فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف خانواده‌هایTEM ، SHV و OXA در میان جدایه‌های کلبسیلا نومونیه و اشرشیا کلای به‌دست‌آمده از بیماران پیوند کلیه

صادق اصغری کلشانی[1]، یعقوب شریفی*[2]، رضا طالبی[3]

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰۲/۱۶ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰۵/۲۴

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: با توجه به اهمیت بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های بیماری‌زا و مشکلات درمان ناشی از آن‌ها، این مطالعه اقدام به تعیین شیوع ژن‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) شامل TEM، SHV و OXA در بین جدایه‌های اشرشیا کلای و کلبسیلا نومونیه بدست آمده از نمونه ادرار بیماران پیوندی، نموده است.

مواد و روش کار: جدایه‌های باکتریایی از نمونه ادرار بیماران بستری در بخش پیوند بیمارستان امام خمینی (ره) ارومیه، جمع‌آوری و تعیین هویت شدند. تمامی جدایه‌ها با استفاده از دیسک‌های سفوتاکسیم و سفتریاکسون به‌تنهایی و در ترکیب کلاوونیک اسید (Double Disc Diffusion Test) ازنظر ESBLs غربالگری گردیدند. سپس حضور ژن‌های بتالاکتامازی TEM، SHV، OXA-10 و OXA-2 با استفاده از PCR موردبررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: درمجموع ۹۶ جدایه، شامل ۳۹ کلبسیلا نومونیه (۴۰/۶درصد) و ۵۷ اشرشیا کلای (۵۹/۴درصد) وارد این مطالعه شدند. با روش دیسک ترکیبی (Double Disc Diffusion Test) ۵۶ جدایه (۵۸/۳درصد) مولدESBLs شناسایی شد که شامل ۳۹ جدایه ایشرشیا کلای و ۱۷ جدایه کلبسیلا نومونیه بود. ژن‌های TEM (۷۸/۶درصد) و OXA-2 (۷/۱درصد) به ترتیب، بیشترین و کمترین فراوانی را داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری: مطالعه فعلی بیانگر فراوانی نسبتاً بالای ژن‌های مولد ESBLs در بین جدایه‌های ایشرشیا کلای و کلبسیلا نومونیه‌های جدا شده از بیماران پیوندی بود که لزوم شناسایی به‌موقع این عوامل عفونی مقاوم را نشان می‌دهد. هم‌چنین اهمیت کنترل بسترهای گسترش این نوع مقاومت‌ها، به‌ویژه لزوم دقت در تجویز منطقی آنتی‌بیوتیک را می‌طلبد.

کلیدواژه‌ها: اشرشیا کلای، کلبسیلا نومونیه، بیماران پیوندی، مقاومت‌های دارویی، بتالاکتاماز وسیع‌الطیف

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره هفتم، ص ۵۵۸-۵۴۹، مهر ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: ارومیه- جاده نازلو- دانشکده پزشکی- گروه میکروب‌شناسی، تلفن: ۰۴۴۳۲۷۵۲۳۷۳

Email: ya.sharifi@gmail.com

مقدمه

خانواده‌ی انتروباکتریاسه بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین باسیل‌های گرم منفی را شامل می‌شوند که از نمونه‌های بالینی جدا می‌شوند. دراین‌بین، اشرشیا کلای و کلبسیلا پنومونیه از شایع‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی بوده و با فراوانی بالا از عفونت‌های دستگاه ادراری و خون بدست می‌آیند. اما مهم‌ترین اهمیت این باکتری‌ها، کسب مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها است (۱). بتالاکتامازهای با طیف اثر وسیع (Extended Spectrum Beta lactamases; ESBLs) آنزیم‌هایی هستند که علاوه بر ایجاد مقاومت به پنی‌سیلین‌ها، واسطه‌ی ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین‌های نسل سوم مثل سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و مونوباکتام‌ها مثل آزترئونام می‌شوند و به راحتی توسط باکتری‌های مذکور کسب می‌شوند. از سوی دیگر بسیاری از ژن‌های ESBLs بر روی پلاسمیدهای بزرگی قرار دارد که هم‌زمان حامل ژن‌های مقاومت به سایر عوامل ضدمیکروبی مثل آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، سولفونامیدها و تتراسایکلین نیز هستند (۲). این توانایی، موجب بروز مقاومت‌های دارویی چندگانه (Multi Drug Resistance; MDR)، در بین ایزوله‌های مولد

[1] کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی با گرایش میکروبی، واحد ارومیه دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

[2] دانشیار، باکتری شناسی پزشکی، علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

[3] استادیار، میکروبشناسی، واحد ارومیه دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

