



Scan online to view this article

identifying antibiotic resistance genes in clinical isolates  
of *Klebsiella pneumoniae* producing *IMP-1* and *TEM*  $\beta$ -lactamase  
Leila Goodarzi<sup>1</sup>, Reza Yari<sup>1</sup>, Mohsen Mirzaei<sup>2\*</sup>

1-Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran.

2- Department of Laboratory Sciences, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran.

## Abstract

**Aim and Background:** *Klebsiella pneumoniae* is a common cause of  $\beta$ -lactamase-associated infections in hospitals. The present study aimed to determine the frequency of antibiotic resistance genes in *Klebsiella pneumoniae* strains producing *IMP-1* and *TEM*  $\beta$ -lactamase.

**Materials and methods:** The present research identified 94 samples of *K. pneumoniae*, using antibiogram for the phenotypic confirmation of ESBLs. The antibiotic resistance of the isolates and the prevalence of *TEM* and *IMP-1* genes were determined using PCR method.

**Findings:** Of 94 samples, 77.6% were ESBL-positive and 22.3% ESBL-negative. A total of 4.1% of the samples carried the *IMP-1* gene and 43.8% the *TEM* gene, while 43.8% of the samples carried both genes.

**Conclusion:** Given that *TEM* and *IMP-1* genes were commonly present in a large number of the resistant samples, physicians are recommended to use therapeutic measures properly, and to prescribe antibiotics rationally.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, Extended-Spectrum Betalactamase (ESBL), *TEM*, *IMP-1*, Antibiotic Resistance.

Corresponding author:

Department of Laboratory Sciences, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran.

Email: mirzaei.iaub@gmail.com



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

## شناسایی ژن های مولد مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های بالینی کلبسیلا پنومونیه تولید کننده بتالاکتاماز *IMP-1* و *TEM*

لیلا گودرزی<sup>۱</sup>، رضا یاری<sup>۱</sup>، محسن میرزایی<sup>۲\*</sup>

۱- گروه زیست شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران  
۲- گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** کلبسیلا پنومونیه از عوامل شایع عفونت های ناشی از آنتی بیوتیک های بتالاکتامازی در بیمارستان ها است. هدف از این مطالعه تعیین میزان فراوانی ژن های مولد مقاومت آنتی بیوتیکی *IMP-1* و *TEM* در سویه های کلبسیلا پنومونیه است.

**مواد و روش ها:** ۹۴ نمونه کلبسیلا پنومونیه جهت تأیید فنوتیپی ESBLs مورد استفاده قرار گرفتند. میزان مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها مشخص و میزان شیوع ژن های *IMP-1* و *TEM* با روش واکنش PCR تعیین شدند.

**یافته ها:** ۷۷/۶٪ جدایه ها دارای فنوتیپ ESBL و ۲۲/۳٪ نمونه ها فاقد فنوتیپ ESBL بودند. نتایج نشان داد که ۴/۱٪ نمونه ها دارای ژن *IMP-1* و ۴۳/۸٪ نمونه ها دارای ژن *TEM* هستند. ۴۳/۸٪ نمونه ها نیز به طور مشترک واجد هر دو ژن *IMP-1* و *TEM* بودند.

**نتیجه گیری:** با توجه به این که ژن های *IMP-1* و *TEM* به طور مشترک در تعداد زیادی از نمونه های مقاوم وجود داشتند، استفاده از راه کارهای درمانی مناسب، تجویز درست و منطقی آنتی بیوتیک ها توسط پزشکان در این زمینه پیشنهاد می گردد.

