

Original Article

Prevalence of extended-spectrum β -lactamases and characterization of integron class 1 in extended spectrum β lactamase-producing *klebsiella pneumoniae* in sina hospital ,Tabriz 2012

Alka Hasani^{1,2}, Forough Shams^{1,2*}, Ali Pormohammad², Mohammad Ahangarzadeh Rezaee²,
Mohammad Reza Nahaei², Mohammad Hossein Soroush barhaghi², Akbar Hasani³

¹Research Center of Infectious and Tropical Diseases, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Department of Biochemistry and Clinical Laboratory, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Corresponding author; E-mail: froogh.shams@yahoo.com

Received: 19 November 2014 Accepted: 9 December 2014 First Published online: 28 August 2017
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017 October;39(4):29-35

Abstract

Background: The existence of beta-lactamase among gram-negative bacteria such as *Klebsiella pneumoniae*, as a significant pathogen in nosocomial infection is the most important cause of resistance against beta-lactam antibiotics family. Class 1 integrons are mobile genetic elements which are mostly prevalent in drug-resistant bacteria. This study was conducted to determine the prevalence of phenotypic and genotypic ESBL-producing strains as well as the incidence of integron class 1 in ESBL-producing strains.

Methods: Sixty three isolates of *K.pneumoniae*, confirmed by biochemical and phenotypic tests, were collected within six months. Susceptibility test was carried out by Disk diffusion method. Prevalence of ESBL producing strains were determined by using Combined Disk Test. Presence of *bla TEM*, *bla SHV* gene family and class I integron were detected by PCR technique.

Results: Forty five (71.4%) of isolates were ESBL-producing. *TEM* and *SHV* gene family were existed in 66.6% and 68.9% of ESBL-producing isolates, respectively. Class I integron were detected in 24 (65%) and 19 (63.3%) of *SHV* and *TEM* positive strains, respectively.

Conclusion: In present study, increasing level of ESBL producing isolates were confirmed. Also, this study intensely demonstrates the role of integron in the dissemination of ESBL-mediated resistance among the nosocomial isolates. Overall, using the proper treatment procedure according to the antibiogram pattern of the strains is specifically recommended.

Keywords: Extended-spectrum β -lactamases (ESBL), *K.pneumoniae*, Integron class I

How to cite this article: Hasani A, Shams F, Pormohammad A, Ahangarzadeh Rezaee M, Nahaei M.R, Soroush barhaghi M.H, Hasani A. [Prevalence of extended-spectrum β -lactamases and characterization of integron class 1 in extended spectrum β lactamase-producing *klebsiella pneumoniae* in sina hospital,Tabriz 2012]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017 October;39(4):29-35. Persian.

مقاله پژوهشى

فراوانى بتالاكتاماز هاى وسيع الطيف و بررسى اينتگرون كلاس ۱ در دركلبسيلا پنومونيه هاى توليد كننده بتالاكتاماز هاى وسيع الطيف در بيمارستان سيناي تبريز- ۱۳۹۱

آلكا حسنى^{۱*}، فروغ شمس^{۲،۱*}، على پورمحمد^۱، محمد رضايى آهنگرزاده^۱، محمد رضا نهايى^۱، محمد حسين سروش برحقى^۱، اكبر حسنى^۲

^۱ مركز تحقيقات بيماريهاى عفونى و گرمسيري، دانشكده پزشكى، دانشگاه علوم پزشكى تبريز، ايران
^۲ گروه ميكروب و ويروس شناسى، دانشكده پزشكى، دانشگاه علوم پزشكى تبريز، ايران
^۳ گروه بيوشيمي، دانشكده پزشكى، دانشگاه علوم پزشكى تبريز، ايران
 *نويسنده رابط: ايميل: froogh.shams@yahoo.com

دريافت: ۱۳۹۳/۸/۲۸ پذيرش: ۱۳۹۳/۹/۱۸ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۶/۶
 مجله پزشكى دانشگاه علوم پزشكى و خدمات بهداشتى - درمانى تبريز. ۱۳۹۶ مهر و آبان؛ ۳۹(۴): ۲۹-۳۵

چكیده

زمينه: حضور بتالاكتاماز ها در ميان باكتري هاى گرم منفى از جمله كلبسيلا پنومونيه، كه به عنوان پاتوژن مهم در عفونت هاى بيمارستانى معرفى گشته، از مهمترين عوامل مقاومت به آنتى بيوتيك هاى خانوادهى بتالاكتام مى باشد. اينتگرون كلاس ۱ از عناصر متحرك ژنتيكي است كه بيشتر در باكتري هاى مقاوم به دارو شيوع دارد. اين مطالعه به منظور تعيين فراوانى فنوتىپى و ژنوتىپى سويه هاى توليد كننده بتالاكتامازهاى وسيع الطيف و نيز تعيين شيوع اينتگرون كلاس ۱ در سويه هاى توليد كننده بتالاكتاماز هاى وسيع الطيف انجام گرديد.