ESBLs می‌شود. میزان مرگ‌ومیر در این گروه به‌طور قابل‌توجهی نسبت به عفونت‌های ناشی از باکتری‌های حساس به آنتی‌بیوتیک بالا بوده و از ۴۲ تا ۱۰۰ درصد متغیر است (۳، ۴). در سال‌های اخیر، پیوند کلیه به‌عنوان درمان اصلی و انتخابی برای اغلب بیماران مبتلا به نارسائی کلیوی در مراحل آخر بیماری در نظر گرفته شده است. با توجه به اینکه این افراد برای حفظ پیوند دریافتی باید داروهای ایمنوساپرسیو مصرف کنند، مستعد آلودگی با عوامل عفونی مختلف هستند (۵). باوجود پیشگیری‌های گوناگون، عفونت مجاری ادراری شایع‌ترین عارضه باکتریایی پس از پیوند است که در ماه‌های اول پس از پیوند در بین گیرندگان کلیه دیده می‌شود و تهدیدی برای از دست دادن پیوند محسوب می‌شود (۶). با توجه به اهمیت مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و گسترش روزافزون آن‌ها و در نظر گرفتن هزینه‌های هنگفت اعمال جراحی نظیر پیوند عضو، این مطالعه اقدام به تعیین فراوانی ژن‌های مرتبط با بتالاکتامازهای با طیف اثر وسیع (TEM و SHV و OXA) در بین جدایه‌های بدست آمده از بیماران پیوندی که اغلب موجب شکست درمان با داروهای بتالاکتامی می‌شوند، نموده است.

مواد و روش کار

شناسایی جدایه‌ها و غربالگری آن‌ها ازنظرESBLs:

این مطالعه تحلیلی- توصیفی، بر روی جدایه‌های باکتریایی بدست آمده از نمونه ادرار بیماران پیوند کلیه‌ی بستری در بخش و به دنبال تشخیص اولیه علائم عفونت اداری توسط پزشک متخصص، در آزمایشگاه بیمارستان امام خمینی (ره) ارومیه از مهرماه سال ۱۳۹۴ تا شهریور ۱۳۹۵ انجام شد. برای این منظور، نمونه‌های ادرار جمع‌آوری‌شده در ظروف استریل، در محیط‌های کشت بلاد آگار و ائوزین متیلن بلو آگار کشت شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط‌های نامبرده شده، با استفاده از تست‌های استاندارد میکروب شناسی نظیر رنگ آمیزی گرم، تست اکسیداز وکاتالاز، رشد در محیط‌های افتراقی سیمونز سیترات، تریپل شوگر آیرون آگار، SIM، MR/VP و اوره تعیین هویت شدند. در مجموع تعداد ۹۶ جدایه از باکتری‌های اشرشیا کلای و کلبسیلا نومونیه شناسایی و برای ادامه کار، در میکروتیوب های حاوی محیط کشت TSB (Tryptic soy broth) و گلیسرول (۱۵ درصد) در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد ذخیره شدند. توضیح اینکه تمام نمونه‌هایی که باکتری‌های رشد کرده آن‌ها بجزء اشرشیا کلای و کلبسیلا نومونیه بود از این مطالعه خارج گردید.

تست فنوتیپی Double Disc Diffusion Test (DDDT) برای شناسایی جدایه‌های ESBLs:

برای غربالگری جدایه های تعیین هویت شده ازنظر ESBLs، باکتری های ذخیره شده از فریزر خارج و در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از هم زدن باکتری‌های ذخیره شده، یک لوپ از آن‌ها را برداشته و در پلیت Blood agar کشت داده شدند تا باکتری تازه رشد کرده در دسترس قرار گیرند. بر اساس توصیه CLSI (2014) برای غربالگری ازنظر ESBLs، از دیسک سفوتاکسیم (۳۰µg) و سفتازیدیم (۳۰µg) به تنهایی و دیسک‌های ترکیبی سفوتاکسیم/ کلاوونیک اسید (۳۰/۱۰µg) و سفتازیدیم/ کلاوونیک اسید (۳۰/۱۰µg) (ساخت شرکت UK-MAST) استفاده شد که تحت عنوان تست فنوتیپی Double Disc Diffusion Test شناخته می‌شود. پس از تلقیح سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند (۱/۵ ×۱۰^{۸} cfu/ml) بر روی پلیت مولر هینتون آگار، دیسک‌های مذکور بصورت دو به دو با فاصله ۲/۵cm از یکدیگر قرار گرفتند. با مشاهده افزایش قطر هاله عدم رشد (قطر هاله عدم رشد مساوی یا بیشتر از ۲۲ میلی متر برای سفتازیدیم و ۲۷ میلی متر برای سفوتاکسیم) به میزان مساوی یا بیشتر از ۵mm در اطراف یک دیسک ترکیبی در مقایسه با همان دیسک در حالت انفرادی، جدایه موردنظر به‌عنوان جدایه مولد ESBL شناسایی شد (۷). الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی همه جدایه با تست دیسک دیفیوژن انجام و گزارش شده بود(۵).

