



Molecular Diagnostic of Drug Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Isolates Containing SHV, PER and VEB Genes in Samples Collected from Patients in Tehran

Zahra Kohanrooz Bijarpas*, Saeid Zaker Bostanabad, Farzaneh Tafvizi

Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2018/10/01

Accepted: 2018/12/25

Available online: 2018/12/25

Article Subject:

Antibiotic Resistance

IJMM 2018; 12(5): 363-370

Corresponding author:

Zahra Kohanrooz Bijarpas

MSc in Genetics, Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email:

zahra.kohan21@yahoo.com

Use your device to scan
and read the article online



Abstract

Background and Aims: Extended-spectrum beta-lactamase of SHV, PER and VEB types are considered as important and widely increasing resistance mechanisms to beta-lactamases in gram-negative pathogens. Also *K. pneumoniae* species are able to produce extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs). The aim of this study was to detect the prevalence of SHV, PER and VEB genes in ESBLs producing *Klebsiella pneumoniae* isolates which were collected from patients of different regions of Tehran city between January 2017 to January 2018 using PCR method.

Materials and Methods: In this analytical-descriptive study, antibacterial susceptibility of 176 *K. pneumoniae* isolates were defined to Cefepime, Ampicillin, Gentamicin, Cefalotine, Ceftazidime, Ciprofloxacin, Imipenem, Cefotaxime and Nitrofurantoin using disk diffusion method. In addition, confirmatory test for detecting ESBLs phenotypes was performed using Cefotaxime-Clavulanic acid combination disk. The presence of SHV, PER and VEB genes were assessed using PCR.

Results and Conclusion: Confirmatory phenotypic test showed that 56.81% of the isolates were ESBL positive. The prevalence of SHV, PER and VEB genes in *K. pneumoniae* isolates was 34%, 13% and 17% respectively. In this study, the most resistance rate was observed to ampicillin (89%) and the lowest resistance rate was observed to imipenem (7%). High frequency of SHV, PER and VEB genes in ESBL producing isolates, indicates that these enzymes play important roles in resistance to beta lactam containing anti biotics. Therefore, proper infection control tools and appropriate therapeutic approaches in different parts of the hospitals are necessary to prevent their spread.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Extended-spectrum beta-lactamase, bla SHV, bla PER and bla VEB genes.

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Kohanrooz Bijarpas Z, Zaker S, Tafvizi F. Molecular Diagnostic of Drug Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Isolates Containing SHV, PER and VEB Genes in Samples Collected from Patients in Tehran . Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (5) :363-370



تشخیص مولکولی کلبسیلا پنومونیه مقاوم به دارو طبق شناسایی ژنهای *SHV PER* و *VEB* در نمونه‌های جدا شده از بیماران شهر تهران

زهرا کهن‌روز بیجارپس*، سعید ذاکر بستان‌آباد، فرزانه تفویضی

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: تولید بتالاکتام‌های *SHV, PER* و *VEB* در سراسر جهان به‌عنوان یک مکانیسم مهم مقاومت در مقابل بتالاکتام‌ها در پاتوژن‌های گرم منفی به‌ویژه کلبسیلا پنومونیه شناخته شده و به‌سرعت در حال افزایش است. هدف از این مطالعه، تعیین حضور ژن‌های *SHV, PER* و *VEB* در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL ایزوله شده از بیمارستان‌های شهر تهران از دی‌ماه ۱۳۹۵ تا دی‌ماه ۱۳۹۶ به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) است. **مواد و روش کار:** در این مطالعه ۱۷۶ جدایه کلبسیلا پنومونیه جداسازی و با آزمون‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، سفالوتین، سفازیدیم، ایمپنم، سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم و نیتروفوران‌توئین به روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های فوق به‌وسیله آزمون تأییدی دیسک‌های ترکیبی سفوتاکسیم - کلوانیک اسید، به‌منظور شناسایی ESBL مطالعه شد. سپس در سویه‌های مولد ESBL، وجود ژن‌های *SHV, PER* و *VEB* با روش مولکولی PCR بررسی شد. **یافته‌ها و نتیجه‌گیری:** در تست فنوتیپی تأییدی ۵۶/۸۱ درصد جدایه‌ها مولد ESBL بودند و فراوانی ژن *SHV* برابر ۳۴ درصد بود. در این پژوهش بیشترین میزان مقاومت، نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۸۹ درصد) و کمترین درصد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم (۷ درصد) مشاهده شد. ژن بتالاکتاماز *SHV* شیوع بالایی در جدایه‌های مولد ESBL دارد؛ لذا اعمال ابزارهای مناسب کنترل عفونت و راهکارهای مناسب درمانی در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های مورد مطالعه برای جلوگیری از انتشار آنها ضروری است.