**واژه های کلیدی:** کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، *IMP-1*، *TEM*، مقاومت آنتی بیوتیکی.

### مقدمه

کلونیزه می گردد و در افرادی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند مانند افراد دیابتی و یا بیماران با نقص ایمنی اکتسابی و افراد مسن و کودکان، بیش تر مشاهده می گردد (۱۲). مطالعه ها نشان می دهد که بیش ترین مقاومت دارویی در بین باکتری های گرم منفی مانند *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli*)، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزای (*Pseudomonas aeruginosa*) ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی، عفونت های مجاری ادراری و باکتری می دیده می شود که می توان علت عمده آن را تولید آنتی بیوتیک های بتالاکتاماز توسط این باکتری ها دانست (۲۸). بتالاکتامازهای طیف گسترده، با انتشار مقاومت های آنتی بیوتیکی در سراسر دنیا، یکی از مشکلات موجود در درمان بیماری های عفونی مختلف محسوب می شوند. این آنتی بیوتیک ها در گروه A بتالاکتامازها قرار دارند و به دلیل انتقال توسط

کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*) باکتری گرم منفی و عامل پنومونی، سپسیس، عفونت های دستگاه ادراری و یکی از مهم ترین عوامل شناسایی شده در ایجاد عفونت های بیمارستانی است (۱۶). عفونت های بیمارستانی یکی از مشکلات مطرح پزشکی در کشورهای توسعه یافته و نیز در حال توسعه است که موجب اشاعه بیماری های عفونی در جامعه می گردد (۴). از نظر بالینی، سویه کلبسیلا پنومونیه به طور وسیعی در بیمارستان ها،

### نویسنده مسئول:

گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران  
پست الکترونیکی: mirzaei.iaub@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۳

فروندی (*Citrobacter freundii*)، آلکالیجنز گزیلواکسیداناس (*Alcaligenes xylosoxidans*) و سویه-های اسینتوباکتر (*Acinetobacter*) اشاره کرد (۱۸). انتروباکتریاسه‌های تولید کننده *IMP* به‌طور عمده در آسیا-اقیانوس آرام یعنی چین، ژاپن، تایوان و استرالیا شناسایی شده‌اند (۳،۲۳). سویه‌های دارای ژن‌های *IMP-1* به‌دلیل توانایی بالا در هم یوغی و انتقال از طریق اینتگرون-ها به‌راحتی نسبت به کارباپنم و پنی‌سیلین‌ها مقاوم می‌شوند. این ژن جز متالوبتالاکتامازهای کلاس B است که توانایی هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها را دارد. قدرت انتقال ژن به باکتری‌ها و کلونیزه شدن طولانی مدت در بیمارستان‌ها خطر جدیدی در مراکز درمانی محسوب می‌شود (۲).

بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی آگاهی کاملی از اهمیت و نحوه شناسایی ESBL ندارند. آزمایشگاه‌ها فاقد منابعی برای مهار شیوع مکانیسم‌های مقاومت هستند. این فقدان اطلاعات علتی برای شکست در جلوگیری از شیوع جهانی پاتوژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف است (۱۹). بهترین روش برای شناسایی بتالاکتامازهای وسیع-الطیف، غربالگری برای حساسیت کاهش یافته نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پیشنهادی CLSI<sup>۴</sup> و سپس انجام آزمون تأییدی به‌منظور اثبات اثر سینرژیسیم بین یک آنتی‌بیوتیک سفالوسپورینی و یک مهار کننده بتالاکتامازی است (۶). با توجه به این که میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت است هدف اصلی این تحقیق، شناسایی بتالاکتامازهای با طیف گسترده *IMP-1* و *TEM* که از مهم‌ترین و شایع‌ترین بتالاکتامازها در جدایه‌های کلبسیلاپنومونیه هستند و از سراسر جهان گزارش شده‌اند است، تعیین فراوانی این ژن‌ها که ایجاد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های کلبسیلاپنومونیه هستند از نظر اپیدمیولوژیکی حائز اهمیت است.

## روش کار

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی از ۹۴ جدایه کلبسیلاپنومونیه که از آبان ۱۳۹۴ تا مهرماه ۱۳۹۵ از بیمارستان‌های امام خمینی (ره) و شهید چمران شهرستان

پلاسمیدها، توانایی انتقال هم‌زمان ژن‌های مقاومت در برابر سایر آنتی‌بیوتیک‌ها را دارند و به‌دنبال آن، محدودیت در انتخاب آنتی‌بیوتیک را موجب می‌شوند.