مطالعه ژنوتیپی جدایه‌ها

استخراج DNA:

استخراج DNA طبق دستورالعمل کیت استخراج YTA Genomic DNA Extraction Mini Kit (شرکت یکتا تجهیز آزما- ایران) صورت گرفت. برای تعیین کیفی و کمی مقدار DNA بدست آمده، به ترتیب از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد و روش اسپکتروفتومتری (Eppendorf BioPhotometer; Hamburg, Germany) (بر حسب نانوگرم) استفاده شد. برای ادامه کار DNAs استخراج شده، در ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید.

شناسایی مولکولی ژن‌های مقاومت با استفاده از PCR:

بعد از استخراج DNA، آزمایش PCR برای تعیین حضور ژن‌های *bla* $_{TEM}$ و *bla* $_{SHV}$، *bla* $_{OXA-2}$، *bla* $_{OXA-10}$ انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ نشان داده است.

جدول (۱): مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز

Target gene	Primer name	Primer sequence	Amplicon References size	Reference
bla_{TEM}	F- TEM	5’-TCCGCTCATGAGACAATAACC-3’	931bp	(۸)
	R- TEM	5’- TTGGTCTGACAGTTACCAATGC-3’		
bla_{SHV}	F- SHV	5’-TGGTTATGCGTTATATTCGCC-3’	868bp	(۹)
	R- SHV	5’-GGTTAGCGTTGCCAGTGCTGG-3’		
bla_{OXA2}	F- OXA-2	5’-AAGAAACGATACTGCCTGC-3’	478bp	(۱۰)
	R- OXA-2	5’- CCACTCAACCCATCCTACCC-3’		
bla_{OXA10}	F- OXA-10	5’-GTCTTTCGAGTACGGCATTA-3’	720bp	(۱۱)
	R- OXA-10	5’-ATTTTCTTCGCGGCAACTTAC-3’		

برای انجـام PCR، ۱۲/۵ میکرو لیتر از محلول DNA Master Mix (حـاوی بـافر PCR×۱۰، MgCl2، dNTPs و آنزیم Taq پلیمراز) (Fermentas-Lithuania) در زیر هود و در شرایط کاملاً اسـتریل به درون میکروتیوب های ۰/۲ میلی لیتری اضـافه گردید. سپس ۵/۵µL آب مقطر استریل اضافه شده و از هر پرایمر به اندازه ۰/۵ µL افزوده و بعد ۲ µL از DNA الگو استخراج شده به درون میکروتیوب اضـافه شـد و در سـانتریفوژ به آرامی spin گردید تا تمامی مواد با هم مخلوط گردند.

در ادامه میکروتیوب ها (حجم واکنش ۲۵ µL) در درون دسـتگاه ترمال سایکلر (Bio Intellectica, Canada) قرار گرفت و واکنش طبق شـرایط زیر در مدت یک سـاعت و بیسـت و نه دقیقه انجام گرفت: واسـرشـتگی اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، در ادامه ۳۰ سـیکل شـامل واسـرشـتگی در۹۴ °C به مدت ۲۵ ثانیه، اتصـال پرایمرها به الگو در ۵۲°C به مدت ۴۰ ثانیه، طویل سازی در۷۲ °C به مدت ۵۰ ثانیه و طویل سازی نهایی در۷۲ °C به مدت ۶ دقیقه.

الکتروفورز:

محصـولات PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵درصـد و رنگ آمیزی با safe stain، در زیر نور ماورای بنفش و در دسـتگاه ژل داک (G:BOX;Syngene, Cambridge, UK) ازنظر حضـور ژن‌های مورد مطالعه بررسی شدند.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:

داده‌ها با استفاده از روش‌های آمار توصیفی و با استفاده از نرم افزار SPSS-16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

فراوانی جدایه‌های بدست آمده از نمونه‌های بالینی:

در مجموع ۹۶ جـدایه باکتریایی بدسـت آمده از نمونه ادرار بیماران پیوندی، شـامل ۵۷ جدایه (۵۹/۴ درصـد) اشرشیا کلای و ۳۹ جدایه (۴۰/۶ درصـد) جدایه کلبسـیلا نومونیه وارد این مطالعه شـد. بیمـاران پیونـدی شـامل، ۴۲ (۴۳/۸درصـد) مرد و ۵۴ (۵۶/۲درصـد) زن با میانگین سـنی حدود ۴۷/۰۷ (۸- ۷۶ سـال) بودند.

نتایج شـناسایی جدایه‌های مولد ESBL با استفاده از روش دیسک ترکیبی (Double Disc Diffusion Test):

از بین ۹۶ جـدایـه بـالینی جمع‌آوری شـده، ۵۶ جـدایـه (۵۸/۳درصد) بعنوان مولد ESBL شناسایی شدند که از این تعداد ۳۹ (۴۰/۶درصـد) مورد اشـرشـیا کلای و ۱۷ (۱۷/۷درصـد) مورد کلبسیلا نومونیه بودند.

