بررسی فراوانی ژن هایrmtB و aac(6')Ib در سویه های مقاوم به جنتامایسین و آمیکاسین در باکتری کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه های بالینی، تبریز

زهرا نیکبخت[1] یونس انزابی[1*]

۱-گروه میکروبیولوژی، واحد تبریز، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
*نشانی برای مکاتبه: anzabi@iaut.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: *افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها نسبت به آمینوگلیکوزیدها به خصوص کلبسیلا پنومونیه در سال‌های اخیر باعث نگرانی دانشمندان و سازمان بهداشت جهانی شده است.هدف از مطالعه حاضر بررسی ژن‌های rmtB و aac(6')Ib در ایزوله های بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و آمیکاسین در باکتری کلبسیلا پنومونیه می باشد.*

روش کار: *مطالعه حاضر از نوع توصیفی-مقطعی بوده که ۵۵۰ نمونه بالینی از بخش های مختلف بیمارستان عالی نسب تبریز جمع آوری گردید. ابتداتمامی ایزوله ها با استفاده از روش‌های استاندارد ازمایشگاهی مجددا تایید هویت شدند. آزمون سنجش مقاومت آنتی بیوتیکی برای دو آنتی بیوتیک آمیکاسین و جنتامایسین با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بر اساس استانداردهای CLSI انجام شد.وهمچنین فراوانی ژن های rmtB و aac (6')Ib با استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره پلی مرازی مورد بررسی قرار گرفت .*

یافته ها: *در این مطالعه از۵۵۰ نمونه بالینی، ۱۰۰ سویه کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده که ۵۲ درصد را زنان و ۴۸ درصد را مردان آلوده کرده بودند.بیشترین میزان مقاومت به جنتامایسین با ۳۴ درصد و بیشترین حساسیت به آمیکاسین با ۷۸ درصد مشاهده شد. همچنین در نتایج مولکولی زنجیره پلی مرازی، ۲۷/۷۷ درصد از ایزوله ها دارای ژن rmtB و ۱۶/۶۶ درصد دارای ژن aac (6')Ib بودند.*

نتیجه گیری: *نتایج پژوهش حاضر نشان دهنده افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌باشد که خطری جدی برای سلامت انسان می باشد. بنابراین به منظور جلوگیری از شیوع هر چه بیشتر این مقاومت‌ها استفاده بهینه از آنتی بیوتیک‌ها و فرهنگ سازی در جامعه منطقی به نظر می‌رسد.*

کلید واژه ها: کلبسیلا پنومونیه، ژن‌های rmtB و aac(6')Ib ،آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی، مقاومت دارویی، تبریز

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه باکتری غیرمتحرک گرم منفی میله‌ای کپسول دار و متعلق به خانواده انتروباکتریاسه بوده و باعث عفونت‌های بیمارستانی و فرصت طلب مثل پنومونی، آبسه‌های کبدی، باکتریمی، عفونت بافت‌های نرم، عفونت مجاری ادراری، التهاب کره چشم و مننژیت می‌شود. لازم به ذکر است که سویه‌های هایپرویرولانت این باکتری توانایی عفونت‌زایی در افراد الکلی و دیابتی جامعه را نیز دارا هستند(۱). *کلبسیلا پنومونیه* به صورت طبیعی در محیط، مجاری گوارشی، دهان و نازوفارینکس انسان یافت شده و برخی نیز خواستگاه غذایی دارند. به علاوه این باکتری با داشتن انواع مختلف از فاکتورهای بیماری زایی مثل کپسول، لیپوپلی ساکارید، سیدروفورها، فیمبریه و پروتئین‌های غشای خارجی، قابلیت بیماری‌زایی بالایی از خود نشان می‌دهد. امروزه ظهور سویه‌های دارای قدرت بیماری زای شدید [1]و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های این باکتری نگرانی شدیدی ایجاد کرده است(۱و۲).

[1] hyper virulent

عفونت‌های ثانویه و فرصت طلب در پاندمی‌های اخیر نقش پررنگی داشتند. در مطالعات مختلف ابتلا به عفونت‌های ثانویه باکتریایی در پاندمی کووید-۱۹ گزارش شده است. البته با اینکه میزان شیوع این نوع از عفونت‌ها در پاندمی کووید-۱۹ کمتر از پاندمی‌های آنفلونزایی سال‌های قبل بود ولی این مسئله از اهمیت غربالگری این نوع از باکتری‌ها نخواهد کاست(۳). در یکی از مطالعات ۳۲ درصد از بیماران (فراوان‌ترین باکتری در عفونت ثانویه) مبتلا به کووید-۱۹ که عفونت ثانویه داشتند دچار عفونت ثانویه با *کلبسیلا پنومونیه* شده بودند این آمار در دیگر مطالعات به ۳۲/۴ درصد نیز می‌رسد. همچنین لی و همکاران *کلبسیلا پنومونیه* را جزو ۳ باکتری اصلی ایجاد کننده عفونت ثانویه ریوی در بیماران مبتلا کووید-۱۹ گزارش داده‌اند(۴). حتی در بخش ICU نیز ابتلا به عفونت ثانویه با این باکتری که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را نیز نشان می‌دادند گزارش شده است(۴-۶).