رایج‌ترین بتالاکتاماز موجود در بین خانواده انتروباکتریاسه، ژن *TEM*<sup>۱</sup> است اما *CTX-M*<sup>۲</sup> دارای توانایی گسترده‌تری بر روی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است (۳۵،۲۱). ژن *TEM* با تولید سیدروفور در بیماری‌زایی نقش دارد (۳۴).

درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌های مولد این آنزیم‌ها مشکل است چون از یک سو مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین‌ها مشاهده می‌شود و از سوی دیگر بسیاری از ژن‌های ESBLs<sup>۳</sup> بر روی پلاسمیدهای بزرگی (بیش از ۱۰۰ کیلوباز قرار دارد که هم‌زمان حامل ژن‌های مقاومت به سایر عوامل ضد میکروبی مانند: آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، سولفونامید و تتراسایکلین است. این عفونت‌ها دارای رابطه معنی‌داری با میزان مرگ‌ومیر بیماران است و هزینه درمانی بالایی دارد (۲۹). این پلاسمیدهای کونزوگاتیو به‌راحتی می‌توانند از یک سویه به سویه دیگر و یا حتی به گونه‌های دیگری منتقل شوند. در مواردی نیز ژن‌های فوق در ترانسپوزون‌ها و یا اینتگرون‌ها جای می‌گیرند (۲۵). متالوبتالاکتامازها جز کلاس B طبقه‌بندی امیر هستند که شامل ژن‌های *KHM*، *NDM*، *VIM*، *AIM*، *SIM*، *GIM*، *SPM* و *IMP* می‌شوند. متالوبتالاکتامازهای نوع *IMP*، *GIM*، *VIM* و *SPM* در کلبسیلاپنومونیه شناسایی شده‌اند (۲). آنزیم *IMP* جزء زیر کلاس B<sub>1</sub> است که دارای یک فلز روی در جایگاه فعال آنزیم به‌همراه سه هیستیدین و یک سیستئین است. *IMP* پلاسمیدی در سال ۱۹۸۸ از سویه GN<sub>17203</sub> سودوموناس *اُتروجینوزوا* در ژاپن گزارش شد (۳۳). این آنزیم پروتئینی با ۲۴۶ اسید آمینه و وزن مولکولی ۳۰ kDa است که بر روی پلاسمید بزرگی (۱۲۰Kb) در داخل اینتگرون کلاس III قرار دارد. از جمله باکتری‌های گرم منفی مولد *IMP-1* می‌توان به *اشریشیاکلی*، کلبسیلاپنومونیه، سیتروباکتر

<sup>1</sup> Temoneria

<sup>2</sup> Cefotaxime

<sup>3</sup> Extended spectrum  $\beta$ -lactamase

<sup>4</sup> Clinical and Laboratory Standards Institute

بروجرد بر اساس فرمول کوکران جمع‌آوری شدند و در پلیت‌های میکروبی به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه آزاد بروجرد منتقل شدند، استفاده گردید. این جدایه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه تحقیقاتی واحد بروجرد با انجام تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل تخمیر قندها در محیط TSI، حرکت در محیط SIM، واکنش در محیط MR/ VP و رشد در محیط سیمون سترات و اوره آگار جداسازی شدند. جدایه‌های تأیید شده تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در محیط کشت TSB حاوی ۱۵ درصد گلیسرول و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۴).

