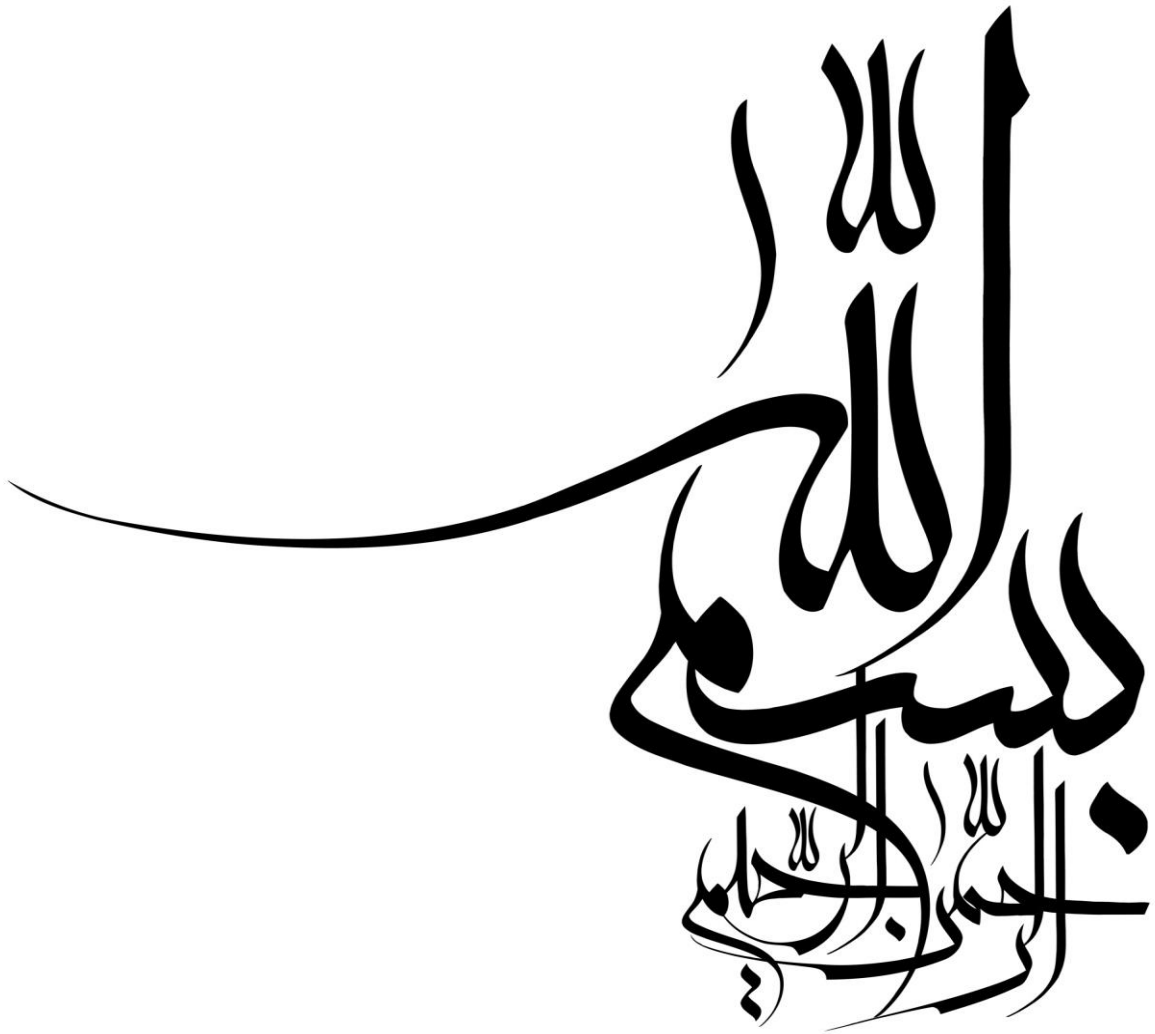

بسم الله الرحمن الرحيم

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایلام دانشکده پزشکی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروب شناسی پزشکی

عنوان پایان نامه:

بررسی شیوع عفونت بیمارستانی در بخش های ICU بیمارستان امام خمینی (ره) شهر ایلام

استاد راهنما:

دکتر نورخدا صادقی فرد

اساتید مشاور:

دکتر حسین کاظمیان و دکتر علی نظری

نگارش:

مرضیه هاشمیان

سال ۱۴۰۰

با درود فراوان

سپاس و ستایش خدای سبحان را که توانایی و بضاعت به انجام رساندن این پژوهش را به ما عنایت فرمود.

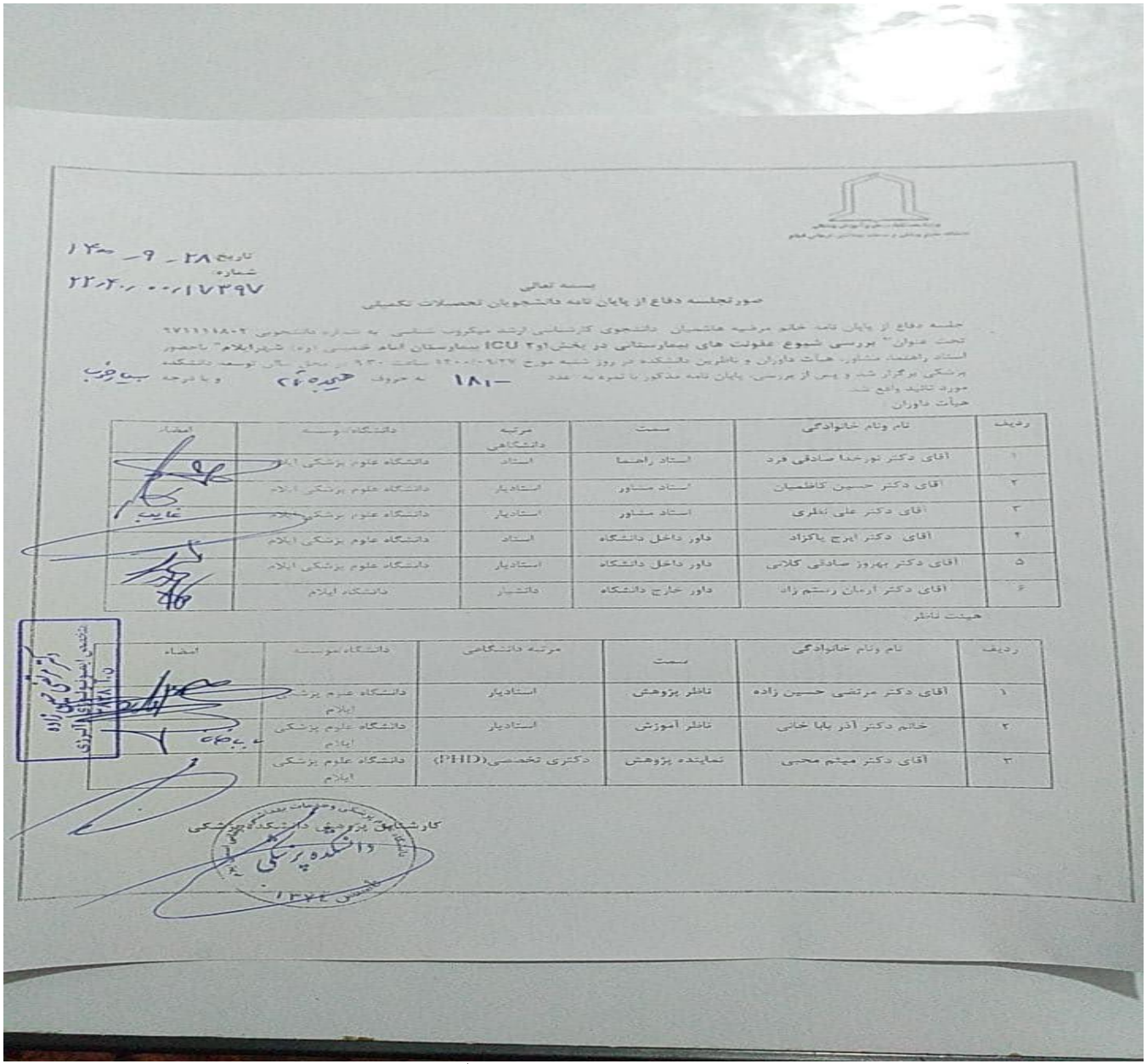
سپاس بیکران بر همدلی و همراهی مادر دلسوز و مهربانم که سجده ایثارش گل محبت را در وجودم پروراند و دامان گهربارش لحضه های مهربانی را به من آموخت و پدر بی مانندم که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی ایستادگی را کنم و همواره پشتیبان و یاری گر من بوده و هست. امیدوارم که بتوانم جوابگوی این همه محبت آنها باشم.

استاد راهنمای عزیز و فرهیخته ام

جناب آقای دکتر نورخدا صادقی فرد که زحمت راهنمایی این پایان نامه را عهده دار گردیدند و در تمامی مراحل این رساله با نکته های پر اهمیت صحیفه های سخن را پرورش نموده اند، ابراز تشکر و سپاسگذاری نموده و توفیقات روز افزون ایشان را توام با سلامت و سعادت ابدی از خداوند خواهانم.

از جناب آقای دکتر کاظمیان وهمچنین جناب آقای دکتر نظری که در امر مشاوره این رساله مساعدت نمودند، و در این امر نهایت توجه خود را مبذول فرموده اند کمال تشکر و امتنان را دارم.

همچنین از اساتید بزرگوار جناب آقای دکتر پاکزاد، آقای دکتر غفوریان، آقای دکتر صادقی کلانی و تمامی دوستان و عزیزانی که بنده را یاری نموده اند کمال تقدیر و تشکر می کنم و از ایزد منان برای این بزرگواران توفیق روز افزون را مسالت دارم.



تاریخ ۱۴۰۰/۹/۲۸
شماره ۲۲۰۲۰۰۰۱۷۳۹۷

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه دانشجویان تحصیلات تکمیلی

جلسه دفاع از پایان نامه خانم مرضیه هاشمیان دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی به شماره دانشجویی ۹۷۱۱۱۱۸۰۲ تحت عنوان " بررسی شیوع عفونت های بیمارستانی در بخش ICU و ICU بیمارستان امام خمینی (ره) شهر ایلام" با حضور استاد راهنما، مشاور، هیات داوران و ناظرین دانشکده در روز شنبه مورخ ۱۴۰۰/۰۹/۲۷ ساعت ۹:۳۰ در سالن کنفرانس دانشکده پزشکی برگزار شد و پس از بررسی، پایان نامه مذکور با نمره به عدد ۱۸/۱ به حروف هیجده و ۱۸ با درجه بسیار خوب مورد تائید واقع شد.

هیأت داوران

ردیف	نام ونام خانوادگی	سمت	مرتبه دانشگاهی	دانشگاه/موسسه	امضاء
۱	آقای دکتر نورخدا صادقی فرد	استاد راهنما	استاد	دانشگاه علوم پزشکی ایلام	
۲	آقای دکتر حسین کاظمیان	استاد مشاور	استادیار	دانشگاه علوم پزشکی ایلام	
۳	آقای دکتر علی نظری	استاد مشاور	استادیار	دانشگاه علوم پزشکی ایلام	
۴	آقای دکتر ایرج پاکزاد	داور داخل دانشگاه	استاد	دانشگاه علوم پزشکی ایلام	
۵	آقای دکتر بهروز صادقی کلاتی	داور داخل دانشگاه	استادیار	دانشگاه علوم پزشکی ایلام	
۶	آقای دکتر آرمان رستم زاد	داور خارج دانشگاه	دانشیار	دانشگاه ایلام	

هیئت ناظر

ردیف	نام ونام خانوادگی	سمت	مرتبه دانشگاهی	دانشگاه/موسسه	امضاء
۱	آقای دکتر مرتضی حسین زاده	ناظر پژوهش	استادیار	دانشگاه علوم پزشکی ایلام	
۲	خانم دکتر آذر بابا خانی	ناظر آموزش	استادیار	دانشگاه علوم پزشکی ایلام	
۳	آقای دکتر میثم محبی	نماینده پژوهش	دکتری تخصصی(PHD)	دانشگاه علوم پزشکی ایلام	

کارشناسان پژوهش دانشکده پزشکی

دانشکده پزشکی

تاسیس ۱۳۷۴

ر

چکیده

مقدمه: عفونت های بیمارستانی به عنوان یک چالش بزرگ در سراسرجهان مطرح است. بخش مهمی از این عفونت‌ها در بخش مراقبت های ویژه در بیمارستان ها رخ می‌دهد، که این عامل در فرآیند طولانی شدن دوره درمان، افزایش مدت زمان بستری و میزان مرگ و میر بیماران بستری در این بخش تاثیر گذار است، بنابرین شناسایی عوامل ایجاد عفونت و نیز الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در بخش ICU در روند کنترل عفونت‌های بیمارستانی این بخش امری ضروری است. دو باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلانمونیه* سبب ایجاد طیف وسیعی از این عفونت‌ها در بخش مراقبت‌های ویژه می شوند و باتوجه به الگوی خاص مقاومت آنها به β- لاکتامازهای وسیع الطیف و نیز کارباپنمازها، تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری ها به عوامل ذکر شده به عنوان یکی از اهداف این مطالعه در جهت اجرای تدابیر مناسب برای مقابله با عفونت ناشی از این باکتری ها مهم تلقی می شود.

روش کار: در این مطالعه مقطعی- توصیفی، الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌های مربوط به عفونت‌های بیمارستانی در بخش مراقبت‌های ویژه، به روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. به طور کلی، ۵۷ جدایهء *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا نمونیه* دخیل در عفونت بیمارستانی بیماران بستری دربخش های مراقبت ویژه جداسازی شدند، مقاومت به بتالاکتاماز های وسیع الطیف، متالوبتالاکتاماز ها و کارباپنماز ها با روش های فنوتیپی و ژنوتیپی برای جدایه ها تعیین گردید.

یافته‌ها : در مجموع ۱۰۳جدایهء مختلف باکتریایی از نمونه های بالینی ۷۱ بیمار مبتلا به عفونت بیمارستانی دربخش ICU جداسازی شد. بیشترین باکتری های جدا شده *اشریشیا کلی* (۲۸/۱۶٪) ، *اسینتوباکتر*(۱۴/۵۶٪) و *کلبسیلا نمونیه* (۱۲/۲۶٪) بودند. شایعترین نوع عفونت بالینی، عفونت دستگاه تنفسی با ۵۰/۴۸ درصد بود. همچنین مقاومت به چند دارو در ۶۱ جدایه (۵۹/۲۲٪) به دست آمد.

تست‌های تایید فنوتیپی نشان دادند که ۴۳ جدایهء (۷۵/۴۳٪) *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* تولید کنندهء ESBLs بودند. همچنین ۹ جدایهء (۱۵/۷۹٪) با آزمون فنوتیپی بعنوان تولید کننده متالو-β -لاکتاماز و کارباپنمازها شناسایی شدند. نتایج بررسی ملکولی، شیوع بالای bla_{CTX-M} (۹۰/۶۹٪) و شیوع پایین bla_{SHV} (۲۰/۹۳٪) در بین ژن‌های ESBLs را نشان داد، همچنین ژن‌های bla_{NDM} و bla_{OXA-23}در (۵۵/۵۵٪) از جدایه‌ها و ژن‌های bla_{OXA-48}و bla_{KPC} در(۱۱/۱۱ ٪) از جدایه‌ها به دست آمد. ژن‌های bla_{VIM} وbla_{IMP} در هیچ یک از جدایه‌ها گزارش نشدند.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر عفونت بیمارستانی در بخش ICU ۱ میزان بالاتری گزارش شد. باکتری‌های گرم منفی بعنوان شایعترین عال عفونت شناسایی شدند. نتایج فنوتیپی و ملکولی در باکتری های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* با یکدیگر مطابقت داشته که روند افزایشی مقاومت به کرباپنم ها را در باکتری های ذکر شده نشان می‌دهد. از طرفی سطح بالای مقاومت به ونکومایسین در باکتری های گرم مثبت بسیار حائز اهمیت می‌باشد که باید بسیار مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: عفونت بیمارستانی، *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا نمونیه*، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، کارباپنماز

فهرست مطالب

Contents

فصل اول ۱

مقدمه و معرفی پژوهش ۱

۱-۱ بیان مسئله و ضرورت اجرای طرح: ۲

۱-۲ اهداف پژوهش: ۵

۱-۲-۱ هدف اصلی طرح: ۵

۱-۲-۲ اهداف اختصاصی پژوهش: ۵

۱-۲-۳ هدف کاربردی پژوهش : ۵

فصل دوم ۷

کلیات و بررسی مطالعات گذشته ۷

۲-۱ عفونت های بیمارستانی : ۸
۲-۱-۱ عفونت بیمارستانی در بخش مراقبت های ویژه(ICU): ۹
۲-۲ مقاومت آنتی بیوتیکی: ۱۷
۲-۲-۱ β- لاکتاماز های وسیع الطیف(ESBLs): ۲۰
۲-۲-۲ کارباپنماز: ۲۴
۲-۳بررسی متون: ۲۹
فصل سوم ۳۲
روش پژوهش ۳۲
۳-۱ روش جداسازی و تشخیص فنوتیپی نمونه ها: ۳۳
۳-۱-۱ کشت در محیط بلاد آگار: ۳۳
۳-۱-۲ کشت در محیط مک کانکی: ۳۴
۳-۱-۳ تست کاتالاز: ۳۵

۳-۱-۴ تست اکسیداز: ۳۵
۳-۱-۵ رنگ آمیزی گرم : ۳۶
۳-۱-۶ تست IMVIC: ۳۷
۳-۱-۷ محیط کشت سیمون سیترات: ۳۹
۳-۱-۸ محیط کلیگر آیرون آگارKIA : ۳۹
۳-۱-۹ آزمایش اوره‌آز: ۴۰
۳-۱-۱۰ مانیتول سالت آگار: ۴۰
۳-۱-۱۱ تستDNase: ۴۱
۳-۲ فریز کردن جدایه ها: ۴۲
۳-۳ روش انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی(AST): ۴۲
۳-۳-۱ روش دیسک دیفیوژن آگار: ۴۲
۳-۳-۲ تست تعیین مقاومت به β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) در باکتری *اشریشا کلای* و *کلبسیلانمونیه*: ۴۴

۳-۳-۳ تست تعیین مقاومت به متالوβ- لاکتاماز و کارباپنماز در باکتری *اشریشیا کلی* و *کلبسیلانمونیه*: ۴۵
۳-۴ روش استخراج DNA: ۴۶
۳-۵ ارزیابی کمی و کیفی DNA: ۴۷
۳-۶ نگهداری DNA استخراج شده: ۴۷
۳-۷ واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR: ۴۸
۳-۸ الکتروفورز محصولات PCR: ۵۴
۳-۸-۱ روش تهیه بافر TAE 50 x: ۵۴
۳-۸-۲ تهیه ژل آگارز ۱/۵ درصد: ۵۶
۳- ۸-۳ بارگذاری نمونه ها در چاهک های ژل و الکتروفورز محصولات PCR: ۵۶
۳-۹ توالی یابی محصولات PCR: ۵۷
فصل چهارم ۵۸
نتایج و یافته های پژوهش ۵۸

۴-۱ نتایج شیوع عفونت بیمارستانی و تعیین هوییت جدایه‌ها: ۵۹
۴-۲ نتایج تشخیص فنوتیپی: ۶۲
۴-۳ نتایج آنتی بیوگرام جهت بررسی مقاومت و حساسیت جدایه ها: ۶۵
۴-۴ نتایج مقاومت چند دارویی در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی: ۶۸
۴-۵ نتایج تست تایید مقاومت به ESBLs، متالوβ- لاکتاماز ونیز کارباپنماز: ۷۱
۴-۶ نتایج PCR برای بررسی ژنهای مقاومت به ESBLs، متالو β- لاکتاماز و نیز کارباپنماز: ۷۴
۴-۷ بررسی توزیع ژن های مشترک در باکتریهای *اشریشیا کلی* و *کلبسیلانمونیه*: ۸۰
۴-۸ نتایج توالی یابی محصولات PCR: ۸۲
فصل پنجم ۸۴
بحث و نتیجه گیری ۸۴
۵-۱ بحث: ۸۵
محدودیت‌ها: ۹۰

پیشنهادات: ۹۱

فهرست جداول

جدول۱-۲: مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی ۱۳

جدول ۲-۲ : طبقه بندی آمبلر برای برای کارباپنماز و β –لاکتامازها. ۲۶

جدول۱-۳: پرایمرهای ژن های مقاومت ESBLs و متالوβ- لاکتاماز و نیز کارباپنماز برای انجام واکنش PCR. ۴۹

جدول شماره۲-۳: مواد مورد نیاز جهت استفاده برای هر نمونه در واکنش PCR ۵۱

جدول شماره۳-۳: برنامه تنظیم شده برای دستگاه ترمال سایکلر جهت واکنش PCR ۵۲

جدول۴-۳: مواد مورد نیاز جهت تهیه بافر TAE 50 x. ۵۵

جدول۱-۴: مشخصات بیماران مبتلا به عفونت بیمارستانی ۵۹

جدول۲-۴: توزیع عوامل باکتریایی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت بیمارستانی ۶۳

جدول۳-۴: نتایج حاصل از بررسی تست حساسیت آنتی بیوتیکی ۶۵

جدول ۴-۴: نتایج مقاومت چند دارویی در جدایه‌های گرم منفی و مثبت ۶۹

جدول۵-۴: جدول توزیع فراوانی ESBLs و کارباپنمازها را در جدایه‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا نمونیه. ۷۲

جدول۶-۴: میزان و درصد شیوع ژن‌های مقاومت باکتری به ESBLs، متالوβ- لاکتاماز ونیز کارباپنماز ۷۶
جدول۷-۴: توزیع ژن‌های مشترک در جدایه‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* ۸۰

فهرست نمودار ها

نمودار۱-۴: نمودار میزان عفونت بیمارستانی بیماران تفکیک شده بر حسب رنج سنی ۶۲
نمودار۲-۴: نمودار توزیع عوامل باکتریایی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت بیمارستانی ۶۵
نمودار ۳-۴: نتایج مقاومت چند دارویی در در جدایه‌های گرم منفی و مثبت. ۷۱
نمودار ۴-۴: نمودار فراوانیESBLs تولید شده در *اشریشیا کلی* و *کلبسیلانمونیه* ۷۳
نمودار ۵-۴: توزیع ژن‌های مشترک در باکتریهای *اشریشیا کلی* و *کلبسیلانمونیه* تولید کننده ESBLs، متالوβ- لاکتاماز ونیز کارباپنماز ۸۲

فهرست تصاویر

تصویر ۱-۲: داروی‌های ضد میکروبی متداول همراه با برخی از داروهای تأیید شده جدید و سال ایجاد مقاومت به آنها ۱۹
تصویر ۲-۲: اپیدمیولوژی *کلبسیلا* نمونیه حساس و مقاوم به کارباپنم به همراه نوع کارباپنمازها در اروپا ۲۸
تصویره۱-۳: مراحل انجام واکنش PCR ۴۹

تصویر ۱-۴: تست حساسیت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن ۶۸

تصویر ۲-۴: نتایج بررسی فنوتیپی مقاومت به ESBLs، متالوβ- لاکتاماز و نیز کارباپنماز در دو *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* ۷۴

تصویر ۳-۴: تصویر ژل الکتروفوز مربوط به ژن‌های bla_{SHV} با طول باند ۱۰۱۶ bp، ژن bla_{CTX-M} با طول باند ۵۴۴bp و ژن bla_{OXA-11} با طول باند ۲۵۵ bp .

