

## مقاله پژوهشی

## شیوع ژن های bla-SHV، bla-TEM و bla-CTX-M و مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در دو دسته کلبسیلا پنومونیه دارا و فاقد آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف در نمونه های بالینی بیمارستان های شهر کرمان

محمد مرادی<sup>۱</sup>، امین نوروزی<sup>۲</sup>، مجید طاعتی مقدم<sup>۳\*</sup>

۱- گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۸/۳۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۱/۱۹

## چکیده

**زمینه و هدف:** مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها در میان باکتری های پاتوژن موضوعی است که امروزه به عنوان یک مشکل در سراسر جهان مورد توجه قرار گرفته است. اعضای خانواده انتروباکتریاسه بتالاکتامازهایی را تولید می نماید که توسط پلاسمید کد می شوند درمان عفونت های حاصل از باکتری های مولد این آنزیم ها بسیار مشکل است.

**مواد و روش ها:** ۱۱۱ نمونه ی کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان های شهر کرمان جمع آوری شد، سپس الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های جدا شده به روش دیسک دیفیوژن انجام شد و جهت شناسایی ژن های bla-SHV، bla-TEM و bla-CTX-M ایجاد کننده مقاومت در نمونه های کلبسیلا پنومونیه ابتدا از روش دیسک سینرژیسیم به صورت فنوتیپی و از روش PCR جهت شناسایی ژنوتیپی استفاده شد.

**نتایج:** بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین و ۹۲/۵ در صد بود و موثرترین آنتی بیوتیک علیه نمونه های کلبسیلا پنومونیه آنتی بیوتیک ایمی پنم می باشد که حساسیت به این آنتی بیوتیک ۸۹٪ می باشد از طرفی میزان مقاومت به تمامی آنتی بیوتیک ها در نمونه هایی که تولید کننده ESBLs می باشد بیشتر از نمونه هایی می باشد که فاقد ESBLs می باشند و بعد از انجام PCR تعداد ۵۶ (۴/۵۰٪) نمونه دارای ژن های bla-SHV، bla-TEM و bla-CTX-M بودند.

**نتیجه گیری:** با توجه به شیوع بالای ژن های ESBL و ایجاد مقاومت بالا در باکتری ها می توان با شناسایی این ژن ها تا حدی از انتقال این ژن ها و ایجاد مقاومت های آنتی بیوتیکی جلوگیری نمود.

**کلمات کلیدی:** کلبسیلا پنومونیه، مقاومت آنتی بیوتیکی، ژن های بتالاکتاماز، PCR

## مقدمه

شده است (۳). از طرفی مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها در میان باکتری های گرم منفی مانند کلبسیلا پنومونیه بالا می باشد که امروزه به عنوان یک مشکل در سراسر جهان مورد توجه قرار گرفته است. تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های بیماریزای شایع جهت درمان علیه یک پاتوژن خاص حائز اهمیت است (۴،۶). استراتژی های مختلفی توسط باکتری ها به کار گرفته می شود تا از اثرات زیانبار آنتی بیوتیک ها مصون بمانند، یکی از این مکانیسم ها که در باکتری های گرم منفی علیه آنتی بیوتیک ها به کار گرفته می شود تولید آنزیم های بتالاکتامازی (Beta-Lactamase enzymes) است (۵). مطالعات نشان می دهد که بیشترین مقاومت دارویی در بین باکتری های

کلبسیلا ها پاتوژن های فرصت طلبی از خانواده انتروباکتریاسه هستند که موجب سپتی سمی، باکتریمی، آنتریت نوزادان، مننژیت، عفونت های دستگاه ادراری و بافت های نرم می شوند. اهمیت کلبسیلا به عنوان پاتوژن انسانی در ایجاد عفونت های بیمارستانی بوده و بیماران بستری با نقص سیستم ایمنی و مبتلا به بیماری های زمینه ای از جمله دیابت ملیتوس، اختلالات ریوی مزمن، اهداف عمده این باکتری هستند (۲،۱). از سال ۱۹۸۴ کلبسیلا پنومونیه به عنوان عامل عفونت های اکتسابی بیمارستانی و حامل مقاومت های چند گانه شناخته

\*نویسنده مسئول: مجید طاعتی مقدم، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران  
Email: Majidtaati@Collegian.kmu.ac.ir

برروی آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و سفتریاکسون نسبت به سفتازیدیم دارند (۱۴).