آمینوگلیکوزیدها که توسط اکتینومایست‌های موجود در خاک تولید شده و با متوقف کردن سنتز پروتئین‌ها در باکتری‌ها خاصیت آنتی بیوتیکی دارند از دیرباز به عنوان ماده آنتی باکتریال اولیه برای درمان عفونت‌های حاصل از باسیل‌های هوازی گرم منفی، انواع عفونت‌هایی که در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) ایجاد می‌شوند، بیمارانی کلیوی تحت دیالیز، سپسیس نوزادان، اندوکاردیت، سیستیک فیبروزیس و استئومیلیت استفاده می‌شوند اما امروزه به دلیل ظهور مقاومت در بر علیه آمینوگلیکوزیدها در عوامل ایجاد کننده این عفونت‌ها، استفاده از این آنتی‌بیوتیک با محدودیت مواجه شده است(۷-۹).

با توجه به تعداد گزارشات مبنی بر شیوع عفونت‌های ثانویه باکتریایی در پاندمی اخیر که تا ۴۵ درصد نیز می‌رسد و باکتری *کلبسیلا پنومونیه* در این فرآیند نقش بسزایی داشته و مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز از خود نشان می دهد(۱۰). به علاوه این باکتری در بیماران دیابتی، سرطانی و بیمارانی که پیوند عضو انجام داده‌اند، عفونت زایی می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد نرخ مرگ و میر این باکتری در بیماران ۱۸ الی ۴۹ درصد می‌باشد. در مطالعه‌ای دیگر نرخ مرگ و میر در عفونت خونی ناشی از این باکتری در کشور کانادا بین سال‌های ۲۰۰۰ - ۲۰۰۷ میلادی ۱۹ درصد گزارش شد که در مطالعات مشابه در بازه سال‌های ۲۰۰۰ – ۲۰۰۶ برای باکتری *اشریشیا کلی* این نرخ ۱۱ درصد گزارش شده بود. هم چنین مطالعات نشان می‌دهند که عفونت‌های تهاجمی حاصل از *کلبسیلا پنومونیه* در بازه ۶ ساله بین سال‌های ۲۰۰۶ الی ۲۰۱۲ افزایش داشته است(۱۱).

آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلکوزیدی مثل استیل ترانسفرازهای آمینوگلیکوزیدی (که به وسیله ژن‌های ***aac*** کد می‌شوند) و متیل‌ترانسفرازهای RNA ریبوزومی 16S (که به وسیله ژن‌هایی مثل ***rmtB*** کد می‌شوند) عمده دلایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی *کلبسیلا پنومونیه* به آمینوگلیکوزیدها هستند(۸). مطالعات نشان می‌دهند در حضور آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل جنتامایسین و توبرامایسین تعداد پلاسمیدها و همچنین ژن‌های کدکننده ***aac*** به ازای هر پلاسمید افزایش پیدا می‌کند. البته این فنوتیپ ناپایدار است و بعد از ۴۰ نسل پس از عدم حضور آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده تعداد کپی‌های ***aac*** و پلاسمیدها کاهش پیدا می‌کند. هم‌چنین نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهد مقاومت به آمیکاسین می‌تواند با افزایش بیان ژن ***aac*** و جهش در ژن‌هایی که کدکننده پروتئین‌هایی هستند که در چندین فرایند فیزیولوژیکی مانند جذب کربوهیدرات و تفکیک کروموزوم‌ها دخالت دارند، مرتبط باشند(۱۲).

ژن ***rmtB 16s-RMTase*** برای اولین بار در سال ۲۰۰۴ در *سراشیا مارسنس* جداشده در فرانسه شناسایی گشت. ***rmtb*** عمدتا در باکتری های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* سراسر جهان یافت می شود و باعث ایجاد مقاومت در برابرآمینوگلیکوزیدها می گردد(۱۳). این ژن بر روی ترانسپوزون‌های قابل انتقال باتوالی‌های درج ISCR وIS26 قرار دارند که باعث میشود ***rmtB*** در بین سویه های مختلف انتقال پیدا کند(۱۴).

آمینوگلیکوزیدهای N– استیل ترانسفراز (AAC) متعلق به خانواده‌ی بزرگ از آنزیم‌های N– استیل ترانسفراز مربوط به GCN5[۲] هستند که با نام GNAT[۳] شناخته می‌شوند. این گروه بزرگ از آنزیم‌ها دارای خاصیت آستیلاسیون یک آمین اولیه در مولکول‌های گیرنده متعدد با استفاده از استیل کو آنزیم آ به عنوان گروه دهنده می‌باشند. آنزیم‌های aac(6') پر شمارترین گروه AAC هستند که بیش از ۴۰ مورد از آن‌ها تاکنون توصیف شده است و هم در باکتری‌های گرم مثبت و هم در باکتری‌های گرم منفی یافت می‌شوند(۱۵).مقایسه مطالعات انجام شده نشان می‌دهد در طی سالیان متمادی با

[۲] General control non-depressible 5
[۳] N-acetyltransferase

افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و آمیکاسین و هم چنین افزایش ژن‌های منجر به مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها مثل *aac(6')Ib* و *rmtB* در ایران مواجه بوده‌ایم. البته ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها به این دو ژن محدود نمی‌شود و سایر ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها مثل *aph(3')-Ia*، *armA*، *aac(3)-II*، *rmtA* و ژن‌های متعدد دیگری نیز هستند که مقایسه مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف نشان می‌دهد که فراوانی این ژن‌ها نیز طی سالیان اخیر افزایش یافته است(۱۳-۱۵). با توجه به مطالب مهم ذکر شده، به نظر می‌رسد که بررسی مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و غربالگری باکتری‌های مقاوم بر اساس آن به منظور کمک به روند درمان بیماران ضروری است. لذا بدین منظور در مطالعه حاضر فراوانی ژن های *rmtB, aac(6')Ib* در سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و آمیکاسین باکتری *کلبسیلا پنومونیه* جداشده ازنمونه های بالینی بیمارستانی به روش واکنش زنجیره پلی مرازی بررسی شدند.