..... ۷۷

تصویر ۴-۴ : تصویر ژل الکتروفورز مربوط به ژن‌های bla_{NDM} با طول ۶۲۱ bp، ژن bla_{OXA-23} با طول ۳۵۵bp و ژن bla_{OXA-48} با طول ۴۳۸bp ۷۸

تصویر ۵-۴ : تصویرژل الکتروفورز مربوط به ژن‌های مثبت bla_{SHV}، bla_{CTX-M}، bla_{OXA-11}، bla_{NDM}، bla_{KPC}، bla_{OXA-48} و bla_{OXA-23} ۷۹

تصویر۶-۴: نتایج آنالیز توالی یابی PCR برای ژن bla_{NDM} در باکتری *کلبسیلا نمونیه* ۸۳

تصویر۷-۴: نتایج آنالیز توالی یابی PCR برای ژن bla_{OXA-23} در باکتری *کلبسیلا نمونیه*. ..... **Error! Bookmark not defined.**

فصل اول

مقدمه و معرفی پژوهش

۱–۱ بیان مسئله و ضرورت اجرای طرح:

عفونت‌های بیمارستانی[1] معمولا ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از بستری شدن بیمار، یا حتی یک هفته بعد از ترخیص آن‌ها می‌تواند رخ دهد (۱-۴). سالانه ۶۰۹۹۱۱ بیمار مبتلا به عفونت‌های بیمارستانی در اروپا گزارش می‌شود که حدود ۴۲۶۲۷۷ مورد از این عفونت‌ها به علت میکروارگانیسم‌های مقاوم به مواد ضد میکروبی است، که در این بین ۳۳۱۱۰ از بیماران از بین می‌روند، میزان شیوع این عفونت‌ها در ایران بصورتی است که سالانه سبب درگیری۲ میلیون نفر می‌شود (۴ و ۵). میزان هزینه‌های ناشی از عفونت بیمارستانی در ایالات متحده آمریکا سالانه در حدود ۴۵ میلیارد دلار می‌باشد و این عفونت‌ها، به عنوان یکی از پنج عامل مرگ در ایالات متحده بشمار می‌آید. بروز این عفونت‌ها در کشورهای توسعه یافته ۷درصد و در کشورهای در حال توسعه ۱۰درصد می‌باشد (۳ و ۶). براساس برآوردهای سازمان جهانی بهداشت (WHO)[2]، تقریباً در حدود ۱۵- ۵ درصد از بیماران بستری از این عفونت‌ها رنج می‌برند، که به طور کلی حدود ۷۵درصد این عفونت‌ها در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد (۳، ۷و ۸). میزان این عفونت‌ها در کشور ایران بعنوان یک کشور در حال توسعه در سال ۲۰۰۷ با ۰/۶درصد و در سال ۲۰۱۱ با۱/۱ درصد گزارش شده است و این نرخ در یک بررسی متاآنالیز در سال ۲۰۱۸ به ۴/۵ درصد افزایش یافته، که این موارد رشد بسیار سریع این عفونت ها را در این کشور نشان می‌دهد (۵ و ۹). امروزه این عفونت‌ها بعنوان عمده ترین مشکلات در پزشکی مدرن جهان و ایران محسوب می‌شوند، که به دلیل کاهش ایمنی بیمار و افزایش مداخلات پزشکی (استفاده از کاتتر

[1] Nosocomial infection
[2] World Health Organization

،ونتیلاتور..) حدود ۲۰ تا ۵۰ درصد از آنها در بخش مراقبت های ویژه(ICU[1]) اتفاق می‌افتد. پاتوژن‌های عامل عفونت بیمارستانی شامل باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌های قارچی هستند، در این بین شایع‌ترین عامل ایجاد عفونت باکتری‌ها می‌باشند که حدود ۹۰ درصد این عفونت‌ها را شامل می‌شوند (۳ و ۸). از جمله مهمترین میکروارگانیسم‌های ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی *استافیلوکوکوس‌اورئوس*، انتروباکتریاسه‌ی مقاوم به کرباپنم، مهمترین آنها *اشریشیاکلی وکلبسیلانمونیه* و با میزان کمتر *آنتروباکتر، پروتئوس* و *سراشیا، سودموناس آئروژینوزا، انتروکوک‌ها، کلستریدیوم‌دیفیسیل، آسینتوباکتربومانی، استاف‌های گواکولاز منفی* و *استرپتوکوکوس‌ها* از دیگر عوامل دخیل در ایجاد عفونت های بیمارستانی هستند (۸ و۱۰). از مهمترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی خانواده انتروباکتریاسه می‌باشند، این خانواده به عنوان فلور طبیعی موجود در روده ونیز پاتوژن مهم بیماری‌زا در اجتماع و بیمارستان مطرح هستند که به دلیل تولید β- لاکتامازهای وسیع والطیف(ESBLs)[2] و کارباپنمازها [3] از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۱۱ و۱۲). شایع‌ترین عامل عفونت بیمارستانی از این خانواده ، *اشریشیا کُلی* و *کلبسیلا نمونیه* است که درصد بالای از مقاومت را با آنزیم‌های ذکر شده نشان می‌دهند (۱۱ و ۱۳). باکتری-های مذکور مسئولیت بیماری‌های از جمله UTI[4]، سپتی سمی، ذات الریه، مننژیت نوزادی، پریتونیت و گاستروانتریت را بر عهده دارند (۸). ژن حمل‌کننده این آنزیم‌ها روی پلاسمیدهای قرار دارد که گاها ژن مقاومت به آمینوگلیکوزید و فلوروکینولون‌ها را نیز به همراه دارد که بین این خانواده منتقل و سبب گسترش مقاومت می‌گردد (۱۱ و ۱۴). ESBLs آنزیمی هستند که قادر به هیدرولیز انواعی از آنتی بیوتیک‌ها از جمله خانواده‌های پنی سیلین[5]،

[1] Intensive care unit
[2] Extended spectrum beta-lactamase
[3] Carbapenem
[4] Urinary tract infection
[5] Penicillin

سفالوسپورین[1] و مونوباکتام[2] می‌باشند (۱۳، ۱۵ و۱۶). ادعا می شود که حدود ۶۷ درصد باکتری‌های جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی قادر به هیدرولیز β- لاکتام بوده و با توجه به اینکه این دسته از مواد ضد میکروبی پایه اصلی برای درمان انتروباکتریاسه بوده و عدم وجود گزینه‌های درمانی مناسب در سال‌های اخیر به عنوان یک نگرانی مطرح هستند(۹، ۱۶ و۱۷). روند رو به رشد باکتری‌های تولیدکننده β- لاکتاماز سبب افزایش مدت زمان بستری شدن، دشوار شدن درمان، گسترش میزان مقاومت ها، افزایش هزینه‌های اضافی و بروز مرگ و میر بخصوص در بیماران بستری در بخش ICU می‌شود(۱۴ و۱۷). امروزه اقدامات خاصی در جهت کنترل عفونت‌های بیمارستانی صورت گرفته، با این وجود به دلیل مداخلات گسترده پزشکی، تنوع عوامل ایجاد کننده عفونت، تجویز آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف، مصرف داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی و عدم رعایت بهداشت کافی در بیمارستان‌ها همچنان افزایش بروز این عفونت‌ها وجود دارد و در روند درمان بیماران بستری ایجاد مشکل می‌کند. در کشور ایران کنترل عفونت‌های باکتریایی به خوبی صورت نمی‌گیرد، همچنین در استان ایلام میزان مرگ و میر ناشی از عفونت‌های بیمارستانی به درستی تعیین نمی‌گردد از طرفی به دلیل استفاده از روش‌های روتین آزمایشگاهی جهت تشخیص باکتری‌ها و عدم آگاهی از استانداردها قادر به تشخیص درست باکتری عامل عفونت و نیز میزان مقاومت باکتریایی نبوده که مجموع این عوامل اهمیت بررسی شیوع عفونت‌های بیمارستانی و تعیین مقاومت دارویی در این بیمارستان را نشان می‌دهد. با شناسایی عامل غالب ایجاد کننده عفونت و تشخیص سریع باکتری‌های تولیدکننده ESBLs و کارباپنماز می‌توان درمان مناسب را به بیمار ارائه داده و این عامل را به عنوان امری مهم در بیمارستان بنیاد کرد که با کنترل عفونت و مقاومت‌ها از گسترش بیشتر مقاومت جلوگیری به عمل آورد (۱، ۴ و۱۰).

[1] Cephalosporin
[2] Monobactam

۲–۱ اهداف پژوهش:

۱–۲–۱ هدف اصلی طرح:

بررسی شیوع عفونت بیمارستانی در بخش های ICU بیمارستان امام خمینی (ره) شهر ایلام.

۲–۲–۱ اهداف اختصاصی پژوهش:

۱. تعیین میزان شیوع عفونت بیمارستانی در بخش ICU.

۲. . تعیین فراوانی مقاومت دارویی در باکتری های جدا شده به صورت فنوتیپی.

۳. تعیین فراوانی مقاومت به β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)، متالوβ- لاکتاماز و کاربا‌پنماز در باکتری های *اشریشیا کُلی* و *کلبسیلا نمونیه* به صورت فنوتیپی.

۴. تعیین فراوانی ژن مقاومت به کاربا‌پنماز و β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) و متالوβ- لاکتاماز در باکتری *اشریشیا کُلی* و *کلبسیلا نمونیه* به روش مولکولی.

۳–۲–۱ هدف کاربردی پژوهش :

هدف از این مطالعه تعیین عامل شایع ایجاد کننده عفونت بیمارستانی در بخش ICU بیمارستان امام خمینی (ره)، تعیین مقاومت دارویی و تشخیص سریع باکتری‌های تولید کننده ESBLs، متالوβ- لاکتامازها وکارباپنماز می‌باشد که مجموع این اعمال منجر به ارائه درمان مناسب به بیمار، ارائه راهنمایی‌های لازم برای کنترل عفونت بیمارستانی و نیز کنترل گسترش بیشتر مقاومت در بیمارستان ها می‌شود.

فصل دوم

کلیات و بررسی مطالعات گذشته

۱-۲ عفونت های بیمارستانی :

عفونت بیمارستانی، یک عفونت موضعی یا سیستمیک است که ارتباطی به بیماری اولیه بیماران در هنگام بستری شدن در بیمارستان ندارد و ناشی از واکنش بدن به عامل ایجاد کننده عفونت یا سموم تولید شده از آن‌ها می‌باشد. این عفونت‌ها در بیمارستان با گذشت ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از بستری شدن بیمار رخ می‌دهند (۱۸ و ۱۹). عفونت بیمارستانی یکی ازمهمترین دغدغه‌های مراکز درمانی محسوب می‌باشد که تهدید عمده‌ای برای بیماران بستری در بیمارستان به حساب می‌آید (۲۰ و۲۱). افزایش شیوع بیماری‌های عفونی نوپدید، تغییر در الگوی بیماری‌ها، افزایش سطح مقاومت میکروبی، افزایش نیاز به خدمات پزشکی، تنوع در خدمات پزشکی و افزایش مدت زمان اقامت در بیمارستان‌ها سبب افزایش بروز این نوع از عفونت‌ها می-گردد، نتیجه افزایش عفونت‌ها خطر مرگ و میر و در نهایت هزینه درمان را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد، به طوری که کل هزینهء سالانه مراقبت‌های بهداشتی در ایالات متحده را تقریباً تا ۱۰ میلیارد دلار افزایش داده‌اند (۱۸ و ۲۰).

طبق گزارش سازمان WHO، حدود ۱۵درصد از بیماران بستری در بیمارستان به این عفونت‌ها مبتلا می‌گردند که بیشترین میزان شیوع عفونت-های بیمارستانی در مناطق شرق مدیترانه و آسیای جنوب شرقی با ۸/ ۱۱درصد و ۱۰ درصد رخ می‌دهد، در حالی که در مناطق اروپایی ۷/۷ درصد و در غرب اقیانوس آرام ۹ درصد ارزیابی شده است. به این وجود، به طور کلی فراوانی این نوع از عفونت‌ها را در کشورهای در حال توسعه و کم درآمد در حدود سه برابر بیشتر از کشورهای توسعه یافته ارزیابی شده اند، این میزان بین ۵ /۳ درصد تا ۱۲ درصد در کشورهای توسعه یافته و۵/۷ درصد تا ۱۹ درصد در

کشورهای در حال توسعه متغییر است (۳ و ۱۸). وضعیت ایران در زمینه کنترل عفونت‌های بیمارستانی بسیار نگران کننده است شیوع عفونت در ایران بین ۱/۹ درصد تا ۲۵ درصد گزارش شده است (۲۱).

۱-۱-۲: عفونت بیمارستانی در بخش مراقبت های ویژه(ICU):

عفونت‌های بیمارستانی در بخش‌های مختلف بیمارستان از جمله بخش مراقبت‌های ویژه (ICU)، بخش اطفال، بخش جراحی و واحد سوختگی به میزان بالایی رخ می‌دهد (۱۸). از زمان تاسیس بخش مراقبت‌های ویژه، همزمان با شیوع فلج اطفال از دهه ۱۹۵۰ و استفاده از ونتیلاتورهای دستی به منظور اکسیژن درمانی در بخش ICU، تا به امروز و استفاده از ونتیلاتورهای پیشرفته، عفونت‌های بیمارستانی به طور مداوم در حال افزایش بوده است. طی دهه‌های اول تاسیس بخش مراقبت‌های ویژه از ۱۹۵۰ تا ۱۹۷۰، عفونت‌های باکتریایی بیمارستانی بیشتر در بین بیماران در بخش جراحی شایع بودند که بیشتر شامل عفونت‌های زخم، ذات الریه، عفونت‌های مجاری ادراری و باکتریمی بودند. اما در حال حاضر، رایج‌ترین عفونت‌های بیمارستانی دربخش ICU به دلیل استفاده از روش‌های تهاجمی خاص و قرار گرفتن در معرض استفاده از آنتی بیوتیک‌های تزریقی رخ می‌دهد در این .بخش به طور معمول بیمارانی با وضعیت وخیم را که نیاز به حمایت تنفسی، قلبی و کلیوی دارند، پذیرفته می‌شوند (۱۹ و ۲۰).

بخش مراقبت‌های ویژه تنها ۵ تا ۱۵ درصد از تحت‌های بیمارستانی را شامل می‌شوند، این در حالی است که ۱۰ تا ۲۵ درصد از هزینه‌های مراقبت های بهداشتی به این بخش اختصاص داده می‌شود. ایجاد عفونت بیمارستانی سبب افزایش مدت زمان اقامت بیمار در بیمارستان، نیاز به داروهای

قوی‌تر و گران‌ترشده که سبب افزایش هزینه‌ها برای بیماران و دولت می‌گردد. بررسی مروری سیستماتیک و متاآنالیز سازمان جهانی بهداشت نشان داده است که شیوع عفونت‌های بیمارستانی در بخش‌های مراقبت ویژه بزرگسالان در کشورهای در حال توسعه ۴۷/۹ مورد در هر ۱۰۰۰ روز می‌باشد، که این مقدار حداقل سه برابر بیشتر از شیوع این نوع ازعفونت‌ها در ایالات متحده گزارش شده است(۱۹). عفونت‌های بیمارستانی دربخشICU بسیار رایج هستند، چرا که معمولا بیماران این بخش دارای سن بالاتر و شدت بیماری بیشتر بوده و به دلیل تجویز داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی، وجود بیماری‌های زمینه‌ای یا اختلال در عملکرد اندام‌ها، سیستم ایمنی ضعیف‌تر دارند. این عفونت‌ها با بستری شدن بیمار بصورت طولانی، ایجاد اختلال در عملکرد چندین عضو و افزایش مرگ و میر در بیمارستان همراه هستند. این عفونت‌ها در بخش مراقبت‌های ویژه به دلیل استفاده از روش‌های تهاجمی طولانی مدت از جمله کاتتریزاسیون وریدی و شریانی، لوله گذاری نای و استفاده از ونتیلاتورها تنفسی، کاتتریزاسیون ادراری یا به طور کلی قرار دادن کاتتر در محل‌های استریل بدن یک پیامد اجتناب ناپذیر است (۲۰).

شایع‌ترین نوع عفونت‌های بیمارستانی طبق گزارش CDC[۱] عبارتند از: عفونت‌های محل جراحی[۲] (SSI)، عفونت جریان خون مرتبط با خط مرکزی[۳] (CLABSI)، عفونت‌های دستگاه ادراری مرتبط با کاتتر[۴] (CAUTI) و پنومونی‌های مرتبط با دستگاه تنفس[۵] (VAP) (۲۲). سه نوع عفونت ذات

[1] Centers for Disease Control
[2] Surgical site infections
[3] Central line-associated bloodstream infections (CLABSIs)
[4] catheter-associated urinary tract infection (CAUTI)
[5] Ventilator-Associated Pneumonia

الریه (معمولاً مرتبط با دستگاه تنفس مصنوعی)، عفونت مجاری ادراری (معمولاً همراه با کاتتر) و عفونت اولیه جریان خون (معمولاً با استفاده از دستگاه داخل عروقی مرتبط است) بیش از ۶۰ درصد از کل عفونت‌های بیمارستانی را شامل می‌شود (۱۹).

عفونت‌های دستگاه ادراری، عفونت‌های دستگاه تنفسی تحتانی (برونشیت مرتبط با دستگاه تنفسی ونتیلاتور[1](VAT) ، ذات الریه مرتبط با دستگاه تنفسی (VAP) ، عفونت‌های جریان خون، عفونت‌های پوست و ساختار پوست از جمله عفونت‌های بیمارستانی شایعی هستند که دربخش ICU دیده می شود (۲۰).

پنومونی بیمارستانی[2] (HAP): این نوع عفونت شایع‌ترین عفونت در بخش مراقبت‌های ویژه و دومین عفونت بیمارستانی شایع می‌باشد (۱۹ و ۲۳). تهویه مکانیکی یک روش درمانی رایج در بخش ICU می‌باشد، که برای درمان نارسایی تنفسی ناشی از بسیاری شرایط استفاده می‌شود (۲۲)، این نوع عفونت شامل دو نوع پنومونی مرتبط با تهویه مکانیکی با ونتیلاتور یا پنومونی شدید ایجاد شده در طول بستری در بیمارستان(severe pneumonia developed during the hospital) می‌باشند (۲۳). پنومونی بیمارستانی علت اصلی مرگ و میر با نرخ تقریبی ۲۰ درصد در بخش مراقبت‌های ویژه ذکر شده است، این درحالی است که بیش از ۹۰ درصد پنومونی‌ها در بیمارانی رخ می‌دهد که از تهویه مکانیکی استفاده می‌کنند (۱۹). مطالعات EPIC[3] که مروری بر تغییرات عفونت در بخش ICU در یک دوره ۲۵ ساله را ارائه می‌دهند برای اولین بار یک دیدگاه جهانی در مورد تغییر چشم انداز عفونت‌های

[1] Ventilator Associated Tracheobronchitis
[2] Hospital-Acquired Pneumonia
[3] Prevalence of Infection in Intensive Care

بیمارستانی در ICU را ارائه می‌دهند، این مطالعات نشان دادند که ریه بیماران بستری به عنوان منبع اصلی عفونت‌های بیمارستانی در بخشICU هستند (۲۰).

عفونت مجاری ادراری: ۳۵ الی ۴۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی در مجاری ادراری رخ می‌دهد که این مورد با استفاده از کاتترهای داخلی یا انسداد ادرار ارتباط دارد (۱۹). بین ۱۵ تا ۲۵ درصد از بیماران بستری در بیمارستان، ممکن است در طول اقامت خود از کاتتر ادراری استفاده کنند که بیشترین میزان استفاده در بخش‌های سوختگی، ICU و جراحی می‌باشد. استفاده از کاتترها می‌تواند طول مدت اقامت بیماران، هزینه مراقبت از بیمار و مرگ و میر را افزایش دهد به طوری که بیش از ۱۳۰۰۰ مرگ در هرسال به علت استفاده از کاتترها تخمین زده شده است. کاتترهای ادارای مخزنی مناسب برای باکتری‌های مقاوم به چند دارو و منبع انتقال به سایر بیماران هستند (۲۳).

عفونت زخم پس از جراحی: این نوع از عفونت معمولا در محل جراحی ایجاد می‌شوند، زمانی که پوست تنها اندام درگیر باشد عفونت سطحی بوده و زمانی که بافت زیر پوست و اندام‌های اطراف پوست را درگیر کنند به صورت عمقی ظاهر می‌گردد. همه زخم‌های جراحی دارای درجاتی از آلودگی هستند که در هنگام بستن محل برش در جراحی عفونت ایجاد می‌شود. میزان مرگ و میر عفونت زخم پس از جراحی به طور کلی در حدود ۳ درصد ذکر شده است (۲۳). عفونت‌های مربوط به زخم جراحی در دهه ۱۹۶۰ بعنوان اصلی‌ترین عامل عفونت در بخش ICU مطرح بودند، درادامه در دهه ۱۹۷۰ و۱۹۸۰ عفونت‌های مجاری ادراری بیشترین شیوع و به دنبال آن در دهه ۱۹۹۰ میلادی عفونت‌های جریان خون مطرح به عنوان شایع‌ترین عامل مطرح شدند، از آن پس پنومونی بیمارستانی بیشترین عفونت را دربخش‌های ICU ایجاد می‌کند (۲۰).

عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی متنوع می‌باشند، شایع‌ترین عفونت‌های گزارش شده عفونت‌های باکتریایی (۶۸٪)، کاندیدال (۹٪) وعفونت‌های ویروسی (۲۲٪) هستند(۱۸). عوامل بیماری‌زای باکتریایی ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی به طور معمول عبارتند از: خانوادهء انتروباکتریاسه، *سودموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، آسینتو باکتر بومانی، هموفیلوس آنفولانزه، انتروکوک، استرپتوکوکوس نمونیه، استافیلوکوکوس‌های گواکولاز منفی* و *کلستردیوم دیفیسیل* می‌باشند (۱۸، ۲۱ و ۲۳). باکتری‌های گرم مثبت یا منفی از جمله استافیلوکوکوس‌ها، طیف وسیعی از *انتروباکتریاسه‌ها*، گونه‌های *سودوموناس* و گونه‌های *اسینتوباکتر* ۷۰ درصد از عفونت‌های بیمارستانی در بیماران بخش ICU را ایجاد می-کنند(۱۹). عفونت با باکتری‌های بسیار مقاوم مانند باکتری‌های گرم منفی مقاوم به چند دارو و *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین* علت درصد بالای عفونت‌های بیمارستانی در سراسر جهان هستند (۳).

جدول۱-۲: مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی در جدول زیر نشان داده شده است (اقتباس از رفرنس شماره(۲۴))

Table 1. common Nosocomial Pathogens
Organism **Gram Positive** ***Staphylococcu aureus*** ***Coagulase (-) staphylococci*** ***Enterococcus faecalis*** ***Enterococcus faecium*** ***Entercoccus spp.*** **Gram Negatives** ***Eschericia coli*** ***Klebsiella (pneumoiae/oxytoca)*** ***Enterobacter spp.*** ***Pseudomonas aeruginosa*** ***Acinetobacter spp.*** ***Bacteriodes spp.*** ***Proteus spp.)*** ***Fungal pathogens*** ***Candida albicans*** ***Candida glabrata*** ***Candida auris*** **Other** ***Candida spp*** ***Yeast***

مقاومت آنتی بیوتیکی یکی از مهمترین مشکلات مربوط به عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد که در برنامه کنترل این عفونت‌ها بسیار حائز اهمیت است. افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی در بین عوامل باکتریایی عفونت بیمارستانی تهدیدی برای سلامت انسان محسوب می‌شود چرا که، مقاومت به طیف وسیع از آنتی بیوتیک‌ها منجر به شکست در درمان و افزایش مرگ و میر بیماران می‌گردد، به همین منظور سازمان WHO سال ۲۰۱۱ را به عنوان سال مقاومت آنتی بیوتیکی تعیین کرده است (۲۵). از نظر اپیدمیولوژیکی، تجزیه و تحلیل‌های اندکی به مسئله مقاومت آنتی بیوتیکی در بخش ICU پرداخته است. با این وجود بررسی اپیدمیولوژی عوامل بیماری‌زا محلی و مقاوم دربخش ICU و نیز چندین متغیر دیگر مانند فراوانی مقاومت آنتی بیوتیک در این بخش بسیار مهم است، چرا که با دانش به تغییرات ایجاد شده در مورد مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها در این بخش می‌توان درمان ضد میکروبی اولیه مناسبی برای عوامل بیماری‌زا در این بخش تجویز نمود (۲۰).

عوامل عفونت‌های بیمارستانی در طی دهه‌های اول تاسیس بخش ICU غالبا در برابر آنتی بیوتیک‌ها حساس بودند، این در حالی است که در طول دهه‌های ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰ این بخش به طور فزآینده ای با باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک همراه شد است (۳). یکی از چالش‌های اصلی پزشکان بخش ICU، علاوه بر جلوگیری از عفونت‌های بیمارستانی، شناسایی عامل عفونت و انتخاب یک رژیم آنتی بیوتیک تجربی مناسب می‌باشد، اساس انتخاب رژیم آنتی بیوتیکی مناسب بر مبنای شناسایی منبع احتمالی عفونت، شناسایی رایج ترین عوامل بیماری‌زا و الگوهای غالب حساسیت به آنتی بیوتیک می‌باشد. روش‌های آزمایشگاهی سنتی برای شناسایی پاتوژن‌ها و حساسیت به آنتی بیوتیک معمولاً ۴۸-۷۲ ساعت طول می‌کشد که متأسفانه، تاخیرهای تشخیصی می‌تواند منجر به تجویز رژیم‌های درمانی نامناسب اولیه یا استفاده غیر ضروری از داروهای ضد میکروبی با طیف گسترده گردد، از طرفی عدم تجویز فوری

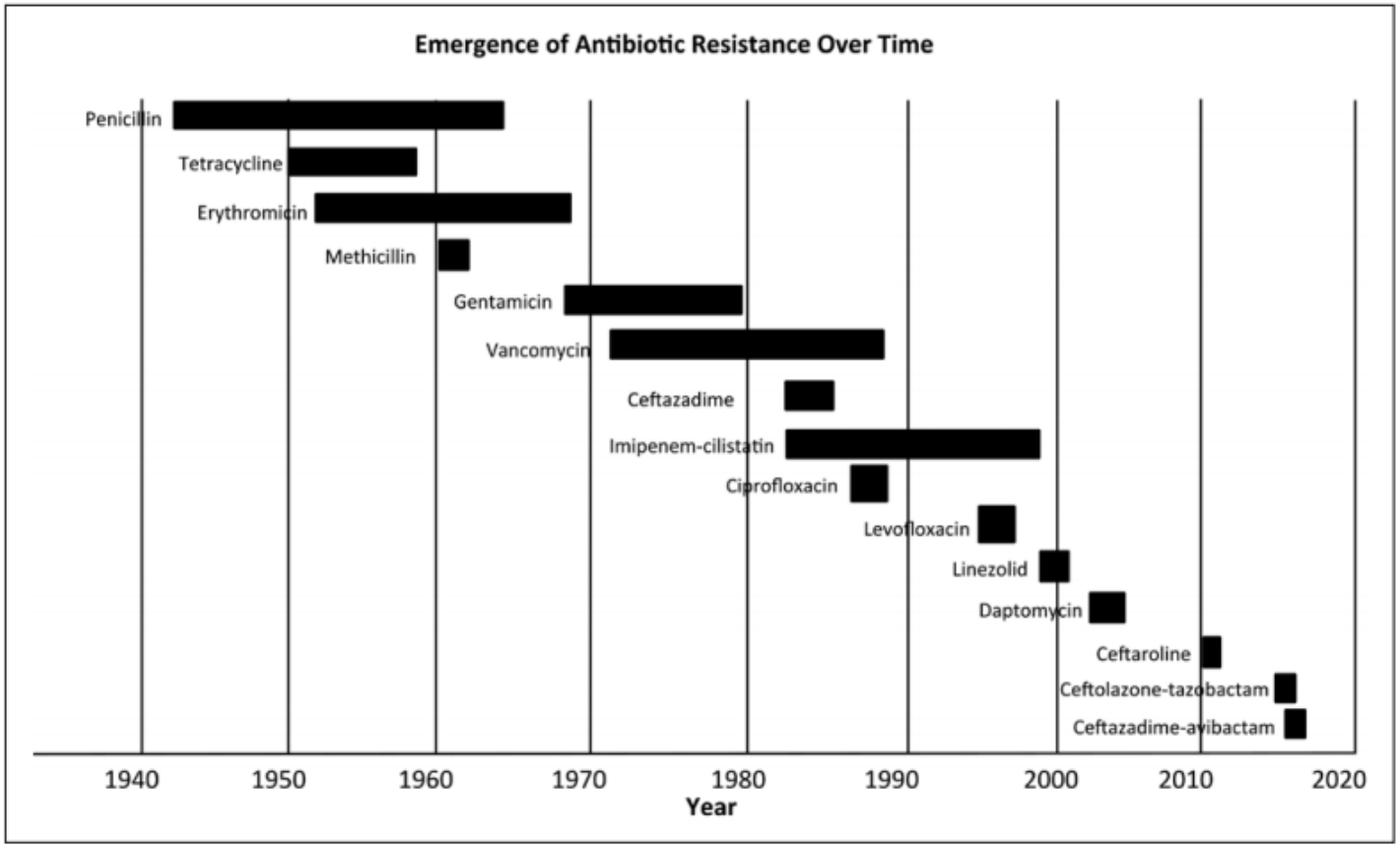
داروی ضد میکروبی مناسب، خطر مرگ و میر بیماران را افزایش می‌دهد، بر اساس اعلام مراکز کنترل و پیشگیری از بیماری بیش از ۷۰۰۰۰۰ نفر در سراسر جهان به عفونت‌های مقاوم به درمان مبتلا می‌شوند که ۲۳۰۰۰ نفر در ایالات متحده جان خود را به همین علت از دست می‌دهند، این درحالی است که تخمین زده شده است در۳ دهه آینده نزدیک به ۳۰۰ میلیون نفردر نتیجه مستقیم مقاومت ضد میکروبی از بین خواهند رفت (۲۰ ، ۲۴ و ۲۶). بنابرین غربالگری و تشخیص سریع مقاومت آنتی بیوتیکی می‌تواند منجر به درمان مناسب، کاهش هزینه‌های درمان و کاهش مرگ و میر بیماران شود (۲۱).