روش كار: تعداد ۶۳ ايزوله‌ى كلبسيلا پنومونيه كه توسط تست هاى بيوشيميائى و فنوتىپى تأييد گرديد، در طى ۶ ماه جمع آورى گشت. آزمون تعيين حساسيت توسط روش ديسك ديفيوژن انجام گرفت و فراوانى سويه هاى توليدكننده بتالاكتامازهاى وسيع الطيف، با روش ديسك تركيبى تعيين گرديد. حضور ژن هاى خانواده *bla SHV*، *bla TEM* و اينتگرون كلاس ۱ به روش PCR بررسى گشت.

يافته ها: از ميان نمونه ها، ۴۵ (٪۷۱/۴) ايزوله مولد بتالاكتامازهاى وسيع الطيف بودند. ژن هاى خانواده *TEM* و *SHV* به ترتيب در ٪۶۶/۶ و ٪۶۸/۹ از ايزوله هاى توليد كننده بتالاكتامازهاى وسيع الطيف حضور داشتند و اينتگرون كلاس ۱ به ترتيب در ٪۶۵ (٪۱۹ و ٪۶۳/۳) مورد از سويه هاى داراى *TEM* و *SHV* مشاهده شد.

نتيجه گيرى: در مطالعه حاضر، شيوع رو به افزايش سويه هاى توليد كننده بتالاكتامازهاى وسيع الطيف تأييد گرديد. هم چنين اين مطالعه اهميت ويژه اينتگرون در انتشار بتالاكتامازهاى وسيع الطيف مولد مقاومت در ميان ايزوله هاى بيمارستانى را بيان مى كند. به طور كللى استفاده از روش درمانى مناسب بر پايه تعيين الكوى آنتى بيوگرام سويه ها، به طور خاص توصيه مى گردد.

كليد واژه ها: بتالاكتاماز وسيع الطيف، كلبسيلا پنومونه، اينتگرون كلاس ۱

نحوه استناد به اين مقاله: حسنى آ، شمس ف، پورمحمد ع، رضايى آهنگرزاده م، نهايى م، سروش برحقى م، حسنى ا. فراوانى بتالاكتاماز هاى وسيع الطيف و بررسى اينتگرون كلاس ۱ در دركلبسيلا پنومونيه هاى توليد كننده بتالاكتاماز هاى وسيع الطيف در بيمارستان سيناي تبريز- ۱۳۹۱. مجله پزشكى دانشگاه علوم پزشكى و خدمات بهداشتى - درمانى تبريز. ۱۳۹۶؛ ۳۹(۴): ۲۹-۳۵

حق تاليف براى مؤلفان محفوظ است.