مواد و روش کار

مطالعه حاضر از نوع مقطعی – توصیفی بوده، در طی مدت پنج ماه از فروردین تا مرداد ۱۴۰۱، از ۵۵۰ نمونه بالینی تعداد ۱۰۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* مربوط به نمونه‌های خون و ترشحات، ادرار و خلط از بیماران بستری در بیمارستان عالی نسب شهرستان تبریز تهیه شد.

کشت نمونه ها

ایزوله های مذکور با استفاده از محیط های کشت آگار خوندار[۴] و ائوزین متیلن بلو آگار[۵](EMB) و نیز انجام تست‌های بیوشیمیایی به کمک محیط‌های افتراقی مانند سیمون سیترات آگار[۶]، سولفید- ایندول-موتیلیتی[۷]، متیل رد[8] ،وگس پروسکائر[۹]، اوره و محیط کشت تریپل شوگر آیرون [۱۰] که همگی ساخت شرکت Condalab اسپانیا بودند، مجدداً تأیید هویت شدند. بر این اساس جدایه‌هایی با پاسخ تست سیترات مثبت، تخمیر قندهای گلوکز و لاکتوز در محیط کشت تریپل شوگر آیرون ، وگس پروسکائر، مثبت، ایندول و حرکت منفی و اوره مثبت، به عنوان جدایهء *کلبسیلا پنومونیه* در نظر گرفته می‌شد(۱۶). در ادامه برای استفاده از ایزوله های مذکور در مراحل بعدی بررسی، جدایه‌ها در محیط تریپتیکاز سوی آگار Condalab[11](اسپانیا) حاوی ۲۰ درصد گلیسرول(مرک- آلمان) کشت داده شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند(۱۷).

تست آنتی بیوگرام

برای انجام این تست از روش دیسک دیفیوژن بر طبق استانداردهای CLSI سال ۲۰۲۱ (۱۸)، از روش انتشار دیسک (Kirby-Bauer) استفاده شد. بدین منظور ابتدا برای تهیه سوسپانسیون میکروبی لازم، از کشت خالص هر جدایه استفاده گردید . از کلنی باکتری مورد نظر در لوله حاوی محیط کشت TSB وارد شده و سپس به مدت ۲ الی ۴ ساعت در دمای۳۷ درجه انکوبه شده تا کدورتی معادل با کدورت لوله نیم استاندارد مک فارلند حاصل گردید. سپس سواپ استریل به سوسپانسیون میکروبی فوق آغشته شده و به روش کشت یکنواخت (spread method culture) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس دیسک‌های آنتی بیوتیکی جنتامایسین(GN) و آمیکاسین (AN) (Rosco, دانمارک) بر روی محیط کشت قرار داده شد و در ادامه پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. درنهایت با استفاده از کولیس دقیق، قطر منطقه عدم رشد هر جدایه، بطور مجزا اندازه گرفته شد و با مراجعه به جدول CLSI، میزان حساسیت یا مقاومت آن نسبت به آنتی بیوتیک‌های مذکور برمبنای حساس، نیمه حساس و مقاوم ثبت شدند(۱۹).

استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره پلی مرازی

در مطالعه حاضر از کیت مخصوص (ویراژن آکام- ایران) برای استخراج DNA از ژنوم جدایه‌ها استفاده شد. برای بررسی کیفی DNA استخراج شده، ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده با ولتاژ ۶۵ الکتروفورز و باندهای ایجاد شده در ژل (۱ درصد آگارز) بررسی گردید. همچنین مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های *aac(6')Ib* و *rmtB* هم در جدول ۱ ارائه شده است. اجزای واکنش زنجیره پلی مراز مورد نظر هم در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس 2x (سیناکلون ایران)، ۱میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (با حجم نهایی ۱۰ پیکومول)، ۳ میکرولیتر از DNA الگو و ۷/۵ میکرولیتر آب دیونیزه بود.

---

[۴] Blood Agar
[۵] Eosin Methylene-Blue agar
[۶] Simmons Citrate agar
[۷] Sulfide Indole Motility Medium
[8] Methyl red
[۹] Voges-Proskauer
[۱۰] Triple sugar iron agar
[11] Trypticase Soy Agar

پروفایل حرارتی به کار رفته برای تکثیر ژن *rmtB* از قرار دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸۰ ثانیه، دناتوراسیون ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای آنلینگ، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه که مراحل دناتوراسیون ثانویه تا طویل شدن اولیه ۳۵ بار تکرار شد و طویل شدن ثانویه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه طول کشید. پروفایل حرارتی برای تکثیر ژن *aac(6')Ib* هم از قرار دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸۰ ثانیه، دناتوراسیون ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، آنلینگ در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه که مراحل دناتوراسیون ثانویه تا طویل شدن اولیه ۳۵ بار تکرار شد و طویل شدن ثانویه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه برای دستگاه تعریف شد. در نهایت هم برای آشکارسازی محصولات واکنش زنجیره پلی مرازی از عمل الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد (مرک-آلمان) و لدر bp ۱۰۰ (سیناکلون ایران) و ولتاژ ۱۰۰ و شدت جریان ۶۵ میلی آمپر به مدت یک ساعت استفاده شد. جهت کنترل کیفی واکنش زنجیره پلی مرازی از سویه *کلبسیلا پنومونیه* (ATCC 700603) خریداری شده از کلکسیون میکروبی دانشگاه علوم پزشکی تبریز استفاده گردید.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