### آزمون آنتی‌بیوگرام جهت تشخیص ایزوله‌های مولد ESBL

به‌منظور شناسایی باکتری‌های تولید کننده ESBLs در ابتدا آزمون غربالگری طبق دستورالعمل CLSI با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفتریاکسون و سفنازیدیم انجام گردید. از سری دیسک‌های سفنازیدیم ۳۰ μg و سفنازیدیم کلاولانیک اسید ۳۰/۱۰ μg، سفتریاکسون ۳۰ μg، سفتریاکسون- کلاولانیک اسید ۳۰/۱۰ μg (شرکت بایو آنالایز ترکیه) و روش انتشار در دیسک استفاده شد. دیسک‌ها در فاصله ۲۰ میلی‌متری از هم در محیط مولر هینتون آگار (مرک) قرار گرفتند. سپس پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک به‌تنهایی و در ترکیب با کلاولانیک اسید سنجیده شد. افزایش ≤ ۵ mm قطر هاله دیسک‌های ترکیبی با کلاولانیک اسید نسبت به دیسک‌های فاقد کلاولانیک اسید نشان دهنده این بود که باکتری مولد ESBLs است (شکل ۱).

### شناسایی ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف

واکنش PCR برای شناسایی ژن‌های *TEM* و *IMP-1* در ۹۴ جدایه کلبسیلاپنومونیه انجام شد. DNA الگو با استفاده از روش جوشاندن (Boiling) جداسازی شد. جهت انجام واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، از مخلوط ۱۲/۵ میکرولیتر ماستر میکس (شرکت سیناکلون - ایران)، ۳ میکرولیتر dNTPs و ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Master cycler® gradient) انجام گرفت. از باکتری

کلبسیلاپنومونیه ۷۰۰۶۰۳ ATCC و اشریشیاکلی ۲۵۹۲۲ ATCC برای ژن *TEM* و از سویه سودوموناس آئروژینوزا/ با شماره ۷۸۰۱۶۵ KP برای ژن *IMP-1* به- عنوان سویه‌های کنترل به‌منظور کنترل صحت و دقت آزمایش استفاده گردید. فهرست پرایمرهای مورد استفاده و شرایط PCR برای هر یک از ژن‌های مورد بررسی در جدول ۱ ذکر شده است. در برنامه PCR از دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه، دمای اتصال ژن *tem* ۵۲ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه و دمای اتصال ژن *imp-1* ۵۱ درجه به‌مدت یک دقیقه، پلی-مریزاسیون در چرخه ۷۲ درجه به‌مدت یک دقیقه، پلی-مریزاسیون نهایی ۷۲ درجه به‌مدت ۵ دقیقه استفاده شد. تعداد چرخه PCR ژن *tem* ۳۵ و ژن *imp-1* ۳۰ چرخه در نظر گرفته شد.

جدول ۱. ترادف پرایمرهای مورد استفاده و برنامه PCR به‌منظور

شناسایی ژن‌های *IMP-1* و *TEM*

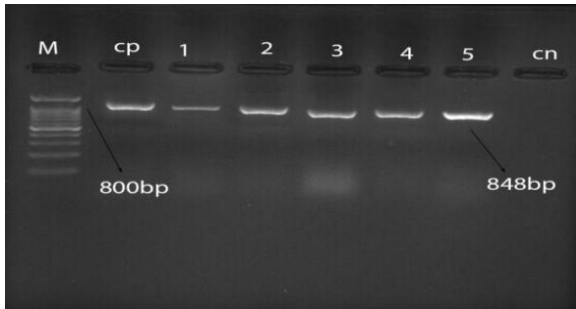
ژن	توالی نوکلئوتیدی پرایمرها (۵'-۳')	طول (بافت باز) (بافت باز)	دما (°C)
<i>TEM</i>	F-GAGTATTCAACATTTCCTGTC	۸۴۸	(۲۰)
	R-TAATCAGTGAGGCACCTATCTC		
<i>IMP-1</i>	F-ACAACCAFTTTTGCCTTACC	۵۸۷	(۹)
	R-ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC		

### آنالیز آماری

تجزیه تحلیل داده‌ها و نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۰) و Excel و آزمون آماری t تک نمونه‌ای انجام گرفت.  $P\text{-value} < 0.05$  از نظر آماری با اهمیت و معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