نتـایج بررسـی حضـور ژن‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز OXA-2، OXA-10، SHV و TEM با استفاده از روش PCR:

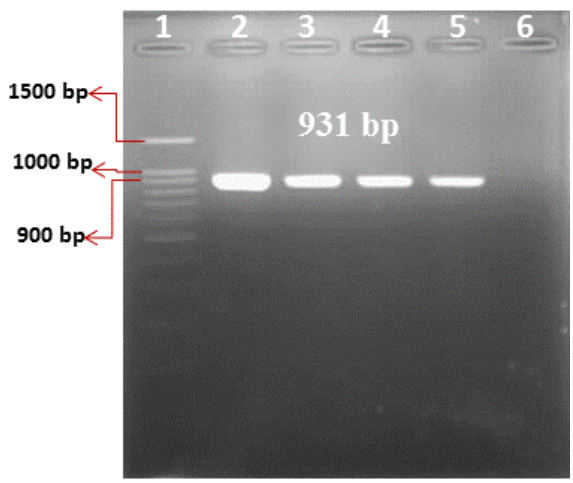
فراوانی هر یـک از ژن‌هـای OXA-2، OXA-10، SHV و TEM در بین جدایه‌های اشـرشـیا کلای و کلبسـیلا نومونیه به تفکیک در جدول شـماره ۱ نشـان داده شـده اسـت. همچنین، همزمانی حضـور ژن‌های مقاومت در بین جدایه‌ها نیز در جدول ۲ نمایش داده شـده که نشـان می‌دهد بیشـترین همزمانی با فراوانی ۲۳/۲درصـد مربوط به ژنوتایپ TEM+SHV می‌باشـد. نتایج ژل الکتروفورز برای ژن‌های مورد مطالعه در شـکل‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است.

جدول (۲): مقایسه حضور ژن‌های مولد آنزیم‌های OXA-2، OXA-10، SHV و TEM در بین جدایه‌ها با روش PCR.

ESBLs genes	*E.coli* (n= 39; %)	*K. pneumoniae* (n= 17; %)	Total 56 (%)	*P*v
TEM	29 (74.4)	15 (88.2)	44 (78.6)	0.567
SHV	11 (28.2)	13 (76.5)	24 (42.9)	0.004
OXA- 10	6 (15.4)	5 (29.4)	11 (19.6)	0.228
OXA- 2	0 (0)	4 (23.5)	4 (7.1)	0.029

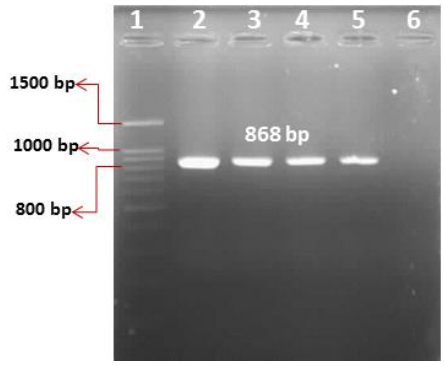
جدول (۳): توزیع هم‌زمان ژن‌های مولد آنزیم‌های OXA-2، OXA-10، SHV و TEM در بین جدایه‌های اشرشیا کلای و کلبسیلا نومونیه

ESBL types	ESBL positive		
	E.coli n= 39 (%)	K. pneumonia n= 17 (%)	Total No (%)
TEM	17 (43.6)	2 (11.8)	19 (33.9)
SHV	1 (2.6)	0(0)	1 (1.8)
OXA-10	1 (2.6)	0 (0)	1 (1.8)
OXA-2	0 (0.0)	1 (5.9)	1 (1.8)
TEM+SHV	7 (17.9)	6 (35.3)	13(23.2)
TEM+ OXA-10	2 (5.1)	1 (5.9)	3 (5.4)
TEM+ SHV+ OXA-10	3 (7.7)	4 (23.5)	7 (12.5)
TEM+ SHV+ OXA-2	0 (0.0)	2 (11.8)	2 (3.6)
SHV+ OXA-2	0 (0.0)	1 (5.9)	1 (1.8)

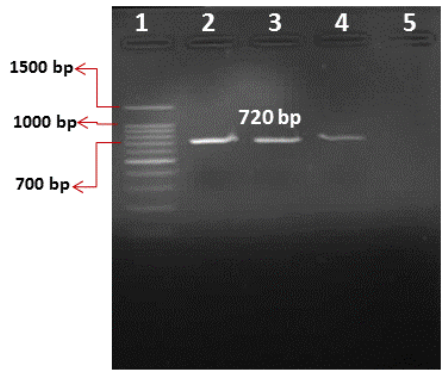


شکل (۱) نتایج الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز برای شناسایی ژنTEM

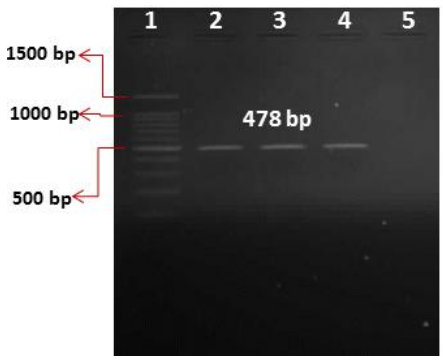
ستون ۱: سایزمارکر (ladder 50bp; Bioflux)، ستون ۲ تا ۵: جدایه‌های TEMمثبت، ستون ٦: کنترل منفی