در طی۷۰ سال ابتدای تاسیس بخش مراقبت‌های ویژه تجویز سریع درمان ضد میکروبی که پایه درمان سایر عفونت‌ها در بیماران بخش ICU می‌باشد موجب گشته، که الگوی مقاومت به مواد ضد میکروبی در عوامل بیماری‌زای عفونت‌های بیمارستانی بطور چشمگیری تغییر یابند. مقاومت ضد میکروبی در هر دو نوع باکتری گرم مثبت و گرم منفی یکی از مهمترین چالش‌های عفونت‌های بیمارستانی در بخش مراقبت‌های ویژه است. ارگانیسم‌های گرم مثبت به ویژه *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین*[1] (*MRSA*) از دههء ۱۹۶۰ تا ۱۹۸۰ در بخش مراقبت‌های ویژه به طور غالب وجود داشتند اما پس از آن و تا به امروز شیوع باکتری‌های گرم منفی مقاوم به آنتی بیوتیک در این بخش غالب گشته است و به شدت سبب محدودیت گزینه-های درمانی گردیده، چرا که این باکتری‌ها اغلب مقاومت چند دارویی را نشان می‌دهند و این در حالی است که ۶۱/۴ درصد از بیماران ICU تحت درمان ضد میکروبی قرار می‌گیرند (۳ ، ۱۹ و۲۰).

[1] *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*

۲-۲ مقاومت آنتی بیوتیکی:

استفاده از عوامل آنتی‌بیوتیک در درمان بیماری‌های عفونی تا حد زیادی به کاهش بیماری و مرگ و میر بیماران کمک کرده است، علارغم پیشرفت‌های بزرگ در زمینهء درمان این مسئله با افزایش مقاومت به مواد ضد میکروبی روبروشده است (۲۷). در دهه‌های گذشته، ما شاهد افزایش مداوم مقاومت ضد میکروبی در میان عوامل بیماری‌زای بیمارستانی و همچنین عوامل بیماری‌زا در جامعه بوده‌ایم، اگر چه مقاومت ضد میکروبی یک پدیده نسبتاً جدید است که بر روی شرایط بالینی تأثیر می‌گذارد، اما ماهیتی باستانی و گسترده دارد (۲۴). باکتری‌های بیماری‌زا از طریق مکانیسم‌های مختلف، مانند بدست آوردن ژن مقاومت، تغییر در پروتئین‌های غشای خارجی، جهش در محل فعال آنزیم‌ها و مهار رقابتی در برابر انواع مختلف آنتی بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند. بسیاری از ژن‌های مقاومت بر روی پلاسمیدها و عناصر ژنتیکی متحرک قرار دارند که به راحتی می‌توانند مقاومت را در بین گونه‌های مختلف باکتریایی، به ویژه باکتری‌های گرم منفی منتقل کنند (۲۱، ۲۴ و۲۶). با این حال، نگران کننده ترین مسئله در زمینه‌های بالینی، مقاومت به دست آمده توسط عوامل بیماری زا در برابر داروهای ضد میکروبی موجود است (۲۴).


Emergence of Antibiotic Resistance Over Time
Penicillin
Tetracycline
Erythromicin
Methicillin
Gentamicin
Vancomycin
Ceftazadime
Imipenem-cilistatin
Ciprofloxacin
Levofloxacin
Linezolid
Daptomycin
Ceftaroline
Ceftolazone-tazobactam
Ceftazadime-avibactam
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
Year

تصویر ۱-۲: داروی‌های ضد میکروبی متداول همراه با برخی از داروهای تأیید شده جدید که به طور خاص برای مقابله با مقاومت آنتی بیوتیکی طراحی شده اند. در تصویر فوق نوار هر آنتی بیوتیک با سال معرفی آن شروع می‌شود و با سالی که مقاومت in vitro به آن رخ داده است پایان می‌پذیرد نشان داده شده است(اقتباس شده ازرفرنس شماره (۲۸)).

سازمان بهداشت جهانی و سازمان ملل متحد مقاومت ضد میکروبی[1] را به عنوان یکی از مهمترین تهدیدهای بهداشت عمومی در قرن ۲۱ نامگذاری کرده است چرا که این موضوع مسئلهء کشف و توسعه عوامل ضد میکروبی بعدی را تحت تاثیر قرار داده است. به طور معمول مقاومت در برابر یک ماده ضد میکروبی در طی ۱۰ سال یا کمتر پس از معرفی آن در بازار ظاهر می‌شود که نشان از سرعت بالای گسترش مقاومت به مواد ضد میکروبی در سراسر جهان دارد، بنابرین مسئله عدم وجود داروهای ضد میکروبی جدید و ظهور عوامل بیماری زا مقاوم در برابر همه داروهای ضد میکروبی موجود، نگران کننده است. میکروارگانیسم‌ها ممکن است به صورت ذاتی در برابر برخی از مواد میکروبی مقاوم باشند. مقاومت چند دارویی(MDR)[2] به عنوان مقاومت اکتسابی به حداقل یک عامل در سه یا چند گروه از مواد ضد میکروبی تعریف شده است که گزینه‌های کمتری برای درمان موثر این نوع عفونت ها در دسترس است (۲۴ و ۲۶).

در حال حاضر، نگرانی‌های اصلی پیرامون مقاومت ضد میکروبی در میکروارگانیسم‌های گرم منفی است (۲۸). باکتری‌های گرم منفی یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زای بیمارستانی بوده و بیشترین تعداد عفونت را در بخش مراقبت‌های ویژه ایجاد می‌کنند (۲۴)، بنابرین مسئله مقاومت باکتری-

[1] Antimicrobial Resistance (AMR)
[2] [2] Multiple drug resistance

های گرم منفی در بخش مراقبت‌های ویژه بسیار نگران کننده است (۲۹). مقاومت چند داروئی در عفونت باکتری‌های گرم منفی چالش اصلی در سراسر جهان محسوب می‌شوند، مقاومت در باکتری‌های گرم منفی از ۹ درصد در اروپای غربی تا ۴۶ درصد در آفریقا و خاورمیانه متغیر است (۳۰). عوامل بیماری‌زای خاصی که به واسطه مقاومت آنتی بیوتیکی بسیار بالا منجر به هراس می‌شوند عبارتند از: انتروباکتریاسه تولید کننده β- لاکتامازهای وسیع الطیف(ESBLs) و کارباپنماز(CREs)، *سودموناس آئروژینوزا* MDR و *آسینتو باکتر بومانی* مقاوم به کرباپنم ها می‌باشند. از نظر بالینی، مهم است بدانیم مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در بخش ICU چه تغییری کرده است، چراکه بسیاری از باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی مستعد آنتی بیوتیک هستند، در حالی که این آنتی بیوتیک‌ها در شرایط بالینی موثر نیستند (۲۰).

۱-۲-۲ β- لاکتاماز های وسیع الطیف (ESBLs):

خانواده انتروباکتریاسه[1] رایج‌ترین باکتری‌های گرم منفی هستند که با مقاومت در برابر چندین گروه از آنتی بیوتیک‌ها مرتبط می‌باشند و اغلب گزینه‌های درمانی را به خطر می‌اندازند(۲۴)، این خانواده به یکی از مهمترین علل عفونت‌های بیمارستانی و اجتماعی تبدیل شده اند (۳۱). از دهه ۱۹۵۰، عفونت‌های ناشی از انتروباکتریاسه با آنتی بیوتیک‌های β- لاکتام[2] درمان می‌شدند، این دسته از آنتی بیوتیک‌ها با تقلید از انتهای طبیعی D-alanine-D-alanine بعنوان پیش ساز پپتیدوگلیکان، به پروتئین‌های PBPs[3] متصل شده تا سنتز دیواره سلولی باکتری را مهار و فعالیت باکتری‌کشی خود را اعمال

[1] Enterobacteriaceae
[2] β-Lactam antibiotic
[3] Penicillin-binding proteins

می‌کنند. پروتئین‌های PBPs مسئول ترانس پپتید شدن و ترانس گلیکوزیلاسیون در دیواره سلولی باکتری هستند (۳۱ و ۳۲). در دهه ۱۹۸۰ میلادی به دنبال معرفی و تولید نسل سوم سفالوسپورین‌های وسیع طیف، میکروارگانیسم‌های تولید کننده β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) ظهور کرده و به یک نگرانی بهداشت عمومی جهانی تبدیل شده است. اولین مورد از ارگانیسم‌های تولید کننده β- لاکتامازهای وسیع الطیف در سال ۱۹۸۳ در آلمان و در سال ۱۹۸۸ میکروارگانیسم‌های اولیه تولید کننده این نوع از مقاومت در اسپانیا توصیف شدند، از آن پس، شیوع این ارگانیسم‌ها در سراسر اروپا، ایالات متحده آمریکا و آسیا گزارش شده است (۳۱). β - لاکتامازها آنزیم‌های باکتریایی هستند که در کروموزوم یا پلاسمیدها کدگذاری شده اند و میکروارگانیسم‌ها را از اثرات کشنده آنتی بیوتیک‌های β- لاکتام محافظت می‌کنند. این آنزیم‌ها پیوند آمیدی حلقه β- لاکتام‌ها را می‌شکنند و دارو را غیرفعال می‌کنند (۲۴). از طرفی قرارگیری ژن‌های تولید کنندهء ESBLs بر روی پلاسمیدها منجر به انتشارسریع و گسترده این ژن‌ها در جمعیت باکتری‌ها می‌گردد (۳۳ و ۳۴). مطالعات جدید نشان داده‌اند که تولید ESBLs درخانواده انتروباکتریاسه در مقایسه با باکتریمی ناشی از انتروباکتریاسه فاقد مقاومت به β-لاکتاماز ها با طیف گسترده با مرگ و میر بیشتری همراه است (۳۵). تولید β- لاکتاماز با طیف گسترده بعنوان یکی از مهمترین مکانیسم‌های مقاومت در بین پاتوژن‌های گرم منفی و همچنین بعنوان زیر بنا درسایر مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در سراسر جهان، به تهدید بزرگی برای سلامت انسان تبدیل گشته است. آنتی بیوتیک‌های β- لاکتام انتخاب اصلی مورد استفاده برای درمان این عفونت ها را تشکیل می‌دهند با این حال، مقاومت در برابر این ترکیبات در چند سال گذشته افزایش یافته است بنابرین درمان عفونت با عوامل انتروباکتریاسه تولید کننده β- لاکتامازها دشوار شده و با افزایش عوارض، هزینه‌های بهداشتی و مرگ و میر همراه می‌باشد (۳۶).

β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)، سفالوسپورین‌های طیف گسترده شامل نسل اول، دوم و سوم سفالوسپورین‌ها، همچنین پنی‌سیلین‌ها و مونوباکتام‌ها را هیدرولیز می‌کنند، البته درشرایط in vitro توسط مهارکننده‌های β- لاکتاماز مانند کلاوولانیک اسید و تازوباکتام مهار می‌شوند. پاتوژن‌های تولیدکننده β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) اغلب ممکن است به سایر مواد ضد میکروبی مانند فلوروکینولون[1]ها، آمینوگلیکوزید[2]ها و تری متوپریم سولفامتوکازول[3] (TMP-SMX) مقاومت نشان دهند اما روی کرباپنم‌ها و سفامایسین‌ها تاثیری ندارد (۳۳، ۳۶ و۳۷).

اغلب β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)، مهم بالینی متعلق به خانواده bla_{TEM}[4]، خانواده‌هایbla_{SHV}[5] و خانوادههای bla_{CTX-M}[6] هستند که بار عفونت‌های ناشی از این سویه‌های مقاوم بسیار زیاد است (۲۷). در خانواده انتروباکتریاسه بیشترین تولیدکننده β- لاکتامازهای طیف گسترده (ESBLs)، معمولا در گونه‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* پدیدار شده است (۳۱-۳۳).

اشریشیاکلی و *کلبسیلا نمونیه* ارگانیسم‌های گرم منفی، پاتوژن‌های باکتریایی فرصت طلب و از شایع ترین عوامل بیماری‌زا در عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند اما درعفونت‌های مربوط به جامعه نیز به طور گسترده ذکر شده‌اند. این دو باکتری عمدتا در دستگاه تنفسی فوقانی و روده‌های انسان وجود دارند با این وجود می‌توانند در طیف وسیعی از بیماری‌ها همانند عفونت‌های دستگاه تنفس (پنومونی)، عفونت زخم، عفونت دستگاه گوارش، عفونت-

[1] Fluoroquinolone
[2] Aminoglycoside
[3] Trimethoprim / Sulfamethoxazole
[4] Temoniera
[5] Sulfhydryl
[6] Cefotaximase-Munich

های جریان خون(باکتریمی)، عفونت بافت نرم، عفونت مجاری ادراری و... نقش داشته باشند. *کلبسیلا*از معدود باکتری‌های گرم منفی است که منجر به ذات الریه شده و همچنین نیمی از عفونت‌های دستگاه ادراری در ایالات متحده به علت این باکتری رخ می‌دهد. باکتری‌های ذکر شده دارای ژنوم نسبتا بزرگی هستند که سبب تنوع متابولیکی و بیوشیمیایی آنها شده و همچنین منجر به موفقیت آنها در شرایط بالینی می‌گردد. تکامل این ارگانیسم‌ها عامل اکثر عفونت‌های باکتریایی مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌ها شده که به طور مداوم به آنتی بیوتیک‌های جدید نیاز دارند (۳۸-۴۰).

تولید کننده β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) توسط این نوع از باکتری‌ها منجر به مقاومتشان به چندین کلاس از آنتی بیوتیک‌ها و محدودیت گزینه‌های درمانی شده است. طیف گسترده از مقاومت و افزایش شیوع این دسته از باکتری‌ها سبب نگرانی شده است. امروزه میزان تشخیص باکتری تولید کننده β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) به طور چشمگیری در سراسر جهان افزایش یافته است، با این وجود میزان شیوع این نوع باکتری با توجه به قاره‌ها متفاوت است بطوری که در آسیای جنوب شرقی، آفریقا و آمریکای مرکزی میزان شیوع بسیار بالا و میزان شیوع پایین در حدود ۱۰ درصد در جمعیت اروپای غربی را تشکیل می‌دهند (۱۴ و ۴۱).

دستگاه گوارش بیماران تحت معالجه بعنوان مخزن اصلی *اشریشیاکلی* تولید کننده β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) معرفی شده است. انتقال عناصر ژنتیکی متحرک از یک گونه یا بین گونه‌های مختلف خانواده انتروباکتریاسه امکان پذیر است، با این وجود میزان و بار انتقال بین گونه‌های مختلف متفاوت است. میزان انتقال بیماران آلوده به *کلبسیلا نمونیه* تولید کننده β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) حداقل دو برابر بیشتر از بیماران آلوده به *اشریشیا کلی* تولید کننده β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) می‌باشد. اخیرا یک مطالعه انجام شده در هلند میزان انتقال ۱۰ درصد برای

انتروباکتر کلواکه، ۱۱ درصد برای *کلبسیلا نمونیه* و ۴/۴ درصد برای *اشریشیا کلی* نشان داده است، با این حال، ۶۱ درصد از انتقال ژن β- لاکتامازهای وسیع الطیف به اشریشیاکلی نسبت داده شده اند. اولین گزارشات β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) در بیمارستان‌ها از اواسط دههء ۱۹۸۰ میلادی در دو باکتری *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* بود که با شیوع گونهء *کلبسیلا نمونیه*‌های حامل مشتقات bla_{SHV} و bla_{TEM} آغاز گشته است، در اوایل قرن ۲۰ میلادی کلون‌های bla_{CTX-M} در *اشریشیاکلی* مشاهده شد و امروزه در بین سایر گونه‌ها بشدت پراکنده شده است. بنابرین به احتمال زیاد باکتری *اشریشیا کلی* به عنوان مخزن عناصر ژنتیکی متحرک بین سایر گونه‌های انتروباکتریاسه عمل می‌کند (۱۴ ، ۳۳ و ۳۴).

۲-۲-۲ کاربانماز[1]:

درمان میکروارگانیسم‌های تولید کننده β- لاکتامازهای وسیع الطیف(ESBLs) همچنان یک چالش باقی مانده است. با در نظر گرفتن برآوردهای اخیر ایالات متحده مبنی بر اینکه حداقل ۲ میلیون نفر به میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی بیوتیک آلوده شده و ۲۳۰۰۰ نفر در نتیجه آن جان خود را از دست می‌دهند، نیاز شدیدی به مشخص کردن انواع β- لاکتامازهای وسیع الطیف(ESBLs) ، به منظور کمک به درمان بیماران نیازمند، به ترکیبات آنتی بیوتیکی جهت درمان تجربی موثر وجود دارد، با این حال بسیاری از داروهای آنتی‌بیوتیکی که در حال حاضر برای درمان تجربی مورد استفاده قرار می-گیرند، ناکافی هستند (۳۳).

[1] Carbapenemases

آنتی بیوتیک‌های کارباپنم، در سال ۱۹۸۵ به منظوراستفاده بالینی مطرح شدند. این دسته گروه دیگری از عوامل آنتی بیوتیکی β- لاکتام می-باشند که هنوز به عنوان خط اول درمان برای عفونت‌های شدید ناشی از انتروباکتریاسه و بخصوص *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* مقاوم به چند دارو و تولید کننده β- لاکتامازهای وسیع الطیف(ESBLs) مورد استفاده قرار می‌گیرند و یک جایگزین درمانی ایده‌آل محسوب می‌شوند (۳۳، ۴۱ و ۴۲).

با این حال، متأسفانه استفاده گسترده از این دسته از عوامل آنتی بیوتیکی منجر به ایجاد باکتری های مولد آنزیم هیدرولیز کننده کارباپنم، تحت عنوان کارباپنماز شده است. این دسته از باکتری‌ها، آنزیم‌هایی را تولید می‌کنند که سبب هیدرولیز کرباپنم‌ها و سایر آنتی‌بیوتیک‌های β- لاکتام از جمله پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و مونوباکتام‌ها به درجات مختلف می‌گردد. داده‌های شبکه نظارت بر عوامل ضد میکروبی افزایش مقاومت هشت برابری را نسبت به آنتی بیوتیک‌های ایمی پنم و مروپنم در سال‌های ۲۰۰۵ با میزان ۳ درصد و ۲/۹ درصد و مقدار ۲۵ درصد و ۲۶/۳ درصد در سال ۲۰۱۸ به ترتیب برای این دو آنتی بیوتیک گزارش کرده است. در سال ۱۹۹۶ اولین کارباپنماز کد شده توسط ژن bla_{KPC} در *کلبسیلا نمونیه* در شهر نیویورک شناسایی شد. متعاقباً، ژن‌های دیگر کارباپنماز مانند bla_{NDM}، bla_{OXA-48}، bla_{VIM} و bla_{IMP-1} ظهور کردند (۱۴، ۴۱ و ۴۳).

β- لاکتام‌ها توسط دو سیستم طبقه بندی، آمبلر (کلاسA-D) که بر اساس هویت توالی اسید آمینه یا سیستم بوش-جاکوبی (گروه ۱-۳) بر اساس فعالیت‌های بیوشیمیایی و ویژگی بستر طبقه بندی می‌شوند.

آنزیم‌های کارباپنماز متعلق به کلاس مولکولی A، B (آنزیم‌های متال -β -لاکتامازها) یا D در طبقه بندی آمبلر هستند . شایع‌ترین کارباپنماز در ایالات متحده یک آنزیم پلاسمیدی با نام bla_{KPC} است که عمدتا در گونه‌های *کلبسیلا نمونیه* گزارش شده است، با این حال در سایر باکتری‌های گرم

منفی نیز وجود دارد. بر خلاف آنزیم‌های کلاس A ،C وD که دارای اسید آمینه سرین در محل کاتالیزوری خود هستند، متالو-β- لاکتامازهای کلاس B از یون فلزی به عنوان کوفاکتور برای هیدرولیز در واکنش‌های خود استفاده می‌کنند و توسط یون مهار می‌شوند.

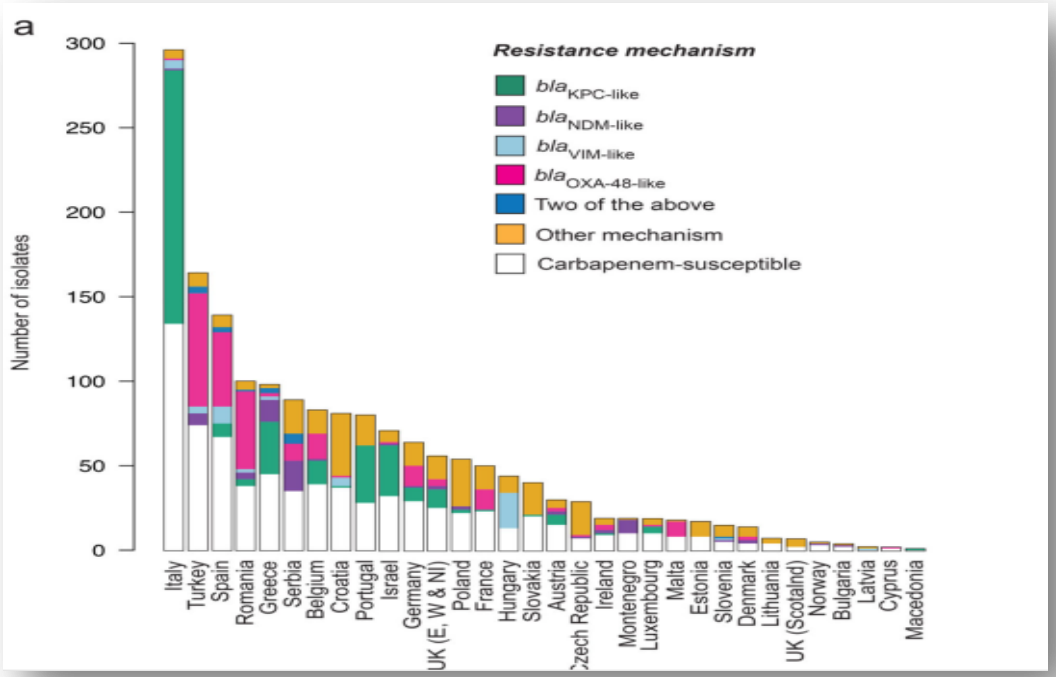
متالو-β-لاکتامازهای مرتبط به کلاس B شامل ژن‌های bla_{IMP} ،bla_{VIM} و bla_{NDM} در سراسر جهان گسترش یافته اند. در میان آنها، ژن bla_{NDM}، که برای اولین بار در هند از *کلبسیلا نمونیه* جدا شد گسترده ترین ژن موجود است که وجود bla_{NDM-1} اغلب با فنوتیپ MDR همراه است. ژن bla_{NDM} در چندین پلاسمید قابل انتقال یافت شده است و در بیش از ۱۴ نوع از آن در بین باکتری‌های گرم منفی توصیف شده است.

در میان کاربانمازهای کلاس D، آنزیم های مشابه bla_{OXA-48} در خانواده انتروباکتریاسه بسیارشایع هستند. پلاسمید pOXA-48a با قدرت انتقال بسیار بالا، مسئول انتشار سریع ژن bla_{OXA-48} در سایر انتروباکتریاسه می‌باشد. ۱۰ نوع ژن bla_{OXA-48} شناسایی شده است که مقاومت در برابر اکثر β- لاکتام ها را رمزگذاری می‌کند. این آنزیم‌ها باعث نگرانی در بالین شده‌اند چرا که انواع جدید ژن $bla\text{-}_{OXA}$ دارای فعالیت ESBLs هستند و می‌توانند سبب کاهش حساسیت به سفالوسپورین‌های نسل سوم (bla_{OXA-11} در *سودموناس آئروژینوزا*) یا کاربانم‌ها (bla_{OXA-23} در *آسینتوباکتر بومانی*) شوند. سفالوسپورینازهای کلاس C عموماً آنزیم‌های کروموزومی می‌باشند که در پاتوژن‌های اصلی مرتبط با مراقبت‌های بهداشتی از جمله *آسینتوباکتر*، *سودموناس*، خانواده انتروباکتریاسه مانند *انتروباکتر*، *سیتروباکتر* و با انتشار کمتر در *سراشیا* وجود دارند (۳۹).

جدول ۲-۲ : در جدول زیر طبقه بندی آمبلر برای برای کاربانماز و β –لاکتامازها نشان داده شده است (اقتباس از رفرنس شماره (۳۹)).

Ambler classification	A	B	C	D
Active Site	Serine	Metallo (Zinc-binding thiol)	Serine	Serine
Substrates	Ampicillin, cephalothin, penicillins, 3rd generation cephalosporins, Extended spectrum cephalosporins, carbapenems	All β-lactams	Cephamycin, 3rd generation cephalosporins	Cloxacillin, Extended-spectrum cephalosporins, carbapenem
Classical Examples	Penicillinase: TEM-1, SHV-1 Extended spectrum β-lactamase (ESBL): CTX-M, TEM-3 carbapenemase: KPC	Carbapenemase: IMP, VIM, NDM	ESBL: AmpC	ESBL: OXA-11 carbapenemase: OXA-23, OXA-48

ظهور و گسترش سریع انتروباکتریاسه مقاوم به کاربانپم‌ها بعنوان شکست بزرگ در درمان موثر عفونت‌های باکتریایی گرم منفی محسوب می‌شود، این نوع مقاومت در نقاط مختلف جهان، از جمله اروپا، شبه قاره هند و ایالات متحده آمریکا گسترش یافته است. ویژگی مهمی که انتشار ژن‌های کاربانپماز را تسهیل کرده است وجود عناصر متحرک مرتبط هستند که می‌توانند بین گونه‌های باکتریایی پخش شوند. خانواده انتروباکتریاسه و بخصوص *کلبسیلا نمونیه* تمایل زیادی به کسب پلاسمید حاوی ژن‌های متعدد مقاومت از جمله: β- لاکتامازهای وسیع الطیف ESBLs با ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{TEM}، bla_{SHV} ، bla_{OXA} و ژن‌های کد کننده کاربانپماز شایع، bla_{KPC}، bla_{NDM} و bla_{IMP} دارند(۳۹). مطالعات اخیر نشان داده اند که *کلبسیلا نمونیه* مقاوم به کاربانپم از نظر عوارض و مرگ و میر انسان‌ها سریعترین رشد مقاومتی را در برابر آنتی بیوتیک‌ها نشان می‌دهد (۴۰).



تصویر ۲-۲: اپیدمیولوژی *کلبسیلا نمونیه* حساس و مقاوم به کاربانپم به همراه نوع کاربانپنمازها در اروپا را با استفاده از داده‌های ژنومی برای ۱۷۱۷ نمونه‌های بالینی از ۲۴۴ بیمارستان در ۳۲ کشور جهان طی یک بررسی شیوع شش ماهه بدست آمده است (اقتباس از رفرنس(۴۴).

(WHO)، مقاومت بالا و گسترش سریع میکروارگانیسم‌های مقاوم در برابر مواد ضد میکروبی همچنین عدم دسترسی عوامل موثر ضد میکروبی موثر را به عنوان "دوران پس از آنتی بیوتیک" معرفی کرده است، جایی که مردم به علت عفونت‌های رایج و آسیب‌های جزئی از بین می‌روند، و در این مورد هشدار داده است (۲۶، ۴۲ و ۴۵). هنگام انتخاب رژیم‌های آنتی بیوتیکی باید الگو مقاومت انتروباکتریاسه در نظرگرفته شود همچنین نباید آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف بعنوان درمان تجربی استفاده گردد. با توجه به نگرانی روز افزون در مقاومت باکتری‌های گرم منفی، استفاده از دو آنتی بیوتیک با مکانیسم عمل مختلف به ویژه در مناطق با مقاومت باکتریایی بالا برای درمان تجربی عفونت اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. بدیهی است که میزان و نوع مقاومت در منطق جغرافیای متفاوت است، بنابراین شناسایی عوامل باکتریای و نوع مقاومت در تعیین استراتژی برای مبارزه با باکتری های مقاوم کلیدی است (۱۹ و ۲۶).