نتایج الگوی آنتی‌بیوگرام: نتایج حاصل از بررسی حساسیت ضد میکروبی نشان داد که از بین ۹۴ جدایه کلبسیلاپنومونیه مورد بررسی ۶۰ جدایه (۶۳/۸٪) به سفنازیدیم، ۲ جدایه (۲/۱٪) به سفتریاکسون مقاوم بودند. ۷۳ جدایه (۷۷/۶٪) فنوتیپ ESBL را نشان دادند و ۲۱ جدایه (۲۲/۳٪) نمونه‌ها غیر ESBL بودند.

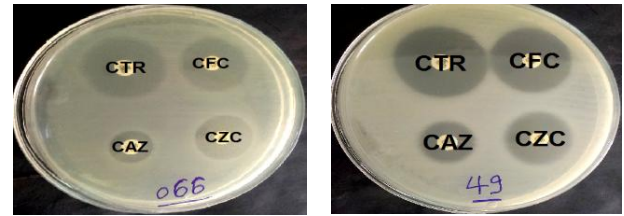


شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ محصول PCR ژن *TEM* ستون M ۱۰۰bp DNA ladder، CP کنترل مثبت، CN کنترل منفی، ستون های ۱-۵ باند اختصاصی ۸۴۸ bp ژن *TEM*

۳۲ جدایه (۴۳/۸٪) واجد هر دو ژن *IMP-1* و *TEM* بوده و تعداد ۹ جدایه (۹/۵٪) به طور همزمان فاقد هر دو ژن *IMP-1* و *TEM* بودند که این نشان می دهد احتمال بروز هر دو ژن در بیش تر جدایه های واجد یک ژن از ژن های *IMP-1* و *TEM* بیش تر از عدم حضور این دو ژن در کل جدایه ها است. بر اساس نتایج آزمون t تک نمونه ای ارتباط معنی داری بین دو گروه نمونه های ESBLs و غیر ESBLs از نظر آماری در سطح معنی داری ۰/۰۵ یافت شد. نتایج آزمون t تک نمونه ای با در نظر گرفتن سطح معنی داری ۰/۰۱ نشان داد که نمونه های ESBLs به طور معنی داری بیش تر از نمونه های فاقد ESBLs هستند. هم چنین ارتباط معنی داری بین حضور دو ژن *IMP-1* و *TEM* و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفتریاکسون، سفنازیدیم وجود دارد.

## بحث

کلبدیلاپنومونیه از نظر کلینیکی نقش مهمی در ایجاد عفونت بیمارستانی و عفونت مجاری ادراری ایفا می کند. متاسفانه مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها در دهه های اخیر موجب افزایش ظهور سویه های مقاوم با مقاومت چند گانه دارویی در باکتری های روده ای گرم منفی از جمله کلبدیلاپنومونیه شده است به طوری که این باکتری ها با تولید آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف یا (ESBLs) نسبت به آنتی بیوتیک هایی نظیر سفالوسپورین، پنی سیلین، سیپروفلوکساسین و سفوتاکسیم مقاومت نشان می دهند. وجود ژن کد کننده 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 (۲۶،۳۰). بر اساس نتایج حاصل از آزمون دیسک ترکیبی از ۹۴ جدایه کلبدیلاپنومونیه مورد بررسی ۷۳



شکل ۱- نمونه آنتی بیوگرام جدایه های کلبدیلاپنومونیه CTR سفتریاکسون، CFC سفتریاکسون+کلولانیک اسید، CAZ سفنازیدیم، CZC سفنازیدیم+کلولانیک اسید