اين مقاله با دسترسى آزاد توسط دانشگاه علوم پزشكى و خدمات بهداشتى - درمانى تبريز تحت مجوز كريتيو كامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده كه طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتى مجاز است كه به اثر اصلى به نحو مقتضى استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه بعد از اشرشیاکلی شایع ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی، عفونت‌های ادراری، عفونت‌های وابسته به کاتتر و هم-چنین سیسیس ناشی از باسیل‌های گرم منفی می باشد (۱). کشف آنتی بیوتیک‌ها و گسترش رواج استفاده از آنها در درمان بیماری‌های ناشی از عفونت‌های باکتریایی، باعث به وجود آمدن مقاومت نسبت به مواد ضد باکتریایی شده است. استراتژی‌های مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها مختلف و متفاوت هستند و یکی از این مکانیسم‌ها تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری‌ها می باشد (۲). بتالاکتامازها به دو صورت عملکردی (Bush-Jacoby-Medeiros) و مولکولی (Ambler) طبقه بندی می‌شوند. بتالاکتامازها بر مبنای طبقه بندی مولکولی که بر اساس توالی نوکلئوتیدها و اسید آمینه در این آنزیم‌ها می باشد، به چهار کلاس A تا D تقسیم می شوند (۳). با مصرف روزافزون سفالوسپورین‌ها، در سال ۱۹۸۰ دسته‌ی دیگری از آنزیم‌ها به نام بتالاکتامازهای وسیع الطیف Extended-Spectrum (Betalactamas=ESBL) که جزء بتالاکتامازهای کلاس A بودند، تشخیص داده شدند (۴). آنزیم‌های وسیع الطیف که می‌توانند به وسیله ژن‌های کروموزومی یا پلاسمیدی ایجاد شوند، شامل خانواده‌های آنزیمی TEM (Temoneria), SHV (SHV), OXA (Oxacilin) (Sulhidril variable) می باشد. تیپ‌های SHV و TEM به خوبی در انتروباکتریاسه شناسایی شده اند (۵). آنزیم بتالاکتاماز TEM اولین بار از باکتری اشرشیاکلی در کشت خون یک بیمار به اسم تمونیرا (Temoneira) شناسایی شد و در طی مدت کوتاهی پس از جداسازی بتالاکتاماز TEM، این آنزیم در سراسر جهان به سرعت انتشار یافت به طوری که امروزه به عنوان شایع ترین مکانیسم مقاومت به داروهای بتالاکتام در باسیل‌های گرم منفی به حساب می آید (۶). در سال‌های اخیر مقاومت دارویی باکتری‌ها به بیش از دو رده مختلف آنتی بیوتیکی که اصطلاحاً "مقاومت دارویی چندگانه" یا Multi-Drug Resistance گفته می‌شود، در میان ایزوله‌های بیمارستانی افزایش یافته است. عوامل ایجاد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها اکثراً بر روی عناصر ژنتیکی متحرک مانند پلاسمید، ترانسپوزون و اینتگرون حمل می‌شوند که در این میان اینتگرون‌ها بدلیل توانایی انتقال مقاومت‌های آنتی بیوتیکی چندگانه بر روی یک واحد ژنی از جایگاه ویژه ای برخوردار هستند (۷). اینتگرون‌های کدکننده مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها را می‌توان به چهار کلاس مختلف تقسیم کرد که هر کلاس واجد اینتگراز خاص خود است (۷). بیشتر اینتگرون‌های شناخته شده متعلق به کلاس ۱ بوده و غالباً حاوی ژن *stII* می‌باشند. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی کلبسیلاهای تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف و هم چنین ارزیابی ملکولی بتالاکتامازهای SHV، TEM و تعیین شیوع اینتگرون کلاس ۱ در نمونه‌های تولید کننده ESBL می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه می توان تا حدودی از مکانیسم مقاومت در کلبسیلا اطلاع یافته و هم‌چنین در انتخاب آنتی بیوتیک مناسب جهت درمان عفونت‌های مختلف کلبسیلا پنومونیه به پزشک کمک نمود.

روش کار

در این مطالعه از میان ۴۸۵ نمونه‌ی مختلف بالینی شامل: زخم، خون، ترشحات، ادرار، مایعات بدن و لوله تراشه که به آزمایشگاه بیمارستان سینای تبریز رسیده بود، تعداد ۶۳ سویه باکتری کلبسیلا پنومونیه در بازه زمانی ۶ ماهه (خرداد-دی ۱۳۹۱) جمع آوری و با تست‌های بیوشیمیایی و فنوتیپی تأیید گردید. از کلنی‌های ظاهر شده‌ی کلبسیلا، سوپانسیون‌ی بر اساس استاندارد نیم مک فارلند تهیه کرده و بر روی محیط مولر هیتون فعالیت ایزوله‌ها به صورت *in vitro* در برابر ۱۰ آنتی بیوتیک تهیه شده از شرکت MAST شامل: جتتامایسین (۱۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۱/۲۵ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، سپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۱۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفماندل (۳۰ میکروگرم)، سفتیزوکسیم (۳۰ میکروگرم) مورد بررسی قرار گرفت. میزان حساسیت یا مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها بر مبنای CLSI گزارش شد (۸). تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف با استفاده از روش دیسک ترکیبی و آنتی بیوتیک‌های تهیه شده از شرکت MAST شامل: سفوتاکسیم، سفپیم، سفوداکسیم و سفنازیدیم به تنهایی و همراه با کلولانیک اسید تعیین گردید. هدف از انجام آزمون دیسک ترکیبی جداسازی سوش‌های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف بود. در این تست از دیسک‌های سفنازیدیم ۳۰ میکروگرم، سفنازیدیم + کلولانیک اسید (۳۰-۱۰ میکروگرم)؛ سفوتاکسیم ۳۰ میکروگرم، سفوتاکسیم + کلولانیک اسید (۳۰-۳۰)؛ و سفپیم ۳۰ میکروگرم، سفپیم + کلولانیک اسید (۳۰-۱۰ میکروگرم)؛ و سفوداکسیم ۳۰ میکروگرم، سفوداکسیم + کلولانیک اسید (۳۰-۱۰ میکروگرم) و آزترونام (۳۰ میکروگرم) که به فاصله ۲۰ میلی متری از یکدیگر قرار گرفتند، استفاده شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف از طریق افزایش قطر هاله‌ی عدم رشد به اندازه ۵ میلی متر یا بیشتر در اطراف دیسک‌های آنتی بیوتیک همراه با کلولانیک اسید تعیین گردید. از سویه کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 و اشرشیاکلی با ATCC25922 به ترتیب جهت کنترل مثبت و منفی برای تأیید و عدم تأیید سویه‌های تولید کننده ESBL استفاده شد. استخراج DNA ژنومی سویه‌های موجود، توسط روش SDS-Proteinase K اصلاح شده با CTAB صورت گرفت و سپس عمل PCR به جهت شناسایی بتالاکتامازهای SHV، TEM و ژن اینتگراز ۱ انجام پذیرفت (جدول ۱). واکنش PCR برای ژن اینتگراز ۱ در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در هر ویال شامل:

۱/۲ میکرولیتر MgCl₂، ۲/۸ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۰/۵ میکرولیتر استوک dNTP، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم Taq Polymerase، ۱۶ میکرولیتر H₂O، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده و تحت برنامه زمانی برای ۳۵ سیکل شامل: مرحله

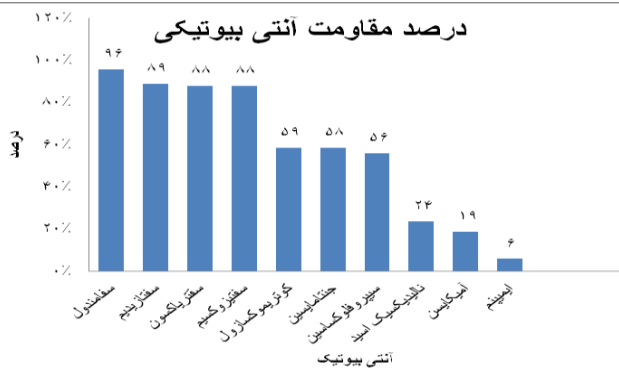
چنین اینتگرون کلاس ۱ در سویه های دارای خانواده های ژنی *SHV* و *TEM* به ترتیب در ۶۵٪ (۲۴) و ۶۳٪ (۱۹) از موارد حضور داشت (جدول ۲).

جدول ۱: توالی پرایمرهای به کار رفته در این تحقیق و وزن مولکولی محصول PCR

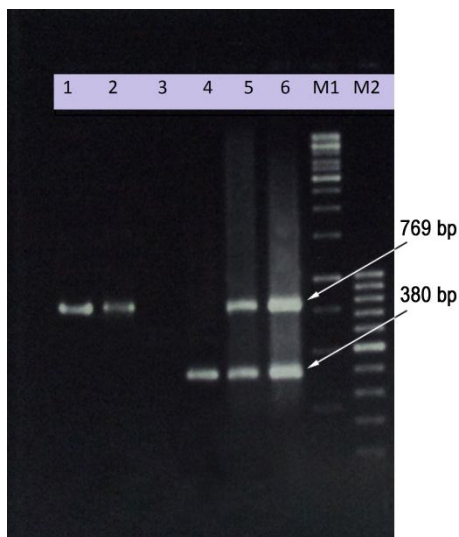
| منبع | اندازه قطعه (bp) | توالی نوکلئوتیدی پرایمر (3-5) | ژن |
|------|------------------|---|------------------|
| (۹) | ۳۷۵ | GCATCCTCGGTTTTCITGG GGTGTGGCGGGCTTCGTG | IntI F IntI R |
| (۲۸) | ۳۸۰ | GGGAAACGGAAGTGAATGAG TTAGCGTTGCCAGTGCTCG | SHV F SHV R |
| (۱۰) | ۷۶۹ | AGATCAGTTGGGTGCACGAG TGCTTAATCAGTGGGCACC | TEM F TEM R |

جدول ۲: بررسی شیوع اینتگرون کلاس ۱ در سویه های دارای ژن های بتالاکتاماز *SHV* و *TEM*

| <i>SHV, TEM</i> (n=۱۲) | ژن <i>TEM</i> (n=۳۰) | ژن <i>SHV</i> (n=۳۷) | اینتگرون کلاس ۱ (n=۲۶) |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| ۷(۱۲)/۵۸۳ | ۱۹(۳۰)/۶۳۳ | ۲۴(۳۷)/۶۵ | |



نمودار ۱: مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های کلسیلیا پنومونیه مورد بررسی در این مطالعه



شکل ۱: نتیجه آزمون PCR جهت حضور *SHV* و *TEM* : مارکر ۱) (Kbp). مارکر ۲) (۱۰۰bp) خط ۶۵۵،۲۱: نمونه مثبت برای *TEM* (۷۶۹bp) خط ۴۵۶: نمونه مثبت برای *SHV* (۳۸۰bp).

اولیه باز شدن دو رشته DNA به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۵°C، مرحله باز شدن دو رشته به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴°C، مرحله اتصال پرایمرها ۱ دقیقه در دمای ۶۰°C، مرحله طولیل شدن رشته هدف ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲°C و مرحله طولیل شدن انتهایی ۷ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد (۹). نتایج PCR جهت شناسایی قطعه اختصاصی ژن اینتگراز ۱ بر روی آگاروز همراه با نشانگر اندازه ۵۰ جفت بازی تعیین گردید (۹).