۳-۲ بررسی متون:

در مطالعه‌ای که توسط آقای نوبخت و همکارانش، در سال ۲۰۱۲ در بیمارستان امام رضا (ع) شهر مشهد صورت گرفت *کلبسیلا نمونیه*، به عنوان شایعترین باکتری ایجادکننده عفونت بیمارستانی گزارش شد (۴).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ توسط خانم قنبری و همکارانش در بیمارستان شریعتی اصفهان صورت گرفت، شایعترین باکتری ایجاد کننده عفونت بیمارستانی *اشریشیا کلی* گزارش شد (۹).

در یک مطالعه که توسط آقای صیدی مهر و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در بیمارستان نفت اهواز صورت گرفت، *اشریشیا کلی* با میزان ۴۳ درصد به عنوان باکتری غالب در ایجاد عفونت بیمارستانی گزارش شد (۱۷).

در مطالعه‌ای که سال ۲۰۱۷ توسط خانم اشرافیان و همکارانش، در شهر مشهد صورت گرفت بیشترین باکتری مقاوم با تولید β- لاکتامازهای وسیع الطیف(ESBLs)، *اشریشیاکلی* و سپس *کلبسیلا نمونیه* گزارش شد (۴۶).

در مطالعه‌ای که سال ۲۰۱۹ توسط آقای Agero perez و همکارانش صورت گرفت بیشترین میکروارگانیسم مقاوم تولید کننده β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)*اشریشیاکلی* با ۷۰ درصد، سپس *کلبسیلا نمونیه* با ۲۰ درصد گزارش شد (۴۷).

در مطالعه‌ای که توسط آقای نصیری و همکارانش در بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۲۰۱۹ صورت گرفت، باکتری شایع عامل عفونت بیمارستانی *اسینتو باکتر بومانی*، سپس *اشریشیا کلی* گزارش شد (۴۸).

در طی مطالعه ای که در طی سال‌های ۲۰۱۸ تا ۲۰۱۹ توسط خانم خمر و همکارانش در شهر مشهد به منظورت بررسی تغییرات الگوی مقاومت در عفونت های بیمارستانی صورت گرفت، بیشترین باکتری جدا شده به ترتیب *آسینتو باکتر بومانی*،*کلبسیلا نمونیه*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بودند. در طی چهار سال *اشریشیا کلی* دارای تغییرات بسیار شدید مقاومت بود درحالی بود که در الگوی مقاومت *کلبسیلا نمونیه* تغییر محسوسی مشاهده نشد (۲۱).

در طی مطالعه ای که توسط Surgers و همکارانش در سال ۲۰۱۷ در کشور فرانسه به منظور بررسی انتروباکتریاسه تولید کننده β- لاکتاماز های وسیع اطیف (ESBLs) بر روی ۴۴۵ جدایهء صورت گرفت، *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا* نمونیه با ۲۰۰ و ۱۲۳ جدایهء بیشترین مورد را به خود اختصاص دادند، همچنین همانطور که مورد انتظار بوده ۹۲/۹ درصد از جدایه‌ها تولید کننده ژن ESBLs از نوع bla_{CTX-M} بودند (۳۳).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۷ توسط Repessé و همکارانش در فرانسه به منظور بررسی انتروباکتریاسه تولید کننده β- لاکتامازهای وسیع الطیف در بخش مراقبت های ویژه (ICU) صورت گرفت *اشریشیاکلی* مهمترین عامل تولید کننده β- لاکتاماز وسیع الطیف(ESBLs) مطرح گشت (۳۶).

در طی مطالعه ای که توسط Luo و همکارانش در سال ۲۰۲۰ در چین، به منظور بررسی مولکولی عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *کلبسیلا نمونیه* صورت گرفت مشخص شد از بین ۸۰ نمونه *کلبسیلا نمونیه* ۵۸ سویه تولید کننده ESBLs و ۱۲ سویه تولید کننده کاربا‌پنماز بودند. در بین ۱۲ نمونه تولید کننده کاربا‌پنماز هشت مورد دارای ژن bla_{NDM-5} , دو مورد تولید کننده bla_{NDM-1} و دو مورد دارای bla_{IMP-4} بودند.(۳۹).

فصل سوم

روش پژوهش

۱–۳ روش جداسازی و تشخیص فنوتیپی نمونه ها:

مطالعه حاضر به صورت توصیفی- مقطعی صورت گرفته است، نمونه‌های باکتریایی مطالعه حاضر در مقطع زمانی مشخص از ۱۵ تیر ماه سال ۱۳۹۹ لغایت ۱۵ دی ماه ۱۳۹۹ به مدت ۶ ماه از بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستان آموزشی امام خمینی(ره) که شامل بخش یک و بخش دو بودند جمع‌آوری شد. نمونه‌های مورد نظر از بیمارانی که از زمان بستری شدن آنها در بیمارستان حداقل ۴۸ تا ۷۲ ساعت گذشته بود و از نظر عفونت بیمارستانی توسط پزشک تایید شده بودند از نمونه های بالینی مختلف مانند: ترشحات تنفسی، ادرار، زخم، خون و ...به دست آمد. از تست-های تشخیص فنوتیپی و بیوشیمیایی به منظور تشخیص باکتری‌های عامل عفونت استفاده شد که این فرآیند طبق مراحل زیل صورت گرفت:

۱–۱–۳ کشت در محیط بلاد آگار[1]:

بلاد آگار یک محیط کشت غنی می‌باشد. خون موجود در این محیط سبب رشد طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا بخصوص موارد سخت رشد می‌گردد، همچنین از این محیط کشت به منظور تشخیص همولیز باکتری ها استفاده می‌شود.

[1] Blood agar

نمونه‌های بالینی را به جهت خالص سازی و رشد هر دو نوع باکتری گرم مثبت و منفی و همچنین بررسی انواع همولیز بتا، آلفا یا بدون همولیز بر روی محیط بلاد آگار بصورت چهار منطقه ای کشت داده شد. کلنی‌های تک و خالص از هر نمونه به منظور تفکیک باکتری گرم مثبت و منفی مجددا بر روی محیط کشت بلاد آگار و مک کانکی آگار کشت داده شد و مراحل بعدی تشخیص جدایه‌ها صورت گرفت.

۲-۱-۳ محیط کشت مک کانکی آگار[1]:

این محیط کشت بصورت انتخابی و افتراقی می‌باشد، محیط کشت مک کانکی آگار برای جداسازی انتخابی باکتری‌های گرم منفی و متمایز کردن آنها بر اساس تخمیر لاکتوز طراحی شده است همچنین، بواسطه حضور نمک‌های صفراوی و کریستال ویوله سبب مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت می‌گردد. باکتری‌های گرم منفی با تخمیر یا عدم تخمیر لاکتوز بر روی این محیط به دو دسته لاکتوز مثبت و لاکتوز منفی تقسیم می‌شوند، معرف این محیط کشت نوترال رد می‌باشد که در PH اسیدی و کلنی‌های به رنگ صورتی و در قلیایی ایجاد کلنی‌های به رنگ محیط می‌نماید.

نمونه‌ها جهت تفکیک باکتری گرم مثبت و منفی و نیز برای تشخیص لاکتوز مثبت و منفی بودن در باکتری‌های گرم منفی، بر روی محیط کشت مک کانکی آگار کشت داده شدند. کشت بر روی محیط مک کانکی آگار در تشخیص باکتری‌های گرم منفی کمک کننده است.

[1] MacConkey agar

۳-۱-۳ تست کاتالاز[1]:

این آزمایش وجود آنزیم کاتالاز در باکتری را نشان می‌دهد، آنزیم کاتالاز واسطه تجزیه پراکسید هیدروژن به اکسیژن و آب می‌باشد. از این تست برای تمایز باکتری‌هایی که آنزیم کاتالاز تولید می‌کنند مانند استافیلوکوکوس (کاتالاز مثبت) ازباکتری‌های فاقد کاتالاز مانند استرپتوکوکوس‌ها (کاتالاز منفی) استفاده می‌شود. آزمایش کاتالاز می‌تواند در شناسایی خانواده انتروباکتریاسه (کاتالاز مثبت) کمک کننده باشد. تست کاتالاز به شرح زیر استفاده شده است:

از یک لوپ پلاستیکی برای انتقال کلونی تک استفاده شد و مقدار کمی از کلنی باکتری برداشته و روی لام شیشه ای تمیز قرار داده شد، در ادامه یک قطره از آب اکسیژنه ۳ درصد به کلنی اضافه گردید. تولید حباب‌های اکسیژن نشان دهنده مثبت بودن تست کاتالاز می‌باشد که در این صورت واکنش مثبت گزارش گردید و در صورت عدم تولید حباب اکسیژن باکتری بعنوان کاتالاز منفی در نظر گرفته شد.

۴-۱-۳ تست اکسیداز[2]:

[1] Catalase Test

[2] Oxidase Test

تست اکسیداز برای تعیین وجود آنزیم سیتوکروم اکسیداز در باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. ارگانیسم‌های حاوی سیتوکروم، آنزیم اکسیداز درون سلولی تولید می‌کنند. آنزیم اکسیداز، اکسیداسیون سیتوکروم c را کاتالیز می‌کند بنابرین ارگانیسم‌های که حاوی سیتوکروم c به عنوان بخشی از زنجیره تنفسی خود هستند، اکسیداز مثبت بوده و دیسک حاوی معرف اکسیداز را آبی/ بنفش می‌کنند. ارگانیسم‌های فاقد سیتوکروم c بصورت بی‌رنگ باقی می‌ماند و اکسیداز منفی در نظر گرفته می‌شوند. روش انجام تست اکسیدار به شرح زیر صورت پذیرفت:

به وسیله لوپ فیلدوپلاتین کلنی باکتری بر روی دیسک اکسیداز قرار داده شد، سپس یک قطره آب مقطر استریل به آن اضافه گردید، واکنش مثبت با رنگ بنفش شدید در عرض ۵-۱۰ ثانیه نشان داده شد و در صورت عدم وجود رنگ بنفش بعد از ۶۰ ثانیه واکنش منفی اعلام گردید. این تست بیشتر برای تمایز خانواده انتروباکتریاسه و *آسینتو باکتر* اکسیداز منفی از *سودموناس* اکسیداز مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

۵-۱-۳ رنگ آمیزی گرم[1]:

روش رنگ آمیزی گرم برای تمایز و طبقه بندی گونه‌های گرم مثبت و گرم منفی بعنوان اولین تست در شناسایی باکتری ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. رنگ آمیزی گرم باکتری ها را از نظر ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی دیواره سلولی متمایز می کند. در رنگ آمیزی گرم باکتری‌های گرم مثبت به

[1] Gram staining

رنگ بنفش و باکتری های گرم منفی به رنگ قرمز دیده می شوند. رنگ آمیزی گرم تقریباً اولین قدم در شناسایی اولیه یک ارگانیسم باکتریایی می باشد و سبب هدایت در انجام تست های تشخیصی بعدی متناسب با باکتری گرم مثبت یا منفی می‌گردد.

پس از انجام رنگ آمیزی گرم از محیط‌های کشت اختصاصی برای شناسایی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت استفاده گردید که به شرح زیر می‌باشند:

۶-۱-۳ تست IMVIC:

این تست شامل ۴ آزمایش و ۶ نتیجه می‌باشد و شاید بعنوان مهمترین آزمایش پس از رنگ آمیزی گرم برای شناسایی باکتری‌ها بخصوص باکتری‌های گرم منفی در نظر گرفته شود. این تست ها دارای واکنش‌های پایداری هستند بنابرین نسبت به نتایج قند از ارزش بیشتری برخوردارند.

محیط کشت SIM: این محیط کشت افتراقی و بصورت عمقی بوده که امکان بررسی ۳ آزمایش، تولید سولفید هیدروژن (گاز H2S)، تولید ایندول و تحرک در آن امکان پذیر است. باکتری‌هایی که آنزیم تریپتوفاناز دارند، می‌توانند اسید آمینه تریپتوفان را به ایندول تبدیل کنند. تولید ایندول با افزودن معرف کواکس قابل بررسی است. تولید ایندول در باکتری های مانند *اشریشیاکلی* با رنگ قرمز مشخص می‌گردد. این محیط کشت به وسیله فیلدپلاتین سوزنی طی یک ضربه به پایین لوله تلقیح شد. اگر یک ارگانیسم دارای تحرک باشد، رشد آن در محل تلقیح بصورت کدر و هاله ابر مانند مشخص می‌گردد مانند سویه *سودوموناس آئروژینوزا*.

سولفید هیدروژن به وسیله کاتابولیسم اسید آمینه سیستئین توسط آنزیم سیستئین دسولفوراز تولید می‌گردد، این واکنش با ایجاد یک رنگ سیاه در محیطSIM مشخص گردید.

آزمایشMRVP :

تست MR[1]: این تست براساس میزان فرآورده‌های اسیدی ناشی از متابولیسم گلوکز مشخص می‌گردد. در تست MR از معرف تازه متیل‌رد استفاده شدکه در شرایط تخمیراسیدی به رنگ قرمز دیده می‌شود و باکتری بعنوان MR مثبت در نظر گرفته شد و رنگ زرد نیز بعنوان منفی بودن تست در نظر گرفته شد.

تست(VP) [2]:

این واکنش ایجاد استیل متیل کربینول یا استوئین را از گلوکز نشان می‌دهد. برای انجام این آزمایش، به ازای هر یک میلی‌لیتر از محیط کشت، ۱۵ قطره محلول الکلی آلفا نفتول و ۱۰ قطره پتاس ۴۰ درصد اضافه شد. پس از مخلوط نمودن به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد، بروز رنگ صورتی- قرمز در محیط بعنوان مثبت بودن واکنش و رنگ زرد نیز نشان دهنده منفی بودن واکنش می‌باشد. *کلبسیلا* و *انتروباکتر* در این تست واکنش مثبت می‌دهند.

[1] Methyl red
[2] voges-proskauer

۳-۱-۷ محیط کشت سیمون سیترات[1]:

باکتری‌ها از سیترات به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند، محیط سیمون سیترات دارای معرف بروموتیمول آبی است که برای تشخیص این تست به کار می‌رود. باکتری‌هایی که دارای آنزیم‌های سیتراتاز، سیتراز و سیترات لیاز هستند، می‌توانند از سیترات استفاده نمایند که در pH خنثی به رنگ سبز و در pH قلیایی آبی رنگ می‌شود. برای انجام این تست، باکتری را بصورت عمقی و سپس سطحی کشت داده شد، سپس به مدت ۴۸ – ۲۴ ساعت در انکوبه ۳۷-۳۵ درجه نگهداری شد که در صورت رشد باکتری‌ها و ایجاد رنگ آبی، واکنش مثبت در نظر گرفته شد.

۳-۱-۸ محیط کلیگر آیرون آگار [2] (KIA):

در بسیاری از باکتری‌ها گلوکز اولین منبع کربن مورد استفاده است و در صورت اتمام این منبع باکتری متابولیسم خود را برای استفاده از دیگر منابع تغییر می‌دهد. در محیط کلیگر آیرون آگار باکتری در صورت تخمیر قندها اسید تولید می‌کند که باعث تغییر رنگ معرف موجود (فنل رد) از قرمز به زرد میشود .در این محیط در صورتی که باکتری قادر به تخمیر قندهای موجود نباشد برای تامین انرژی از پپتون استفاده می‌کند که با تولید مواد قلیایی رنگ معرف به قرمز تغییر می‌کند. باکتری‌ها فقط در شرایط هوازی قادر به متابولیسم پپتون هستند. مقداری از کلنی باکتری را با فیلدپلاتین

[1] Simmons Citrate agar
[2] Kligler Iron Agar

برداشته و ابتدا بصورت عمقی سپس سطحی کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه تغییرات مشاهده شد، در این محیط علاوه بر تخمیر قندها تولید سولفید هیدروژن و گاز CO2 تولید شده از باکتری نیز مورد بررسی قرار گرفت.

۹-۱-۳آزمایش اوره‌آز[1]:

باکتری‌هایی که دارای آنزیم اوره‌آز هستند، می‌توانند اوره را مصرف کنند و تولید آمونیاک، دی‌اکسید کربن و آب نمایند. آمونیاک حاصل با ترکیبات دیگر به کربنات آمونیم تبدیل شده و pH محیط قلیایی می‌گردد. معـــرف محیط فنل‌رد است که در pH ۸/۶ = نارنجی و در pH= ۸/۱ صورتی یا بنفش رنگ می‌شود. برای انجام تست، باکتری را به میزان کم بر روی محیط جامد اوره آز به صورت سطحی و یا یک لوپ داخل محیط مایع کشت داده شد و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوبه نگهداری شد. در صورت مثبت بودن تست، کل محیط مایع و سطح محیط جامد بنفش شده و در صورت منفی بودن تست، رنگ محیط زرد باقی می‌ماند.

۱۰-۱-۳ محیط کشت مانیتول سالت آگار[1]:

[1] Urease Test

این محیط کشت انتخابی برای شناسایی باکتری‌های بیماری‌زای استافیلوکوکوس توصیه شده است. این محیط دارای ۷/۵ درصد نمک و معرف فنول‌رد است و محیط کشت افتراقی برای تشخیص باکتری‌هایی است که در درصد بالای نمک می‌توانند رشد کنند. بین استافیلوکوکوس بیماری‌زا و توانایی آن‌ها برای تخمیر مانیتول رابطه مستقیم وجود دارد. تخمیر مانیتول در نتیجه تجمع تولید اسید پدیدار می‌شود که معرف فنل رد رنگ زرد ایجاد می‌کند و هاله زرد رنگی روی محیط و اطراف کلنی ها به وجود می‌آید، در حالی که باکتری هایی که توانایی تخمیر قند مانیتول را ندارند کلنی به رنگ قرمز/نارنجی ایجاد خواهند کرد.

روش انجام به این صورت می‌باشد که مقدار مناسبی از باکتری را برداشته و به روی محیط کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه نتایج برای تشخیص باکتری گرم مثبت تفسیر شد.

۳-۱-۱۱ تست DNase:

تقریباً تمامی *استافیلوکوکوس اورئوس‌ها* DNase مثبت هستند. باکتری‌ها را روی محیط DNase کشت داده شد و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و پس از آن چند قطره HCL یک نرمال روی کلونی‌ها می‌ریزیم. اگر در اطراف کلونی‌ها ناحیه شفاف ظاهر شد دلیل بر مثبت بودن تست و اگر ناحیه تیره و مات ایجاد شود دلیل بر منفی بودن آن است.

---

[1] Mannitol Salt Agar

۲-۳ نگهداری جدایه ها:

یک کلنی کشت خالص از هر جدایه باکتری که توسط فرآیند تشخیصی باکتری تایید شده بود در یک میکروتیوب حاوی ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت تریپتیک سوی براث به مدت ۶-۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه کشت داده شد و بعد از رشد باکتری‌ها ۲۰۰ میکرو لیتر گلیسرول به آن اضافه گردید و در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۳-۳ روش انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی(AST[1]):

یکی از اهداف این مطالعه بررسی مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی، در باکتری‌های عامل عفونت بیمارستانی جدا شده از بخش های یک و دو مراقبت های ویژه بیمارستان امام خمینی (ره) بود. تست حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن آگار[2] و بر اساس دستورالعمل CLSI 2020[3] انجام شد (۴۹).

۱-۳-۳ روش دیسک دیفیوژن آگار:

[1] Antimicrobial susceptibility testing
[2] Disk diffusion
[3] Clinical and Laboratory Standards Institute

جدایه های فریز شده از هر گونه باکتریایی از فریزر خارج و بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شد. پس تهیه از کشت ۲۴ ساعته جهت تهیه نیم مک فارلند[1] چند کلنی به محیط مولر هینتون براث تلقیح شد و میزان جذب نوری (OD[2]) آن با اسپکتروفتومتر بین ۰۸/ تا ۱/. تنظیم شد که این غلظت برابر نیم مک فارلند (۱/۵ ×۱۰[۸] CFU/ml) است و برای تست حساسیت آنتی بیوتیکی مورد استفاده قرارگرفت. در مرحله بعد یک سواپ استریل را داخل سوسپانسیون حاوی باکتری فرو برده تا به باکتری آغشته شود، در نهایت باکتری با کشت چمنی بر روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح شد. برای باکتری-های گرم منفی از دیسک‌های آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، تری متوپریم/سولفامتوکسازول (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم(۱۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفپودوکسیم (۱۰ میکروگرم) و برای باکتری های گرم مثبت از دیسک‌های ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، لینوزولید (۳۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۳۰ میکروگرم)، تیگاسایکلین (۳۰ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و تری متوپریم/سولفامتوکسازول (۳۰ میکروگرم) (TAV) استفاده گردید. دیسک‌های مورد نظر به فاصله ۱/۵ سانتی متر از لبه پلیت و ۲ سانتی متر از یکدیگر قرار داده و به مدت ۱۶-۱۸ ساعت کامل در انکوباتور ۳۵ درجه نگهداری شد ند. سپس بعد از ۱۶-۱۸ ساعت با استفاده از خط کش قطر هاله ایجاد شده اطراف دیسک اندازه گیری و نتایج حساسیت و مقاومت طبق (۲۰۲۰) CLSI بررسی گردید. به منظور بررسی کنترل کیفی دیسک‌های مورد

[1] McFarland standards
[2] Optical Density

استفاده از سویه استاندارد *E.coli* ATCC 25922 برای دیسک‌های گرم منفی و ازسویه *Staphylococcus aureus* 29213 برای دیسک‌های استفاده شده در باکتری های گرم مثبت، استفاده گردید(۴۹).

۲-۳-۳ تست تعیین β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) در باکتری *اشریشیا کلای* و *کلبسیلا نمونیه*:

باکتری‌های *اشریشیا کلی* و*کلبسیلا نمونیه* تولید کننده β- لاکتاماز های وسیع الطیف (ESBLs) به صورت غربالگری و نیز تاییدی مورد بررسی قرار گرفتند. مطابق با CLSI 2020 برای تعیین ESBLs در مرحله غربالگری از دیسک‌های سفپودوکسیم 10 میکروگرم، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و نیز آزترونام 30 میکروگرم استفاده شد. پس از ۱۶ تا ۱۸ ساعت قطر هاله مورد بررسی قرار گرفت، در صورت ایجاد قطر هاله مقاوم در هر کدام از دیسک‌های سفالوسپورین نسل سوم و یا مونوباکتام (آزترونام) تست تاییدی برای β- لاکتاماز های وسیع الطیف (ESBLs) انجام شد. در تست تاییدی از دیسک سفتازیدیم به تنهایی و دیسک ترکیبی سفتازیدیم به همراه مهار کننده (کلاولانیک اسید) استفاده شد، سپس قطر هاله برای باکتری مورد نظر روی محیط مولر هینتون آگار بررسی گردید، وجود قطر هاله عدم رشد به مقدار ۵ میلی متر یا بیشتر در دیسک ترکیبی سفتازیدیم /کلاولانیک نسبت به دیسک سفتازیدیم به تنهایی نشان دهنده وجود ESBLs می باشد.

به منظور بررسی کیفیت دیسک‌های مورد استفاده برای مقاومت به β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) از سویه استاندارد *klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 استفاده شد (۴۹).

۳-۳-۳ تست تعیین متالوβ- لاکتاماز و کارباپنماز در باکتری *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه*:

برای بررسی مقاومت کارباپنمازها در باکتری *اشریشیا کلی* و *کلبسیلانمونیه* از روش MCIM استفاده شد.

روش انجام: از کشت۲۴ ساعته جدایه‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* بر روی محیط بلادآگار که در تست غربالگری نسبت به کارباپنم ها مقاومت نشان داده بودند یک لوپ یک میکرولیتری از کلنی باکتری های ذکر شده برداشته و به دو میلی لیتر محیط تریپتیک سوی براث اضافه شد، سپس به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس شدند، در ادامه به وسیله فورسپس یک دیسک ۱۰ میکروگرمی مروپنم به سوسپانسیون اضافه و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند.

هم زمان با انکوبه شدن دیسک مروپنم در محیط تریپتیک سوی براث، از باکتری سویه استاندارد *E.coli* ATCC 25922 حساس به مروپنم سوسپانسیون معادل با نیم مک فارلند تهیه و روی مولر هینتون آگار تلقیح شد، سپس دیسک مروپنم را از محیط خارج کرده، مایع اضافی دیسک گرفته شد. دیسک مروپنم وسط محیط مولر هینتون قرار داده شد و بعد از ۱۸تا ۲۴ ساعت انکوبه در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد، نقاط مهار مطابق با CLSI 2020 چک شد.

برای تشخیص متالوβ- لاکتامازها در مرحله غربالگری از دو دیسک ایمی پنم و مروپنم استفاده شد که در صورت ایجاد مقاومت به هرکدام از دو دیسک مطابق با CLSI از تست تاییدی استفاده شد. در تست تاییدی، باکتری مورد نظر پس از تهیه نیم مک فارلند بر روی محیط مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد و دیسک‌های ایمی پنم یا مروپنم به تنهایی و ایمی پنم یا مروپنم ترکیبی با ده میکرو لیتر EDTA نیم مولار روی محیط

قرارداده شد، سپس به مدت۱۶ تا ۱۸ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه و پس از آن قطر هاله هر دو دیسک بررسی شد، وجود قطر هاله عدم رشد به اندازه ۷ میلی متر و یا بیشتر در دیسک داری EDTA نشان دهده مثبت بودن باکتری تولید کننده متالوβ- لاکتاماز می باشد (۴۹).

۴-۳ روش استخراج DNA:

به منظور بررسی مولکولی β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) و کارباپنمازها، جدایه های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلانمونیه* که به صورت فنوتیپی مقاوم گزارش شده بودند، به روش جوشاندن[1] استخراج DNA شدندکه مراحل انجام این روش به شرح زیر می‌باشد:

باکتری‌ها بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند و پس از کشت ۱۸ ساعته انکوبه یک کلنی به محیط کشت تریپتیک سوی براث تلقیح گردید، بعد از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه ۱میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری به یک میکروتیوب ۱/۵میکرولیتری منتقل شد. میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند، سپس مایع رویی دور ریخته می‌شود و به آن آب مقطراستریل اضافه شد و مجددا در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد میکروتیوب‌ها در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس میکروتیوب‌ها از دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد خارج و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و بعد از اتمام زمان فریز شدن مجددا در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. بعد از اتمام زمان جوش،

[1] Boiling

میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰-۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. در مرحله پایانی صد میکرو لیتر ازمایع رویی برداشته شد و به یک میکروتیوب ۲دهم منتقل شد (۵۰).

۳-۵ ارزیابی کمی و کیفی DNA:

به منظور ارزیابی کیفی و کمی DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ استفاده شد. این دستگاه توسط اندازه گیری نسبت جذب نوری نمونه در طول موج ۲۶۰ نانومتر به جذب آن در طول موج ۲۸۰ نانومتر میزان خلوص DNA را تعیین می‌کند. در صورتی که DNA خالص باشد دستگاه عددی بین ۲ -۱/۸ را نشان می‌دهد و در غیر این صورت اگر پایین‌تر از ۱/۸ باشد آلودگی با پروتئین می‌باشد و چنان چه بیشتر از ۲ باشد آلودگی با RNA وجود دارد که باید استخراج دوباره تکرار شود این نوع بررسی با نانودراپ ارزیابی کیفی می‌باشد. برای ارزیابی کیفی DNA استخراج شده همچنین در دستگاه الکتروفورز و ژل اگارز مشاهده می‌شود.