با افزایش مقاومت گونه‌های کلبسیلا پنومونیه به آنتی‌بیوتیک‌ها، هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع ژن‌های مقاومتی bla-SHV، bla-TEM و bla-CTX-M در نمونه‌های بالینی (زخم، سوختگی، ادرار، تراشه، خلط و سایر مایعات) و ارتباط این گونه‌ها با میزان مقاومت می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

شناسایی باکتری: جمع آوری ۱۱۱ نمونه ی کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان‌های افضلی پور، شفا، باهنر و سیدالشهدای شهر کرمان از خرداد تا بهمن سال ۱۳۹۲ انجام گرفت و نمونه‌ها از زخم، سوختگی، ادرار، تراشه، خلط و سایر مایعات بدن جداسازی شد و به بخش میکروپ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه کرمان انتقال داده شد و سپس با توجه به روش‌های استاندارد تشخیصی و بیوشیمیایی تعیین گونه گردیدند. پس از ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، برای کلنی‌هایی که ویژگی‌های کلنی کلبسیلا پنومونیه را داشتند تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل TSI، SIM، MR-VP، سیترات، اوره در آزمایشگاه گروه میکروپ شناسی صورت گرفت و باکتری کلبسیلا پنومونیه جداسازی شد.

تست تعیین حساسیت دارویی (آنتی‌بیوگرام): الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده به روش استاندارد دیسک (CLSI Clinical and laboratory standard institute) دیفیوژن انجام شد و آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده شامل دیسک‌های ای‌می‌پنم (۱۰ μg)، سفتازیدیم (۳۰ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، کلرامفنیکل (۳۰ μg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ μg)، کوتریموکسازول (۱/۲۵/۲۳/۷۵ μg)، سفتریاکسون (۳۰ μg)، تتراسایکلین (۳۰ μg)، آزترونام (۳۰ μg)، سفوتاکسیم (۳۰ μg)، آمپی‌سیلین (۱۰ μg)، آمیکاسین (۳۰ μg)، سفالوتین (۳۰ μg) و سیپروفلوکساسین (۵ μg) بودند که از شرکت Himedia هند خریداری شد.

شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs): برای شناسایی ایزوله‌های تولیدکننده ESBLs از تست تاییدی فنوتیپی شامل دیسک‌های ترکیبی سفتازیدیم/کلولانیک اسید در مقایسه با سفتازیدیم و سفوتاکسیم/کلولانیک اسید در

گرم منفی مانند اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزای ایجادکننده‌ی عفونت‌های بیمارستانی، عفونت‌های مجاری ادراری و باکتری‌می‌دیده می‌شود که می‌توان علت عمده‌ی آن را تولید آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز توسط این باکتری‌ها دانست (۶). این آنتی‌بیوتیک‌ها از طریق هیدرولیز حلقه بتالاکتام منجر به ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند (۷). اعضای خانواده انتروباکتریاسه بتالاکتامازهایی را تولید می‌نمایند که توسط پلاسمید کد می‌شوند از نمونه این بتالاکتامازها می‌توان به TEM، CTX-M و SHV اشاره کرد. درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌های مولد این آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار مشکل است چون از یک سو مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین‌ها مشاهده می‌شود و از سوی دیگر بسیاری از ژن‌های ESBL بر روی پلاسمیدهای بزرگی (بیش از ۱۰۰ کیلو باز) قرار دارد که هم‌زمان حامل ژن‌های مقاومت به سایر عوامل ضد میکروبی مثل آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، سولفونامیدها و تتراسایکلین نیز است. این عفونت‌ها رابطه معنی‌داری با میزان مرگ و میر بیماران داشته و بار مالی زیادی را در پی دارند (۸). براساس عملکرد آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامازی در چهار گروه یا چهار کلاس اصلی A، B، C و D طبقه‌بندی می‌شوند. براساس این طبقه‌بندی، آنتی‌بیوتیک‌های TEM، SHV و CTX-M در کلاس A قرار دارند (۹). امروزه به‌عنوان یکی از مهمترین مکانیسم‌های مقاومتی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام، در میان باکتری‌های گرم منفی مطرح می‌باشد (۱۰). بتالاکتاماز SHV برای نخستین بار توسط Pitton در سال ۱۹۷۲ کشف و PIT-2 نامگذاری شد که طبق تقسیم‌بندی Bush بتالاکتاماز کلاس A محسوب می‌گردد (۱۱). ژن پیش‌ساز SHV ممکن است به صورت یک ژن کروموزومی در سویه‌های کلبسیلا ظاهر شده و سپس از راه‌های مختلف ژنتیکی به پلاسمید منتقل شده و از آن طریق در بین گونه‌های دیگر انتروباکتریاسه پخش شده باشد (۱۲).