نام ژن هدف	توالی پرایمرها (3′→5′)	اندازه محصول نهایی PCR (bp)	منبع
rmtB-F *rmtB-R*	GCTTTCTGCGGGCGATGTAA ATGCAATGCCGCGCTCGTAT	۱۷۳	(۲۰)
aac(6')Ib-F *aac(6')Ib-R*	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	۴۸۲	(۲۱)

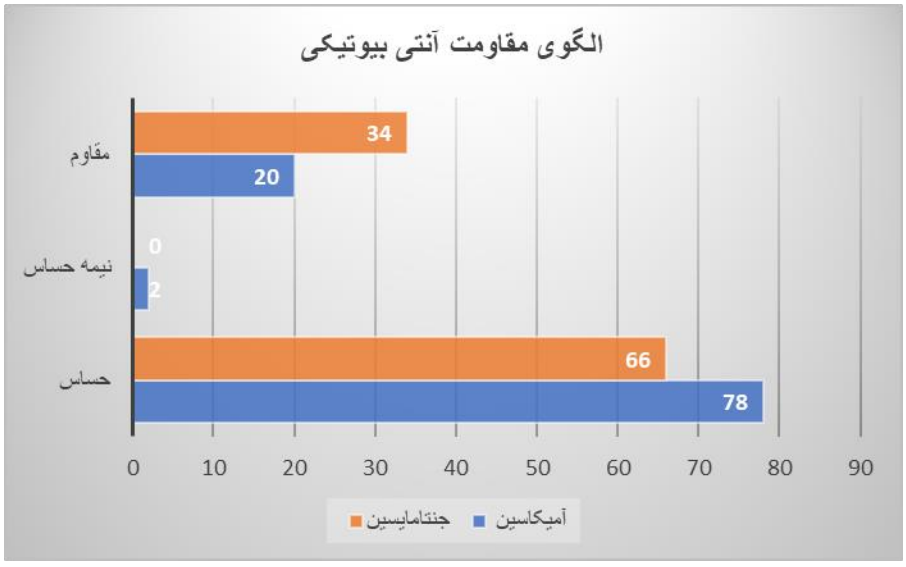
یافته‌ها

از این ۱۰۰ ایزوله ۵۲ جدایه (۵۲ درصد) از افراد مؤنث و ۴۸ جدایه (۴۸ درصد) از افراد مذکر جداسازی شد. سایر اطلاعات مربوط به نوع نمونه و فراوانی آن‌ها هم در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲. فراوانی جدایه‌های گرم منفی و *کلبسیلا پنومونیه* بر اساس نوع نمونه بالینی

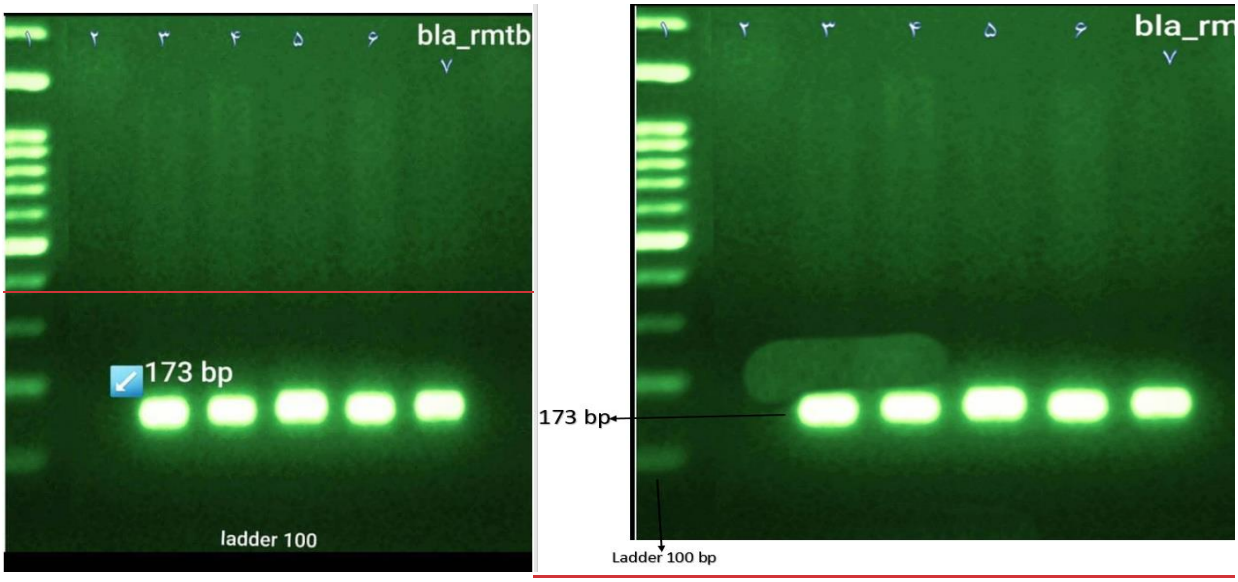
نوع نمونه بالینی	تعداد باکتری‌های گرم منفی جداسازی شده	تعداد (درصد) *کلبسیلا پنومونیه* جداسازی شده
ادرار	۲۳۲	۷۶ (۷۶)
خون	۲۱۰	۱۶ (۱۶)
خلط	۴۰	۲ (۲)
پیلور	۲۲	۲ (۲)
زخم و تراشه	۳۶	۴ (۴)
مدفوع	۱۰	۰
جمع کل	۵۵۰	۱۰۰

از طرف دیگر الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های *کلبسیلا پنومونیه* مشخص گردیده است. بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، بیشترین مقاومت در جدایه‌های مورد بررسی در رابطه با آنتی بیوتیک جنتامایسین با فراوانی ۳۴ درصد و آمیکاسین با فراوانی ۲۰ درصد مشاهده شد. همچنین ۱۸درصد از کل سویه‌ها، به هر دو آنتی بیوتیک مذکور، همزمان مقاومت نشان دادند. میزان فراوانی حساسیت دارویی در آمیکاسین ۷۸ درصد و در جنتامایسین ۶۶ درصد گزارش شد(نمودار ۱).