۳-۶ نگهداری DNA استخراج شده:

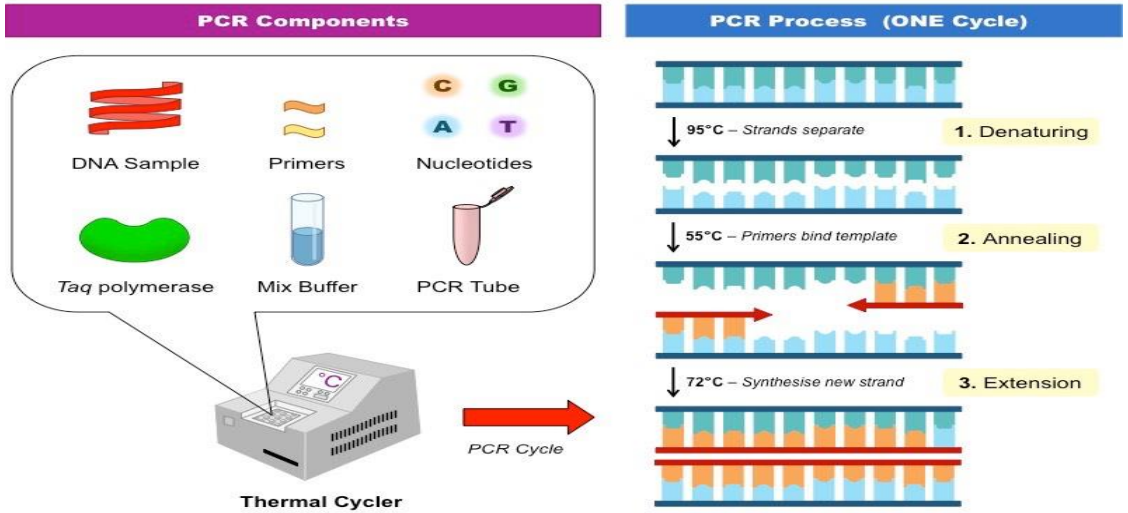
جهت پایداری بیشتر DNA به جای آب مقطر در زمان استوک گیری از آب بدون آنزیم Dnase استفاده شد. سپس نمونه‌ها در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و در حین کار DNA روی ظرف حاوی یخ قرار داده شد. به منظور کاهش فریز و دفریز شدن زیاد که موجب آسیب و شکستن DNA می‌شود نمونه‌ها در چند میکروتیوب قرار داده شدند (Aliquot) و استوک اصلی در فریزر نگهداری شد.

۳-۷ واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR:

در این واکنش طی واکنش‌های بیوشیمیایی و سیکل‌های دمایی قطعه مشخص از ژن مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به تعداد زیاد تکثیر می‌شود. که در نهایت با استفاده از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز مشاهده می‌شود. این روش یک روش کیفی برای بررسی وجود یک ژن در توالی DNA است. در این واکنش DNA الگو، پرایمرهای اختصاصی، آب مقطر و مسترمیکس که دارای آنزیم DNA پلیمراز، دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات [1] و بافر است برای انجام واکنش نیاز است که با استفاده از دستگاه ترمال سایکلرو سه سیکل دمایی انجام می شود (تصویر ۳-۱).

پرایمرهای ژن‌های مقاومت ESBLs، متالو β- لاکتاماز و نیز کارباپنماز، مواد مورد نیاز برای تهیه نمونه برای انجام واکنش PCR و نیز برنامه تنظیم شده برای دستگاه ترمال سایکلر جهت واکنش واکنش PCR به ترتیب درجدول های ۳-۱، ۳-۲ و ۳-۳ نشان داده شده اند.

[1] Deoxynucleoside triphosphates



تصویره۱-۳: مراحل انجام واکنش PCR

جدول۱-۳: پرایمرهای استفاده شده برای بررسی ESBLs، متالو β- لاکتاماز و کارباپنماز در واکنش PCR

	Primer Name	Sequence (5' → 3')	Size (bp)	**Reference**
	bla$_{SHV}$ F	GCCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC	1016(bp)	(51)
	bla$_{SHV}$ R	TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA	-	-

	bla$_{CTX-M}$ F	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	544(bp)	(51)
	bla $_{CTX-M}$ R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	-	-
	bla $_{Oxa-11}$ F	CGAGTACGGCATTAGCTGGT	252(bp)	-
	bla $_{Oxa-11}$ R	CTCTTGGCTTTCCGTCCCAT	-	-
	bla $_{OXA-48}$ F	CGTGGTTAAGGATGAACAC	438(bp)	(51)
	bla $_{OXA-48}$ R	CATCAAGTTCAACCCAACCG	-	-
	bla$_{NDM}$ F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	621(bp)	(51)
0	*bla*$_{NDM}$ R	CGGAATGGCTCATCACGATC	-	-
1	*bla*$_{VIM}$ F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390(bp)	(51)
2	*bla*$_{VIM}$ R	CGAATGCGCAGCACCAG	-	-
3	*bla*$_{OXA-23}$ F	TGGAAGGGCGAGAAAAGGTC	355(bp)	-

4	$bla_{OXA\text{-}23}$R	TTGCCCAACCAGTCTTTCCA	-	-
5	bla_{KPC} F	TGTGTACGCGATGGATACCG	608(bp)	-
6	bla_{KPC} R	CGGCATAGTCATTTGCCGTG	-	-
7	bla_{IMP} F	AGCCAATAGTTAACCCCGCC	114(bp)	-
8	bla_{IMP} R	GTGGCTTAATTCTCAATCCATCCC	-	-

جدول شماره۲-۳: مواد مورد نیاز جهت تهیه هر نمونه در واکنش PCR

Requisite materials for PCR	Volume
Master Mix	12 µL
Forward Primer	1pmol
Reverse Primer	1pmol
Template DNA	2 µL

D .W	7 µL
Final volume	25 µL

جدول شماره۳-۳: برنامه تنظیم شده برای دستگاه ترمال سایکلر جهت واکنش PCR

Gene	Initial denaturation	Denauration	Annealing	Extensin	Finl Extension	Cycle number
bla$_{SHV}$	95 °C 5 min	95 °C 1 min	64 °C 1min	74 °C 1min	72 °C 10 min	35
bla$_{CTX-M}$	95 °C 5 min	95 °C 30 sec	55.5 °C 30 sec	72 °C 40 sec	72 °C 7 min	37
bla$_{oxa-11}$	95 °C 5 min	95 °C 40 sec	57 °C 40 sec	75 °C 50 sec	72°C 9 min	38

bla$_{NDM}$	95 °C 5 min	95 °C 45 sec	50 °C 1min	74 °C 1 min	72 °C 10 min	39
bla$_{VIM}$	94 °C 10 min	94 °C 30 sec	54 °C 35sec	72 °C 50 sec	72 °C 5 min	36
bla$_{OXA-48}$	95 °C 5 min	95 °C 40 sec	55 °C 45 sec	72 °C 45 sec	72 °C 5 min	34
bla$_{OXA\ -23}$	95 °C 5 min	95 °C 40 sec	55 °C 45 sec	72 °C 35 sec	72 °C 10 min	41

blakpc	95 °C 5 min	95 °C 50 s	56.5 50 sec	72 °C 40sec	72 °C 9 min	37
bla IMP	95 °C 8 min	95 °C 35 sec	53 °C 30 sec	72 °C 25sec	72 °C 8 min	30

۸–۳ الکتروفورز محصولات PCR:

۱–۸–۳ روش تهیه بافر TAE 50 x:

بافر TAE برای انجام الکتروفورز ضروری است که در ابتدا یک محلول غلیظ TAE 50 x تهیه گردید و به هنگام استفاده رقیق سازی انجام شد. در واقع محلول کار بافر TAE 1 x است که برای انجام الکتروفورز و تهیه ژل آگارز مورد نیاز است. مواد لازم جهت تهیه بافر TAE 50 x به شرح زیر در جدول ۴-۳ ذکر شده است:

جدول۴-۳: مواد مورد نیاز جهت تهیه بافر TAE 50 x در جدول زیر ذکر شده است.

Chemical	Volume
Tris base (FW = 121.14)	242 g
Glacial acetic acid	57.1 ml
EDTA (pH 8.0)	100 ml of 0.5 M

این مقادیر از مواد ذکر شده را با آب دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر (PH=8) رسانده شد و به عنوان استوک TAE 50 x در دمای محیط نگهداری گردید. برای تهیه TAE 1 x که در الکتروفورز نیاز است به نسبت ۱ به ۴۹ رقیق می شود که از فرمول زیر محاسبه می شود:

فرمول محاسبه حجم مایعات ⟶ M1V1=M2V2

۲-۸-۳ تهیه ژل آگارز ۱ درصد:

با توجه به اندازه محصولات PCR، ژل آگارز ۱ درصد تهیه گردید. به این ترتیب که ۱ گرم از پودر آگارز (سینا کلون) را در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TAE 1 x در ارلن مایر حل کرده و جهت حل شدن کامل آگار در بافر و شفاف شدن به آن حرارت می‌دهیم. بعد از پایین آمدن دما به ژل آماده شده ۱۰ میکرولیتر رنگ DNA safe اضافه شد و در کاست‌های مخصوص دستگاه الکتروفورز قرار داده و در نهایت بعد از سفت شدن ژل به داخل تانک الکتروفورز منتقل شد.

۳-۸-۳ بارگذاری نمونه ها در چاهک های ژل و الکتروفورز محصولات PCR:

بعد از اتمام واکنش PCR، محصول واکنش باید توسط الکتروفورز مشاهده شود که از وجود ژن‌های مد نظر اطمینان حاصل گردد. ابتدا ژل با کاست تعبیه شده در داخل تانک قرار داده شد. سپس بافر TAE1x به درون تانک الکتروفورز ریخته شد تا حدی که روی ژل را بپوشاند. در مرحله بعد بارگذاری محصولات انجام شد و بدین منظور در چاهک اول سمت چپ ۵ میکرولیتر، DNA Ladder برای اندازه گیری سایز محصولات بارگذاری شد و سپس ۶ میکرولیتر ازمحصولات PCR به چاهک های بعد اضافه شد. در ادامه بعد از تنظیم دستگاه الکتروفورز در ولتاژ ۷۵ ولت و گذشت زمان مورد نیاز جهت تفکیک باند ها، ژل از دستگاه خارج شد و برای مشاهده باند ها به دستگاه ژل داکیومنت منتقل شد و نتایج عکس برداری و ثبت گردید.

۹-۳ توالی یابی[1] محصولات PCR:

پس از انجام واکنش PCR برای ژن‌های مورد نظر،به طور کلی ژن‌های استفاده شده با باکتری‌های کنترل مثبت دارای ژن مورد نظرتایید شدند و تعدادی از ژن‌های کارباپنماز مانند bla_{NDM} و bla_{OXA-23} به منظور تایید نهایی نتایج حاصل از PCR جهت توالی یابی به شرکت پیشگام فرستاده و تایید نهایی شدند. به منظور انجام این پروسه محصولات از ژل آگارز استخراج شدند و در شرکت ذکر شده تعیین توالی صورت گرفت، پس از ارسال نتایج توسط شرکت با نرم افزار Chromas آنالیز شد و در نهایت با استفاده از پایگاه NCBI توالی ها Blast شدند و نتیجه نهایی ثبت شد.

۱۰-۳ آنالیز آماری:

در مطالعه حاضر از نرم افزار آماری Stata نسخه۱۰ و از تست های Fishers exact tests و Chi-Square برای آنالیز های آماری استفاده شد.

[1] Sequencing

فصل چهارم

نتایج و یافته های پژوهش

۴–۱ نتایج شیوع عفونت بیمارستانی و تعیین هوییت جدایه‌ها:

در مجموع تعداد ۶۰۲ بیمار در طی دوره مطالعه در بخش‌های ICU بستری شدند، از این تعداد ۲۳۹ بیمار (۷۰/۳۹٪) در بخش ICU1 و ۳۶۳ بیمار (۳۰/۶۰٪) در بخش ICU2 بستری بودند. به طور کلی تعداد ۷۱ بیمار شامل ۴۴ مرد (۶۱/۹۷٪) و ۲۷ زن (۳۸/۰۳٪) دچار عفونت بیمارستانی شدند که از این تعداد ۴۳ بیمار در بخش ICU1 و ۲۸ بیمار در بخش 2 ICU بستری بودند. میانگین سنی بیماران دارای عفونت بیمارستانی ۰۶. ۲۳ ±۵۳. ۴۹ سال ارزیابی شد. همچنین میانگین مدت زمان بستری تا ترخیص بیماران در بیمارستان ۲۲ روز بدست آمد

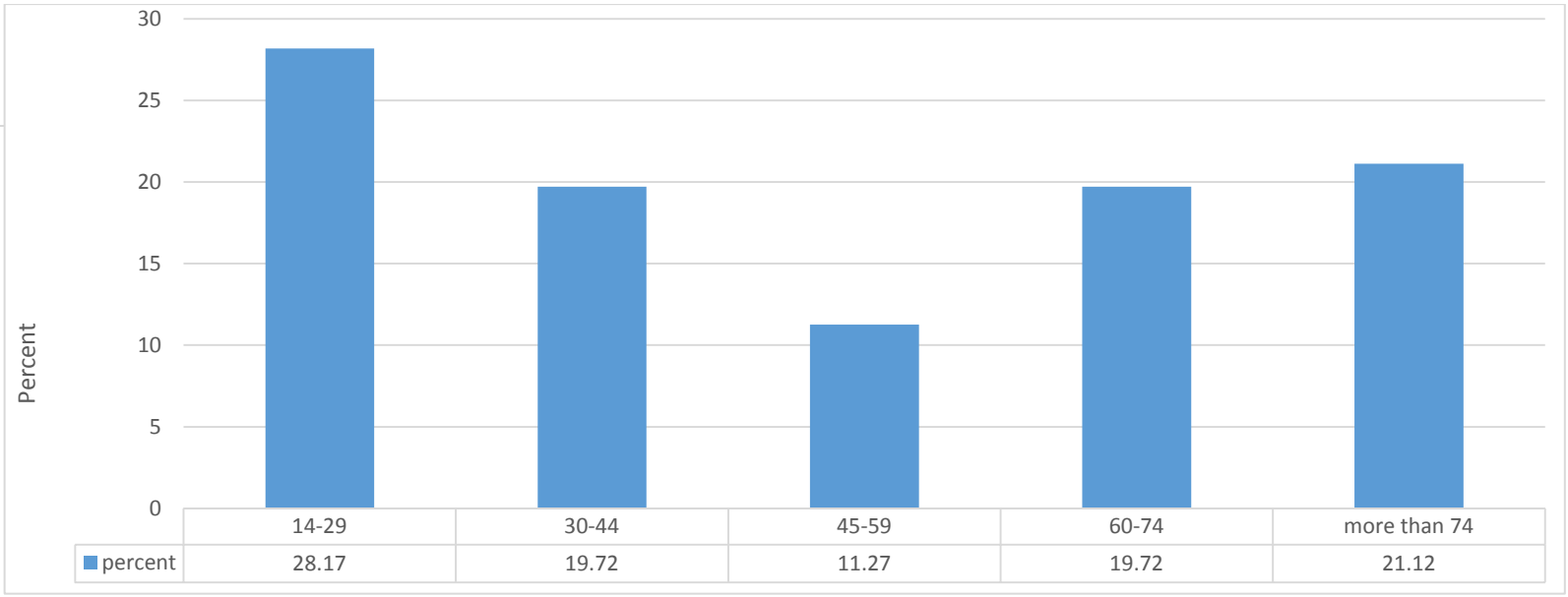
در بررسی حاضر، میزان شیوع عفونت بیمارستانی در بخش ICU1 ، ۹۹ /۱۷درصد و در بخش 2 ICU، ۷/۷۷ درصد بدست آمد. میزان کلی شیوع عفونت بیمارستانی در هر دو بخش ICU، ۱۱/۷۹درصد برآورد شد. عفونت بیمارستانی در هر دو بخش ICU از لحاظ آماری معنا دار بود با این حال میزان عفونت بیمارستانی در بخش ICU1 بسیار بیشتر از 2 ICU به دست آمد. اطلاعات بیماران در جدول(۱-۴)-طبقه بندی شده است.

جدول۱-۴: مشخصات بیماران بخش ICU مبتلا به عفونت بیمارستانی در طی شش ماه نمونه گیری در جدول زیر مشخص شده است.

Characteristics	No(%)
SEX	

Male	44 (61.97)
Female	27 (38.03)
Total	71 (100%)
Age group (in years)	
14-29	20(28.17)
30-44	14 (19.72)
45-59	8(11.27)
60-74	14 (19.72)
More than 75	15 (21.12)
Mean age	49.53 ± 23.06
Admission wards	
ICU(1)	239(39.70)
ICU(2)	363(60.30)
Total	602(100)
NIs ICU(1)	43 (61.11)
NIs ICU(2)	28 (38.89)
Inpatient duration(mean .day)	(22)

Comorbidity	
Pulmonary disorder	1(1.41)
Type 1 diabetes	6(8.45)
Hypertension	6(8.45)
Urinary tract disease	3(4.23)
Non Comorbidity	55(77.46)
Prevalence nosocomial infection in ICU	11.79 (95% CI: 9.32 to 14.64)
Prevalence nosocomial infection in ICU 1	17.99 (95% CI: 13.33 to 23.45)
Prevalence nosocomial infection in ICU 2	7.77 (95% CI: 5.18 to 10.95)
Difference was significant ($p<0.001$)	



نمودار۱-۴: نمودار فوق میزان عفونت بیمارستانی بیماران بر حسب رنج سنی تفکیک شده است، بر این اساس در رنج سنی۲۹-۱۴ بیشترین شیوع عفونت بیمارستانی به دست آمد.

۴-۲ نتایج تشخیص فنوتیپی:

از ۷۱ بیمار مبتلا به عفونت بیمارستانی تعداد ۱۰۳ جدایهء باکتریایی، شامل ۷۹ باکتری گرم منفی (۷۶/۷۰٪) و ۲۴ باکتری گرم مثبت (۲۳/۳۰٪) جداسازی شد. *اشریشیا کلی* با ۲۹ جدایهء (۲۸/۱۶٪) و در ادامه *اسینتوباکتر بومانی با* ۱۵ جدایهء (۱۴/۵۶٪) و *کلبسیلا نمونیه* با ۱۳ جدایهء (۱۲/۶۲٪)

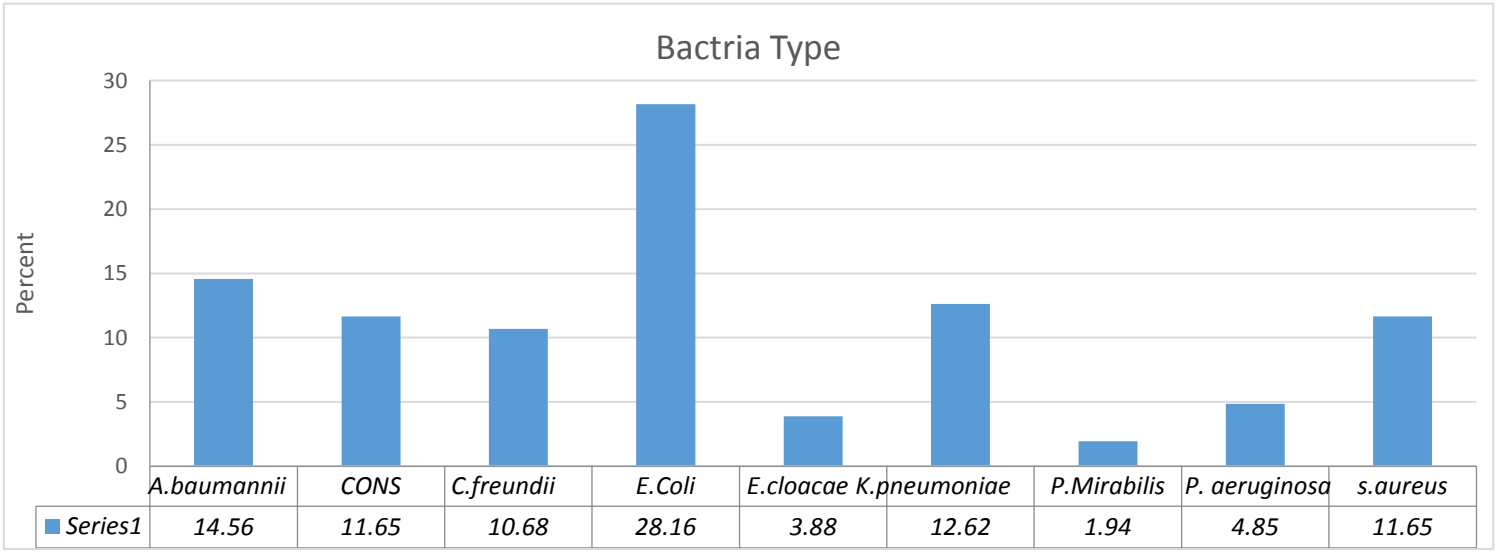
بیشترین فراوانی در باکتری‌های گرم منفی و *استافیلوکوکوس اورئوس* با ۱۲ جدایهء (۱۱/۶۶٪) بیشترین فراوانی در باکتری‌های گرم مثبت به دست آمد . نتایج در جدول ۲-۴ نشان داده شده است..

بر اساس نوع عفونت بالینی، بیشترین عفونت مربوط عفونت تنفسی با ۵۲ مورد (۵۰/۴۸٪) و در ادامه عفونت ادارای با ۲۶ مورد (۲۵/۲۵٪)، عفونت جریان خون با ۲۲ مورد (۲۱/۳۶٪) و در نهایت کمترین نوع عفونت مربوط به زخم با ۳ مورد (۲/۹۱٪) به دست آمد (جدول۲-۴).

جدول۲-۴: توزیع عوامل باکتریایی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت بیمارستانی و نوع عفونت در بیماران بخش های ICU

Bacterial isolates	Wounds No (%)	Urinary tract No (%)	Respiratory tract No (%)	Bloodstream No (%)	Total (%)
Gram-negative					
E. coli	1(33.33)	20(76.93)	1(1.93)	7(31.82)	29(28.16)
K pneumoniae	1(33.33)	1(3.84)	11 (21. 15)	0(0.0)	13 (12.62)
E.cloacae	0(0.0)	0(0.0)	3(5.76)	1(4.54)	4(3.88)
C.freundii	0(0.0)	1 (3.84)	10(19.24)	0(0.0)	11(10.67)
P.mirabilis	0(0.0)	1(3.84)	1(1.93)	0(0.0)	2(1.94)
A.baumannii	0(0.0)	1(3/84)	13(25)	1(4.54)	15(14.56)
P. aeruginosa	0(0.0)	0(0.0)	3(5.76)	2(9.09)	5(4.85)

Total					79 (76.70)
Gram-positive					
S. aureus	1(33.33)	0(0.0)	7(13.47)	4(18.19)	12(11. 66)
CoNS	0(0.0)	2(7.72)	3(5.76)	7(31.82)	12(11. 66)
Total					24(23.30)
Total	3(2.91)	26(25.25)	52 (50.48)	22(21.36)	103 (100)



نمودار۲-۴: توزیع عوامل باکتریایی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت بیمارستانی در بخش های ICU

۴-۳ نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی جهت بررسی مقاومت و حساسیت باکتری‌های جدا شده:

در باکتری‌های گرم منفی بیشترین میزان مقاومت نسب به سفالسپورین های نسل سوم، به ترتیب سفتازدیم با ۶۹ جدایهء (۸۷/۳۴٪)، سفوتاکسیم، سفپودوکسیم ۵۹ جدایهء (۷۴/۶۹٪) و سفتریاکسون با ۵۸ جدایهء (۷۳/۴۲٪) گزارش شد. از طرفی کمترین میزان مقاومت در این باکتری‌ها به ترتیب نسبت به آمیکاسین با ۲۵ جدایهء (۳۴/۶۱٪) و در ادامه برای ایمی پنم و مروپنم با ۲۷ جدایهء (۳۴/۱۷٪) به دست آمد.

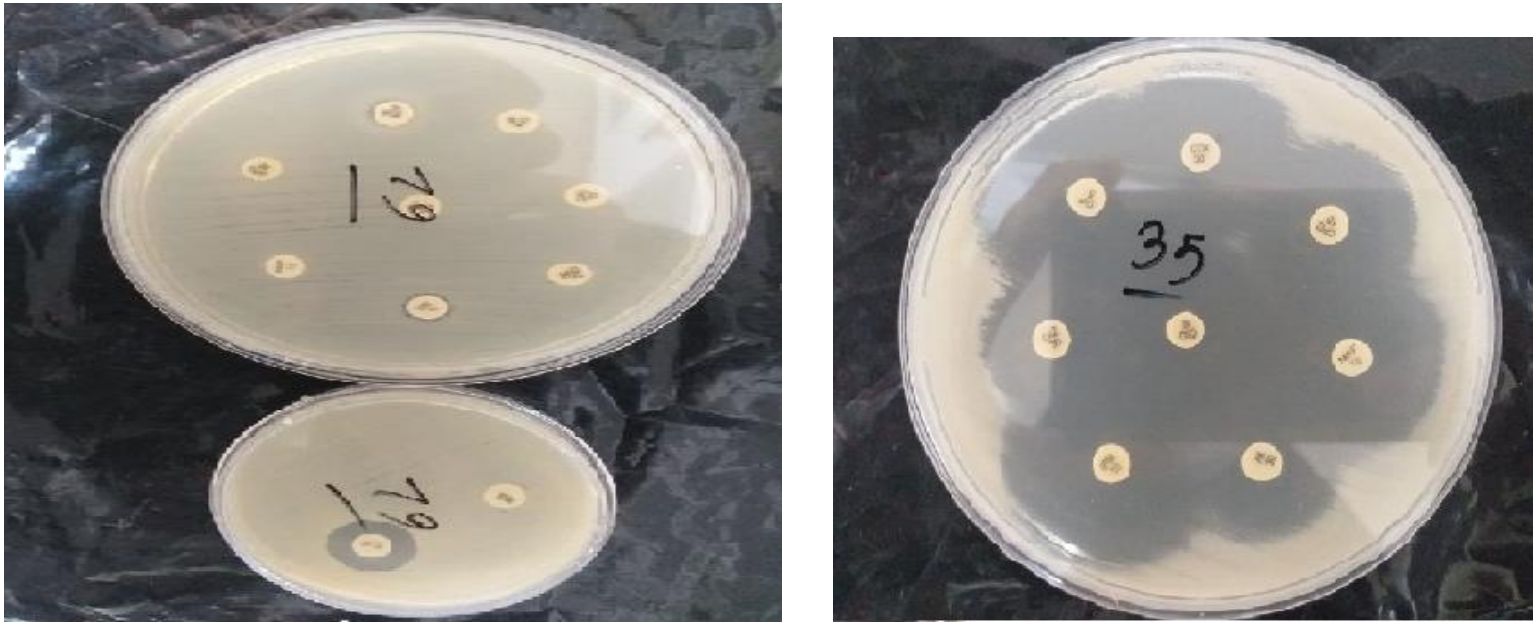
در باکتری‌های گرم مثبت، بیشترین میزان مقاومت نسبت به پنی سیلین با ۲۲ جدایهء (۹۱/۶۷٪) و کمترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به تیگاسایکلین با ۲۴ جدایهء (۱۰۰٪) و در ادامه تریمتوپریم/سولفامتوکسازول با ۲۳ جدایهء (۹۵/۸۴٪) و لینوزولید با ۲۲ جدایهء (۹۱/۶۷٪) به دست آمد جدول(۳-۴). با این وجود سطوح بالایی از مقاومت به سفوکسیتین (۷۹/۱۷٪) و ونکومایسین (۱۶/۶۷٪) در باکتری های گرم مثبت به دست آمد که در باکتری های گرم مثبت بسیار حائز اهمیت می باشد و تست حساسیت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن در تصویر ۱-۴ نشان داده شده است.