شکل (۲): نتایج الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز برای شناسایی ژن SHV
ستون ۱: سایزمارکر ((ladder 50bp; Bioflux، ستون‌های ۲ تا ۵: سویه‌های SHVمثبت، ستون ۶: کنترل منفی



شکل (۳): نتایج الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز برای شناسایی ژنOXA-10
ستون ۱: سایزمارکر ((ladde 50bp; Bioflux، ستون ۲ تا ۴: سویه‌های OXA-10 مثبت، ستون ۵: کنترل منفی



شکل (۴): نتایج الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز برای شناسایی ژنOXA-2
ستون ۱: سایزمارکر (ladder 50bp; Bioflux)، ستون ۲ تا ۴: سویه‌های OXA-2 مثبت، ستون ۵: کنترل منفی

بحث

عفونت دستگاه ادراری رایج‌ترین شکل عفونت، در افراد با نقص عملکردی کلیه است که عمل پیوند انجام داده‌اند. استفاده از داروهای سرکوبگر سیستم ایمنی و درمان آنتی‌بیوتیکی نامناسب عفونت‌های دستگاه ادراری، می‌تواند نتایج پیوند را تحت تأثیر قرار دهد(۱۲) و لذا جلوگیری از چنین عفونت‌هایی و عواقب آن‌ها نیاز به توجه زیادی دارد. بر این اساس، در مرکز پیوند مرکز آموزشی درمانی امام خمینی (ره) ارومیه مشابه سایر مراکز پیوند دنیا، برای جلوگیری از عفونت‌های باکتریایی، پروفیلاکسی با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف صورت می‌گیرد. اما بنظر می‌رسد بین پروفیلاکسی قبل عمل جراحی به همراه بستری طولانی مدت و بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی ارتباط وجود داشته باشد. در این راستا، برخی محققین بر وجود ارتباط بین عفونت‌های ادراری با مصرف آنتی‌بیوتیک قبل عمل پیوند، تاکید دارند(۱۳). عوامل عفونی ایجاد

کننده‌ی عفونت‌های ادراری بسیار متنوع و شامل عوامل قارچی و ویروسی است ولی عفونت‌های باکتریال از عوامل غالب ایجاد کننده این عفونت‌ها و مسبب بوجود آمدن بیش از ۳۰ درصد عفونت‌های ادراری بیمارستانی است(۱۴). از شایعترین عوامل باکتریایی ایجاد کننده عفونت‌های ادراری اشرشیا کلی، سودوموناس، پروتئوس میرابیلیس، گونه های کلبسیلا، انتروباکتر، استافیلوکوکوس، انتروکوکوس می‌باشد(۱۵).

همانند سایر مطالعات (۱۶) در این مطالعه نیز اشریشیا کلی و کلبسیلا از شایع‌ترین عوامل باکتریایی در ایجاد عفونت ادراری در جمعیت مورد مطالعه بودند. چنین باکتری‌های با کسب مقاومت‌های ناشی از بتالاکتاماز های وسیع‌الطیف ESBL می‌توانند منشاء بسیاری از مشکلات درمانی با آنتی‌بیوتیک‌های روتین از جمله دسته بتالاکتامی، مورد استفاده در مراکز درمانی باشند. در واقع بتالاکتامازهای با طیف اثر وسیع، آنزیم‌هایی هستند که علاوه بر ایجاد مقاومت به پنی‌سیلین‌ها، واسطه‌ی ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین‌های نسل سوم مثل سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و دسته آنتی‌بیوتیکی مونوباکتام مثل آزترئونام محسوب می‌شوند(۱۷). گزارش میزان شیوع سویه‌های مولد ESBL در نقاط مختلف دنیا بسیار متفاوت است(۱۸، ۱۹) که عمدتاً مرتبط با سطح بهداشت و درمان آن مناطق است.

در مطالعه حاضر سویه‌های مولد ESBL در بین سویه‌های اشریشیا کلی (۳۹ مورد از ۵۷ جدایه [۶۸،۴درصد]) بیشتر از کلبسیلا نومونیه (۱۷ مورد از ۳۹ جدایه [۴۳،۶درصد]) بود و این تفاوت ازنظر آماری معنی دار بود(Pv= 0.021) . برای خلاف یافته ما، در بعضی مطالعات فراوانی کلبسیلا نومونیه در بین جمعیت پیوند عضو شده بیشتر بوده است(۲۰).