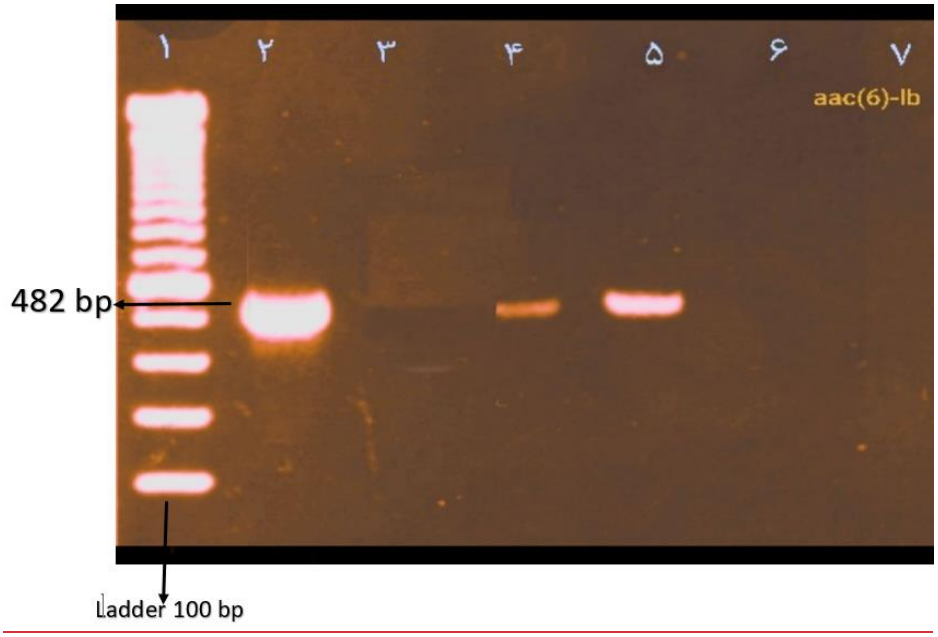


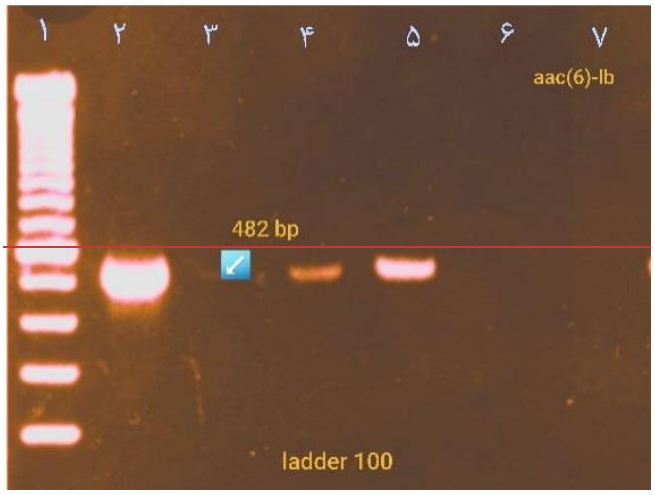
نمودار ۱ الگوی مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی کل ایزوله های *کلبسیلا پنومونیه*

همچنین طبق نتایج بدست آمده از الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره پلی مراز، مشخص گردید که ۱۶/۶۶ درصد از کل ایزوله هایی که در تست آنتی‌بیوگرام به عنوان مقاوم ثبت شده بودند، دارای ژن *aac(6')Ib* و ۲۷/۷۷ درصد از کل ایزوله های مذکور، دارای ژن *rmtB* بودند.شکل های ۱ و ۲ محصول واکنش زنجیره پلی مراز ژن های *RmtB* و *aac(6')Ib* را نشان می دهد.



شکل ۱ نتایج الکتروفورز برای بررسی حضور ژن *rmtB* در جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* را نشان می دهد.چاهک ۱- لدر ۱۰۰ bp ، چاهک ۲-کنترل منفی آب مقطر، چاهک ۳- کنترل مثبت *کلبسیلا پنومونیه* (ATCC 700603)، چاهک های ٤،٥،٦ و ۷ جدایه های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* دارای ژن *rmtB*





شکل ۲ نتایج الکتروفورز برای بررسی حضور ژن *aac(6')Ib* در جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* را نشان می دهد. چاهک ۱- لدر bp ۱۰۰ ، چاهک ۲- کنترل مثبت *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603)، چاهک ۳- کنترل منفی آب مقطر، چاهک های ۵و٤ نمونه های دارای ژن مورد نظر، پاهک های ۷و٦ جدایه بالینی *کلبسیلا پنومونیه* فاقد ژن مورد نظر

بحث

در مطالعه حاضر از مجموع ۱۰۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه*، ۲۰ درصد آن‌ها مقاوم به آنتی بیوتیک آمیکاسین و نیز ۳۴ درصد هم مقاوم به آنتی بیوتیک جنتامایسین بودند که در این میان، ۱۸ درصد ازجدایه ها به هردو آنتی بیوتیک مقاوم بودند.از کل جدایه های مقاوم به آنتی بیوتیک آمیکاسین وجنتامایسین، ۲۷/۷۷ درصد حامل ژن *rmtB* و ۱۶/۶۶ درصد هم حامل ژن *aac(6')Ib* بودند.