خانواده CTX-M از بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در سال ۱۹۸۹ برای اولین بار از آلمان گزارش شدند و پس از آن در نقاط مختلف دنیا گسترش یافتند. این آنتی‌بیوتیک‌ها عمدتاً در خانواده انتروباکتریاسه وجود دارند (۱۳). بتالاکتامازهای CTX-M ارتباطی با بتالاکتامازهای TEM یا HSV ندارند، و تنها ۱۴٪ این دو بتالاکتاماز شباهت دارند. برخلاف بتالاکتامازهای TEM و SHV بتالاکتامازهای CTX-M اثر هیدرولیزکنندگی بیشتری

انجام گردید (۲۸). پس از انجام آزمایش PCR محصولات PCR را در ژل ۱/۵٪ در TBE بافر به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ الکتروفورز کردیم. برای رنگ آمیزی ژل، آن را به مدت ۱۵ دقیقه در تانک حاوی اتیدیوم بروماید قرار دادیم و سپس نتایج توسط دستگاه Geldocument بانور UV مشاهده شدند. از سویه کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 به عنوان سویه کنترل مثبت تولید کننده ژن bla-SHV و bla-CTX-M و از سویه اشریشیاکلی ATCC 35218 به عنوان کنترل مثبت ژن bla-TEM استفاده کردیم و همچنین از سویه اشریشیا کلی ATCC 25922 به عنوان سویه کنترل منفی در این مطالعه استفاده شد.

مقایسه با سفوتاکسیم استفاده شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نمونه های تولیدکننده ESBLs دارای قطر هاله عدم رشد به اندازه ۵ میلیمتر یا بیشتر در اطراف دیسکهای سفتازیدیم /کلولانیک اسید در مقایسه با سفتازیدیم و یا سفوتاکسیم /کلولانیک اسید در مقایسه با سفوتاکسیم بودند.

پس از تعیین ایزوله هایی که از نظر فنوتیپی مثبت بودند، DNA نمونه های شناسایی شده به عنوان ESBLs با استفاده از روش جوشاندن جداسازی شد که در این روش مقداری از کلنی های باکتری کلبسیلا پنومونیه را به داخل یک اپندورف حاوی

جدول ۱. پرایمر ژن های بیماری زا

ژن	توالی پرایمر (5'-3')	باند محصول (bp)	رفرنس
bla-SHV	F- TCAGCGAAAAACACCTTG R- TCCCGCAGATAAATCACC	۴۷۱	۱۵
bla-TEM	F- GAGTATTCAACATTTCCGTGTC R- TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	۸۶۱	۱۵
bla-CTXM	F- CGCTTTGCGATGTGCGAG R- ACCGCGATATCGTTGGT	۵۵۰	۲۶

## نتایج

با توجه به جدول ۲، بیشترین مقاومت به نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین مشاهده شد که ۹۲/۵٪ از نمونه ها کلبسیلا پنومونیه مقاوم به این آنتی بیوتیک بودند از طرفی در صد مقاومت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، آرترونام، سفالوتین و کوتریموکسازول در مقایسه با سایر آنتی بیوتیک ها بیشتر بوده است که مقاومت به تمامی این آنتی بیوتیک ها بالای ۵۰٪ می باشد. موثرترین آنتی بیوتیک علیه نمونه های کلبسیلا پنومونیه آنتی بوتیک ایمی پنم بود که حساسیت به این آنتی بیوتیک ۸۹ درصد می باشد و تنها ۷/۲٪ از کل نمونه ها به این آنتی بیوتیک مقاوم بودند علاوه بر آن درصد بالایی از نمونه های کلبسیلا پنومونیه به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، کلرامفنیکل، افلوکساسین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین حساس بودند که میزان حساسیت به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، افلوکساسین، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین بالای ۷۰٪ و برای آنتی بیوتیک های تتراسایکلین و جنتامایسین تقریباً بالای ۶۰٪

۱ میلی لیتر آب مقطر انتقال دادیم و یک سوسپانسیون بوجود آوردیم و سپس اپندورف حاوی سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار دادیم و بعد از آن در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ کردیم، محلول رویی حاوی DNA مورد نظر بوده که جهت انجام PCR استفاده گردید.

