دید شد و احتمالاً از طریق فراوردهای حیوانی به انسان منتقل شده است. بیان این پمپ‌ها در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم زیاد بود که این عمل یکی از دلایل مقاومت به داروها به ویژه سیپروفلوکساسین بود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از پرسنل مرکز تحقیقات اطفال بیمارستان مفید و همکاران بخش میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی شهر تهران کمال تشکر را داریم.

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 2013; 6(4): 104-116 (Persian).
2. Fallah F, Taherpour A, Hakemi Vala MH, Hashemi A. Global Spread of New Delhi mettallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). Archives of Clinical Infectious Diseases2012; 6(4): 171-177.
3. Rahmati Roodsari R, Fallah F, Taherpour A, Hakemi M, Hashemi A. Carbapenem-Resistant Bacteria and Laboratory Detection Methods. Archives of Pediatric Infectious Diseases 2013; 1(4): 188-191.
4. Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martínez-Martínez L, Arlet G, et al. qnr, aac (6′)-Ib-cr and qepA genes in Escherichia coli and Klebsiella spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2012; 67(4): 886-897.
5. Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, Sørensen SJ. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in Escherichia coli and selected enteric bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2007; 60(1): 145-147.
6. Rodríguez-Martínez JM, de Alba PD, Briales A, Machuca J, Lossa M, Fernández-Cuenca F, et al. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2013; 68(1): 68-73.
7. Fallah F, Hakemi Vala M, Goudarzi H, Hashemi A, Taherpour A, Bigdel Shamloo K, et al. Identification of extended-spectrum-beta-lactamases (ESBLs), metallo-beta-lactamases (MBLs), Amp-C and KPC ß-lactamases among Klebsiella pneumoniae isolated from adults and pediatric patients in Iran. Afr J Microbiol Res 2013; 7(25): 3254-3261.

8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement. Document M100-S22 Wayne, PA: CLSI; 2012; 32(3). Availiable at: http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E.pdf. Accessed January 2, 2012.
9. Hashemi A, Shams S, Barati M, Samedani A. Antibacterial effects of methanolic extracts of Zataria multiflora, Myrtus communis and Peganum harmala on Pseudomonas aeruginosa producing ESBL. J Arak Univ Med Sci 2011; 14(4): 104-112.
10. Hashemi A, Shams S, Kalantar D, Taherpour A, Barati M Antibacterial effect of Methanolic extract of Camellia Sinensis L. on Pseudomonas aeruginosa strains producing β-lactamases. J Gorgan Univ Med Sci 2012; 14(1): 136-142.
11. Fallah F, Borhan RS, Hashemi A. Detection of bla(IMP) and bla(VIM) metallo-beta-lactamases genes among Pseudomonas aeruginosa strains. Int J Burns Trauma 2013; 3(2): 122-124.
12. 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): BR 247-250.
13. Jafari M, Fallah F, Borhan Rebwar S, Navidinia M, Karimi A, Rafiei Tabatabaei S, et al. The First Report of CMY, aac (6′)-Ib and 16S rRNA Methylase Genes Among Pseudomonas aeruginosa Isolates From Iran. Arch Pediatr Infect Dis 2013; 1(3): 109-112.
14. 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): 609-615.
15. Rastegar Lari A, Azimi L, Rahbar M, Fallah F, Alaghehbandan R. Phenotypic detection of Klebsiella pneumoniae carbapenemase among burns patients: first report from Iran. Burns 2013; 39(1): 174-176.
16. Shahcheraghi F, Nobari S, Rahmati Ghezelgeh F, Nasiri S, Owlia P, Nikbin VS, et al. First report of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing Klebsiella pneumoniae in Iran. Microb Drug Resist 2013; 19(1): 30-36.
17. Mansouri S, Kalantar D, Asadollahi P, Taherikalani M, Emaneini M. Characterization of Klebsiella pneumoniae strains producing extended spectrum beta-lactamases and AMPC type beta-lactamases isolated from hospitalized patients in Kerman, Iran. Roum Arch Microbiol Immunol 2012; 71(2): 81-86.
18. Ghafourian S, Bin Sekawi Z, Sadeghifard N, Mohebi R, Kumari Neela V, Maleki A, et al. The Prevalence of ESBLs Producing Klebsiella pneumoniae Isolates in Some Major Hospitals, Iran. The Open Microbiology Journal 2011; 5: 91-99.
19. Virgincar N, Iyer S, Stacey A, Maharjan S, Pike R, Perry C, et al. Klebsiella pneumoniae producing KPC carbapenemase in a district general hospital in the UK. J Hosp Infect 2011; 78(4): 293-296.
20. Chen X, Zhang W, Pan W, Yin J, Pan Z, Gao S, et al. Prevalence of qnr, aac(6')-Ib-cr, qepA, and oqxAB in Escherichia coli isolates from humans, animals, and the environment. Antimicrobial Agents Chemother 2012; 56(6): 3423-3427.
21. Rodriguez-Martinez JM, Diaz de Alba P, Briales A, Machuca J, Lossa M, Fernandez-Cuenca F, et al. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in

extended-spectrum-beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae. J Antimicrob Chemother 2013; 68(1): 68-73.

22. Zhao J, Chen Z, Chen S, Deng Y, Liu Y, Tian W, et al. Prevalence and dissemination of oqxAB in Escherichia coli isolates from animals, farmworkers, and the environment. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(10): 4219-4224.
23. Ruiz E, Saenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martinez-Martinez L, Arlet G, et al. qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in Escherichia coli and Klebsiella spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. J Antimicrob Chemother 2012; 67(4): 886-897.
24. Liu BT, Liao XP, Yang SS, Wang XM, Li LL, Sun J, et al. Detection of mutations in the gyrA and parC genes in Escherichia coli isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from diseased food-producing animals. J Med Microbiol 2012; 61(Pt 11): 1591-1599.
25. Liu BT, Wang XM, Liao XP, Sun J, Zhu HQ, Chen XY, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants oqxAB and aac(6')-Ib-cr and extended-spectrum beta-lactamase gene blaCTX-M-24 co-located on the same plasmid in one Escherichia coli strain from China. J Antimicrob Chemother 2011; 66(7): 1638-1939.