در مطالعه انجام شده توسط وی و همکاران در سال ۲۰۱۴، ۵۴ سویه مختلف *کلبسیلا پنومونیه* از نمونه‌های بالینی جداسازی شد که از این بین ۱۹ جدایه گزارش شد. از بین ۱۹ جدایه همه سویه‌ها مقاوم به جنتامایسین و آمیکاسین گزارش شد. هم‌چنین ۴ جدایه حاوی ژن *aac(6')Ib* و ۳ جدایه حاوی ژن *rmtB* بود. نتایج این مطالعه نشان داد که با توجه به مقاومت بالای جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* به جنتامایسین و آمیکاسین، از این دو آنتی بیوتیک نمی‌توان برای مقابله با جدایه‌ها استفاده نمود. به دلیل تفکیک جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* از کل جدایه‌ها و صرف انجام آزمایشات بر روی آن‌ها در مطالعه مذکور نمی‌توان میزان مقاومت به این دو آنتی‌بیوتیک‌ها را با مطالعه انجام شده حاضر مقایسه کرد اما مقایسه داده‌های حاصل از تست مولکولی واکنش زنجیره پلی مراز انجام شده در مطالعه حاضر و مطالعه مذکور حاکی از افزایش ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در ۸ سال اخیر بوده است(۲۲). در صورتی که نتایج حاصل از مطالعه انجام شده بر روی جدایه‌های حاصل از نمونه‌های غذایی که توسط گوئو و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام شده است نشان می‌دهد هیچ ایزوله ای به آمیکاسین مقاومت نداشته و مقاومت به جنتامایسین نیز ۱۹/۲ درصد در این مطالعه گزارش شده است. با توجه به این نتایج افزایش مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در جدایه‌های بالینی به دلیل افزایش استفاده نادرست و بیش از حد کاملاً مشهود است چراکه در جدایه‌های حاصل از مواد غذایی مقاومت بالایی دیده نمی‌شود، با این وجود ژن *aac(6')Ib* در این جدایه‌های شناسایی شده بود(۲۳). علاوه بر این، ژن *aac(6')Ib* در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* هایپرویرولانت جدا شده از نمونه‌های بالینی در بیمارستانی در چین نیز گزارش شده است؛ لیائو و همکاران ۳۹ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* هایپرویرولانت را از لحاظ داشتن ژن *aac(6')Ib* مورد بررسی قرارداده و فراوانی این ژن را ۷۹/۵ درصد گزارش دادند. نکته هائز اهمیت این است که فراوانی ژن *aac(6')Ib* در مطالعه لیائو و همکاران بسیار بیشتر از فراوانی این ژن در مطالعه حاضر می باشد، این دو مطالعه به فاصله ۵ سال از همدیگر در کشور چین انجام شده است لذا به نظر می‌رسد در این بازه زمانی ۵ ساله فراوانی ژن *aac(6')Ib* بسیار بالا رفته است، لیکن ذکر این نکته ضروری است که جدایه‌های مورد مطالعه توسط لیائو و همکاران هایپرویرولانت بودند پس احتمالاً جدایه‌های هایپرویرولانت بیشتر از سایر جدایه‌ها حامل ژن مذکور می‌باشند(۲۴).

از طرف دیگر در مطالعه‌ای که توسط نصیری و همکاران در سال ۲۰۱۹ در قزوین و تهران صورت گرفت از مجموع ۱۷۷ نمونه *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده ۴۹/۲ درصد از آن‌ها نسبت به جنتامایسین و ۳۹ درصد از آن‌ها نسبت به آمیکاسین مقاوم گزارش شده‌اند. همچنین ژن *aac(6')Ib* در ۹۱/۵ درصد از جدایه‌ها شناسایی و غالب‌ترین ژن مورد مطالعه گزارش شد(۲۵). یافته‌های حاصله از مطالعه اخیر زنگ خطری برای حضور ژن‌های مقاومتی چون *aac(6')Ib* و در نتیجه مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به آمینوگلیکوزیدها به شمار می‌رود. با توجه به یافته‌های این مطالعه در مقایسه با مطالعه‌ای هم که توسط پاکزاد و همکاران در سال۲۰۱۹ در ایلام انجام شده که در این مطالعه از بین ۵۲ ایزوله مقاوم یا نیمه مقاوم در برابر آمینوگلیکوزیدها، ژن *aac(6')Ib* در ۵۵/۸ درصد و ژن *rmtB* در ۱/۹ درصد از آن‌ها شناسایی شد به نظر می‌رسد وضعیت پایتخت ایران نسبت به دیگر شهرها از لحاظ مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و ژن‌های مقاومت مربوطه بسیار بدتر می باشد(۲۶).

با توجه به مطالعات مذکور و همچنین در مطالعه‌ای که توسط احمدیان در سال ۲۰۲۰ در تهران صورت گرفته که در این مطالعه از مجموع ۱۰۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه*، مقاومت به آمیکاسین و جنتامایسین به ترتیب ۷۰ و ۵۲ درصد بوده‌است. علاوه بر این، ۴۰درصد از جدایه‌ها همزمان به هر دو آمینوگلیکوزید مقاوم بودند. علاوه بر این ژن *rmtB* در ۷/۳ درصد از جدایه‌های فوق شناسایی شد(۲۷). مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و فراوانی ژن‌ها در این مطالعه بیش از سایر مطالعات انجام شده که می‌تواند به دلیل تفاوت مکانی و زمانی مطالعات باشد هم‌چنین به نظر می‌رسد کشور ایران در کنترل مقاومت‌های آنتی بیوتیکی ناموفق عمل کرده است چراکه مقایسه مطالعات مذکور نشان می‌دهد هر ساله میزان مقاومت‌ها افزایش یافته است، اما در مطالعه‌ای هم که توسط کاشفیه و همکاران در سال۲۰۲۰ در استان آذربایجان

شرقی انجام گرفته از مجموعه ۱۰۰ایزوله *کلبسیلا پنومونیه*، در ۳۲درصد از آن‌ها ژن *aac(6')Ib* شناسایی شد(۲۸).