کلمات کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف، ژن *SHV bla PER bla VEB* واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۰۹
پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۰۴
انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۰/۰
موضوع:
مقاومت پادزیستی (آنتی بیوتیکی)
IJMM1397;12(5): 363-370

نویسنده مسئول:
زهرا کهن‌روز بیجارپس
کارشناس ارشد ژنتیک، گروه
زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی،
واحد پرند، تهران، ایران

پست الکترونیک:
zahra.kohan21@yahoo.com

مقدمه

این باکتری‌ها هستند؛ آنها به‌دلیل سمیت پایین برای سلول‌های یوکاریوتی، طیف اثر گسترده و اثر ضد میکروبی قوی، از پرمصرف‌ترین گروه‌های آنتی‌بیوتیکی در دسترس هستند. بین انواع مختلف مکانیسم‌های مقاومت در باکتری‌ها، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز مؤثر علیه سفالوسپورین‌های نسل سوم به‌ویژه سفزازیدیم، سفپودوکسیم و سفوتاکسیم، از نظر بالینی اهمیت خاصی دارد که به این آنزیم‌ها ESBLs

کلبسیلا پنومونیه یکی از عوامل مهم عفونت‌های اکتسابی از جامعه و بیمارستان است. این باکتری یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی است که میزان مرگومیر ناشی از آن زیاد است. افزایش ظهور مقاومت چنددارویی در جدایه‌های بیمارستانی کلبسیلا پنومونیه، گزینه‌های درمانی را برای عفونت‌های ایجاد شده به‌وسیله این باکتری محدود کرده است (۱). آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بهترین گزینه برای درمان بسیاری از عفونت‌های ناشی از

پزشکی، می‌توان به پزشکان دست‌اندرکار درمان این قبیل بیماران در راستای تجویز صحیح و مناسب آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر کمک کرده و در نتیجه ضمن جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم به بتالاکتامازها، به درمان مؤثرتر و قطعی عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها دست یافت. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی جدایه‌های مولد ESBL، تعیین الگوی مقاومت دارویی و شناسایی ژن‌های مسئول آن در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به دست آمده از مراجعان به بیمارستان‌های لولاگر، بقیه‌الله، بعثت، مسیح دانشوری و آزمایشگاه مسعود در شهر تهران از دی‌ماه ۱۳۹۵ تا دی‌ماه ۱۳۹۶ انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک دوره یک‌ساله از دی‌ماه ۱۳۹۵ تا دی‌ماه ۱۳۹۶، ۲۷۰ نمونه بالینی ادرار، خون و خلط از بیمارستان‌های لولاگر، بقیه‌الله، بعثت، مسیح دانشوری و آزمایشگاه مسعود در تهران جمع‌آوری شد.

جداسازی و تشخیص ایزوله‌ها: برای تأیید، نمونه‌های

بالینی روی دو محیط پایه بلاد آگار و مک کانگی آگار (شرکت سیگما) کشت داده شدند و پس از رشد مجدد پاساژ داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. بعد از انکوباسیون از کلنی‌های مشکوک به کلبسیلا پنومونیه لام مستقیم تهیه، و در صورت مشاهده باسیل‌های گرم منفی، اقدامات تشخیصی زیر انجام شد: از آزمون‌های مرسوم آزمایشگاهی شامل تست اکسیداز، کشت در محیط‌های MR-VP (Methyl Red-Voges Proskauer broth)، TSI (Triple Sugar Iron Agar)، SIM (Simmons Citrate agar)، لیزین دکربوکسیلاز، محیط‌های سترات و اوره استفاده شد. سپس باکتری‌های جداسازی شده بعد از تشخیص، به منظور نگهداری طولانی مدت ابتدا در محیط LB broth (شرکت سیگما) کشت داده شده و بعد از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، در گلیسرول ۵۰ درصد تا زمان انجام آزمون‌های بعدی در فریزر -۷۰ درجه سلسیوس ذخیره شدند (۱۰).