شناسایی ژن های bla-SHV، bla-TEM و bla-CTX-M: جهت شناسایی ژن های bla-SHV، bla-TEM و bla-CTX-M ایجاد کننده مقاومت در نمونه های کلبسیلا پنومونیه از روش PCR استفاده کردیم در این روش با استفاده از کیت Master mix (شرکت آمپیکون دانمارک) PCR را انجام دادیم. توالی پرایمرهای مورد استفاده و همچنین اندازه باندهای محصولات بر روی ژل الکتروفورز بر اساس رفرنس در جدول ۱ ذکر گردیده است. جهت انجام PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در لوله های اپندورف از مخلوط کردن ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۳ میکرولیتر از DNA باکتری، ۱۰ pmol از پرایمر و آب مقطر استریل استفاده شد و همچنین واکنش PCR طبق برنامه زیر

می باشد. جدول ۲ جزئیات بدست آمده از نتایج آنتی بیوگرام را نشان می دهد. نتایج دیسک های ترکیبی جهت شناسایی فنوتیپی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه نشان دادند که تعداد ۵۹ (۵۳/۱٪) نمونه به طور فنوتیپی دارای آنزیم های ESBLs

جدول ۲. درصد مقاومت و حساسیت نمونه های کلبسیلا پنومونیه

آنتی بیوتیک	حساس (S)	نیمه حساس (I)	مقاوم (R)
آمپی سیلین	٪ ۱/۹	٪ ۵/۵	٪ ۹۲/۵
آمیکاسین	٪ ۶۸/۴	٪ ۱۱/۷	٪ ۱۹/۸
کوتریموکسازول	٪ ۴۵	٪ ۲/۷	٪ ۵۲/۲
نالدیکسیک اسید	٪ ۷۲/۹	٪ ۱۰/۸	٪ ۱۶/۲
افلوکساسین	٪ ۷۷/۴	٪ ۰/۹	٪ ۲۱/۶
کلرامفنیکل	٪ ۷۲/۲	٪ ۸/۱	٪ ۲۱/۶
آزوترونام	٪ ۴۷/۷	٪ ۰/۰	٪ ۵۲/۲
جنتامایسین	٪ ۵۹/۴	٪ ۰/۰	٪ ۴۵/۵
تتراساکلین	٪ ۶۹/۳	٪ ۵/۴	٪ ۲۵/۲
سفتریاکسون	٪ ۴۵	٪ ۰/۰	٪ ۵۴/۹
سفتازیدیم	٪ ۴۶/۹	٪ ۰/۰	٪ ۵۳
سفالوتین	٪ ۳۹/۲	٪ ۱/۱	٪ ۵۹/۵
سیپروفلوکساسین	٪ ۷۹/۴	٪ ۳/۵	٪ ۱۶/۹
ایمی پنم	٪ ۸۹/۱	٪ ۳/۶	٪ ۷/۲

جدول ۳. درصد مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف در مقایسه با نمونه های تولید کننده ESBLs و نمونه های فاقد ESBLs

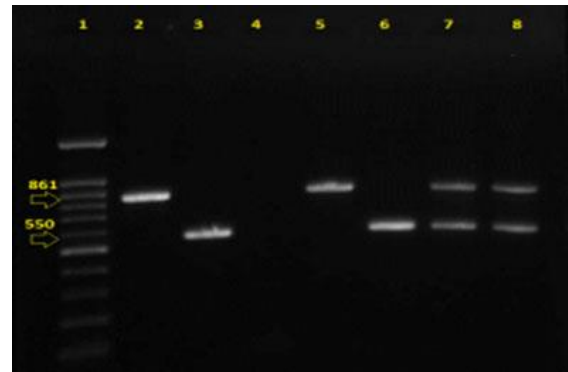
آنتی بیوتیک	نمونه های فاقد ESBLs	نمونه های دارای ESBLs
آمپی سیلین	٪ ۸۶/۵	٪ ۹۸/۳
آمیکاسین	٪ ۳/۸	٪ ۳۲/۲
کوتریموکسازول	٪ ۱۵/۳	٪ ۷۹/۶
نالدیکسیک اسید	٪ ۷/۶	٪ ۲۷/۵
افلوکساسین	٪ ۳/۸	٪ ۳۷/۲
کلرامفنیکل	٪ ۱۵/۳	٪ ۲۷/۱
آزوترونام	٪ ۱/۹	٪ ۹۶/۶
جنتامایسین	٪ ۰/۰	٪ ۷۶/۲
تتراساکلین	٪ ۱۱/۵	٪ ۳۷/۲
سفتریاکسون	٪ ۵/۷	٪ ۹۸/۳
سفتازیدیم	٪ ۰/۰	٪ ۹۵/۵
سفالوتین	٪ ۱۹/۵	٪ ۹۷/۸
سیپروفلوکساسین	٪ ۱/۹	٪ ۳۰/۵
ایمی پنم	٪ ۰/۰	٪ ۱۳/۵