مقایسه این مطالعه با یافته‌های تحقیق حاضر نشان از کاهش فراوانی ژن مذکور در استان آذربایجان‌شرقی در طی دو سال اخیر دارد که می‌تواند نشان از کنترل موفق شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در استان آذربایجان شرقی باشد؛ مطالعه انجام شده در کشور اسپانیا توسط مارتینز و همکاران در سال ۲۰۱۸ که برروی جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه*‌های بدست آمده در سال ۲۰۰۰ و ۲۰۰۶ انجام شده، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و آمیکاسین در جدایه‌های سال ۲۰۰۰ به ترتیب ۵۲/۹ درصد و ۱/۴ درصد و در جدایه‌های سال ۲۰۰۶ به ترتیب ۵۶/۵ درصد و ۱/۴ درصد گزارش شد. فارغ از پایین بودن فراوانی مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در کشور اسپانیا در آن بازه زمانی به نظر می‌رسد که کشور اسپانیا در کنترل شیوع مقاومت‌های آنتی بیوتیکی (حداقل آمینوگلیکوزیدها) موفق عمل کرده است. مطالعه مذکور نشان می‌دهد با اتخاذ راهکارهای صحیح در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و یا سایر راه حل‌ها برای کنترل شیوع می‌توان از بروز یک فاجعه جهانی تا حدود زیادی جلوگیری کرد(۲۹).

نتیجه‌گیری

نتیجه مطالعه حاضر و بررسی مطالعات مشابه انجام شده نشان دهنده رشد رو به افزون مقاومت آنتی بیوتیکی در نقاط مختلف جهان می باشد و این امر منجر به ایجاد بسیاری از مشکلات در بیمارستان‌ها و درمان عفونت های ناشی ازسویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها میگردد. به همین علت کنترل مصرف آنتی بیوتیک ها حائز اهمیت فراوان می‌باشد لذا مصرف بی رویه و خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها و تجویزهای نادرست از سوی پزشکان، می‌تواند منجر به بروز وگسترش مقاومت در بین سویه‌های پاتوژن گردد. به همین علت تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های جداشده از انواع عفونت ها، می‌تواند بسیار موثر واقع شود. بالا بودن میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در بین ارگانیسم‌های ایجاد کننده عفونت‌های بالینی، پیشنهاد کننده بررسی مکانیسم‌های موثر در ایجاد مقاومت و بررسی فعالیت ضد میکروبی انواع آنتی بیوتیک‌ها در شرایط آزمایشگاهی و در نتیجه کمک به روند درمان در برابر انواع عفونت ها است، به گونه‌ای که کنترل مصرف آنتی بیوتیک‌ها در بیمارستان‌ها نقش بسیار مهمی در جلوگیری از ظهور سویه‌های مقاوم دارد و با توجه به اینکه مطالعه حاضر نشان دهنده شایع بودن *کلبسیلا پنومونیه* در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی است، لذا معیار های کنترل عفونت‌های بیمارستانی در مطالعه ما احساس می‌گردد. از سوی دیگر بررسی نتایج مطالعه حاضر و مطالعات مشابه نشان دهنده حضور درصد بالایی از ژن های *rmtB , aac(6')Ib* در ژنوم سویه‌های دارای مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد.

ملاحضات اخلاقی

نویسندگان تمام نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی زهرا نیکبخت به شماره ۱۰۲۲۹۰۰۴۰۱۶۶۴۳۰۱۴۰۰۱۶۲۵۸۰۷۳۵ می‌باشد ازآقای جاوید تقی نژاد بخاطر کمک های بی شائبه ایشان قدردانی می شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تضاد منافعی وجود ندارند.