جدول۳-۴: نتایج بررسی تست حساسیت آنتی بیوتیکی به صورت درصد حساسیت و مقاومت برای باکتری های گرم مثبت و گرم منفی.

Bacterial	/ N /	Pattern	Antimicrobial susceptibility, no. (%)									
			AK	CIP	SXT	IMP	MER	ATM	CAZ	CPD	CRO	CTX
E. coli	29	S	27(93.10)	13(44.83)	6(20.69)	27(93.10)	27(93.10)	17(58.62)	5(17.24)	10(34.48)	11(37.93)	10(34.48)

		I	1(3.45)	0 (0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(3.45)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		R	1(3.45)	16(55.17)	23(79.31)	2 (6.90)	2(6.90)	11(37.93)	24 (82.76)	19(65.52)	18(62.06)	19(65.52)
K.pneumoniae	13	S	9(69.24)	5(38.46)	7(53.85)	9(69.24)	9(69.24)	8(61.54)	0(0.0)	5(38.46)	5(38.46)	5(38.46)
		I	0(0.0)	0(0.0)	4(30.77)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		R	4 (30.76)	8(61.54)	2(15.38)	4 (30.76)	4 (30.76)	5(38.46)	13(100)	8 (61.54)	8 (61.54)	8 (61.54)
E.cloacae	4	S	4(100)	0(0.0)	0(0.0)	2(50)	2(50)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		I	0(0.0)	0(0.0)	2(50)	0(0.0)	0(0.0)	1(25)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		R	0(0.0)	4(100)	2(50)	2(50)	2(50)	3(75)	4(100)	4(100)	4(100)	4(100)
C.freundii	11	S	4(36.36)	3(27.27)	2(18.18)	5(45.46)	5(45.46)	3(27.27)	3(27.27)	3(27.27)	3(27.27)	3(27.27)
		I	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		R	7(63.67)	8(72.73)	9(81.82)	6(54.55)	6(54.55)	8(72.73)	8(72.73)	8(72.73)	8(72.73)	8(72.73)
P. mirabilis	2	S	2 (100)	1(50)	0(0)	2 (100)	2(100)	1(50)	1 (50)	1(50)	1(50)	1(50)
		I	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		R	0(0.0)	1(50)	2(100)	0(0.0)	0(0.0)	1(50)	1(50)	1(50)	1(50)	1(50)
A.baumannii	15	S	3(20)	2(13.33)	1(3.33)	3(20)	3(20)	1(6.67)	1(6.67)	1 (6.67)	1(6.67)	1(6.67)
		I	0(0.0)	0(0.0)	1(3.33)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		R	12(80)	13(86.67)	13 (93.34)	12(80)	12(80)	14(93.33)	14(93.33)	14(93.33)	14(93.33)	14(93.33)
P. aeruginosa	5	S	4(80)	4(80)	2(40)	4(80)	4(80)	4(80)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		I	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		R	1(20)	1(20)	3(60)	1(20)	1(20)	1(20)	5(100)	5(100)	5(100)	5(100)
Total	79	S	53(67.09)	28(35.44)	18(22.79)	52(65.82)	52(65.82)	34(43.03)	10(12.66)	20(25.31)	21(26.58)	20(25.31)
		I	1 (1.27)	0(0.0)	7(8.86)	0(0.0)	0(0.0)	2(2.53)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		R	25(31.64)	51(64.56)	54(68.35)	27(34.17)	27(34.17)	43(54.44)	69(87.34)	59(74.69)	58(73.42)	59(74.69)

			Antimicrobial susceptibility, no. (%)									
Bacterial	N	Pattern	FOX	DA	AK	P	TGC	CIP	LNZ	GEN	SXT	V
S. aureus	12	S	1(8.33)	2 (16.67)	11(91.67)	0(0.0)	12 (100)	3(25)	11(91.67)	12 (100)	12(100)	10(83.33)
		I	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		R	11(91.67)	10(83.33)	1(8.33)	12(100)	0(0.0)	9(75)	1(8.33)	0(0.0)	0(0.0)	2(16.67)
CoNS	12	S	4(33.33)	3(25)	10 (83.34)	2(16.67)	12(100)	4(33.33)	11(91.67)	8(66.67)	11(91.67)	10(83.33)
		I	0(0.0)	1(8.33)	1 (8.33)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		R	8(66.67)	8(66.67)	1(8.33)	10(83.33)	0(0)	8(66/67)	1(8.33)	4(33.33)	1(8.33)	2 (16.67)
Total	24	S	5(20.83)	5(20.83)	21(87.5)	2(8.33)	24(100)	7(29.16)	22(91.67)	20(83.33)	23(95.84)	20(83.33)
		I	0(0.0)	1(4.16)	1(4.16)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		R	19(79.17)	18 (75)	2(8.33)	22(91.67)	0(0.0)	17(70.83)	2(8.33)	4(16.67)	1(4.16)	4(16.67)



تصویر ۱-۴: تست حساسیت انتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن، به منظور بررسی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی.

۴-۴ نتایج مقاومت چند دارویی در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی:

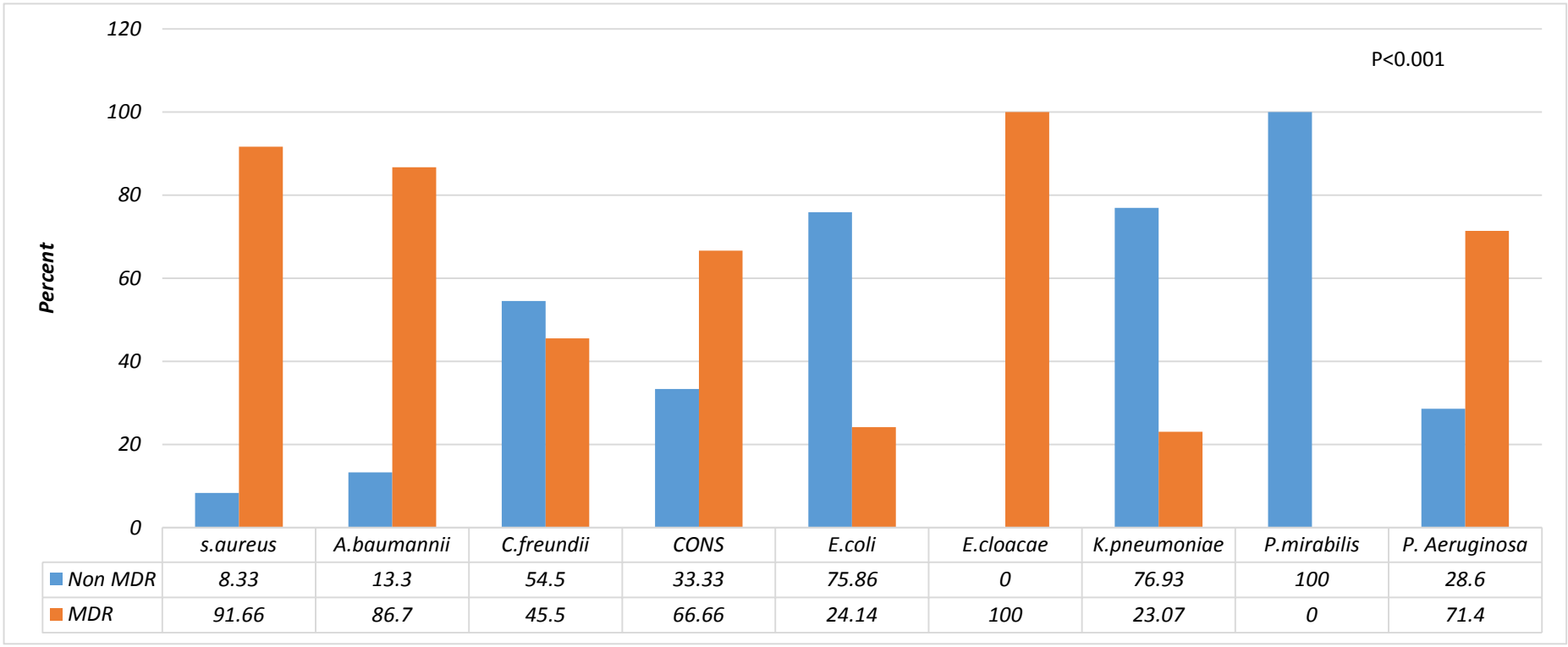
جدایه‌های باکتری در صورتی مقاوم به چند دارو در نظر گرفته می‌شوند که حداقل به سه کلاس متفاوت از مواد ضد میکروبی مقاومت داشته باشند. به طور کلی مقاومت چند دارویی در ۶۱ جدایهء باکتریایی (۵۹/۲۲٪) به دست امد. *انتروباکترکلوآکه* با ۴ جدایهء (۱۰۰٪) استافیلوکوکوس

اورئوس با ۱۱ جدایهء (۹۱/۶۶٪) و در ادامه اسینتو *باکتربومانی* با ۱۳ جدایهء (۸۶/۶۶٪) بیشترین باکتری گرم منفی و گرم مثبت مقاوم به چند دارو شناسایی شدند. نسبت تعداد جدایه‌های مقاوم به چند دارو نسبت به تعداد کلی جدایه‌ها از نظر آماری معنا دار به دست آمد .نتایج مقاومت چند دارویی در جدول ۴-۴ و نمودار ۳-۴ نشان داده شده است.

جدول ۴-۴: نتایج مقاومت چند دارویی در جدایه های گرم منفی و مثبت

Bactria										
	S. aureus	*CONS*	*A.baumannii*	*C.freundii*	*E. coli*	*E.cloacae*	*K.pneumoniae*	*P. mirabilis*	*P.aeruginosa*	p-value
Non MDR	1(8.33 %)	4 (33.33%)	2(13.3%)	6(54.5%)	7 (24.14%)	0(0.0%)	3 (76.93%)	2(100.0%)	3(60.0%)	<0.001
MDR	11 (91.66 %)	8(66.66 %)	13(86.7%)	5(45.5%)	22(75.86%)	4(100.0%)	10 (24..07 %)	0(0.0%)	2(40.0%)	

Total all MDR
(72.81%)



	s.aureus	A.baumannii	C.freundii	CONS	E.coli	E.cloacae	K.pneumoniae	P.mirabilis	P. Aeruginosa
Non MDR	8.33	13.3	54.5	33.33	75.86	0	76.93	100	28.6
MDR	91.66	86.7	45.5	66.66	24.14	100	23.07	0	71.4

نمودار ۳-۴: نتایج مقاومت چند دارویی در در جدایه های گرم منفی و مثبت

۴-۵ نتایج تست ESBLs، متالوβ- لاکتاماز و کارباپنمازبه صورت فنوتیپی:

به منظور بررسی فنوتیپی β- لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)، متالوβ- لاکتاماز و کارباپنماز از ۵۷ جدایهء شامل، ۳۷ جدایهء *اشریشیا کلی* و ۲۰ جدایهء *کلبسیلا نمونیه* مربوط به دو بخش ICU و جراحی استفاده شد. در بخشICU ، ۲۹ جدایهء *اشریشیا کلی* و ۱۳ *کلبسیلا نمونیه* و در بخش جراحی، ۸ جدایهء *اشریشیا کلی* و ۷ جدایهء *کلبسیلا نمونیه* مورد بررسی قرار گرفتند.

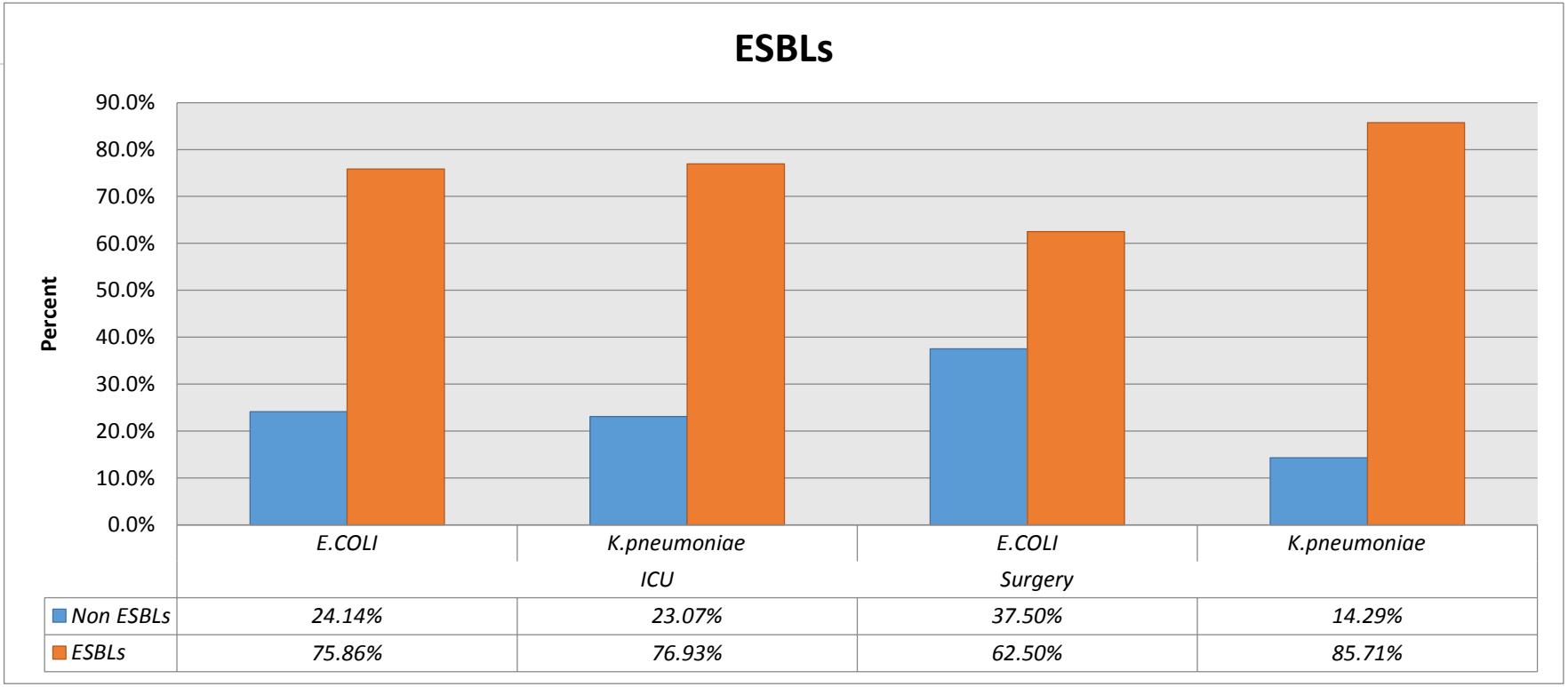
از ۲۷ جدایهء (۷۲/۹۷٪) *اشریشیا کلی* ، ۲۲ جدایهء (۷۵.۸۶٪) مربوط به بخش ICU و ۵ (۵. ۶۲٪) جدایهء مربوط به بخش جراحی بودند. همچنین از تعداد ۱۶جدایهء (۸۰٪) *کلبسیلا نمونیه*، به ترتیب۱۰ جدایهء (۹۳. ۷۶٪) و ۶ جدایهء (۸۵. ۷۱٪) به ترتیب در بخش‌های ICU و جراحی بعنوان تولید کننده ESBLs گزارش شد. در مجموع، ۴۳جدایهء (۷۵/۴۳٪) ESBLs و ۱۴ جدایهء (۲۴/۵۶٪) شامل ۱۰جدایهء (۲۷/۰۳٪) *اشریشیا کلی* و ۴ جدایهء (۲۰٪) *کلبسیلا نمونیه* به عنوان غیر ESBLs شناسایی شدند، نتایج مربوطه درجدول ۵ -۴ نشان داده شده است .

در نتایج تست فنوتیپی مقاومت به کرباپنم ها، ۹ جدایهء *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* به عنوان تولید کننده کارباپنماز ها شناسایی شدند. به طور کلی۲ جدایهء (۶۸/۹٪) *اشریشیا کلی* و ۴ جدایهء (۳۰/۷۷٪) *کلبسیلا نمونیه* مربوط به بخش ICU و ۱ جدایهء (۱۲/۵٪) *اشریشیا*

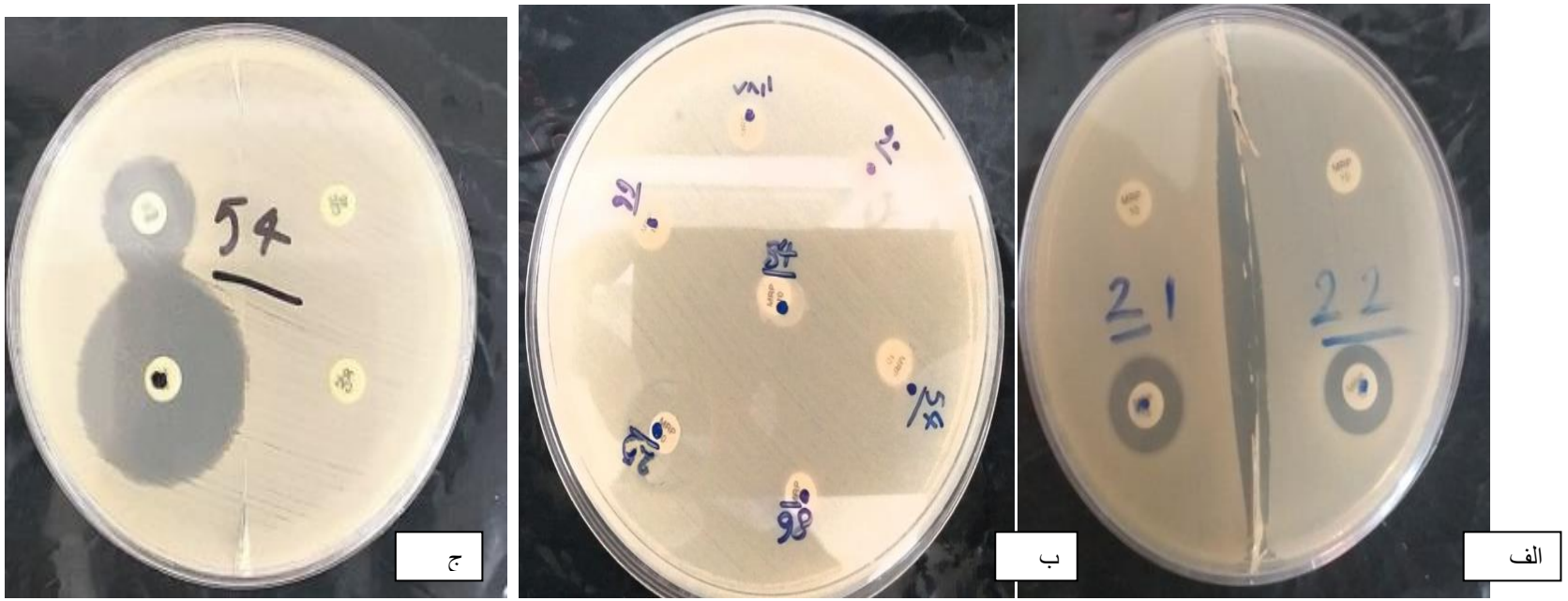
کلی و ۲جدایهء (۲۸/۵۷٪) *کلبسیلانمونیه* در بخش جراحی بعنوان متالوβ -لاکتاماز و کارباپنماز شناسایی شدند(جدول۵-۴). جدایه های که مقاومت آن‌ها در تست فنوتیپی تایید شدند به منظور بررسی ژنوتایپی مقاومت در مراحل بعد استفاده شدند.

جدول۵-۴: توزیع فراوانیESBLs و کارباپنمازها در جدایه‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلانمونیه*، در دو بخش ICU و جراحی

			ESBL		Carbapenemases	
	Department	N	Non ESBL n(%)	ESBL n(%)	Department	(CRE) n(%)
E. coli	ICU	29	7 (24.14)	22(75.86)	ICU	2(6.89)
E. coli	surgery	8	3(37.5)	5(62.5)	surgery	1(12.5)
Total		37	10(27.03)	27(72.97)		3(8.10)
K.pneumoniae	ICU	13	3(23.07)	10(76.93)	ICU	4 (30.77)
K.pneumoniae	surgery	7	1(14.29)	6(85.71)	surgery	2 (28.57)
Total		20	4(20)	16(80)		6 (30)
Total		57	14(24.56)	43(75.43)	Total	9(15.79)



نمودار ۴-۴: فراوانیESBLs تولید شده در *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* را در دو بخش ICU و جراحی



تصویر ۲-۴: نتایج بررسی فنوتیپی مقاومت به ESBLs (ج)، متالوβ- لاکتاماز (الف) و کاربا‌پنماز (ب) در دو باکتری *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه*

۶-۴ نتایج ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت به ESBLs، متالو β- لاکتاماز و کاربا‌پنماز ها :

به منظور بررسی مقاومت به ESBLs از ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{SHV} و bla_{OXA-11} استفاده شد. مقاومت به متالوβ- لاکتاماز و کاربا‌پنمازها نیز با ژن-های bla_{NDM}، bla_{VIM}، bla_{KPC}، bla_{IMP}، bla_{OXA-23} و bla_{OXA-48} بررسی شد.

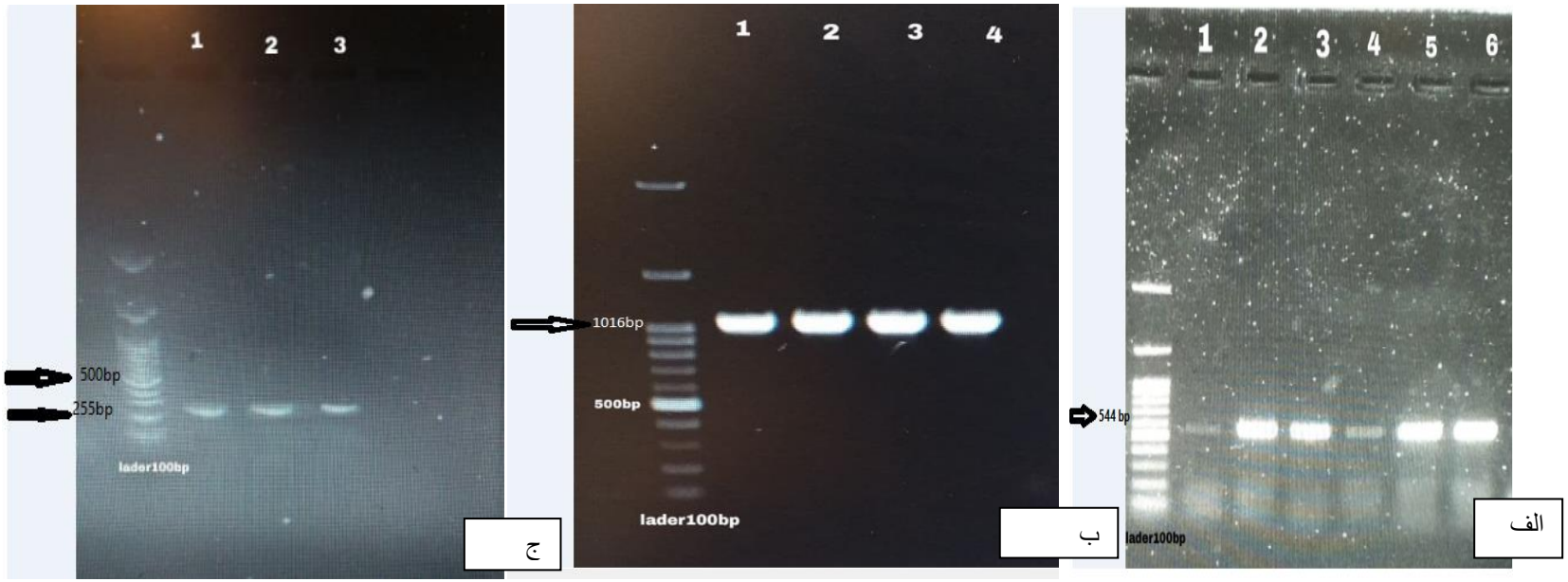
در بررسی مولکولی ژن‌های کد کننده مقاومت به ESBLs در مجموع از ۴۳جدایهء *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه*، ۳۹ جدایهء (۹۰/۶۹٪) دارای ژن bla_{CTX-M} مشاهده شد، که از این تعداد ۲۲ جدایهء (۱۰۰٪) *اشریشیا کلی* و ۷ جدایهء (۷۰٪) *کلبسیلا نمونیه* مربوط به بخش ICU بودند. همچنین ۴ جدایهء (۸۰٪) *اشریشیا کلی* و ۶ جدایهء (۱۰۰٪) *کلبسیلا نمونیه* مربوط به بخش جراحی به دست آمد. دیگر ژن کد کننده مقاومت به ESBLs در مطالعه حاضر bla_{SHV} با فراوانی کلی ۹ جدایهء (۲۰/۹۳٪) در هر دو نوع باکتری *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* گزارش شد، که از تعداد۱ جدایهء (۵۴/۴٪) *اشریشیا کلی* و ۶ جدایهء (۶۰٪) *کلبسیلا نمونیه* مربوط به بخش ICU ، ۱ جدایهء (۲۰٪) *اشریشیا کلی* و ۱ جدایهء (۱۶/۶۶٪) *کلبسیلا نمونیه* مربوط به بخش جراحی بودند. ژن کد کننده bla_{OXA-11} نیز به طور کلی در ۱۳ جدایه (۳۰/۲۳٪) شناسایی شد،که ۷ جدایهء (۳۱/۸۱٪) *اشریشیا کلی* و ۳ جدایهء (۳۰٪) *کلبسیلا نمونیه* مربوط به بخش ICU، ۲ جدایهء (۴۰٪) *اشریشیا کلی* و ۱ جدایه (۱۶/۶۶٪) *کلبسیلا نمونیه* مربوط به بخش جراحی مشاهده شد.(جدول۶-۴).