۵۴ (٪ ۹۶/۴) دارای ژن bla-SHV بودند و تعداد ۳۳ (٪ ۵۸/۹) سویه دارای هر ژن bla-SHV، bla-TEM، و bla-CTX-M بودند. شکل شماره یک و دو نشان دهنده وجود ژن بر روی ژل آگاروز می باشد. در این مطالعه نیز نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که میزان مقاومت به تمامی آنتی بیوتیک ها در نمونه هایی که تولید کننده ESBLs می باشد بیشتر از نمونه هایی می باشد که فاقد ESBLs می باشند (جدول ۳).

### بحث و نتیجه گیری

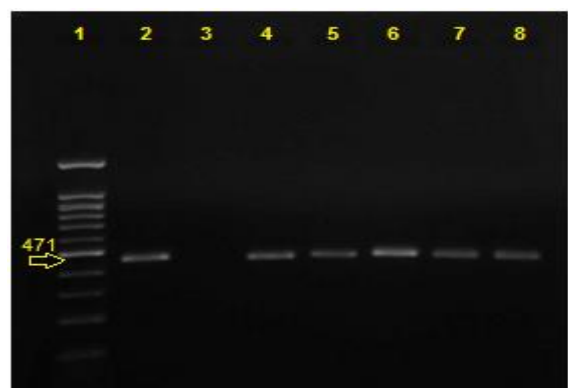
کلبسیلا پنومونیه از باکتری های گرم منفی می باشد که از نظر کلینیکی نقش مهمی در ایجاد عفونت بیمارستانی و عفونت مجاری ادراری ایفا می کند. متأسفانه مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها در دهه های اخیر موجب افزایش ظهور سویه های مقاوم با مقاومت چند گانه ی دارویی در باکتری های روده ای گرم منفی از جمله کلبسیلا پنومونیه شده است، به طوری که این باکتری ها با تولید آنزیم های بتالاکتامازی وسیع الطیف یا ESBLs نسبت به آنتی بیوتیک هایی نظیر سفالوسپورین، پنی سیلین، سیپروفلوکساسین و سفوتاکسیم مقاومت نشان میدهند و وجود ژن کد کننده ی آنزیم های بتالاکتامازی و انتقال آن در بین باکتری های گرم منفی روده ای یک تهدید بزرگ برای مصرف کنندگان سفالوسپورین های با طیف وسیع به شمار می آیند (۱۶-۱۹). در این مطالعه مقاومت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، آزترونام، سفالوتین، و کوتریموکسازول بخصوص آمپی سیلین در سطح بالایی وجود داشت که مقاومت به این شش آنتی بیوتیک بالای ۵۰٪ بود که در آینده میتواند این مقاومت ها بیشتر شده و ایجاد مشکلاتی در درمان کند، از طرفی حدود ۹۰٪ سویه ها به ایمی پنم حساس بودند. مطالعات زیادی در ایران انجام شده است که تایید کننده نتایج بدست آمده از این مطالعه می باشد در مطالعه ای که مشعوف و همکاران در همدان انجام دادند موثرترین آنتی بیوتیک علیه ایزوله های کلبسیلا پنومونیه آنتی بیوتیک ایمی پنم اعلام شد و با اینکه مقاومت به این آنتی بیوتیک در اکثر مطالعات بسیار پایین می باشد اما باید توجه داشت از مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک در درمان جلوگیری کنیم تا مقاومت به این آنتی بیوتیک افزایش نیابد. همچنین در مطالعه ای که توسط فیض آبادی و همکاران انجام شد تمامی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به آنتی بیوتیک ایمی پنم حساس

بودند اما بعد از انجام PCR تعداد ۵۶ (٪ ۵۰/۴) سویه دارای ژن های bla-SHV، bla-TEM، و bla-CTX-M بودند،