نکته قابل توجه این که بیماران پیوندی حدود دو هفته و گاه بیشتر در بیمارستان بستری می‌شوند و این زمان برای کلونیزاسیون باکتری‌های مولدESBL می‌تواند کافی باشد. در این مطالعه، غربالگری جدایه‌هایESBL با روش فنوتیپی توصیه شده در CLSI (۲۰۱۴) با استفاده از دو دیسک سفوتاکسیم و سفتازیدیم به تنهایی و در ترکیب با کلاوونیک اسید بعنوان تست تائیدی (DDDT) صورت گرفت. اما زمانی که برخی سویه‌های مورد مطالعه برای دیسک‌های منفرد سفوتاکسیم و سفتازیدیم مقاومت کامل نشان می‌دادند (هاله عدم رشد مشاهده نمی‌شد)، تست تائیدی با ترکیب دو دیسک سفوتاکسیم و کلاوونیک اسید نیز هاله عدم رشد با افزایش ۵ میلی متری را نشان نمی‌داد. در عین حال در بررسی مولکولی، این سویه‌ها دارای ژن‌های مولد بتالاکتامازی بودند. هر چند در این موارد، نقطه نظری در CLSI دیده نمی‌شود اما به نظر نویسندگان، چنین سویه‌هایی نیز باید مولد ESBL در نظر گرفته شوند چرا که با روش مولکولی مانند PCR، ژن‌های مقاومت بتالاکتامازی در آن‌ها یافت شد. بهر حال آنچه مسلم است تعداد سویه‌های مولد ESBL در بین جدایه‌ها زیاد است که احتمالاً با افزایش مصرف سفالوسپورین‌ها در قبل و بعد پیوند و همچنین با فشار انتخاب آنتی‌بیوتیکی مرتبط است(۵).

این شرایط می‌تواند به پایداری بیشتر سویه‌هایی با مقاومت چند دارویی در مراکز درمانی کمک کند. از طرف دیگر بیشتر ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، منشاء خارج کروموزومی نظیر ترانسپوزون و پلاسمیدی دارند و جابجایی ژن‌های مذکور در بین باکتری‌ها، می‌تواند باعث گسترش جهانی ESBLs شود (۲۱).

شیوع ژن‌های مولد بتالاکتاماز در بین جمعیت‌های مورد مطالعه، در مراکز درمانی مختلف و بسته به شرایط جغرافیایی، متفاوت گزارش می‌شود(۲۲). در این مطالعه، در بین جدایه‌های مولد ESBL بررسی شده ، بیشترین فراوانی مربوط به ژن TEM (۷۸/۶درصد) و کمترین آن مربوط به OXA-2 (۷/۱درصد) بود. همسو با این تحقیق، در مطالعه‌ای از هند نیز فراوانی ژن TEM بیشتر از سایر ژن‌ها بود(۲۳). مقایسه فراوانی ژن TEM در بین باکتری‌های مولد ESBL نشان داد که این ژن در بین کلبسیلا نومونیه (۸۸/۲درصد) فراوانی بیشتری از اشریشیا کلی دارد(حدود ۷۴/۴درصد) ولی این تفاوت ازنظر آماری معنی دار نیست (۰/۲۱۳ =Pv).

همچنین در تحقیق حاضر دومین ژن ازنظر فراوانی، ژن SHV بود با این تفاوت که فراوانی آن در بین جدایه‌های کلبسیلا ها (۷۶/۵درصد) به‌طور معنی داری از اشریشیا کلی‌ها (۲۸/۲درصد) بیشتر است (Pv= 0.001). در تحقیق صورت گرفته در تهران در سال ۲۰۱۰ فراوانی ژن‌های TEM و SHV در بین کلبسیلا های جدا شده، به ترتیب ۵۴درصد و ۶۷/۴درصد بدست آمد(۲۴).

همچنین بیشترین فراوانی ژن‌های OXA در بین جمعیت میکروبی مورد مطالعه، در بین کلبسیلاها دیده شد. در واقع ژن OXA-2فقط در بین کلبسیلاها یافت شد و هیچ موردی در اشریشیا کلی‌ها مشاهده نگردید. بر اساس این یافته‌ها، بنظر می‌رسد سویه‌های کلبسیلای جدا شده از بیماران پیوندی، مستعد کسب ژن‌های مقاومت بیشتری هستند.

آنچه مسلم است تنوع جمعیتی باکتری‌ها در مناطق جغرافیایی مختلف، قابلیت‌های ذاتی و اکتسابی آن‌ها در کسب مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و همچنین پایبندی مردم به اصول بهداشتی می‌تواند از عوامل تأثیر گذار در نتایج مطالعات گوناگون باشد.

در ارتباط با توزیع هم‌زمان ژن‌های مقاومت در بین جدایه‌های ESBL، بیشترین فراوانی مربوط به حضور هم‌زمان TEM و SHV (۲۳/۲درصد) بود و این فراوانی در بین جدایه‌های کلبسیلا

(۳۵/۳درصد) از اشریشیا کلی (۱۷/۹درصد) بیشتر شد (جدول شماره ۲). کمترین فراوانی هم مربوط به حضور همزمان OXA-2 و SHV (۱/۸درصد) بود که تنها در یک جدایه کلبسیلا نومونیه دیده شد.