واکنش نهایی برای ژن های *SHV* و *TEM* در حجم ۲۵ میکرولیتر در هر ویال شامل:

۱/۲ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۲/۸ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۰/۵ میکرولیتر از استوک dNTP، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم Taq Polymerase، ۱۴ میکرولیتر H_2O ، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۲ جفت)، ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده و سپس تحت برنامه زمانی ۳۰ سیکل شامل: دناتوراسیون اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، مرحله باز شدن دو رشته در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۱۰). محصولات ۷۶۹ bp و ۳۸۰ bp بعد از الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفتند. در پایان داده ها بصورت درصد فراوانی گزارش و ارتباط ایزوله های تولید کننده ESBL به همراه وجود اینتگرون کلاس ۱ توسط نرم افزار SPSS صورت گرفت.

یافته ها

از میان نمونه های بالینی مورد بررسی، ۶۳ ایزوله ی کلسیلیا پنومونیه جدا شد که ۴۱/۲ درصد (۲۶) نمونه ها مربوط به زخم، ۳۰/۲ درصد (۱۹) مربوط به خون، ۲۵/۴ درصد (۱۶) ادرار و ۳/۲ درصد (۲) مربوط به لوله تراشه بودند. نتایج حاصل از مقاومت دارویی در برابر ۱۰ آنتی بیوتیک مورد استفاده به روش انتشار دیسک در نمودار ۱ بیان شده است. در این مطالعه مشخص گردید که ۷۶/۲٪ (۴۸) از نمونه ها به بیش از دو رده مختلف آنتی بیوتیکی (Multi-Drug Resistance) مقاوم بودند. نتایج حاصل از آزمایش دیسک ترکیبی (Combined disk) نشان داد که از میان ۶۳ سویه کلسیلیا، ۴۵ (۷۱/۴٪) ایزوله بتا لاکتامازهای وسیع الطیف بودند. مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مورد استفاده به روش Combined disk به این ترتیب بودند: سفپودوکسیم ۵۷ (۹۰٪)، آزترونام ۵۷ (۹۰٪)، سفنازیدیم ۵۵ (۸۷٪)، سفوتاکسیم ۵۴ (۸۵٪) و سفپیم ۱۵ (۲۳٪). قابل توجه است که بیشترین مولدین آنزیم های بتالاکتامازی ۷۶/۹٪ و ۷۵٪ به ترتیب متعلق به نمونه های زخم و ادرار بودند.

در آزمایش PCR برای تشخیص ژن های *SHV* و *TEM* مشخص گردید که به ترتیب ۶۳/۳۰ و ۶۳/۳۷ از نمونه ها حاوی ژن های مورد نظر بودند که البته در ایزوله های تولید کننده ESBL، فراوانی *TEM* (۴۵/۳۰) (۶۶/۶٪) و *SHV* (۴۵/۳۱) (۶۸/۹٪) گزارش گردید (شکل ۱). اینتگرون کلاس ۱ در (۴۵/۲۶) (۵۷/۸٪) از نمونه های مولد آنزیم های بتالاکتاماز که به صورت فنوتیپی بررسی شده بودند، وجود داشت. هم

بحث

مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها در دهه های اخیر موجب افزایش ظهور سویه هایی با مقاومت چندگانه دارویی در باکتری های روده ای گرم منفی مانند کلبسیلا شده است (۱۱). تعداد زیادی از آنتی بیوتیک های بتالاکتام که به طور معمول و رایج استفاده می شوند، توسط بتالاکتاماز های وسیع الطیف هیدرولیز می شوند. بطوری که این باکتری ها با تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) نسبت به آنتی بیوتیک هایی چون پنی سیلین، سفالوسپورین، سفوتاکسیم و سپیروفلوکسازین مقاوم گشته و بانتقال ژن کلکننده آنزیم های بتالاکتامازی در بین باکتری های گرم منفی روده ای یک تهدید بزرگ برای مصرف کنندگان سفالوسپورین های با طیف وسیع بشمار می آیند (۱۲). شناسایی این آنزیم ها توسط تست های فنوتیپی به تنهایی امکان پذیر نمی باشد و ممکن است عواملی سبب ایجاد نتیجه منفی کاذب شوند، که از جمله علل عمده آن می توان به حضور آنزیم های مختلف مانند Ampc، متالوبتالاکتامازها، سیستم Efflux قوی و نیز مقاومت به مهار کنندگی، مهار کننده های بتالاکتاماز نظیر کلاولانیک اسید اشاره کرد (۵، ۱۳). این امر مشکلاتی را در تفسیر این نوع مقاومت ها ایجاد نموده است. همان طور که در مورد ژن *SHV*، منفی کاذب در بررسی فنوتیپی بتالاکتاماز های وسیع الطیف به کرات مشاهده شده است در نتیجه استفاده از روش های مولکولی بسیار سودمند تر است (۱۴). در مطالعه حاضر ۴۵ (۷۱/۴٪) ایزوله ESBL مثبت بودند، در حالی که در مطالعه ای که توسط Mobasher-kare-Jeddi و همکاران در سال ۱۳۸۷ در تبریز صورت گرفت از میان ۴۱ ایزوله اشرشیاکلی ۴۰ ایزوله ESBL (۹۷/۵۶٪) مثبت بودند (۱۵). در این مطالعه با روش PCR مشخص گردید ژن *TEM* در ۶۶/۶٪ از ایزوله های تولید کننده ESBL حضور دارند که در این راستا مطالعه ایی که توسط Mazinani و همکاران در سال ۱۳۸۶ در بیمارستان ولیعصر تهران صورت گرفت، از میان ۷۶ نمونه بالینی *E. coli*، ۲۷ (۶۰٪) ایزوله حاوی ژن *TEM* بودند که این میزان بسیار مشابه با نتایج حاصل از این تحقیق بود (۱۶). هم چنین مسجیدیان و رستگار لاری در مطالعه خود نشان دادند که درمیان سویه های اشرشیاکلی، ۸۵/۶٪ ایزوله ها ژن *TEM* را دارا بودند (۱۷).