شکل ۱. نشان دهنده وجود ژن bla TEM (۸۶۱ bp) و bla-CTXM (۵۵۰ bp) می باشد. چاهک شماره ۱ مارکر (۱۵۰۰-۱۰۰bp)، چاهک شماره ۴ سویه کنترل منفی، چاهک شماره ۷ سویه کنترل مثبت و چاهک شماره ۲، ۳، ۵ و ۸ نمونه های بالینی دارای ژن های bla-CTXM و bla-TEM می باشند. از سویه کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 به عنوان سویه کنترل مثبت تولید کننده ژن bla CTXM و از سویه اشیشیاکلی ATCC 35218 به عنوان کنترل مثبت ژن bla TEM و همچنین از سویه اشیشیا کلی ATCC 25922 به عنوان سویه کنترل منفی استفاده شدند.

که از این تعداد ۴۳ (٪ ۷۶/۷) سویه دارای ژن bla-TEM و ۵۲ (٪ ۹۲/۸) سویه دارای ژن های bla-CTX-M و ۵۴ (٪ ۹۶/۴) دارای ژن bla-SHV بودند و تعداد ۳۳ (٪ ۵۸/۹) سویه دارای هر ژن bla-SHV، bla-TEM، و bla-CTX-M بودند.



شکل ۲. نشان دهنده باندهای ژن bla-SHV (۴۷۱ bp) می باشد، چاهک شماره ۱ مارکر (۱۵۰۰-۱۰۰bp)، چاهک شماره ۲ سویه کنترل مثبت و شماره ۳ سویه کنترل منفی و چاهک شماره های ۶-۸ نمونه های بالینی دارای ژن bla-SHV می باشند. از سویه کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 به عنوان سویه کنترل مثبت تولید کننده ژن bla-SHV و از سویه اشیشیا کلی ATCC 25922 به عنوان سویه کنترل منفی استفاده شدند.

تهران به ۷۶٪ رسیده است (۲۲). همچنین مطالعه ای که در ترکیه توسط Aladag و همکاران بر روی ۸۷ سویه کلبسیلا پنومونیه صورت گرفت نشان داد که ۴۴٪ از این سویه ها دارای ESBLs بودند (۲۳). Patzer و همکاران نیز در ۵۶٪ از سویه های کلبسیلا پنومونیه، ژن SHV-1 را گزارش کردند (۲۴). Song و همکاران در مطالعه ای نشان دادند که ۸۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه دارای ژن TEM-1 و ۴۰ نمونه ژن SHV-1 را دارا می باشند (۲۵).

در مطالعه ای که Amer و همکاران در سال ۲۰۰۳ بر روی نمونه های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBLs انجام دادند ۵۲٪ از این سویه ها تولید کننده این آنزیم ها می باشند (۲۷). با توجه به گزارشات فوق میزان شیوع ESBL در سویه های کلبسیلا پنومونیه در شهر کرمان مشابه با برخی نقاط جهان و ایران می باشد ولی این شیوع، با بسیاری از نقاط جهان و حتی ایران متفاوت است.

با بررسی فوق و نتایج مشابه توسط سایر محققان میتوان به این نتیجه رسید که مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها باعث مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها می شود و ژن های مقاومت به طور سریع تر در بین باکتری های پاتوژن انتقال می یابند. بنابراین پیشنهاد میشود با مطالعه در زمینه ی شیوع مقاومت ها و انتقال ژن های بیماریزا در باکتری ها بتوان از مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک ها جلوگیری به عمل آورد و همچنین با رعایت بهداشت بیماران و تغییر استراتژی مصرف آنتی بیوتیک، شرایطی مناسب را در بخش هایی که بیماران در آن به مدت طولانی بستری هستند مهیا کرد و تا حدی از انتقال این مقاومت ها جلوگیری نمود.

### تشکر و قدردانی

در این مطالعه مراتب قدردانی و تشکر خود را از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به دلیل حمایت های مالی و اجرایی اعلام می داریم.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده اند.

بودند و مقاومت به سیپروفلوکساسین و افلوکساسین در سطح پایینی وجود داشت اما مقاومت به سفالوسپورین ها در سطح بالایی وجود داشت این نتایج با نتایج بدست آمده از مطالعه ما مطابقت دارد (۲۰، ۲۱).