REFERENCE

1. Hu Y, Anes J, Devineau S, Fanning S. *Klebsiella pneumoniae*: Prevalence, Reservoirs, Antimicrobial Resistance, Pathogenicity, and Infection: A Hitherto Unrecognized Zoonotic Bacterium. Foodborne Pathog Dis. 2021; 18(2):63–84.
2. Roshdi Maleki M, Taghinejad J. Prevalence of Extended-spectrum Beta-lactamases (ESBL) Types blaTEM and blaSHV in *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Clinical Samples by PCR in Miandoab, West Azerbaijan. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2021; 15(4):458-64.
3. Fattorini L, Creti R, Palma C, Pantosti A. Bacterial coinfections in COVID-19: an underestimated adversary. Ann Ist Super Sanita. 2020; 56(3):359–64.
4. Montrucchio G, Corcione S, Sales G, Curtoni A, and De Rosa FG, Brazzi L. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in ICU-admitted COVID-19 patients: Keep an eye on the ball. J Glob Antimicrob Resist. 2020; 23:398–400.
5. Arcari G, Raponi G, Sacco F, Bibbolino G, Di Lella FM, Alessandri F, et al. *Klebsiella pneumoniae* infections in COVID-19 patients: a 2-month retrospective analysis in an Italian hospital. Vol. 57, International journal of antimicrobial agents. 2021.
6. Mędrzycka-Dabrowska W, Lange S, Zorena K, Dabrowski S, Ozga D, Tomaszek L. Carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* infections in icu covid-19 patients—a scoping review. J Clin Med. 2021; 10(10):1–13.
7. Pagkalis S, Mantadakis E, Mavros MN, Ammari C, Falagas ME. Pharmacological considerations for the proper clinical use of aminoglycosides. Drugs. 2011; 71(17):2277–94.
8. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrobial Anticancer Chemother2010; 13(6):151–71.
9. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *klebsiella pneumoniae*. Int J Environ Res Public Health. 2020; 17(17):1–17.
10. O'Toole RF. The interface between COVID-19 and bacterial healthcare-associated infections. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2021; 27(12):1772–6.
11. Vading M, Nauclér P, Kalin M, Giske CG. Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality. PLoS One. . 2018; 13(4):1–13.
12. Stojowska-swędrzyńska K, Łupkowska A, Kuczyńska-wiśnik D, Laskowska E. Antibiotic heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*. Int J Mol Sci. 2022.
13. Yang W, Hu F. Research Updates of Plasmid-Mediated Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methyltransferase. Antibiotics. 2022; 11(7):906.
14. Yuan L, Liu JH, Du XD, Zong ZY, Chen M, Hu GZ, Pan YS. Comparative genomics of rmtB-carrying IncI1 ST136 plasmids in avian *Escherichia coli* isolates from chickens in China. International journal of antimicrobial agents. 2018; 51(4):659-62.

15. Yan JJ, Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Chuang CL, Wu HM, Lu YJ, Li JD. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates from two Taiwanese hospitals. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2004; 54(6):1007-12.
16. Ahmed OB, Asghar AH, Bahwerth FS. Increasing frequency of Aminoglycoside-Resistant *Klebsiella pneumoniae* during the era of pandemic COVID-19. Mater today Proc. 2021.
17. Hu X, Xu B, Yang Y, Liu D, Yang M, Wang J, et al. A high throughput multiplex PCR assay for simultaneous detection of seven aminoglycoside-resistance genes in *Enterobacteriaceae*. BMC Microbiol. 2013; 13(1).
18. Zhou Y, Yu H, Guo Q, Xu X, Ye X, Wu S, et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010; 29(11):1349–53.
19. Scott B&. General Principles in Clinical. Diagnostic Microbiol. 2014; 153–66.
20. Abdelrahman, F.; Rezk, N.;Fayez, M.S.; Abdelmoteleb, M.;Atteya, R.; Elhadidy, M.; El Shibiny, A. Isolation, Characterization, and Genomic Analysis of Three Novel *E.coli* Bacteriophages That Effectively Infect *E. coli* O18. Microorganisms 2022, 10, 589.
21. Humphries R, Bobenchik AM, Hindler JA, Schuetz AN. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100. Journal of clinical microbiology. 2021; 59(12):e00213-21.
22. Bado I, Papa-Ezdra R, Delgado-Blas JF, Gaudio M, Gutiérrez C, Cordeiro NF, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *acinetobacter baumannii* in the intensive care unit of Uruguay's University hospital identifies the first rmtC gene in the species. Microb Drug Resist. . 2018; 24(7):1012–9.
23. Eftekhar F, Seyedpour SM. Prevalence of qnr and *aac(6')-Ib-cr* Genes in Clinical Isolates of *Klebsiella Pneumoniae* from Imam Hussein Hospital in Tehran. Iran J Med Sci. 2015; 40(6):515-21.
24. Wei DD, Wan LG, Yu Y, Xu QF, Deng Q, Cao XW, et al. Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase, Carbapenemase, and Plasmid Quinolone Determinants in *Klebsiella pneumoniae* Isolates Carrying Distinct Types of 16S rRNA Methylase Genes, and Their Association with Mobile Genetic Elements. Microb Drug Resist. 2015; 21(2):186–93.
25. Guo Y, Zhou H, Qin L, Pang Z, Qin T, Ren H, et al. Frequency, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in food samples. PLoS One. 2016; 11(4):1–13.
26. Liao W, De Wang L, Li D, Du FL, Long D, Liu Y, et al. High prevalence of 16s rrna methylase genes among carbapenem-resistant hypervirulent *klebsiella pneumoniae* isolates in a chinese tertiary hospital. Microb Drug Resist. 2021; 27(1):44–52.
27. Nasiri G, Peymani A, Farivar TN, Hosseini P. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* collected from Qazvin and Tehran provinces, Iran. Infect Genet Evol [Internet]. 2018; 64:219–24.
28. Pakzad I, Samadi N, Imanieini M, Taherikalani M, Rahbar M, Heidari R, et al. Assessment of 16srRNA methylase genes among non-ESBL and esbl-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. 2019; 14(6).
29. Ahmadian Alashti F, Ghane M. High Frequency of 16S Ribosomal RNA Methyltransferases among *Klebsiella pneumoniae* Isolates: First Report of *rmtA*, *rmtD*, *rmtE* and *rmtF* Resistance Genes in Iran. Infect Epidemiol Microbiol. 2020; 6(3):153–63.

30. Kashefieh M, Hosainzadegan H, Baghbanijavid S, Ghotaslou R. The Molecular Epidemiology of Resistance to Antibiotics among *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Azerbaijan, Iran. J Trop Med. 2021.
31. Fernández-Martínez M, Ruiz Del Castillo B, Lecea-Cuello MJ, Rodríguez-Baño J, Pascual Á, Martínez-Martínez L. Prevalence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended Spectrum β-Lactamases Collected in Two Multicenter Studies in Spain. Microb Drug Resist. 2018; 24(4):367–76.