در مورد ژن *SHV* نتایج قابل تأمل و جالبی در PCR این ایزوله ها به دست آمد است. علاوه بر این که درصد بالایی از سویه های تولید کننده ESBL، ۶۸/۸٪ (۴۵/۳۱) حاوی این ژن بودند حتی ۶ (۳۳/۳٪) سویه از ایزوله های غیر تولید کننده ESBL هم حاوی این ژن بودند. مطالعه Zaniani و همکاران در مشهد نشان داد تنها ۱۴/۴٪ از سویه های اشرشیاکلی که تولید کننده ESBL نبودند، واجد ژن *SHV* بودند (۱۸). بنابراین ۳۷ (۵۸/۸٪) سویه از کل نمونه ها حامل ژن *SHV* بودند. مطالعه رستگار لاری و همکاران بر روی اشرشیاکلی درصد بالایی از وجود ژن *SHV* (۶۹/۲٪) را در سویه های تولید کننده ESBL

نشان داد که مشابه این نتیجه در کلبسیلا های تولید کننده ESBL در مطالعه حاضر وجود داشت (۱۷).

در مطالعه ایی که توسط Pirouzi و همکاران منحصراً بر روی کلبسیلا های جدا شده از عفونت ادراری صورت گرفته بود، ۲۸/۹٪ از سویه ها واجد ژن *TEM* و ۳۲/۴٪ از سویه ها دارای ژن *SHV* بودند (۱۹). در مطالعه ایی که اخیراً توسط Peymani و همکاران بر روی انتروباکتر کلوآکه در قزوین صورت گرفت، وجود ژن *CTX* (۶۰٪)، *TEM* (۳۲/۲٪) و *SHV* (۷/۵٪) گزارش گردید که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مغایرت دارد (۲۰). وجود همزمان دو ژن *TEM* و *SHV* در این مطالعه از میان سویه های تولید کننده ESBL ۲۶/۶٪ بود، در حالی که در مطالعه رستگار لاری و همکاران ۵۳/۸٪ از سویه های اشرشیاکلی واجد این دو ژن بودند (۱۷). در مطالعه Pirouzi و همکاران، مشابه مطالعه حاضر فراوانی ژن *SHV* بیشتر از *TEM* بود (۱۹). هم چنین مطالعه مشابهی که در ترکیه بر روی سویه های اشرشیاکلی و کلبسیلا صورت گرفت، فراوانی ژن های *SHV* (۵۲/۷٪) نسبت به *TEM* (۳۲/۴٪) در میان سویه های تولید کننده ESBL بیشتر بود که با مطالعه حاضر قرابت داشت (۲۱). در حالی که در بیشتر مطالعات ایران همانند Yazd و همکاران (۲۲) همچنین Zaniani (۱۸) و سایر کشور ها فراوانی ژن *TEM* بیشتر گزارش شده است. وجود سویه های منسوب به مقاوت دارویی چند گانه در (۴۸) ۷۶/۲٪ از ایزوله ها و تمام سویه های تولید کننده ESBL مشاهده شد. زیرا بیمارانی که به عوامل عفونی مولد بتالاکتاماز های وسیع الطیف دچار می گردند به درمان با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و سایر آنتی بیوتیک ها هم مقاومت نشان می دهند. به سبب نقش مهم ایتگرون ها در انتشار مقاومت های وسیع الطیف، بررسی وجود ژن ایتگراز ۱ در ایزوله های تولید کننده ESBL دارای اهمیت است. زیرا ESBL ها می توانند به عنوان بخشی از مجموعه ایتگرون ها باشند که منجر به تسهیل در امر انتقال آنها می گردد (۱).