تعیین باکتری‌های مولد بتالاکتاماز با طیف وسیع

(ESBL): برای شناسایی باکتری‌های مولد ESBL از روش دیسک ترکیبی (CD) Combination Disk محصول شرکت MAST انگلستان با توجه به دستورالعمل CLSI استفاده شد با استفاده از دو دیسک سفوتاکسیم (Confirmatory) TES (۳۰ میکروگرمی، سفوتاکسیم/کلولانیک اسید ۳۰ و ۱۰ میکروگرمی) آزمایش انجام

(Expanded spectrum β -lactamase) گفته می‌شود (۲). ظهور مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام اغلب مربوط به حضور پلاسمید در سویه‌های تولیدکننده پنی‌سیلیناز است که به سرعت بین جدایه‌های بالینی انتشار می‌یابد (۳). فراوان‌ترین و مهم‌ترین مکانیسم مقاومت به داروهای بتالاکتام، به واسطه تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده بتالاکتام‌ها است. در واقع این آنزیم‌ها که سرین پروتئاز هستند، با اتصال به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و با ایجاد پیوند کووالان و با تخریب پیوند آمیدی موجب غیرفعال شدن این داروها می‌شوند. آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری‌ها بسیار متنوع هستند و در پاسخ به فشار انتخابی آنتی‌بیوتیک، دائما در حال موتاسیون و یا جایگزینی اسیدهای آمینه به‌ویژه در جایگاه فعال آنزیم هستند؛ به طوری که باعث ظهور انواع جدیدی از بتالاکتامازهای با طیف گسترده (ESBL) شده‌اند (۴). ژن پیش ساز بتالاکتاماز SHV (Sulfhydryl variable) ممکن است به صورت یک ژن کروموزومی در کلبسیلا ظاهر شده و سپس از راه‌های مختلف ژنتیکی به پلاسمیدها منتقل و از آن طریق بین گونه‌های دیگر انتروباکتریاسه پخش شده باشد؛ به طوری که آنالیز ترادف ژنومی کلبسیلا پنومونیه تأییدکننده منشأ کروموزومی SHV bla است (۵،۶). آنزیم بتالاکتاماز PER (*Pseudomonas extended resistant*) هم روی کروموزوم باکتری و هم روی پلاسمید یافت شده و در باکتری‌های مختلفی گزارش شده است. همچنین این آنزیم روی عناصر انتقال‌دانی واقع شده و قادر به هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها است و فعالیت آن از طریق کلونالیک اسید نیز مهار می‌شود. آنزیم PER می‌تواند سفالوسپورین‌های نسل چهارم را به جز سفنازیدیم و سفوتاکسیم هیدرولیز کند (۷). آنزیم بتالاکتاماز (Vietnam extended-spectrum Betalactamas) VEB نیز برای اولین بار روی پلاسمید و اینتگرون جدایه‌های *شریشیاکلی* و کلبسیلا از یک نوزاد ۴ ماهه ویتنامی شناسایی شد که متعلق به بتالاکتاماز وسیع‌الطیف است. این آنزیم در تایلند، کویت، هند و چین نیز گزارش شده است و به نظر می‌رسد احتمالا منشأ آنزیم‌های بتالاکتامازی VEB بیماران آسیایی باشد (۸،۹). با توجه به اهمیت کلبسیلاهای پنومونیه مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در عفونت‌های بیمارستانی این امر مشکلی جدی برای بخش سلامت کشور است و بیماران را نیز در بیمارستان‌های سراسر جهان تحت تأثیر قرار می‌دهد. با دستیابی به اطلاعات مربوط به فراوانی ژنوتیپ‌های فوق در کلبسیلا پنومونیه مقاوم به بتالاکتاماز جداسازی شده از نمونه‌های بالینی و انتقال این اطلاعات به جامعه

DNA template (۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت‌وبرگشت (۱۰ پیکامول) طبق شرایط دمایی و زمانی ارائه‌شده در جدول ۲ انجام گرفت. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای طراحی‌شده با نرم‌افزار Primer3 و Gen Runner در جدول ۱ و شرایط دمایی و زمانی ترموسایکلر در جدول ۲ ارائه شده است. محصول به‌دست‌آمده از PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد؛ سپس وجود باند در دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت. برای اطمینان از صحت انجام آزمایش، از کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 تهیه‌شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی تهران به‌عنوان کنترل مثبت برای ژن SHV و سویه استاندارد/سینتوباکتر بومانی ATCC19606 به‌عنوان کنترل مثبت برای ژن‌های VEB و PER استفاده شد. سویه استاندارد/شریشیالکی ATCC25922 به‌عنوان کنترل منفی برای واکنش PCR به‌کار رفت.