در تست های فنوتیپی مقاومت به واسطه متالوβ- لاکتاماز و کارباپنمازها ۹ جدایهء *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* مشاهده شدند، از این تعداد ۵ جدایهء (۵۵/۵۵٪) *کلبسیلانمونیه* دارای ژن bla_{NDM} و bla_{OXA-23} بودند. ژن bla_{NDM} در ۴ جدایهء (۱۰۰٪) *کلبسیلا نمونیه* مربوط به بخش ICU و ۱جدایهء (۵۰٪) *کلبسیلا نمونیه* بخش جراحی به دست آمد. ژن bla_{OXA-23} نیز در۳ جدایهء (۷۵٪) *کلبسیلا نمونیه* و ۱ جدایهء (۵۰٪) *اشریشیا کلی* به *ترتیب* مربوط به بخش ICU، ۱ جدایهء (۱۱.۱۱٪) *اشریشیا کلی* مربوط به بخش جراحی مشاهده شد. ژن های bla_{KPC} و bla_{OXA-48} نیز هرکدام تنها در۱

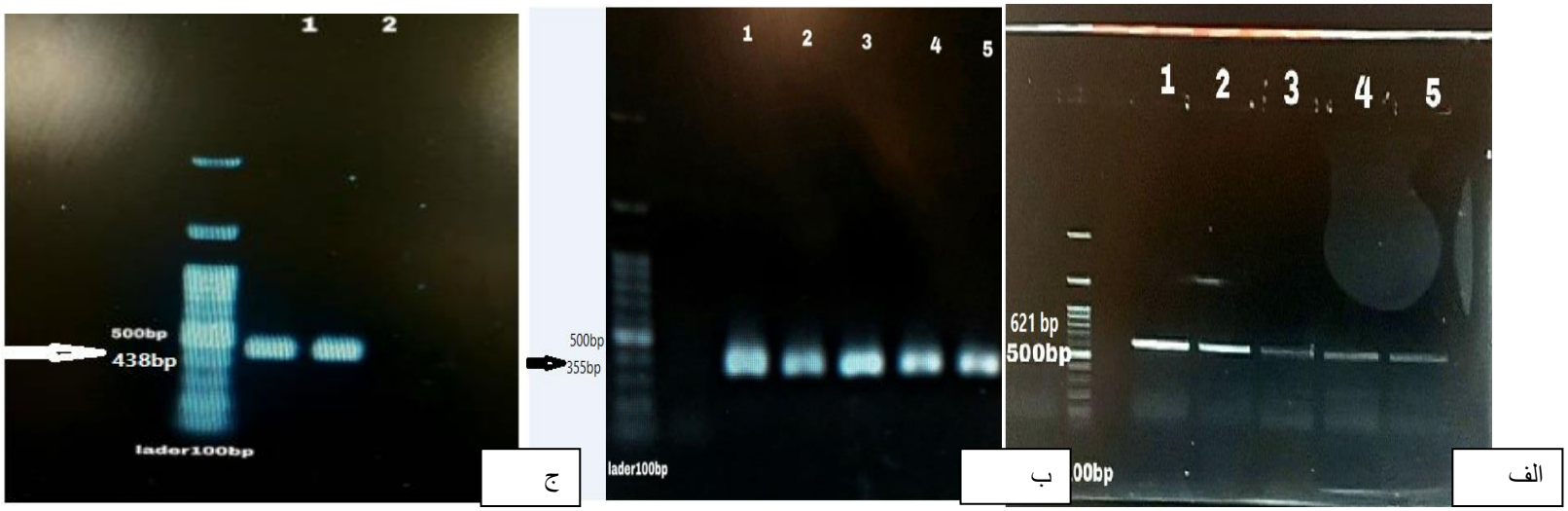
جدایهء (۱۱.۱۱٪) به ترتیب، *اشریشیا کلی* مربوط به بخش جراحی و *کلبسیلا نمونیه* مربوط به بخش ICU گزارش شدند. ژن‌های bla_{VIM} و bla_{IMP} نیز در هیچ جدایهء ای مشاهده نشد، اطلاعات نتایج حاصل در جدول ۶-۴ نشان داده شده است.

جدول۶-۴: میزان و درصد شیوع ژن‌های مقاومت باکتری به ESBLs، متالوβ- لاکتاماز و کارباپنماز در *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* بخش های ICU و بخش جراحی.

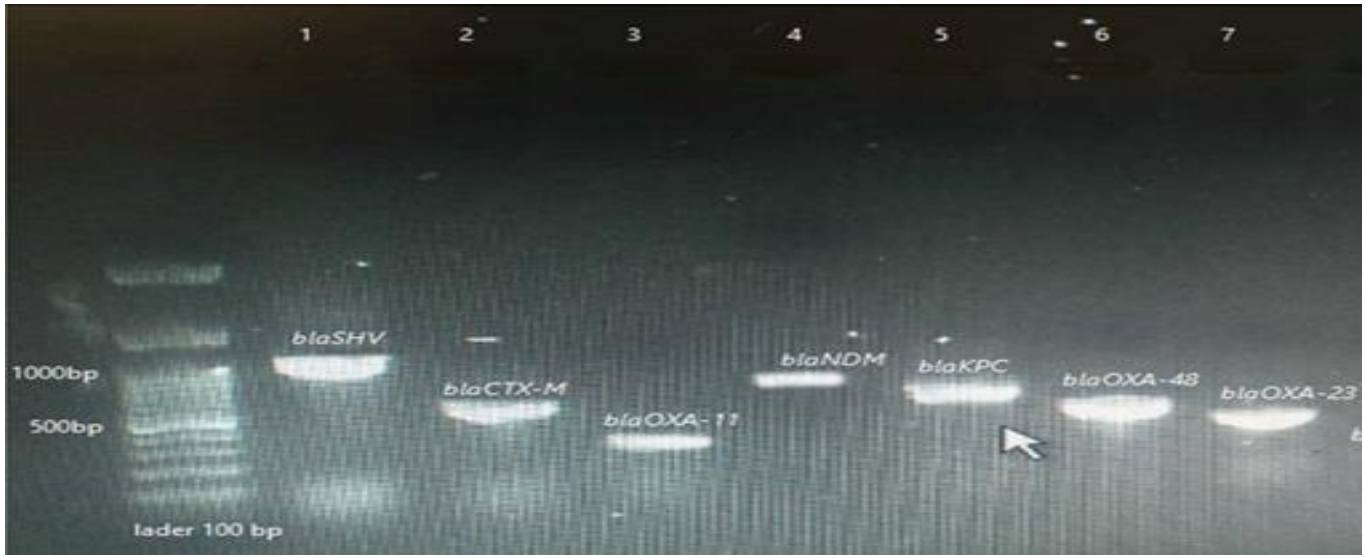
			ESBLs n(%)					(CREs)n(%)					
	Department	N	bla_{CTX-M}	bla_{SHV}	bla_{OXA-11}	Department	N	bla_{NDM}	bla_{VIM}	bla_{KPC}	bla_{IMP}	bla_{OXA-23}	bla_{OXA-48}
E. coli	ICU	22	22(100)	1(4.54)	7(31.81)	ICU	2	0(0.0)	0(0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0(0.0)	1(50)
E. coli	surgery	5	4(80)	1(20)	2(40)	surgery	1	0(0.0)	0(0.0)	1(100)	0 (0.0)	1(100)	0(0)
Total		27	26(96/29)	2(7/40)	9(33/33)		3	0(0.0)	0(0.0)	1(100)	0 (0.0)	1 (11.11)	0(0)
K.pneumoniae	ICU	10	7(70)	6(60)	3(30)	ICU	4	4(100)	0(0.0)	0(0.0)	0 (0.0)	3(75)	0(0.0)
K.pneumoniae	surgery	6	6(100)	1(16.66)	1(16.66)	surgery	2	1(50)	0(0.0)	0(0.0)	0 (0.0)	1(50)	0(0.0)
Total								5(100)	0(0.0)	0(0.0)	0 (0.0)	4(44.44)	0(0.0)
Total		43	39(90.69)	9(20.93)	13(30.23)		9	5(55.55)	0(0.0)	1(11.11)	0 (0.0)	5(55.55)	1(11.11)



تصویر ۳-۴: تصویر ژل الکتروفورز مربوط به محصول PCR ، ژن های کد کننده bla_{SHV} با طول باند ۱۰۱۶ bp (ب)، ژن کد کننده bla_{CTX-M} با طول باند ۵۴۴bp (الف) و ژن کننده bla_{OXA-11} با طول باند ۲۵۵ bp(ج) در باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* .



تصویر ۴-۴ تصویر ژل الکتروفورز مربوط به محصول PCR، ژن های کد کننده bla_{NDM} با طول ۶۲۱ bp (الف)، ژن bla_{OXA-23} با طول ۳۵۵bp (ب)و ژن bla_{OXA-48} با طول ۴۳۸bp (ج) در باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه*



تصویر ۵-۴ : تصویر ژل الکتروفورز مربوط به محصول PCR ژن های کد کننده bla_{SHV} ردیف۱، ژن کد کننده bla_{CTX-M}ردیف ۲، ژن کد کننده bla_{OXA-11} ردیف ۳، ژن کد کننده bla_{NDM} ردیف ۴، ژن کد کننده bla_{KPC} ردیف ۵، ژن کد کننده bla_{OXA-48} ردیف ۶ و ژن کد کننده bla $_{OXA-23}$ در ردیف ۷ در باکتری-های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه*

۴-۷ بررسی حضور همزمان ژن های کد کننده ESBLs، متالوβ- لاکتاماز و کارباپنماز در باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه*:

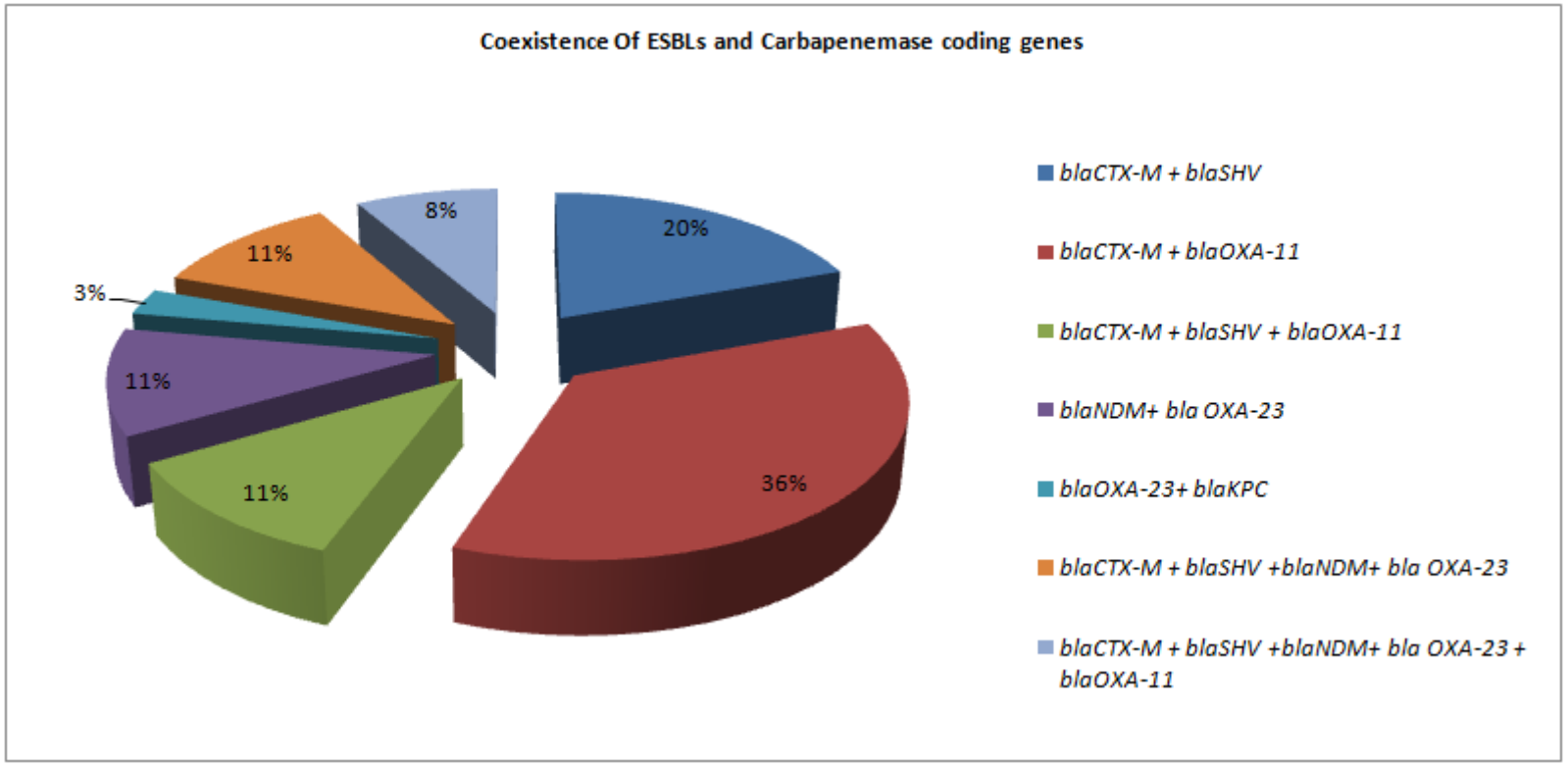
در بررسی *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* تولید کننده ESBLs، متالوβ- لاکتاماز و کارباپنماز، ۷ جدایهء به طور هم زمان دارای ژن‌های کد کننده bla_{CTX-M} و bla_{SHV}، ۱۳جدایهء به طور هم زمان دارای ژن‌های کد کننده دارای bla_{CTX-M} و bla_{OXA-11} و ۴ جدایهء به طور هم زمان دارای ژن‌های کد کننده bla_{CTX-M} ، bla_{SHV} و bla_{OXA-11} مشاهده شد. همچنین، ۴ جدایهء *کلبسیلانمونیه* به طور هم زمان دارای ژن‌های کد کننده bla_{NDM} و bla_{OXA-23} و ۱جدایهء *اشریشیا کلی* به طور هم زمان دارای ژن‌های کد کننده bla_{OXA-23} و bla_{KPC} مشاهده شد. ۴ جدایهء *کلبسیلا نمونیه* به طور مشترک دارای ۴ ژن کد کنندهء bla_{CTX-M}، bla_{SHV}، bla_{NDM} و bla_{OXA-23} و ۳ جدایهء کلبسیلا نمونیه به طور مشترک دارای ژن کد کنندهء bla_{OXA-11}، bla_{CTX-M}، bla_{SHV}، bla_{NDM} و bla_{OXA-23} از کلاس های متفاوت ESBLs، متالوβ- لاکتاماز و کارباپنماز به دست آمد.نتایج به دست آمده در جدول ۴-۷ و نمودار ۴-۵ نشان داده شده است.

جدول۴-۷: حضور همزمان ژن های کد کننده ESBLs، متالوβ- لاکتاماز و کارباپنماز در باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه*

	A	B	C	D	E	F	G
E. coli	2(28.57)	9(69.23)	1(25)	0(0.0)	1(100)	0(0.0)	0(0.0)
K.pneumoniae	5(71.43)	4(30.77)	3(75)	4(100)	0(0.0)	4(100)	3(100)
TOTAL	7 (100)	13(100)	4(100)	4(100)	1(100)	4(100)	3(100)

A: $bla_{CTX-M} + bla_{SHV}$ B: $bla_{CTX-M} + bla_{OXA-11}$ C : $bla_{CTX-M} + bla_{SHV} + bla_{OXA-11}$ D: $bla_{NDM} + bla_{OXA-23}$ E: $bla_{OXA-23} + bla_{KPC}$

F: $bla_{CTX-M} + bla_{SHV} + bla_{NDM} + bla_{OXA-23}$ G: $bla_{CTX-M} + bla_{SHV} + bla_{NDM} + bla_{OXA-23} + bla_{OXA-11}$



نمودار ۵-۴: حضور همزمان ژن های کد کننده ESBLs، متالوβ- لاکتاماز و کارباپنماز در باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه*

۴-۸ نتایج توالی یابی محصولات PCR:

به منظور تایید نتایج *PCR* توالی یابی برای ۵ نمونه bla_{NDM} و ۱ نمونه ء *bla* $_{OXA-23}$ انجام شد و تشابه ۹۸٪ نوکلوئتیدی در هر دو ژن به دست آمد. از طرفی ۵ نمونه bla_{NDM} به عنوان ۱- bla_{NDM} شناسایی شدند.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
813 bits(440)	0.0	460/469(98%)	4/469(0%)	Plus/Plus

```
Query  11      GTCTGGCAGCACACCTTCCTATCTCGACATGCCGGGTTTCGGGGCAGTCGCTTCCAACGG  70
               ||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  157174  GTCTGGCAGCACA-CTTCCTATCTCGACATGCCGGGTTTCGGGGCAGTCGCTTCCAACGG  157232

Query  71      TTTGATCGTCAGGGATGGCGGCCGCGTGCTGGTGGTCGATACCGCCTGGACCGATGACCA  130
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  157233  TTTGATCGTCAGGGATGGCGGCCGCGTGCTGGTGGTCGATACCGCCTGGACCGATGACCA  157292

Query  131     GACCGCCCAGATCCTCAACTGGATCAAGCAGGAGATCAACCTGCCGGTCGCGCTGGCGGT  190
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  157293  GACCGCCCAGATCCTCAACTGGATCAAGCAGGAGATCAACCTGCCGGTCGCGCTGGCGGT  157352

Query  191     GGTGACTCACGCGCATCAGGACAAGATGGGCGGTATGGACGCGCTGCATGCGGCGGGGAT  250
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  157353  GGTGACTCACGCGCATCAGGACAAGATGGGCGGTATGGACGCGCTGCATGCGGCGGGGAT  157412

Query  251     TGCGACTTATGCCAATGCGTTGTCCAACCAGCTTGCCCCGCAAGAGGGGATGGTTGCGGC  310
               ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  157413  TGCGACTTATGCCAATGCGTTGTCGAACCAGCTTGCCCCGCAAGAGGGGATGGTTGCGGC  157472

Query  311     GCAACACAGCCTGACTTTCGCCGCCAATGGCTGGGTCGAACCACCAACCGCGCCCAACTT  370
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  157473  GCAACACAGCCTGACTTTCGCCGCCAATGGCTGGGTCGAACCAGCAACCGCGCCCAACTT  157532

Query  371     TGGCCCGCTCCAGGTATTTTACCCCGGCCCCGGCCACACCAGTGACAATATCACCCGTTG  430
               |||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct  157533  TGGCCCGCTCAAGGTATTTTACCCCGGCCCCGGCCACACCAGTGACAATATCA-CCGTTG  157591

Query  431     GGATCCACGGCCCCGCACATCGCTTTTGGTGGCTGCCCTGATCAAGGAC  479
               ||||| ||||| ||| ||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct  157592  GGATCGACGGCACCG-ACATCGCTTTTGGTGGCTGCC-TGATCAAGGAC  157638
```

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
442 bits(239)	1e-119	272/287(95%)	5/287(1%)	Plus/Plus

```
Query  43      AAGCTTCTCTCGCAGTCCCAGTCTATCCAGGAACTTGCGCGACGTATCGGTCTTGATCTC  102
               |||||| ||| ||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  110     AAGCTT-TCT-GCAGTCCCAGTCTAT-CAGGAACTTGCGCGACGTATCGGTCTTGATCTC  166

Query  103     CTGCAAAAAGAA-TAAAACGTATTGGTTTCGGTAATGCTGAAATTGGACAGCAGGTTGAT  161
               |||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  167     ATGCAAAAAGAAGTAAAACGTATTGGTTTCGGTAATGCTGAAATTGGACAGCAGGTTGAT  226

Query  162     AATTTCTGGTTGGTAGGACCCTTAAAGGTTACGCCTATTCAAGAGGTAGAGTTTGTTTCC  221
               |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  227     AATTTCTGGTTGGTAGGACCATTAAAGGTTACGCCTATTCAAGAGGTAGAGTTTGTTTCC  286

Query  222     CAATTACCACATACCCAGCTTCCATTTACTGAAAAAGTGCAGGCTAATGCAAACACTCTC  281
               |||||| ||||||| |||||||||||| |||||||||||||||||| ||| | | |
Sbjct  287     CAATTAGCACATACACAGCTTCCATTTAGTGAAAAAGTGCAGGCTAATGTAAAAAATATG  346

Query  282     CCTTCTTTTAAAAGAGAGTAATGGCTACAAAATTTTTGGAAAGACTG  328
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  347     -CTTCTTTTAAAAGAGAGTAATGGCTACAAAATTTTTGGAAAGACTG  392
```

تصویر۶-۴: نتیجه آنالیز توالی یابی PCR برای ژن‌های bla_{NDM} و bla_{OXA-23} در باکتری *کلبسیلانمونیه* با تشابه ۹۸٪ و ۹۵٪ نوکلوئتیدی

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

۱–۵ بحث:

عفونت‌های بیمارستانی یکی از عمده مشکلات بهداشت عمومی در سراسر جهان بوده، که تمام بیماران بستری در معرض خطر ابتلا به این نوع عفونت ها هستند. میزان شیوع این نوع عفونت از کشوری به کشور دیگر متفاوت است. در اکثر کشورهای توسعه یافته، سیستم نظارت بر عفونت بیمارستانی برای جمع آوری داده های مربوط به شیوع عفونت بیمارستانی در دسترس است. طبق مطالعه متاآنالیز آقای محمدی در سال ۲۰۱۹، شیوع عفونت بیمارستانی در ایران به طور کلی ۴.۶٪ برآورد شده بود، این در حالی است که ارومیه با ۴٪ درصد کمترین میزان و سنندج با ۱۵/۶ درصد بیشترین میزان شیوع را نشان دادند. این میزان از شیوع در ایران نسبت به سایر کشورها سطوح پایین تری را نشان می‌دهد، مهمترین دلیل این موضوع حاکی از عدم گزارش دهی میزان عفونت می‌باشد، چراکه براساس شواهد داخلی و خارجی میزان شیوع عفونت بیمارستانی بین ۸ تا ۱۰ درصد براورد شده و طبق گزارشات مرکز مدیریت بیماری‌های کشور در سال ۸۷ میزان شیوع عفونت های بیمارستانی درایران تا ۸۷ درصد نیز براورد شده است (۱۸ و ۲۵)

در بررسی حاضر میزان شیوع عفونت بیمارستانی تایید شده در بخش ICU، ۱۱.۷۹ درصد به دست آمد، این میزان با مطالعه شجاعی در قم و نیز با مطالعه گلشا به ترتیب با شیوع ۶.۵۶ درصد و ۱۳ درصد عفونت در بخش ICU مطابقت داشت (۵۲ و ۵۳). با این وجود در بررسی که در زاهدان صورت گرفت، میزان کلی شیوع عفونت در بیمارستان ۱ درصد گزارش شده بود که ۷۶.۹ درصد آن مربوط به بخش ICU بوده که این یافته ها با مطالعه حاضر مغایرت و تفاوت بسیار بالایی داشت (۵۴). دلایل تفاوت در نتایج گزارش شده ممکن است به دلیل تفاوت در دوره مطالعه یا حاکی از عدم گزارش دهی میزان عفونت و یا تفاوت در نوع واحدهای مورد بررسی باشد (۵۴)

در بررسی حاضر مهمترین عفونت بالینی در بیماران عفونت‌های تنفسی با ۵۲ مورد (۵۰/۴۸٪) و در ادامه عفونت مربوط به دستگاه ادارای با ۲۶ مورد (۲۵/۲۵٪) به دست آمد . تایید این نتیجه، با مطالعه طباطبایی با بیان اینکه از ۱۷۱بیمار دارای عفونت بیمارستانی ۱۱۸ مورد مرتبط به عفونت تنفسی بود اثبات گردید (۵۴). در مطالعه دیگر با مقایسه عفونت بیمارستانی در بخش ICU داخلی و جراحی عفونت تنفسی در هر دو بخش ICU داخلی و جراحی بعنوان شایعترین نوع عفونت شناسایی شد، همچنین در مطالعه ذکر شده پس از عفونت تنفسی، عفونت ادارای دومین عفونت شایع در این دو بخش گزارش شدکه به مطالعه حاضر مطابقت داشت، در بخش ICU به صورت گسترده از ونتیلاتورهای تنفسی و سوند های ادراری استفاده می‌شود که خود می تواند بعنوان عامل مستعد کننده در ایجاد عفونت در بیماران بستری در این بخش باشد (۵۵).

در بررسی کشت‌های باکتریای، باکتری‌های گرم منفی با ۷۹جدایهء (۷۶/۷۰٪)، بعنوان عامل اصلی ایجاد عفونت بیمارستانی در بخش ICU معرفی شدند، این نتیجه با یافته‌های نوری که باکتری‌های گرم منفی را بعنوان عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی معرفی کردند، سازگار بود (۵۶). در مطالعه حاضر شایعترین باکتری‌های عامل عفونت به ترتیب *اشریشیا کلی* با ۲۹ جدایهء (۲۸/۱۶٪) و در ادامه *اسینتوباکتر* با ۱۵جدایهء (۱۴.۵۶٪) به دست آمد، مطابق با این نتیجه در بررسی گلشا و نیز نوری، *اشریشیا کلی* شایعترین باکتری گرم منفی عامل عفونت بیمارستانی گزارش شد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. همچنین *استافیلوکوکوس اورئوس* بعنوان باکتری گرم مثبت غالب در بررسی حاضر گزارش شد که با مطالعه نوری مطابقت داشت (۵۲ و۵۶).

گسترش عفونت‌های بیمارستانی مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌ها یک نگرانی بهداشت عمومی در سراسر جهان تبدیل شده است. افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در بین میکروارگانیسم‌های ایجاد کننده عفونت بیمارستانی با مرگ و میر بالا در بیماران بستری همراه است (۵۵).

تست حساسیت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های گرم منفی، بیشترین حساسیت به ترتیب نسبت به آمیکاسین با ۳۱/۶۴ درصد و در ادامه ایمی پنم و مروپنم با ۳۴/۱۷ درصد و بیشترین مقاومت نسبت به سفتازیدیم ۸۷/۳۴ درصد به دست آمد، نتیجه این مطالعه با یافته‌های نوری با براورد مقاومت بالا نسبت به سفتازیدیم مطابقت دارد، با این وجود در مطالعه ذکر شده سطح بالای مقاومت نسبت به ایمی پنم، مروپنم و آمیکاسین نشان داده شد که با نتیجه بررسی حاضر مغایرت دارد (۵۶).

در باکتری‌های گرم مثبت، بیشترین حساسیت به ترتیب نسبت به تیگاسایکلین (۱۰۰٪)، تری متوپریم/سولفامتوکسازول(۹۵/۸۴٪) و در ادامه لینوزولید (۹۱/۶۷ ٪) به دست آمد. همچنین بیشترین مقاومت نسبت به پنی سیلین (۹۱/۶۷ ٪) در باکتری‌های گرم مثبت مشاهده شد. باکتری‌های گرم مثبت سطوح پایین تری از مقاومت را نشان دادند که با نتایج نوری و نیز Tolera در اتیوپی سازگار بود (۲۵ و ۵۶). با این حال در مطالعه حاضر سطح بسیار بالایی از مقاومت نسبت به سفوکسیتین (۷۹/۱۷٪) و نیز ونکومایسین (۱۶/۶۷٪) در باکتری های گرم مثبت مشاهده شد. میزان مقاومت سفوکسیتین در مطالعه حاضر با یافته های گوردزی با شیوع ۷۰/۸درصدی مقاومت به سفوکستین مطابقت داشت، از طرفی میزان بالای مقاومت به ونکومایسین با مطالعه اسدپور با بیان سطوح بالای مقاومت به سفوکستین در باکتری های گرم مثبت مطابقت نشان داد (۵۷ و ۵۸). تفاوت‌های منطقه‌ای در نقاط مختلف جهان واکنش های آنتی بیوتیکی متفاوتی را ایجاد می‌کند، الگوهای مقاومت به آنتی بیوتیک ها

ممکن است از یک بیمارستان به بیمارستان دیگر در یک کشور متفاوت باشد. منشا این تفاوت ها عبارتند از: تفاوت‌های ژنتیکی بین افراد، تفاوت-های ژنتیکی گونه‌ها، تفاوت در زمینه‌های فرهنگی و اقتصادی، تفاوت در نوع عوامل بیماری‌زا بومی و الگوی حساسیت آنتی بیوتیک آن، بستری شدن طولانی مدت بیماران و استفاده مداوم از انتی بیوتیک های وسیع الطیف در طول بستری از دلایل مقاومت بالا به نتی بیوتیک ها می‌باشد. بنابراین الگوی درمان مورد استفاده در مناطق مختلف بسته به ویژگی‌های خاص یک منطقه متفاوت است، لذا بررسی شیوع باکتری‌های مقاوم درکنترل عفونت‌های بیمارستانی مفید است (۵۶ و۵۹).