در این مطالعه (۲۶/۴۵) ۵۷/۸٪ از ایزوله های ESBL مثبت حامل ژن ایتگراز ۱ بودند (۱، ۲۳، ۲۴). در ایران بررسی های فراوانی در مورد حضور ژن های ایتگراز صورت گرفته است، همانند مطالعه Derakhshan و همکاران بر روی کلبسیلا که تنها ۸ سویه (۲۵/۸٪) از ۳۱ نمونه دارای ایتگرون کلاس ۱ بودند (۲۵) و هم چنین مطالعه صورت گرفته توسط Ahangarzadeh و همکاران در تبریز نشان داد که ایتگرون کلاس ۱ در ۷۸/۵٪ از ایزوله های کلبسیلا وجود داشت (۲۶). اما تأکید مطالعه حاضر، ارتباط ژن های تولید کننده ESBL و حضور ایتگرون کلاس ۱ است. در مطالعه حاضر وجود ایتگرون کلاس ۱ در سویه های دارای *SHV* و *TEM* به ترتیب ۶۵٪ و ۶۳/۳٪ بود که در تحقیقات مشابه بر روی کلبسیلا در استرالیا و هلند، حضور ایتگرون کلاس ۱ در ژن *SHV* به ترتیب ۷۳٪ و ۷۶٪ گزارش شده است (۲۸-۲۷). در مطالعه حاضر هر دو ژن *SHV* و *TEM* در ۱۲ سویه مشاهده

دقيق سويه هاى توليد کننده ESBL توسط آزمايشگاه و پزشكان و پيشگيري از انتشار اين مقاومت دارويى و تجويز دقيق آنتى بيوتيك ها بر اساس تعيين الكوى حساسيت امرى مهم و ضرورى تلقى مى گردد.

قدردانى

اين پژوهش حاصل بخشى از پايان نامه دانشجويى سرکارخانم فروغ شمس به شماره ۹۱/۲-۳/۵ به عنوان طرح تحقيقاتى مرکز تحقيقات بيماريهاى عفونى و گرمسيري به شماره ۹۱-۱۷ مى باشد. لذا بدینوسيله از معاونت محترم پژوهشى دانشگاه علوم پزشكى تبريز و مرکز تحقيقات بيماريهاى عفونى و گرمسيري به دليل پشتيبانى مالي و کليه همکارانى که ما را در انجام اين تحقيق يارى رساندند تشکر و قدردانى مى نماييم.

گريد و حضور اينتگرون کلاس ۱ در اين سويه ها (۱۲/۷) ۵۸/۳٪ گزارش گرديد.

نتيجه گيرى

با مقايسه نتايج حاصل از اين مطالعه و ديگر موارد، گزارشات بدست آمده نشان دهنده آن است که درصد سويه هاى توليد کننده بتالاکتامازهاى وسيع الطيف رو به افزايش است و اين افزايش مى-تواند در نتيجه مصرف بيش از حد و طولانى مدت سفالوسپورين-هاى وسيع الطيف، طولانى بودن مدت زمان بسترى در بيمارستان و استفاده از کاتترهاى عروقى و ادرارى باشد. طبق نتايج حاصل در مورد شش سويه داراى ژن SHV و عدم مشاهده فنوتیپ ESBL در ميان اين سويه ها، مشخص شد روش هاى فنوتیپى به تنهائى نمى توانند نشان دهندى بتالاکتامازهاى وسيع الطيف باشند و منفي کاذب در اين روش قطعاً وجود دارد لذا انجام تکنیک هاى مولکولى از قبيل PCR جهت تشخيص انواع بتالاکتاماز هاى وسيع الطيف ضرورى به نظر مى رسد. هم چنين ضرورت شناسايى