و افزایش بیش از ۵ میلی‌متری در قطر هاله رشدنیافتگی در حضور کلونیک اسید به‌عنوان ESBL تأیید شد (۱۰).

بررسی حساسیت دارویی به روش انتشار از دیسک:
مقاومت دارویی سویه‌های جداشده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های (سفپیم، آمپی‌سیلین، جنتامیسین، سفالوتین، سفنازیدیم، ایمی‌پنم، سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم، نیتروفورانتوئین) براساس رهنمودهای CLSI به روش انتشار دیسک در آگار (Disk) Diffusion انجام شد. ذکر این نکته لازم است که از سویه استاندارد E.coli ATCC25922 به‌عنوان سویه کنترل منفی و سویه استاندارد *Klebsiella pneumonia* ATCC700603 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۱).

بررسی فراوانی ژن‌های SHV، PER و VEB: در این مطالعه استخراج DNA به روش جوشاندن صورت گرفت و برای انجام واکنش PCR استفاده شد (۱۲). این واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر Mastermix از شرکت امپلیکون، ۸ میکرولیتر (Dnase free Deionized Water)، ۱ میکرولیتر

جدول ۱. اطلاعات پرایمرها

نام پرایمر	توالی	طول قطعه	دمای TM
SHV	F: 5'- GAAAAACACCTTGCCGACGG -3' R: 5'- ATTTGCTGATTCGCTCGGC -3'	۵۰۳bp	۵۸/۴
PER	F: 5'- TTGATGTTTATGCCGCGTGC -3' R: 5'- TTCAAAACCGCGAGAATGC -3'	۵۰۰bp	۵۸/۴
VEB	F: 5'- CAACCCCAACAGCGATGAAC -3' R: 5'- ACCCCAACATCATTAGTGGCT -3'	۲۲۳bp	۵۹/۴

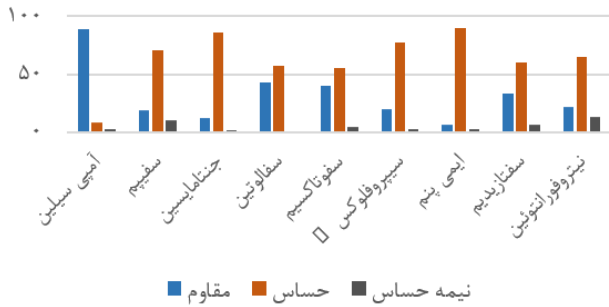
جدول ۲. اطلاعات دمایی و زمانی دستگاه ترموسایکلر

ردیف	مراحل	درجه حرارت (°C)			زمان		
		SHV	VEB	PER	SHV	VEB	PER
۱	Initial denaturation	۹۴	۹۴	۹۴	۵ Min	۵ Min	۵ Min
۲	Denaturation	۹۴	۹۴	۹۴	۳۰ S	۳۰ S	۳۰ S
۳	Annealing	۵۸/۴	۵۹/۴	۵۸/۴	۲۵ S	۲۵ S	۴۰ S
۴	Extension	۷۲	۷۲	۷۲	۳۰ S	۲۵ S	۳۰ S
۵	Final extension	۷۲	۷۲	۷۲	۵ Min	۵ Min	۵ Min
۶	Cycle number	۴۰ دور					