گروهی از محققین در ژاپن با جمع آوری اطلاعات از مراکز درمانی به طور سالیانه در خصوص حساسیت و مقاومت باکتری‌های ایجاد کننده UTI نشان دادند که نوع باکتری و حساسیت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها دائماً در حال تغییر است (۱). در عین حال شیوع بالای مقاومت باکتریایی به داروهای رایج، موجب صرف هزینه‌های درمانی گزافی می‌شود. لذا توصیه می‌شود در هر منطقه و در فواصل زمانی مناسب، این بررسی انجام شود تا بتوان در مورد درمان، تصمیم مناسب‌تری را اتخاذ کرد چراکه هر گونه تأخیر در درمان می‌تواند عواقب خطرناکی مانند سپتی سمی داشته باشد که تهدید کننده زندگی است.

از محدودیت‌های اساسی در طرح حاضر عدم امکان پیگیری بیماران پیوندی پس از ترخیص از مراکز درمانی است که آیا درمان صورت گرفته منتج به ریشه کنی کامل باکتری‌های مقاوم شده است یا اینکه آن‌ها به حاملان این باکتری‌های مقاوم تبدیل و در گسترش این نوع مقاومت تقض ایفاء می‌کنند.

نتیجه گیری

علی رغم پیشرفت‌های مراقبتی در مراکز پیوند کلیه هنوز هم عفونت دستگاه ادراری پس از پیوند مشکل جدی است که جای مطالعات بیشتری دارد. مطالعه حاضر نشان داد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی ناشی جدایه‌های مولد ESBL در بین بیماران پیوندی زیاد است. از بین ژن‌های مورد مطالعه، ژن TEM بیشترین فراوانی را نشان داد، این در حالی است که ژن OXA-2 فقط در بین سویه‌های کلبسیلا مشاهده شد. بروز چنین سویه‌هایی، شرایط پر خطر برای بیماران پیوندی و تیم درمانی را بوجود می‌آورد چرا که منجر به محدویت در انتخاب آنتی‌بیوتیک‌های مناسب برای درمان عفونت‌های مختلف از جمله عفونت‌های دستگاه ادراری می‌شود. بنابر این همکاری بین پزشکان و میکروب شناسان برای تشخیص به موقع و تعیین الگوی حساسیتی سویه‌های نوظهور مقاوم، ضروری بنظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه به دلیل ارائه مجوز برای انجام این پایان نامه در مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشکده پزشکی تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از کلیه کارکنان بخش پیوند و میکروب شناسی بیمارستان امام خمینی (ره) و دانشکده پزشکی ارومیه، جهت همکاری بی دریغشان سپاسگزاریم. لازم به توضیح است که این مقاله مستخرج از پایان نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی با گرایش میکروبی با کد شناسایی ۱۰۳۳۰۵۶۰۹۶۱۰۰۶ می‌باشد.

References:

1. Kumamoto Y, Tsukamoto T, Matsukawa M, Kunishima Y, Yamaguti O, Ishibashi K, et al. Comparative studies on activities of antimicrobial agents against causative organisms isolated from patients with urinary tract infections (2003). II. Background of patients. Jpn J Antibiot 2005; 58(6):544-56.
2. Lukac PJ, Bonomo RA, Logan LK. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in children: old foe, emerging threat. Clin Infect Dis 2015; 60(9):1389-97.
3. Tumbarello M, Spanu T, Di Bidino R, Marchetti M, Ruggeri M, Trecarichi EM, et al. Costs of bloodstream infections caused by Escherichia coli and influence of extended-spectrum-beta-lactamase production and inadequate initial antibiotic therapy. Antimicrob Agents Chemother 2010; 4(10):4085-91.
4. Knudsen JD, Andersen SE. A multidisciplinary intervention to reduce infections of ESBL- and AmpC-producing, gram-negative bacteria at a University Hospital. PLoS One 2014; 9(1):e86457.
5. Kashef Nejad M, Jazani NH, Sharifi Y. Urinary tract infections among kidney transplant patients due to extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria. Microb Pathog 2017; 107:276-9.
6. Purnell TS, Auguste P, Crews DC, Lamprea-Montealegre J, Olufade T, Greer R, et al. Comparison of life participation activities among adults treated by hemodialysis, peritoneal dialysis,

and kidney transplantation: a systematic review. Am J Kidney Dis 2013; 62(5):953-73.