برخی از مطالعات در باکتری های مختلف نشان میدهد که مقاومت به اکثر آنتی بیوتیک ها نظیر کینولون ها، فلوروکینولون ها و بتالاکتام ها، در سویه های تولید کنند ESBL بیشتر از سویه های فاقد ESBL است (۲۰) در این مطالعه نیز نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که میزان مقاومت به تمامی آنتی بیوتیک ها در نمونه هایی که تولید کننده ESBLs می باشد بیشتر از نمونه هایی می باشد که فاقد ESBLs می باشند.

همچنین در این مطالعه از ۱۱۱ نمونه کلبسیلا پنومونیه بیشتر از ۵۰ درصد نمونه تولید کننده آنزیم های وسیع الطیف ESBLs بودند که تعداد ۵۶ (۵۰/۴) سویه دارای ژن های bla-SHV، bla-TEM و bla-CTX-M بودند و در میان ژن های ESBLs بیشترین شیوع را ژن bla-SHV در بین سویه های کلبسیلا پنومونیه به خود اختصاص داده است این در حالی است که مشعوف و همکاران در سال ۱۳۹۲ در همدان نشان دادند که میزان شیوع کلبسیلا پنومونیه های تولید کننده ESBLs ۴۶/۷٪ می باشد (۲۰). این میزان شیوع بالای ژن های ESBLs توجه کننده مقاومت بالا به آنتی بیوتیک های بتالاکتام و سفالوسپورین های نسل سوم می باشد که متأسفانه تولید میزان بالای ESBLs نشان دهنده این موضوع است که سویه های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده آنزیم ها بتالاکتاماز وسیع الطیف در طی این سال ها رو به افزایش بوده اند. مطالعات مشابه زیادی در ایران و سایر نقاط جهان در زمینه کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBLs صورت گرفته است که تایید کننده اطلاعات به دست آمده از این مطالعه می باشد که می توان به مطالعه ای که در سال ۱۳۸۹ در تهران بر روی ۱۰۴ نمونه کلبسیلا پنومونیه توسط فیض آبادی و همکاران مورد بررسی قرار گرفت اشاره کرد که ۷۲/۱٪ از این نمونه ها تولید کننده ESBLs بودند که این اعداد نشانگر درصد بالای ESBLs در کشور ما می باشد (۲۱). از طرفی میر صالحیان و همکاران گزارش دادند که تولید ESBLs در سویه کلبسیلا پنومونیه در

## References

1. Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum-lactamases in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*-Prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol.* 2004;22(3):172.
2. Mahmood A, Al Hakawati MI. Non-beta-lactam Antimicrobials versus Extended Spectrum Beta-lactamase Producing Gram Negative Bacteria: In vitro Susceptibility Study. *Infect Dis Soc of Pak.* 2011;43(5):507-511.
3. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(4):589-603.
4. Tankhiwale SS, Jalgaonkar SV, Ahamad S, Hassani U. Evaluation of extended spectrum beta lactamase in urinary isolates. *Indian J Med Res.* 2004;120(6):553-556.
5. Cryz S, Fürer E, Germanier R. Safety and immunogenicity of *Klebsiella pneumoniae* K1 capsular polysaccharide vaccine in humans. *J Infect Dis.* 1985;151(4):665-671.
6. Silvestri L, van Saene H. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med.* 2010;363(15):1482-1486.
7. Perilli M, Celenza G, De Santis F, Pellegrini C, Forcella C, Rossolini GM, et al. E240V substitution increases catalytic efficiency toward ceftazidime in a new natural TEM-type extended-spectrum beta-lactamase, TEM49, from *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(3):915-919.
8. Sturenburg E, Mack D. Extended spectrum beta-lactamases: implication for the clinical microbiology, therapy and infection control. *J Infect* 2003;47(4):273-295.
9. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211-1233.
10. Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanes C. SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 2856-2861.
11. Livermore DM. Beta-lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(4):557-584.
12. Miranda G, Castro N, Leanos B, Valenzuela A, Garza-Ramos U, Rojas T, et al. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended spectrum beta-lactamase in a Mexican pediatric hospital. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(1): 30-35.
13. Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39(10): 2269-2275.
14. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;14(2):137-142.
15. Zaniani FR, Meshkat Z, Nasab MN, Khaje-Karamadini M, Ghazvini K, Rezaee A, et al. The Prevalence of TEM and SHV Genes among Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Basic Med Sci.* 2012;15(1):654-660.
16. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001; 65(2): 232-260.
17. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med.* 2010; 362(19): 1804-1813.
18. Paterson DL, Ko W-C, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, et al. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections. *Annals of internal medicine.* 2004;140(1):26-32.
19. Subha A, Ananthan S. Extended spectrum beta lactamase (ESBL) mediated resistance to third generation cephalosporins among *Klebsiella pneumoniae* in Chennai. *Indian J Med Microbiol.* 2002; 20(2): 92-95.
20. Mashouf RY, Alijani P, Saidijam M, Alikhani M, Rashidi H. Study of Antibiotic Resistance Pattern and Phenotypic Detection of ESBLs in *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Clinical Samples and Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Imipenem and Ceftazidim Antibiotics. *Scientific J Hamadan Univ Med Sci.* 2014;4(70):295-302.
21. Feizabadi MM, Mahamadi-Yeganeh S, Irsalehian A, Mirafshar S-M, Mahboobi M, Nili F, et al. Genetic characterization of ESBL producing strains of *Klebsiella pneumoniae* from Tehran hospitals. *J Infect Dev Ctries.* 2010;4(10):609-615.
22. Mirsalehan A, et al. Prevalence of Extended Spectrum beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae by Phenotypic and Genotypic Methods in Intensive Care Units in Tehran, Iran. *DARU.* 2008;16(3):169-173.
23. Aladag MO, Durak Y, Uysal A. Investigation of imipenem and meropenem susceptibilities, plasmid profiles and ESBL characteristic of *Klebsiella pneumoniae*. Isolated from urinary tract infections. *World Appl Sci J.* 2009; 7(3): 378-381.
24. Patzer JA, Dzierzanowska D, Pawinska A, Turner PJ. High activity of meropenem against Gram-negative

bacteria from a paediatric Intensive Care Unit, 2001-2005. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 29(3): 285-288.

25. Song W, Bae IK, Lee YN, Lee CH, Lee SH, Jeong SH. Detection of extended-spectrum betalactamases by using boronic acid as an AmpC beta-lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(4): 1180-1184.

26. Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, Boyer M, Chanal C, Sirot D, et al. CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14  $\beta$ -lactamases from Enterobacteriaceae isolated in France. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2002;46(2):534-537.

27. Aamer A, Fariha H, Safia A. Prevalance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in nosocomial and outpatient. *Pak J Med Sci*. 2003; 9(3):187-191.

28. Pakzad I, Ghafourian S, Taherikalani M. Qnr prevalence in extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) and none-ESBLs producing *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in central of Iran. *Iran J Basic Med Sci*. 2011;14(5):458-464.



## Original Article

## Prevalence of bla-CTX-M, bla-SHV, and bla-TEM Genes and Comparison of Antibiotic Resistance Pattern in Extended-spectrum $\beta$ -lactamase producing and non-producing groups of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Samples in Kerman Hospitals

Moradi M<sup>1</sup>, Norouzi A<sup>2</sup>, Taati Moghadam M<sup>2\*</sup>

1- Department of Microbiology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2- Students Research Committee, Department of Microbiology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Received: 08 Apr 2015

Accepted: 21 Nov 2015

### Abstract

**Background & Objectives:** Antibiotic resistance among pathogens bacteria are an important problem noted worldwide. Beta-lactamases that are produced by *Enterobacteriaceae* have been located mainly on plasmid. Treatment of these bacterial infections which produced  $\beta$ -lactamase are a major problem.

**Materials & Methods:** 111 *Klebsiella pneumoniae* isolates were collected from hospitals in Kerman; therefore, antibiotic susceptibility test was performed by disk diffusion method. At first, detection of ESBLs were performed by phenotypic confirmatory test, and presence of bla-SHV, bla-TEM, and bla-CTX-M were detected by PCR.

**Results:** Resistant to ampicillin (92.5%) was more than others antibiotics, and the imipenem (89%) was the most effective antibiotic against *Klebsiella pneumoniae* isolates. Additionally, the resistance to all antibiotics in ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* was more than that of Non-ESBL *Klebsiella pneumoniae*. After the detection of bla-SHV, bla-TEM, and bla-CTX-M genes in *Klebsiella pneumoniae* by PCR, 56 (50.4%) isolates presented these genes.

**Conclusion:** With regard to high prevalence of ESBLs genes and high level of antibiotic resistance in bacteria, detecting these genes can prevent the extension of antibiotic resistance through these bacteria.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, Antibiotic resistance,  $\beta$ -lactamase genes, PCR

\*Corresponding author: Majid Taati Moghadam, Department of Microbiology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.  
Email: Majidtaati@collegian.kmu.ac.ir

Journal of Fasa University of Medical Sciences (2016) 6: 120-128