یافته‌ها و بحث

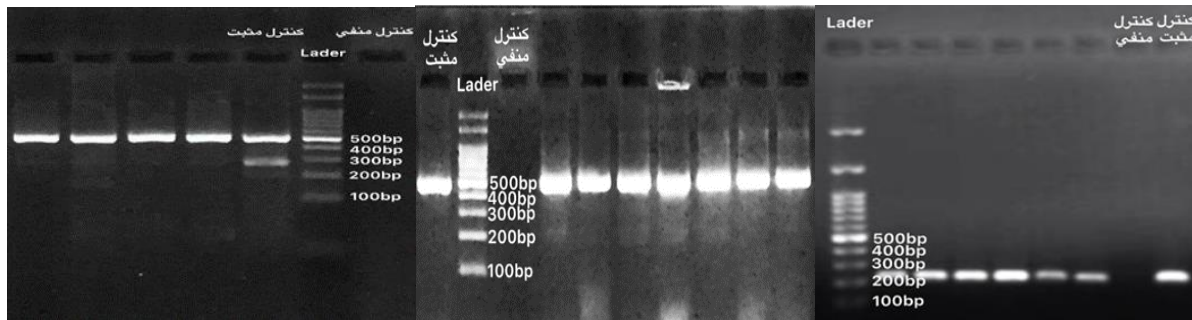
با وجود تلاش‌های بسیاری که برای ریشه‌کنی بیماری‌های عفونی صورت گرفته است، تغییر رفتار میکروارگانیسم‌ها از جنبه‌های مختلف موجب شده ریشه‌کنی بسیاری از این عوامل میکروبی با موفقیت کافی همراه نباشد و حتی با ظهور و شیوع جدایه‌های جدید، منجر به افزایش بیماری‌های عفونی شود (۱۳)؛ به طوری که با وجود اقداماتی که تاکنون برای تولید مواد ضد میکروبی وسیع‌الطیف انجام شده است، کماکان موضوع بروز و شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، به خصوص مقاومت باکتری‌های گرم منفی یکی از موانع اساسی برای درمان قطعی بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود (۱۴). در مطالعه حاضر از مجموع ۲۷۰ نمونه بالینی (ادرار، خون، خلط)، ۲۴۰ جدایه گرم منفی گزارش شد. ۱۷۶ جدایه کلبسیلا پنومونیه از مجموع ۲۴۰ جدایه گرم منفی دریافت شده از مناطق مختلف شهر تهران در آزمایشگاه میکروبیولوژی با انجام آزمایش‌های میکروبیولوژی و بیوشیمیایی تأیید شدند. از این بیماران در مجموع ۸۶ جدایه از نمونه ادرار، ۱۴ جدایه از نمونه خون و ۷۶ جدایه از نمونه خلط جمع‌آوری شدند. با بررسی اطلاعات بیماران مشخص شد که ۲۴ نفر (۱۳/۶۴ درصد) از بیماران، مرد و ۱۵۲ نفر (۸۶/۳۶ درصد) از بیماران، زن بودند. از ۱۷۶ جدایه کلبسیلا پنومونیه ۱۰۰ جدایه (۵۶/۸۱ درصد) توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز را داشتند. شیوع تیپ‌های مختلف ESBL در جدایه‌های بالینی کشورهای مختلف و حتی بیمارستان‌های موجود در یک منطقه می‌تواند متفاوت باشد که این به تأثیرات متقابل میزبان و باکتری و همچنین انتقال ژنتیکی بین باکتری‌ها بستگی دارد. آمارها در شهرهای ایران متفاوت گزارش شده است. در کرمانشاه (سال ۲۰۱۴) ۴۵ درصد (۱۵)، تهران (سال ۲۰۱۵) ۴۸ درصد (۱۶)، در مطالعه Dehghan و همکاران (۲۰۱۷) ۳۲/۸ درصد (۱۷)، همچنین در دیگر نقاط جهان از جمله کره جنوبی (سال ۲۰۱۰) ۲۶/۵ درصد، اندونزی (سال ۲۰۱۰) ۲۳/۷ درصد، چین (سال ۲۰۰۹) ۳۳/۴ درصد (۱۰)، ایزوله‌ها از نظر تولید ESBL مثبت بودند. به نظر می‌رسد تنوع در الگوی مصرف و تجویز داروهای بتالاکتام و نحوه به‌کارگیری ابزارهای کنترل عفونت در بخش‌های مختلف بیمارستان دلایل عمده تنوع در میزان شیوع ارگانیسم‌های تولیدکننده ESBL در مناطق جغرافیایی متفاوت است. جدایه‌های تولیدکننده ESBL به‌طور خاص می‌توانند به راحتی ژن‌های مقاومت را به وسیله

پلاسمید از طریق انتقال افقی منتقل کنند و باعث ایجاد عفونت‌های بیمارستانی شوند (۱۸). در این پژوهش بیشترین میزان مقاومت باکتری، نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۸۹ درصد) و کمترین درصد مقاومت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم (۷ درصد) مشاهده شد (نمودار ۱).



نمودار ۱. نتایج تست حساسیت دارویی

دو مطالعه انجام شده در ایران که Moradi (۲۰۱۵) و Sarshar (۲۰۱۴) انجام دادند و با نتایج تحقیق حاضر همسو است، نشان داد در شهر کرمان بیشترین مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۹۲/۵ درصد) و مؤثرترین آنتی‌بیوتیک علیه کلبسیلا پنومونیه آنتی‌بیوتیک ایمپنم با حساسیت (۸۹ درصد) است (۱۹). همچنین در کرمانشاه (سال ۲۰۱۴) بیشترین و کمترین مقاومت باکتری به ترتیب به آمپی‌سیلین و آنتی‌بیوتیک‌های گروه کارباپنم مربوط است (۱۵). در مطالعات انجام شده در ایران و خارج از ایران، کمترین مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک ایمپنم و بیشترین مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین گزارش شد که همسو با مطالعه حاضر است. تفاوت در میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در مطالعات پیشین، می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع درمان بیماران مورد مطالعه بوده باشد که مصرف زیاد برخی آنتی‌بیوتیک‌ها در آنها باعث افزایش چشمگیر مقاومت به این نوع آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. در این تحقیق، انتظار می‌رود علت بالا بودن مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به مکانیسم‌های دیگری از جمله پمپ‌های ترشحی، تشکیل بیوفیلم و نیز تغییر در پورین‌ها نیز باشد که باید بررسی شود (۲۰). در مطالعه حاضر، نتایج PCR ژن‌ها روی ۱۰۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL مشخص شد که در مجموع ۳۴ جدایه (۳۴ درصد) ژن SHV، ۱۳ جدایه (۱۳ درصد) ژن PER و ۱۷ جدایه (۱۷ درصد) ژن VEB داشتند (شکل ۱، ۲، ۳).



شکل ۱. برخی از نمونه‌های حاوی ژن *SHV*؛ شکل ۲. برخی از نمونه‌های حاوی ژن *PER*؛ شکل ۳. برخی از نمونه‌های حاوی ژن *VEB*

دارند. گفتنی است مسئله بروز مقاومت‌های متعدد در باکتری، به چرخش جغرافیایی و اپیژنتیک نیز وابستگی دارد و در به‌دست آوردن پلاسمیدهای متعدد در نوع بروز مقاومت‌ها بی‌تأثیر نیست (۲۶). از طرفی ممکن است در این پلاسمیدها به‌طور هم‌زمان، ژن مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها (مثل آمینوگلیکوزیدها) قرار گیرد و مقاومت هم‌زمان باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها را ایجاد کند که در این صورت داروهای مناسب برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها بسیار محدود خواهد شد که از دلایل مهم نگرانی گسترش سویه‌های ESBL است (۲۷). لذا اختلاف در فراوانی ژن‌های مقاومت را باید در حضور سایر ژن‌های مولد مقاومت جستجو کرد که در مناطق مختلف از وفور متفاوتی برخوردارند که باعث تفاوت فنوتیپی و ژنوتیپی در سطح سویه‌های مقاوم این باکتری می‌شود. به‌علاوه تنوع روش‌های ژنوتیپی مورداستفاده در تحقیقات مختلف نیز می‌تواند از دلایل این اختلاف نتایج باشد. به نظر می‌رسد مصرف خودسرانه و بیش‌ازحد دارو به‌ویژه در محیط بیمارستان، از سویی با افزایش مقاومت دارویی و فرایند کنژوگاسیون روبه‌رو است که در انتقال ژن‌های بتالاکتامازهای پلاسمیدی نقش اساسی دارد و به رشد فزاینده و مقاومت‌های دارویی می‌انجامد؛ از سوی دیگر در انتقال مقاومت بین سویه‌های بیمارستانی و جامعه دخیل بوده که یک معضل جدی روبه‌افزایش است. تغییر در استراتژی مصرف آنتی‌بیوتیک و استفاده از ابزارهای کنترل عفونت در بخش‌هایی که بیماران در آن به‌مدت طولانی بستری می‌شوند از عوامل مهمی هستند که می‌تواند در کنترل انتشار ارگانسیم‌های تولیدکننده ESBL ایفای نقش کند. یافته‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه بر ضرورت اتخاذ راهکارهای عملی درباره تجویز منطقی داروها، ضرورت تجهیز آزمایشگاه‌ها به روش‌های تشخیصی (فنوتیپی، تکنیک‌های مولکولی، ...) برای شناسایی و تعیین نوع مقاومت ژنتیکی، برآورد

در مطالعه‌ای در آرژانتین (۲۰۰۳) ۲۳/۰۸ درصد (۲۱)، در تحقیق Nasehi (۲۰۱۰) ۷/۵ درصد (۲۲)، در تحقیق Dehghan (۲۰۱۷) در سویه کلبسیلا صفر درصد، در سویه اشریشیاکلی ۲/۱ درصد شیوع ژن *PER* گزارش شد (۱۷). در مطالعه Jiang (۲۰۰۶) ۳۸/۶ درصد (۲۳)، در مطالعه Latifpour (۲۰۱۵) ۰/۸ درصد (۲۴)، در مطالعه Dehghan (۲۰۱۷) در جدایه‌های کلبسیلا ۸/۶ درصد در جدایه اشریشیاکلی ۱۷/۲ درصد، شیوع ژن *VEB* گزارش شد (۱۷). به نظر می‌رسد که دو ژن *blaPER* و *blaVEB* در حال انتقال از سویه‌های مختلف به سویه کلبسیلا پنومونیه است که روند صعودی در مطالعه حاضر مشاهده شد. براساس مطالعات انجام‌شده روی ژن *blaSHV* در شهرهای ایران روند روبه‌افزایشی مشاهده شد. در مطالعه‌ای در قزوین (۲۰۱۳) ۲۲/۷ درصد (۱۰)، تهران (۲۰۱۵) ۶۲/۵ درصد (۱۶)، ترکیه (۲۰۱۰) ۲۱/۸ درصد (۲۵)، از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه را حاوی ژن *SHV* گزارش کردند. گفتنی است ژنوم استخراج‌شده حاوی Total DNA است چون ژن‌های مورد مطالعه هم در کروموزوم و هم در پلاسمید باکتری حضور دارند و پرایمرها به ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی متصل می‌شوند. حساسیت پایین PCR در مطالعه حاضر می‌تواند به‌علت تغییر در غلظت آگارز و یا تکثیر ژن‌های غیراختصاصی باشد؛ چون محصول PCR ژن‌های مورد مطالعه نسبت به ژن‌های دیگر که از طریق پرایمر تکثیر شدند، بسیار بیشتر بود و هدف این مطالعه فقط تشخیص حضور ژن‌های مورد مطالعه بود. به همین خاطر از باندهای غیراختصاصی خیلی کم‌رنگ صرف‌نظر شد. اختلافات در میزان شیوع *SHV* *PER* و *VEB* در ایران و کشورهای دیگر ممکن است به‌دلیل میزان و روش تجویز دارو، میزان مراقبت‌های بهداشتی و کنترل انتشار سویه‌های مقاوم در مناطق مختلف باشد. این نتایج نشان می‌دهد این ژن‌ها روی عناصر ژنتیکی قرار دارند و توانایی انتقال به دیگر باکتری‌ها را

مرکز تحقیقات بیولوژی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله
کمال تشکر را داریم.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

میزان شیوع سویه‌های مقاوم باکتری‌ها اتخاذ تدابیر لازم برای
درمان بیماران و کنترل مقاومت در باکتری‌ها تأکید می‌کند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از پرسنل محترم و زحمت‌کش گروه
زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند و پرسنل محترم

References

- Amraei S, Eslami G, Taherpour A, Goudarzi H, Hashemi A. Detection of FOX, MOX, and ACT Genes in ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Iranian journal of health sciences*. 2014; 24(118): 11-20.
- Hassan SA, Jamal SA, Kamal M. Occurrence of multidrug resistant and ESBL producing *E. coli* causing urinary tract infections. *Journal of Basic & Applied Sciences*. 2011; 7(1).
- Far N, Moghaddam N. Phenotypic and molecular detection of PER extended spectrum β -lactamases in urinary Enterobacteriaceae isolates in Mashhad. *Journal of North Khorasan University of Medical*. 2012; 4(1): 87-93. <https://doi.org/10.29252/jnkums.4.1.87>
- Alsultan A, Hamouda A, Evans B, Amyes S. *Acinetobacter baumannii*: emergence of four strains with novel bla OXA-51-like genes in patients with diabetes mellitus. *Journal of Chemotherapy*. 2009; 21(3): 290-5. <https://doi.org/10.1179/joc.2009.21.3.290>
- 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 β -lactamase in a Mexican pediatric hospital. *Avicenna J Clin Microbiol Infect*. 2004; 42(1): 30-5. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.30-35.2004>
- Livermore D. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008; 14: 3-10. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01857.x>
- Pasterán F, Rapoport M, Petroni A, Faccone D, Corso A, Galas M, et al. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(9): 3222-4. <https://doi.org/10.1128/AAC.00284-06>
- Girlich D, Naas T, Leelaporn A, Poirel L, Fennewald M, Nordmann P. Nosocomial Spread of the Integron-Located veb-1—Like Cassette Encoding an Extended-Spectrum β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clin Infect Dis*. 2002; 34(5): 603-11. <https://doi.org/10.1086/338786>
- Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(3): 573-81. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.3.573>
- Peymani A, Moeini Rad M, Naserpour Farivar T, Sanikhani R, Javadi A, Pahlavan AA. In SHV and TEM isolates, the prevalence of broad-spectrum β -lactamases and *Klebsiella pneumoniae* genotypes isolated from clinical specimens collected from Qazvin's hospitals. *Iranian Journal of Infectious Diseases*. 2013; 15(60): 15-20.
- Standards A. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved Standards CLSI. 2010; M100-S20.
- Yazdi M, Nazemi A, Mir IM, Khataminejad MR, Sharifi S, BABAI KM. PREVALENCE OF SHV/CTX-M/TEM (ESBL) BETA-LACTAMASE RESISTANCE GENES IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM URINARY TRACT INFECTIONS IN TEHRAN, IRAN. 2010.
- Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010; 74(3): 417-33. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- Yagi T, Wachino J-i, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Avicenna journal Clinical Microbiology and Infection*. 2005; 43(6): 2551-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2551-2558.2005>
- Sarshar MHF, Akya A. The frequency of extended spectrum β -lactamase genes of SHV-2a, SHV-5 and SHV-12 in clinical isolates of *klebsiella pneumoniae* isolated from Kermanshah medical centers in 2014. *Majallah-i dānishgāh-i ulūm-i pizishkī-i Arāk*. 2016; 19(2): 59-67.
- Hashemi A, Fallah F, Taherpour A, Goudarzi H, Tarashi S, Erfanimesh S, et al. Detection of

- metallo-beta-lactamases, extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), outer membrane porins among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Tehran. *Journal of Zanjan University of Medical Sciences*. 2015; 23(98): 89-102.
17. Dehghan F, Zolghadri N, Karmostaji A. Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in Hospital and Community Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Jundishapur J Microbiol*. 2017. <https://doi.org/10.5812/jjm.45678>
 18. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8(4): 557-84. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.4.557>
 19. Moradi M, Norouzi A. 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. *JUMFS*. 2016; 6(1): 120-8.
 20. Ahanjan M, Naderi F, Solimani A. Prevalence of Beta-lactamases Genes and Antibiotic Resistance Pattern of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Teaching Hospitals, Sari, Iran, 2014. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2017; 27(149): 79-87.
 21. Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez M, Costa N, Korbenfeld D, et al. Extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(9): 2864-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2864-2867.2003>
 22. Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin VS, Nematzadeh S. PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Tehran, Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2010; 13(3): 111-18.
 23. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(9): 2990-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.01511-05>
 24. Latifpour M, Gholipour A, Damavandi MS. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in nosocomial and community-acquired urinary tract infections. *Jundishapur J Microbiol*. 2016; 9(3). <https://doi.org/10.5812/jjm.31179>
 25. Bali EB, Accedil L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum-lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. *African Journal of Microbiology Research*. 2010; 4(8): 650-4.
 26. Shamlou N, Zaker Bostan Abad S, Mirnejad R. Molecular identification of genes of beta_lactamase(CTX_M)in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Patien refer to hospitals of tehran city. *NCMBJ*. 2018; 8(30): 10.
 27. Babei kocheksaraei M, Nasrolahi A, Javid N, Shakeri F, Yazdi M, Ghaemi A. Frequency of *Escherichia coli* generating enzymes of Beta-lactamase in gorgan. *Journal of Laboratory Sciences*. 2012; 6(1): 51-8.