References

- Bhattacharjee A, Sen MR, Prakash P, Gaur A, Anupurba S, Nath G. Observation on integron carriage among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Indian J Med Microbiol* 2010; **28**(3): 207-210.
- Sanchez UM, Bello TH, Dominguez YM, Mella MS, Zemelman ZR, Gonzalez RG. Transference of extended-spectrum beta-lactamases from nosocomial strains of *Klebsiella pneumoniae* to other species of Enterobacteriaceae. *Rev Med Chil* 2006; **134**(4): 415-420. doi: 10.4067/S0034-98872006000400002
- Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**(8): 2385-2392. doi: 10.1128/AAC.47.8.2385-2392.2003
- Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; **33**(3): 259-263. doi: 10.1128/AAC.33.3.259
- Kruger T, Szabo D, Keddy KH, Deeley K, Marsh JW, Hujer AM, et al. Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**(11): 4263-4270. doi: 10.1128/aac.48.11.4263-4270.2004
- Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK, Biddle JW, Raney PM, Anderson GJ, et al. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum beta-lactamase detection methods. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(8): 2864-2872. doi: 10.1128/jcm.39.8.2864-2872.2001
- Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**(4): 272-288. doi: 10.1111/j.1198-743x.2004.00858.x
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2011.
- Shibata N, doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003; **41**(12): 5407-5413. doi: 10.1128/jcm.41.12.5407-5413.2003
- Herra CM. *The Role of β -Lactamase in Low-Level Cephalosporin-resistant Serratia marcescens*: Trinity College Dublin; 2002.
- Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett* 2000; **184**(1): 53-56. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08989.x
- Song JS, Lee JH, Jeong BC, Lee WK, Lee SH. Removal of contaminating TEM-la beta-lactamase gene from commercial Taq DNA polymerase. *J Microbiol* 2006; **44**(1): 126-128.
- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**(4): 933-951. doi: 10.1128/CMR.14.4.933-951.2001
- Bell JM, Chitsaz M, Turnidge JD, Barton M, Walters LJ, Jones RN. Prevalence and significance of a negative

- extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) confirmation test result after a positive ESBL screening test result for isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: results from the SENTRY Asia-Pacific Surveillance Program. *J Clin Microbiol* 2007; **45**(5): 1478-1482.
15. Mobasher-kare-Jeddi AR, Nahaei MR, Mobayyen H, Pornour M, Sadeghi J. Molecular study of extended spectrum beta-lactamase (SHV Type) in *Escherichia Coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Medical Centers of Iran. *J Med Microbiol* 2008; **3**(4): 9-17.
 16. Hosseini-Mazinani SM, Eftekhari F, Milani M, Ghandili S. Characterization of beta-lactamases from urinary isolates of *Escherichia coli* in Tehran. *Iran Biomed J* 2007; **11**(2): 95-99.
 17. Masjedian Jazi F VF, Talebi A, Rastegar Lari A. Molecular characterization of resistance to Extended - Spectrum antibiotics in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Med Microbiol* 2007; **2**: 27-34.
 18. Zaniani FR, Meshkat Z, Naderi Nasab M, 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.
 19. Pirouzi AJ, Kargar M, Mohsenzadeh M, Feizabadi M, Afkari R. Molecular Detection of Simultaneous Occurrence of Antibiotic- and Heavy Metal-Resistance in *Klebsiella Pneumoniae* Isolated from Urinary Tract Infection. *Journal of Isfahan Medical School* 2012; **3**: 181-186.
 20. Peymani A, Naserpour Farivar T, Sanikhani R, Javadi A, Najafipour R. Emergence of TEM, SHV, and CTX-M-Extended Spectrum beta-Lactamases and Class 1 Integron Among *Enterobacter cloacae* Isolates Collected from Hospitals of Tehran and Qazvin, Iran. *Microb Drug Resist* 2014; **20**(5): 424-430. doi: 10.1089/mdr.2013.0191
 21. Tasli H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2005; **58**(3): 162-167. doi: 10.5336/medsci.2009-15118
 22. Yazd M, Nazemi A, Mir inargasi M, Khataminejad MR, Sharifi S, Babai kochkaksaraei M. Prevalence of SHV/CTX-M/TEM (ESBL) Beta-lactamase Resistance Genes in *Escherichia Coli* Isolated from Urinary Tract Infections in Tehran, Iran. *Medical Laboratory Journal* 2010; **4**(1): 48-54.
 23. Machado E, Ferreira J, Novais A, Peixe L, Canton R, Baquero F, et al. Preservation of integron types among *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**(6): 2201-2204. doi: 10.1128/AAC.01389-06
 24. Radstrom P, Skold O, Swedberg G, Flensburg J, Roy PH, Sundstrom L. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J Bacteriol* 1994; **176**(11): 3257-3268.
 25. Derakhshan S, Najar Peerayeh S, Fallah F, Bakhshi B, Rahbar M, Ashrafi A. Detection of Class 1, 2, and 3 Integrons Among *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Children in Tehran Hospitals. *Arch Pediatr Infect Dis* 2013; **1**(4): 164-168. doi: 10.5812/pedinfect.11845
 26. Ahangarzadeh Rezaee M, Langarizadeh N, Aghazadeh M. First report of class 1 and class 2 integrons in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from northwest Iran. *Jpn J Infect Dis* 2012; **65**(3): 256-259. doi: 10.7883/yoken.65.256
 27. Machado E, Canton R, Baquero F, Galan JC, Rollan A, Peixe L, et al. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**(5): 1823-1829. doi: 10.1128/AAC.49.5.1823-1829.2005
 28. Hanson ND, Thomson KS, Moland ES, Sanders CC, Berthold G, Penn RG. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1999; **44**(3): 377-380. doi: 10.1093/jac/44.3.377