7. Wayne A. Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document. 2014;34(1).
8. Sturenburg E, Kuhn A, Mack D, Laufs R. A novel extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-23 with a P167T substitution in the active-site omega loop associated with ceftazidime resistance. J Antimicrob Chemother 2004; 54(2):406-9.
9. Pai H, Lyu S, Lee JH, Kim J, Kwon Y, Kim JW, et al. Survey of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: prevalence of TEM-52 in Korea. J Clin Microbiol. 1999;37(6):1758-63.
10. Yan JJ, Tsai SH, Chuang CL, Wu JJ. OXA-type beta-lactamases among extended-spectrum cephalosporin-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates in a university hospital in southern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2006; 39(2):130-4.
11. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in Pseudomonas aeruginosa using PCR-restriction fragment length polymorphism. J Antimicrob Chemother 2002; 50(1):11-8.
12. de Souza RM, Olsburgh J. Urinary tract infection in the renal transplant patient. Nat Clin Pract Nephrol 2008; 4(5):252-64.
13. Kawecki D, Kwiatkowski A, Sawicka-Grzelak A, Durlik M, Paczek L, Chmura A, et al. Urinary tract infections in the early posttransplant period after kidney transplantation: etiologic agents and their susceptibility. Transplant Proc 2011; 43(8):2991-3.
14. Mojtahedzadeh M, Panahi Y, Fazeli MR, Najafi A, Pazouki M, Navehsi BM, et al. Intensive care unit-acquired urinary tract infections in patients admitted with sepsis: etiology, risk factors, and patterns of antimicrobial resistance. Int J Infect Dis 2008; 12(3):312-8.
15. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol 2015; 13(5):269-84.
16. Yacoub R, Akl NK. Urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in renal transplant recipients. J Glob Infect Dis 2011; 3(4):383-9.
17. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis 2008; 8(3):159-66.
18. Chander A, Shrestha CD. Prevalence of extended spectrum beta lactamase producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae urinary isolates in a tertiary care hospital in Kathmandu, Nepal. BMC Res Notes 2013; 6:487. DOI: 10.1186/1756-0500-6-487
19. Guzman-Blanco M, Labarca JA, Villegas MV, Gotuzzo E. Extended spectrum beta-lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. Braz J Infect Dis 2014; 18(4):421-33.
20. Mehrgan H, Rahbar M, Arab-Halvaii Z. High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. J Infect Dev Ctries 2010; 4(03):132-8.
21. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. Int J Med Microbiol 2013; 303(6-7):298-304.
22. Jena J, Sahoo RK, Debata NK, Subudhi E. Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M genes of extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli strains isolated from urinary tract infections in adults. 3 Biotech 2017; 7(4):244. DOI: 10.1007/s13205-017-0879-2
23. Bajpai T, Pandey M, Varma M, Bhatambare GS. Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-

bla(TEM), bla(SHV), bla(CTX-M) genes among clinical isolates of Klebsiella pneumoniae at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. Microb Drug Resist 2010; 16(1):49-53.

Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. Avicenna J Med 2017; 7(1):12-6.

24. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, et al. Distribution of

Original Article

THE FREQUENCY OF TEM, SHV, AND OXA GENES AMONG EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE PRODUCING KLEBSIELLA PNEUMONIAE AND ESCHERICHIA COLI OBTAINED FROM KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS

Sadegh Asghari Kalashani[1], Yaeghob Sharifi [2], Reza Talebi[3]*

Received: 05 May, 2020; Accepted: 14 August, 2020

Abstract

Background & Aims: Considering the importance of drug resistance among pathogenic bacteria and their treatment problems, this study aimed to determine the prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), including TEM, SHV, and OXA genes among the isolated Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae obtained from urine specimens of kidney transplant patients.

Materials & Methods: The bacterial isolates were collected and identified from urine specimens of kidney transplant patients at Imam Khomeini hospital of Urmia, Iran. All isolates were screened for ESBLs using both cefotaxime and ceftazidime, alone and in combination with clavulanate (Double Disc Diffusion Test; DDDT). The presence of TEM, SHV, OXA-10, and OXA-2 beta-lactamase genes were then investigated using PCR.

Results: A total of 96 isolates, including 39 (40.6%) K. pneumoniae and 57 (59.4%) E.coli were included in this study. Of these, 56 (58.3%) isolates were screened as ESBLs, including 17 K. pneumoniae and 39 E.coli using DDDT. The TEM (78.6%) and OXA-2 (7.1%) genes had the highest and lowest frequency among the isolates, respectively.

Conclusion: The study showed a relatively high frequency of ESBLs producing genes among E.coli and K. pneumoniae isolated from kidney transplant patients, indicating the necessity for early detection of these resistant infectious agents. It is also important to control the conditions in which these types of resistances are developed, especially the need for careful antibiotic administration.

Keywords: Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, transplant patients, antibiotic resistance, extended-spectrum beta-lactamases

Address: Cellular and molecular research center, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, West Azerbaijan, Iran
Tel: +989141484807
Email: ya.sharifi@gmail.com and Sharifi_y@umsu.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(7): 558 ISSN: 2717-008X

[1] M.Sc., Microbial Propensity Biotechnology, Urmia Branch Islamic Azad University, Urmia, Iran
[2] Cellular and molecular research center, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran. (Corresponding Author)
[3] Assistant Professor, Microbiology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran