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[۱]، امین نوروزی[۲]، مجیدطاعتی مقدم[۲*]

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

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۱/۱۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۸/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها درمیان 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 جداشده 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 سینرژیسم به صورت فنوتیپی و از روش PCR جهت شناسایی ژنوتیپی استفاده شد.

نتایج: بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین و ۹۲/۵ درصد 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 (۵۰/۴ ٪) 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

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). ازسال ۱۹۸۴ *کلبسیلا پنومونیه* به عنوان عامل عفونت های اکتسابی بیمارستانی و حامل مقاومت های چند گانه شناخته شده است (۳). از طرفی مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها درمیان 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

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

گرم منفی مانند اشرشیاکلی، *کلبسیلا پنومونیه* و سودوموناس آئروژینوزای ایجاد کننده‌ی عفونت های بیمارستانی، عفونت های مجاری ادراری و باکتریمی دیده می شود که می توان علت عمده ی آن را تولید آنزیم های بتالاکتاماز توسط این باکتری ها دانست (۶). این آنزیم ها از طریق هیدرولیز حلقه بتالاکتام منجر به ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ها می شوند (۷). اعضای خانواده انتروباکتریاسه بتالاکتامازهایی را تولید می نماید که توسط پلاسمید کد می شوند از نمونه این بتالاکتامازها می توان به TEM ، CTX-M وSHV اشاره کرد. درمان عفونت های حاصل از باکتری های مولد این آنزیم ها بسیار مشکل است چون از یک سو مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین ها مشاهده می شود و از سوی دیگر بسیاری از ژن های ESBL برروی پلاسمیدهای بزرگی (بیش از ۱۰۰کیلو باز) قرار دارد که هم زمان حامل ژن های مقاومت به سایر عوامل ضد میکروبی مثل آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، سولفونامیدها وتتراسایکلین نیز است. این عفونت ها رابطه معنی داری با میزان مرگ و میر بیماران داشته و بار مالی زیادی را در پی دارند (۸). براساس عملکرد آنزیم های بتالاکتامازی در چهار گروه یا چهار کلاس اصلیA ، B، C و D طبقه بندی می شوند. براساس این طبقه بندی، آنزیم های SHV, TEMو CTX-M در کلاس A قرار دارند (۹). TEM امروزه به عنوان یکی از مهمترین مکانیسم های مقاومتی در برابر آنتی بیوتیک های خانواده بتالاکتام، در میان باکتری های گرم منفی مطرح می باشد (۱۰). بتالاکتاماز SHV برای نخستین بار توسط Pitton در سال ۱۹۷۲ کشف و PIT-2 نامگذاری شد که طبق تقسیم بندی Bush بتالاکتاماز کلاس A محسوب میگردد (۱۱). ژن پیش ساز SHV ممکن است به صورت یک ژن کروموزومی در سویه های کلبسیلا ظاهر شده و سپس از راههای مختلف ژنتیکی به پلاسمید منتقل شده و از آن طریق در بین گونه های دیگر انتروباکتریاسه پخش شده باشد(۱۲).

خانواده CTX-M از بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سال ۱۹۸۹ برای اولین بار از آلمان گزارش شدند و پس از آن در نقاط مختلف دنیا گسترش یافتند. این آنزیم ها عمدتاً در خانواده انتروباکتریاسه وجود دارند (۱۳). بتالاکتامازهایCTX-M ارتباطی با بتالاکتامازهای TEM یا HSV ندارند، و تنها ٪۱۴ با این دو بتالاکتاماز شباهت دارند. برخلاف بتالاکتامازهای TEM و SHV بتالاکتامازهای CTX-M اثر هیدرولیز کنندگی بیشتری برروی آنتی‌بیوتیک های سفوتاکسیم و سفتریاکسون نسبت به سفتازیدیم دارند (۱۴).

با افزایش مقاومت گونه‌های *کلبسیلا پنومونیه* به آنتی بیوتیک ها ، هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع ژن های مقاومتی bla-SHV، bla-TEM و bla-CTX-M در نمونه های بالینی(زخم، سوختگی، ادرار، تراشه، خلط وسایر مایعات) و ارتباط این گونه ها با میزان مقاومت می باشد.

مواد و روش ها

شناسایی باکتری: جمع آوری ۱۱۱ نمونه ی *کلبسیلا پنومونیه* از بیمارستان های افضلی پور، شفا، باهنر وسیدالشهدای شهر کرمان از خرداد تا بهمن سال ۱۳۹۲ انجام گرفت و نمونه ها از زخم، سوختگی، ادرار، تراشه، خلط وسایر مایعات بدن جداسازی شد و به بخش میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه کرمان انتقال داده شد وسپس با توجه به روش های استاندارد تشخیصی و بیوشیمیایی تعیین گونه گردیدند. پس از ۲۴- ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، برای کلنی هایی که ویژگی های کلنی *کلبسیلا پنومونیه* را داشتند تستهای بیوشیمیایی افتراقی شامل TSI، SIM، MR-VP، سیترات، اوره در آزمایشگاه گروه میکروب شناسی صورت گرفت و باکتری *کلبسیلا پنومونیه* جداسازی شد.

تست تعیین حساسیت دارویی (آنتی بیوگرام): الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های جدا شده به روش ا ستاندارد دیسک CLSI (Clinical and laboratory standard institute) دیفیوژن انجام شد وآنتی بیوتیک های مورد استفاده شامل دیسک های ایمی پنم(۱۰µg)، سفتازیدیم (۳۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، کلرامفنیکل(۳۰µg)، نالیدیکسیک اسید(۳۰µg)، کوتریموکسازول(۱/۲۵،۲۳/۷۵µg)، سفتریاکسون(۳۰µg)، تتراسایکلین(۳۰µg)، آزترونام(۳۰µg)، سفوتاکسیم(۳۰µg) ، آمپی سیلین(۱۰µg)، آمیکاسین(۳۰µg)، سفالوتین(۳۰µg) وسیپروفلوکساسین(۵µg) بودند که از شرکت Himedia هند خریداری شد.

شناسایی بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs): برای شناسایی ایزوله های تولید کننده ESBLs از تست تاییدی فنوتیپی شامل دیسک های ترکیبی سفتازیدیم/کلاولانیک اسید در مقایسه با سفتازیدیم و سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید در

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 /کلاولانیک اسید در مقایسه با سفتازیدیم و یا سفوتاکسیم /کلاولانیک 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 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 ژن‌های bla-SHV، bla-TEM و bla-CTX-M ایجاد کننده مقاومت در نمونه های *کلبسیلا پنومونیه* از روش PCR استفاده کردیم دراین 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 اکتروفورز بر اساس رفرنس در جدول ۱ ذکر گردیده است. جهت انجام PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در لوله های اپندروف از مخلوط کردن ۱۲/۵میکرولیتر مسترمیکس، ۳ میکرولیتر از DNA باکتری، ۱۰ pmol از پرایمر و آب مقطر استریل استفاده شد و همچنین واکنش PCR طبق برنامه زیر 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 ژنbla-SHV وbla-CTX-M و از سویه اشریشیاکلی ATCC 35218 به عنوان کنترل مثبت ژن bla-TEM استفاده کردیم و همچنین از سویه اشرشیا کلی ATCC 25922 به عنوان سویه کنترل منفی در این مطالعه استفاده شد.

جدول ۱. پرایمر ژن های بیماری زا

ژن	توالی پرایمر (3'-5')	باند محصول(bp)	رفرنس
bla-SHV	F- TCAGCGAAAAACACCTTG R- TCCCGCAGATAAATCACC	۴۷۱	۱۵
bla-TEM	F- GAGTATTCAACATTTCCGTGTC R- TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	۸۶۱	۱۵
bla-CTXM	F- CGCTTTGCGATGTGCAG 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، آزترونام، 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 کقاوم 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 تقریبا بالای ۶۰٪

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

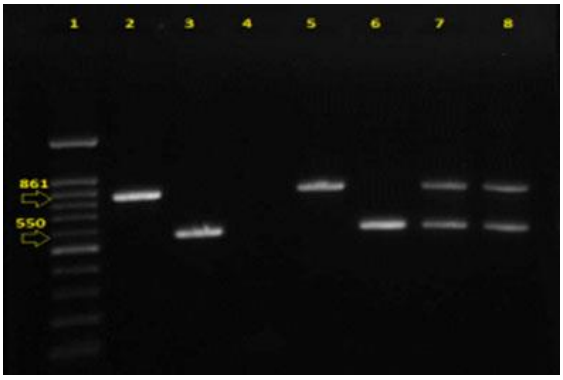
جدول ۲. درصد مقاومت وحساسیت نمونه های کلبسیلا پنومونیه

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
نالیدیکسیک 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

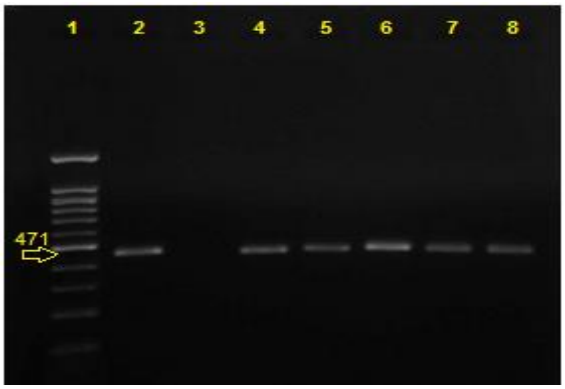
آنتی بیوتیک	نمونه های فاقد ESBLs	نمونه های دارای ESBLs
آمپی سیلین	٪ ۸۶/۵	٪ ۹۸/۳
آمیکاسین	٪ ۳/۸	٪ ۳۲/۲
کوتریموکسازول	٪ ۱۵/۳	٪ ۷۹/۶
نالیدیکسیک اسید	٪ ۷/۶	٪ ۲۷/۵
افلوکساسین	٪ ۳/۸	٪ ۳۷/۲
کلرامفنیکل	٪ ۱۵/۳	٪ ۲۷/۱
آزوترونام	٪ ۱/۹	٪ ۹۶/۶
جنتامایسین	٪ ۰/۰	٪ ۷۶/۲
تتراساکلین	٪ ۱۱/۵	٪ ۳۷/۲
سفتریاکسون	٪ ۵/۷	٪ ۹۸/۳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

بودنند اما بعد از انجام PCR تعداد ۵۶ (۵۰/۴ ٪) ســـویه 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) می‌باشد. چاهک شماره ۱ مارکر (۱۵۰۰-۱۰۰bp) ، چاهک شماره ۴ سویه کنترل منفی، چاهک شماره ۷ سویه کنترل مثبت و چاهک شماره۲، ۳، ۵ و ۸ نمونه های بالینی دارای ژن های bla-TEM و bla-CTXM می باشند. از سویه کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 به عنوان سویه کنترل مثبت تولید کننده ژن bla CTXM و از سویه اشریشیاکلی ATCC 35218 به عنوان کنترل مثبت ژن bla TEM و همچنین از سویه اشرشیا کلی ATCC 25922 به عنوان سویه کنترل منفی استفاده شدند.

که از این تعداد ۴۳ (۷۶/۷ ٪) سویه دارای ژنbla-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 ٪) ســـویه 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 ۸-۶ 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 اشرشیا کلی ATCC 25922 به عنوان سویه کنترل منفی استفاده شدند.