در بررسی حاضر، فراوانی مقاومت به ESBLs و نیز کارباپنمازها در جدایه‌های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا نمونیه* به روش‌های فنوتیپی و نیز ژنوتایپی بررسی شد. در تست‌های تایید فنوتیپی ۴۳ جدایهء (۷۵.۴۳٪) *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* تولید کنندهء ESBLs به دست آمد، این نتیجه با یافته های آقای حسنی با شیوع ۸۷.۸٪ ESBLs درتست‌های فنوتیپی سازگار بود (۶۰). با این حال در ایران و نیز نقاط مختلف جهان درصدهای متفاوتی از شیوع گزارش شده است، در مطالعه عبدالشاهی ۴۴.۴۴٪ از جدایه ها تولید کننده ESBLs بودند(۶۱). در مطالعه دیگری از ۱۹۸ نمونه *اشریشیا کلی* ۲۷.۲۷٪ و از ۱۳۹ جدایهء *کلبسیلا نمونیه* ۲۵.۹٪ تولید کننده ESBLs بودند(۶۲). با توجه به مطالعه مرور سیستماتیک و متاآنالیز خانم جابلاملی در مورد شیوع مقاومت به ESBLs، به طور کلی ۴۳.۲٪را در ایران گزارش کردند که این میزان از مقاومت نسبت به کشورهای توسعه یافته مانند فرانسه با ۱.۵٪ و آلمان با ۳.۳٪ بسیار بالا می‌باشد که می‌تواند علت مقاومت بالای آنتی بیوتیکی در باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* را در مطالعه حاضر توجیح کند (۶۳).

در بررسی حاضر، بیشترین فراوانی ژن کد کنندهء مقاومت به ESBLs، در ژن کد کنندهء bla_{CTX-M} با ۹۰/۶۹ درصد به دست آمد، نتیجه حاضر با یافته‌های حسنی با شیوع ۹۲/۵ ژن کد کنندهء bla_{CTX-M} در *اشریشیا کلی* و نیز شیوع ۱۰۰ درصدی این ژن در *کلبسیلا نمونیه*در مطالعه دیگر سازگار است (۶۰ و ۶۴). همچنین کمترین شیوع در ژن کد کنندهء bla_{SHV} با ۲۰/۹۳ درصد گزارش شد، تایید این نتیجه با مطالعه بشارتی زاده با شیوع پایین ژن کد کنندهء bla_{SHV} در *اشریشیا کلی* و همچنین با بررسی شهبازی و همکارانش با شیوع ۱۰ درصدی ژن کد کنندهء bla_{SHV} مطابقت دارد (۶۵ و۶۶).

در.مطالعه حاضر، ۹ جدایه (۱۵/۷۹٪) *اشریشیاکلی* و *کلبسیلانمونیه* با تست‌های فنوتیپی بعنوان تولید کننده متالو-β -لاکتاماز و کارباپنماز به دست آمدند.

این نتیجه با بررسی مرور سیستماتیک و متاآنالیز نصیری در ایران که میزان کلی مقاومت به کرباپنم‌ها در *کلبسیلا نمونیه* ۲۴ درصد و در *اشریشیاکلی* ۵ درصد ارزیابی کرده بود سازگار است همچینین در بررسی ذکر شده، روند رو به افزایش برای این نوع از مقاومت‌ها گزارش شده بود (۶۷).

در بررسی مقاومت به کارباپنمازها در ۹ جدایهء *اشریشیا کلی* و *کلبسیلانمونیه*، بیشترین فراوانی در ژن‌های کد کنندهء bla_{NDM} و bla_{OXA-} 23 با ۵۵/۵۵ درصد به دست آمد، که ژن bla_{NDM}در نتایج حاصل از توالی یابی به عنوان bla_{NDM-1} تایید شدند، نتایج حاصل از مطالعه حاضر با مطالعه Huang با شیوع بالای ژن کد کننده bla_{NDM-1} در *کلبسیلا نمونیه* مطابقت دارد (۶۸). همچنین میزان شیوع ژن‌های کد کنندهء bla_{IMP} و bla_{VIM} در بررسی حاضر منفی گزارش شد که با نتایج خانم کیایی و همکارانش سازگار است، با این وجود در مطالعه ذکر شده ژن‌های کد کنندهء

bla_{NDM}، bla_{OXA-48} و bla_{KPC} نیز منفی گزارش شده بود که با اطلاعات حاصل از مطالعه حاضر مغایرت دارد(۶۹). دراین مطالعه جدایه‌های تولید کننده bla_{KPC}، bla_{NDM} و bla_{OXA-48} نسبت به تعدادمقاوم با تست‌های فنوتیپی سطح بالای از ژن های کد کنندهء مقاومت به دست آمد، که نتیجه این مطالعه با نتایج خانم جلاوند و همکارانش با شیوع بالایی مقاومت نسبت به سه ژن ذکر شده در جدایه‌های انتروباکتریاسه مطابقت داشت (۷۰).

نتیجه گیری:

در مطالعه ء حاضر بیشترین عفونت بیمارستانی در بخش ICU1 گزارش شد. از طرفی باکتری‌های گرم منفی با تنوع و نیز مقاومت بسیار بالا بعنوان عامل اصلی ایجاد عفونت بیمارستانی در بخش ICU معرفی شدند. نتایج فنوتایپی و ملکولی مقاومت در باکتری های *اشریشیا کلی* و نیز *کلبسیلا نمونیه* با یکدیگر مطابقت داشتند که سطوح بالایی از مقاومت آنتی بیوتیکی را در باکتری های ذکر شده نشان دادند. از طرفی مقاومت نسبت به ونکومایسین در باکتری های گرم مثبت به دست آمد که این مسئله بسیار حائز اهمیت بوده و باید مورد توجه قرار گیرد. بنابرین شناسایی عامل و منبع احتمالی ایجاد عفونت، و شناسایی الگوهای غالب حساسیت به آنتی بیوتیک در این بخش به انتخاب رژیم آنتی بیوتیک تجربی مناسب در کاهش عفونت بیمارستانی و میزان مرگ و میر بیماران کمک کننده است.

محدودیت‌ها:

محدودیت زمانی جهت انجام نمونه گیری و بررسی بیشتر

عدم دسترسی مستقیم به بیمار جهت نمونه گیری به دلیل وقوع پاندمی کرونا

عدم دسترسی مستقیم به نمونه های بالینی

عدم دسترسی به پزشک جهت بررسی علائم عفونت و نیز نوع داروهای تجویزی

پیشنهادات:

ایجاد سیستم های نظارتی برای تجزیه و تحلیل روند مقاومت آنتی بیوتیکی

نظارت بر تجویز آنتی بیوتیک و برنامه های نظارت ضد میکروبی در سیستم های مراقبت های بهداشتی

راه اندازی بخش قارچ شناسی در بیمارستان و بررسی عفونت بیمارستانی ناشی از عفونت قارچی

استفاده از دستورالعمل های خاص در ICU و مطالعه تاثیر آن بر کاهش و پیشگیری از عفونت های بیمارستانی

Reference:

1. Rezai MS, Bagheri-Nesami M, Nikkhah A. Catheter-related urinary nosocomial infections in intensive care units: An epidemiologic study in North of Iran. Caspian journal of internal medicine. 2017;8(2):76.
2. Akbari R, Bafghi MF, Fazeli H. Nosocomial Infections Pathogens Isolated from Hospital Personnel, Hospital Environment and Devices. Journal of Medical Bacteriology. 2018;7(1-2):22-30.
3. Khan HA, Baig FK, Mehboob R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2017;7(5):478-82.
4. Saeidimehr S, Geravandi S, Rahim F, Yosefi F, Salmanzadeh S, Foruozandeh H, et al. Nosocomial infection rates during one year in naft grand hospital, Ahvaz, Iran. Jundishapur journal of health sciences. 2015;7(4).
5. Friedrich AW. Control of hospital acquired infections and antimicrobial resistance in Europe: the way to go. Wiener Medizinische Wochenschrift. 2019;169(1):25-30.
6. Ghashghaee A, Behzadifar M, Azari S, Farhadi Z, Bragazzi NL, Behzadifar M, et al. Prevalence of nosocomial infections in Iran: A systematic review and meta-analysis. Medical journal of the Islamic Republic of Iran. 2018;32:48.
7. Haque M, Sartelli M, McKimm J, Bakar MA. Health care-associated infections–an overview. Infection and drug resistance. 2018;11:2321.
8. Khan HA, Ahmad A, Mehboob R. Nosocomial infections and their control strategies. Asian pacific journal of tropical biomedicine. 2015;5(7):509-14.
9. Nasiri MJ, Goudarzi AM, Aslani HR, Goudarzi M, Zamani S, AdinehKharrat S. Nosocomial Infections Caused by Drug-Resistant Bacteria in a Referral University Hospital, Tehran, Iran. Novelty in Biomedicine. 2019;7(2):64-70.
10. Jaffar A AT, Paul T. Healthcare associated infections [HAI] perspectives. 2014.
11. Xu Y, Gu B, Huang M, Liu H, Xu T, Xia W, et al. Epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae (CRE) during 2000-2012 in Asia. Journal of thoracic disease. 2015;7(3):376.
12. Afle FCD, Agbankpe AJ, Johnson RC, Houngbegnon O, Houssou SC, Bankole HS. Hospital Acquired Infection: Bacteriological Profile of Species from Environmental Surfaces of Cotonou 5 Hospital in South Benin (West Africa). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2018;7:1503-15.
13. Martinez AE, Widmer A, Frei R, Pargger H, Tuchscherer D, Marsch S, et al. ESBL-colonization at ICU admission: impact on subsequent infection, carbapenem-consumption, and outcome. Infection Control & Hospital Epidemiology. 2019;40(4):408-13.
14. Tschudin-Sutter S, Lucet J-C, Mutters NT, Tacconelli E, Zahar JR, Harbarth S. Contact precautions for preventing nosocomial transmission of extended-spectrum β lactamase–producing Escherichia coli: a point/counterpoint review. Clinical Infectious Diseases. 2017;65(2):342-7.

15. Dubinsky-Pertzov B, Temkin E, Harbarth S, Fankhauser-Rodriguez C, Carevic B, Radovanovic I, et al. Carriage of extended-spectrum beta-lactamase–producing Enterobacteriaceae and the risk of surgical site infection after colorectal surgery: a prospective cohort study. Clinical Infectious Diseases. 2019;68(10):1699-704.
16. Flokas ME, Karanika S, Alevizakos M, Mylonakis E. Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in pediatric bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. PloS one. 2017;12(1):e0171216.
17. Ashrafian F, Askari E, Kalamatizade E, Ghabouli-Shahroodi M, Naderi-Nasab M. The Frequency of Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: A Report from Mashhad, Iran. Journal of Medical Bacteriology. 2013;2(.9-12:(2-1
18. Mohammadi M, Vaisi Raiegan A, Jalali R, Ghobadi A, Salari N, Barati H. The prevalence of nosocomial infections in Iranian hospitals. Journal of Babol University of Medical Sciences. 2019;21(1):39-45.
19. Agaba P, Tumukunde J, Tindimwebwa J, Kwizera A. Nosocomial bacterial infections and their antimicrobial susceptibility patterns among patients in Ugandan intensive care units: a cross sectional study. BMC research notes. 2017;10(1):1-12.
20. Kollef MH, Torres A, Shorr AF, Martin-Loeches I, Micek ST. Nosocomial Infection. Critical care medicine. 2021;49(2):169-87.
21. Khammar M, Hassanzadeh S, Tara F, Siahsar M, Tahmasbi F, Keikha M, et al. A 4-year Study on Antimicrobial Susceptibility Trends of Nosocomial Infections in a Mashhad Referral Hospital, Mashhad, Iran. Reviews in Clinical Medicine. 2021;8(2):50-5.
22. Monegro AF, Muppidi V, Regunath H. Hospital acquired infections. Statpearls [Internet]. 2020.
23. Leone M, Bouadma L, Bouhemad B, Brissaud O, Dauger S, Gibot S, et al. Hospital-acquired pneumonia in ICU. Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine. 2018;37(1):83-98.
24. Khan A, Miller WR, Arias CA. Mechanisms of antimicrobial resistance among hospital-associated pathogens. Expert review of anti-infective therapy. 2018;16(4):269-87.
25. Tolera M, Abate D, Dheresa M, Marami D. Bacterial nosocomial infections and antimicrobial susceptibility pattern among patients admitted at Hiwot Fana Specialized University Hospital, Eastern Ethiopia. Advances in medicine. 2018;2018.
26. Campion M, Scully G. Antibiotic use in the intensive care unit: optimization and de-escalation. Journal of intensive care medicine. 2018;33(12):647-55.
27. Nwafia IN, Ohanu ME, Ebede SO, Ozumba UC. Molecular detection and antibiotic resistance pattern of extended-spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli in a Tertiary Hospital in Enugu, Nigeria. Annals of clinical microbiology and antimicrobials. 2019;18(1):1-7.
28. Weinstein RA. Nosocomial infection update. Emerging infectious diseases. 1998;4(3):416.
29. Lockhart SR, Abramson MA, Beekmann SE, Gallagher G, Riedel S, Diekema DJ, et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. Journal of clinical microbiology. 2007;45(10):3352-9.

30. De Waele JJ, Boelens J, Leroux-Roels I. Multidrug-resistant bacteria in ICU: fact or myth. Current Opinion in Anesthesiology. 2020;33(2):156-61.
31. García-Tello A, Gimbernat H, Redondo C, Meilán E, Arana DM, Cacho J, et al. Prediction of infection caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: development of a clinical decision-making nomogram. Scandinavian journal of urology. 2018;52(1):70-5.
32. Urase T, Okazaki M, Tsutsui H. Prevalence of ESBL-producing Escherichia coli and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in treated wastewater: a comparison with nosocomial infection surveillance. Journal of Water and Health. 2020;18(6):899-910.
33. Surgers L, Boyd A, Boelle P-Y, Lalande V, Jolivot P-A, Girard P-M, et al. Clinical and microbiological determinants of severe and fatal outcomes in patients infected with Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β-lactamase. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2017;36(7):1261-8.
34. Mulki SS, Ramamurthy K, Bhat S. Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in intensive care unit patients. Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine. 2017;21(8):525.
35. Li Y, Gong Z, Lu Y, Hu G, Cai R, Chen Z. Impact of nosocomial infections surveillance on nosocomial infection rates: A systematic review. International journal of surgery. 2017;42:164-9.
36. Kluytmans-van den Bergh MF, van Mens SP, Haverkate MR, Bootsma MC, Kluytmans JA, Bonten MJ, et al. Quantifying hospital-acquired carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae among patients in Dutch hospitals. infection control & hospital epidemiology..9-32:(1)39;2018
37. Choudhuri AH, Chakravarty M, Uppal R. Epidemiology and characteristics of nosocomial infections in critically ill patients in a tertiary care intensive care unit of Northern India. Saudi journal of anaesthesia. 2017;11(4):402.
38. Peralta G, Sanchez MB, Garrido JC, De Benito I, Cano ME, Martínez-Martínez L, et al. Impact of antibiotic resistance and of adequate empirical antibiotic treatment in the prognosis of patients with Escherichia coli bacteraemia. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2007;60(4):855-63.
39. Luo K, Tang J, Qu Y, Yang X, Zhang L, Chen Z, et al. Nosocomial infection by Klebsiella pneumoniae among neonates: a molecular epidemiological study. Journal of Hospital Infection. 2021;108:174-80.
40. Choby J, Howard-Anderson J, Weiss D. Hypervirulent Klebsiella pneumoniae–clinical and molecular perspectives. Journal of internal medicine. 2020;287(3):283-300.
41. Xiao T, Yang K, Zhou Y, Zhang S, Ji J, Ying C, et al. Risk factors and outcomes in non-transplant patients with extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli bacteremia: a retrospective study from 2013 to 2016. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2019;8(1):1-11.

42. Ding Y, Wang Y, Hsia Y, Sharland M, Heath PT. Systematic review of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae causing neonatal sepsis in China. Annals of clinical microbiology and antimicrobials. 2019;18(1):1-8.
43. Emele FE, Daramola KC, Anyabolu AE. Isolation and Molecular Characterization of Klebsiella And Enterobacter Species Recovered in Sunflower Seed Agar from Cases Resembling Respiratory Cryptococcosis. Tropical Health and Medical Research. 2021;3(2):69-78.
44. David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, et al. Epidemic of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in Europe is driven by nosocomial spread. Nature microbiology. 2019;4(11):1919-29.
45. Klompas M, editor Prevention of intensive care unit-acquired pneumonia. Seminars in respiratory and critical care medicine; 2019: Thieme Medical Publishers.
46. Javanbakht A, Askari E, Danesh L, Moghadas N, Mostafavi I, Naderinasab M. The incidence of cross infections in Imam Reza hospital, Mashhad, Iran. Iranian journal of microbiology. 2012;4(4):177.
47. Rouhi S, Mohajeri P, Ramazanzadeh R. Survey and typing of Pseudomonas aeruginosa strains causing nosocomial infection using multiple-locus variable number tandem repeat analysis. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. 2019;23(6):128-41.
48. Pérez CD-A, López-Fresneña N, Carlavilla ALR, Garcia MH, Ruiz-Garbajosa P, Aranaz-Andrés JM, et al. Local prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae intestinal carriers at admission and co-expression of ESBL and OXA-48 carbapenemase in Klebsiella pneumoniae: a prevalence survey in a Spanish University Hospital. BMJ open. 2019;9(3):e024879.
49. Weinstein MP, Lewis JS. The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: background, organization, functions, and processes. Journal of clinical microbiology. 2020;58(3):e01864-19.
50. Yamagishi J, Sato Y, Shinozaki N, Ye B, Tsuboi A, Nagasaki M, et al. Comparison of boiling and robotics automation method in DNA extraction for metagenomic sequencing of human oral microbes. PloS one. 2016;11(4):e0154389.
51. Kazemian H, Heidari H, Ghanavati R, Ghafourian S, Yazdani F, Sadeghifard N, et al. Phenotypic and genotypic characterization of ESBL-, AmpC-, and carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli isolates. Medical Principles and Practice. 2019;28(6):547-51.
52. Golsha R, Ashoori N, Tajik M, Sohrabi A, Montazeri M. Prevalence of Nosocomial Infections in Intensive Care Units in Shahid Sayyad-E-Shirazi Hospital of Gorgan During 2016-2018. Tabari Biomedical Student Research Journal. 2020.
53. Shojaei S, Rahimi T, Amini M, Shams S. Survey of nosocomial infections in patients admitted to Nekoei hospital of Qom city in 2012, Iran. Qom University of Medical Sciences Journal. 2015;9(4):64-73.
54. Tabatabaei SM, Behmanesh Pour F, Osmani S. Epidemiology of hospital-acquired infections and related anti-microbial resistance patterns in a tertiary-care teaching hospital in Zahedan, Southeast Iran. International Journal of Infection. 2015;2(4).
55. Ebrahimzadeh A, Allahyari E, Nikoomanesh F, Bidaki MZ. A Comparative Analysis of Nosocomial Infections between Internal and Surgical Intensive Care Units of a University Hospital in Birjand, Iran from 2015 to 2016: A Retrospective Study. 2020.

56. Nouri F, Karami P ,Zarei O, Kosari F, Alikhani MY, Zandkarimi E, et al. Prevalence of common nosocomial infections and evaluation of antibiotic resistance patterns in patients with secondary infections in Hamadan, Iran. Infection and Drug Resistance. 2020;13:2365.
57. Asadpour L, Ghazanfari N. Detection of vancomycin nonsusceptible strains in clinical isolates of Staphylococcus aureus in northern Iran. International Microbiology. 2019;22(4):411-7.
58. Goudarzi M, Eslami G, Rezaee R, Heidary M, Khoshnood S, Nia RS. Clonal dissemination of Staphylococcus aureus isolates causing nosocomial infections, Tehran, Iran. Iranian journal of basic medical sciences. 2019;22(3):238.
59. Pournajafi A, Mahmoudi A. Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Production in Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infection Samples in Zanjan Hospitals, Iran. 2020.
60. Hasani A, Mohammadzadeh A, Kafil HS, Rezaee MA, Aghazadeh M. Characterization of TEM-, SHV-, CTX-and AmpC-type?-lactamases from cephalosporin resistant Escherichia coli isolates from Northwest of Iran. Journal of Pure and Applied Microbiology. 2015;9(4):3401-6.
61. Abdolshahi A, Aminian Z, Zinati T, Shabani A, Khaledi M, Zarrinpour V. Assessment of SHV, CTX-M, and IMP Genes in Beta-Lactam-Resistant Escherichia coli Isolated from Patients with Urinary Tract Infection. Middle East Journal of Rehabilitation and Health Studies. 2019;6(3).
62. Bialvaei AZ, Kafil HS, Asgharzadeh M, Aghazadeh M, Yousefi M. CTX-M extended-spectrum β-lactamase-producing Klebsiella spp, Salmonella spp, Shigella spp and Escherichia coli isolates in Iranian hospitals. brazilian journal of microbiology. 2016;47:706-11.
63. Jabalameli L, Beigverdi R, Ranjbar HH, Pouriran R, Jabalameli F, Emaneini M. Phenotypic and Genotypic Prevalence of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Escherichia coli: A Systematic Review and Meta-Analysis in Iran. Microbial Drug Resistance. 2021;27(1):73-86.
64. Saisi H, Makobe C, Kangongo M, Kariuki S. Prevalence of CTXM, SHV, TEM AND OXA Genes among Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Klebsiella pneumoniae from Mukuru Slum, Kenya. Advances in Microbiology. 2019;9(10):853-62.
65. Besharati Zadeh S, Shakib P, Zolfaghari MR, Farajzadeh Sheikh A. Prevalence of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae, Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBLs) from Clinical Specimen in Khuzestan, Iran. Gene, Cell and Tissue. 2021(In Press).
66. Shahbazi S, Karam MRA, Habibi M, Talebi A, Bouzari S. Distribution of extended-spectrum β-lactam, quinolone and carbapenem resistance genes, and genetic diversity among uropathogenic Escherichia coli isolates in Tehran, Iran. Journal of global antimicrobial resistance. 2018;14:118-25.
67. Nasiri MJ, Mirsaeidi M, Mousavi SMJ, Arshadi M, Fardsanei F, Deihim B, et al. Prevalence and mechanisms of carbapenem resistance in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli: a systematic review and meta-analysis of cross-sectional studies from Iran. Microbial Drug Resistance. 2020;26(12):1491-502.
68. Huang X, Cheng X, Sun P, Tang C, Ni F, Liu G. Characteristics of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae ST234 and ST1412 isolates spread in a neonatal unit. BMC microbiology. 2018;18(1):1-6.

69. Kiaei S, Moradi M, Hosseini-Nave H, Ziasistani M, Kalantar-Neyestanaki D. Endemic dissemination of different sequence types of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae strains harboring blaNDM and 16S rRNA methylase genes in Kerman hospitals, Iran, from 2015 to 2017. Infection and drug resistance. 2019;12:45.
70. Jalalvand K, Shayanfar N, Shahcheraghi F, Amini E, Mohammadpour M, Babaheidarian P. Evaluation of phenotypic and genotypic characteristics of carbapnemases-producing Enterobacteriaceae and its prevalence in a referral hospital in tehran city. Iranian journal of pathology. 2020;15(2):86.

چکیده انگلیسی:

Titel: Prevalence of Nosocomial Infections in Intensive Care Unit, Imam Khomeini Hospital , Ilam,Iran 2020

Introduction: Nosocomial infections are a major challenge worldwide. A vast majority of these infections occurs in the ICU, which increases the treatment process, inpatient duration and mortality of hospitalized patients. Therefore, identification the etiology agents of these infections and detection antimicrobial susceptibility pattern of bacterial pathogens are essential to control nosocomial infections in this department In this study frequency *E.coli* and *Klebsiella* in nosocomial infections in ICU were investigated. also some of major ESBLs and MBLs coding genes in two bacteria were detected by PCR method

Material and methods : In this cross-sectional study, the antimicrobial susceptibility pattern of isolated bacteria from patients with nosocomial infections admitted to the ICU during 6 months was determined by disk diffusion method.

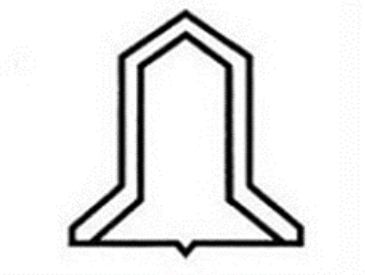
Phenotypic screening and Confirming tests of ESBLs, Metallo-β-lactamases and carbapenemases enzymes were done for *E.coli* and *Klebsiella* isolates. Detection of ESBLs (bla_{CTX-M},bla_{OXA11} and bla_{SHV}) , Metallo-β-lactamases (bla_{NDM},bla_{VIM} and bla_{IMP}) and carbapenemases (bla_{KPC},bla_{OXA-48} and bla_{OXA-23}) genes were also performed by the PCR method.

Results: A total of 103 different bacterial isolates were isolated from 71 patients with nosocomial infections in the ICU. The most frequently isolated bacteria were *E.coli* 28.16%, *Acinetobacter* 14.56% and *Klebsiella* 12.26%. The most common type of infection was a respiratory tract infection (50.48%), Also, the rate of multidrug resistant isolates was 72.81%.

Phenotypic confirmation tests showed that 43 (75.43%) isolates of *E.coli* and *Klebsiella* produced ESBLs and 9 isolates (15.79%) were identified by MCIM phenotypic test as producers of metallobetalactamase and carbapenemase. Molecular tests showed high prevalence of the $bla_{CTX\text{-}M}$ 90.69% and low prevalence of the bla_{SHV} 20.93% among isolates . also bla_{NDM} and $bla_{OXA\text{-}23}$ genes were detected in 55.55% of isolates and $bla_{OXA\text{-}48}$ and bla_{KPC} genes in 11.11% of isolates .The bla_{VIM} and bla_{IMP} genes were not detected in any of the isolates.

Conclusion: In this study, gram-negative bacteria with high antimicrobial resistance pattern were the cause of a high percentage of nosocomial infections in the ICU. Therefore, implementing an appropriate strategy in diagnosing, prescribing medication and monitoring infection control can be effective in reducing the rate of this resistance as well as the rate of nosocomial infections.

Keywords: Nosocomial infection, *E. coli, Klebsiella*, ESBLs, Carbapenamase



Ilam University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

A Thesis Presented for MSc Degree

Medical Microbiology

Title:

Prevalence of Nosocomial Infections in Intensive Care Units in Imam Khomeini Hospital of Ilam, During 2020

Supervisor

Dr .Nourkhoda Sadeghifard

Cosupervisor

Dr. Hossein Kazemian

Dr .Ali Nazari

By

Marzieh Hashemian

2021