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 باکتر ی‌های گرم منفی می باشد که از نظر کلینیکی نقش مهمی در ایجاد عفونت بیمارستانی و عفونت مجاری ادراری ایفا می کند. متاســفانه مصــرف بی رویه ی آنتی بیوتیک ها در دهه های اخیر موجب افزایش ظهور ســـویه های مقاوم با مقاومت چند گانه ی دارویی در باکتر ی های روده ای گرم منفی از جمله *کلبسیلا پنومونیه* شده ا ست، به طوری که این باکتری ها با تولید آنزیم های بتالاکتاماز وســـیع الطیف یا ESBLs نسبت به آنتی بیوتیک هایی نظیر سفالو سپورین، 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 تهد ید بزرگ برای مصرف کنندگان سفالوسپورین های با طیف وسیع به شمار می آیند (۱۹-۱۶). در این مطالعه مقاومت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، آزترونام، سفالوتین، و کوتریموکسازول بخ صوص آمپی سیلین در سطح بالایی وجود دا شت که مقاومت به این شش آنتی بوتیک بالای ۵۰٪ بود که در آینده میتواند این مقاومت ها بی شتر شده و ایجاد م شکلاتی در درمان کند، از طرفی حدود ۹۰٪ ســـویه ها به ایمی پنم حســـاس بودند. مطالعات زیادی در ایران انجام شــده اســت که تایید کننده نتایج بدســـت آمده از این مطالعه می باشـــد در مطالعه ای که مشـــعوف و همکاران در همدان انجام دادند موثرترین آنتی بیوتیک علیه ایزوله های *کلبسیلا پنومونیه* آنتی بیوتیک ایمی پنم اعلام شـــد و با اینکه مقاومت به این آنتی بیوتیک در اکثر مطالعات بســـیار پایین می باشـــد اما باید توجه دا شت از م صرف بی رویه این آنتی بیوتیک در درمان جلوگیری کنیم تا مقاومت به این آنتی بیوتیک افزایش نیابد. همچنین در مطالعه ای که توســط فیض آبادی و همکاران انجام شـد تمامی ایزوله های *کلبسیلا پنومونیه* به آنتی بیوتیک ایمی پنم حساس

بودند و مقاومت به سیپروفلوکساسین و افلوکساسین در سطح پایینی وجود دا شت اما مقاومت به سفالو سپورین ها در سطح بالایی وجود داشت این نتایج با نتایج بدست امده 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 ا ست که م شعوف و همکاران در سال ۱۳۹۲ در همدان ن شان دادند که میزان شیوع *کلبسیلا پنومونیه* های تولید کننده ESBLs ۴۶/۷٪ می باشد (۲۰). این میزان شیوع بالای ژن های ESBLs توج یه کن نده م قاو مت بالا به آنتی بیوت یک های بتالاکتام و سفالوسپورین های نسل سوم می باشد که متاسفانه 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 ا ند. مطالعات مشابه زیادی در ایران و سایر نقاط جهان در زمینه *کلبسیلا پنومونیه* تولید کننده ESBLs صورت گرفته ا ست که تایید کننده اطلاعات به د ست آمده از این مطالعه می با شد 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 ک شور ما می با شد (۲۱). از طرفی میر صالحیان و همکاران گزارش دادند که تولید ESBLs در سویه *کلبسیلا پنومونیه* در 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 Aamer 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 با شند (۲۷). با توجه به گزارشات فوق میزان شیوع ESBL در سویه های *کلبسیلا پنومونیه* در شهر کرمان م شابه با برخی نقاط جهان و ایران می با شد 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 می‌داریم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

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 speciesspecific enzyme in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 2856-2861.

11. Liver more 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 betalactamase isolated from Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39(10): 2269-2275.

14. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type betalactamases: 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 β-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. jenetic 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 β-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 suseeptibilties, 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 β-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 β-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 β-lactamase producing and non-producing groups of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Samples in Kerman Hospitals

Moradi M[1], Norouzi A[2], Taati Moghadam M[2*]

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 β-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 pneumonia*, Antibiotic resistance, β- 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