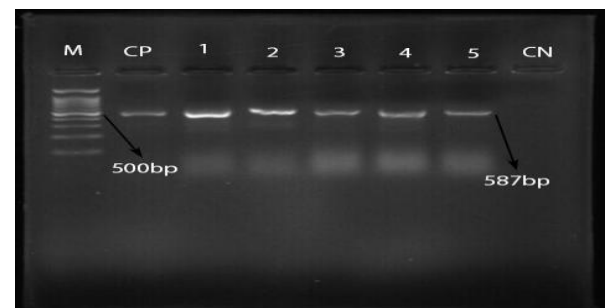
## نتایج PCR

از بین ۹۴ جدایه کلبدیلاپنومونیه مورد بررسی ۴۹ جدایه (۵۲/۱٪) مربوط به زنان و ۴۵ جدایه (۴۷/۸٪) مربوط به مردان بود. هم چنین فراوانی این جدایه ها در بخش های مختلف بیمارستانی به این شرح بود: ۳۴ جدایه (۳۶/۱٪) از ICU، ۱۱ جدایه (۱۱/۷٪) از اورژانس، ۳۴ جدایه (۳۶/۱٪) از بخش داخلی، ۱۵ جدایه (۱۵/۹٪) از بخش اطفال بودند. پس از انجام PCR و ژل الکتروفورز مربوط به امپلیکون ژن های *IMP-1* شکل ۲ و *TEM* شکل ۳ نتایج ارائه شده در جدول ۲ مشخص گردید.

جدول ۲: فراوانی ژن های مورد بررسی

شیوع ژن <i>TEM</i>			شیوع ژن <i>IMP-1</i>		
وضعیت حضور ژن	فراوانی	درصد	وضعیت حضور ژن	فراوانی	درصد
مثبت	۶۴	۸۷/۶	مثبت	۳۵	۴۷/۹
منفی	۹	۱۲/۳	منفی	۳۸	۵۲
جمع کل	۷۳	۱۰۰	جمع کل	۷۳	۱۰۰

از ۷۳ جدایه ESBLs، ۳۵ جدایه (۴۷/۹٪) *IMP-1* مثبت و ۶۴ جدایه (۸۷/۶٪) *TEM* مثبت بودند.



شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ محصول PCR ژن *IMP-1*

ستون M ۱۰۰bp DNA ladder، CP کنترل مثبت، CN کنترل منفی، ستون های ۱-۵ باند اختصاصی ۵۸۷ bp ژن *IMP-1*



جدایه (۰/۷۷/۶) به عنوان مولد ESBL شناسایی شدند که در مقایسه با مطالعه Mirsalehan و همکاران، ۰/۷۶ سویه های کلبسیلاپنومونیه دارای آنزیم ESBLs بودند که همخوانی مناسبی با مطالعه حاضر دارد و نشان دهنده پتانسیل بالای بیماری زایی و بقای این سویه ها در بخش های مختلف بیمارستانی است (۲۲). هم چنین در مطالعه ای که توسط Pornour و همکاران انجام شد از ۴۷ جدایه کلبسیلاپنومونیه ۹۷/۸٪ مولد ESBLs بودند (۲۷) و مطالعه دیگری که در سال ۱۳۸۹ در تهران بر روی ۱۰۴ نمونه کلبسیلاپنومونیه توسط Feizabadi و همکاران مورد بررسی قرار گرفت ۰/۷۲/۱٪ از این نمونه ها تولید کننده ESBLs بودند که همگی نشان دهنده درصد بالای ESBLs در ایران است (۱۲).

مطالعه های مشابه زیادی در ایران و سایر نقاط جهان در زمینه کلبسیلاپنومونیه تولید کننده ESBLs صورت گرفته که تأیید کننده اطلاعات به دست آمده از این مطالعه است که می توان به مطالعه ای در سال ۲۰۰۹ که توسط Ehlers و همکاران انجام شد اشاره کرد که ۵۸/۴٪ سویه های کلبسیلا فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع الطیف را نشان دادند (۱۱). هم چنین میزان شناسایی فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع-الطیف در سویه های کلبسیلا در سال ۲۰۰۸ توسط Leung Ho و همکاران، ۵۰٪ گزارش گردید (۱۴). این میزان شیوع بالای ژن های ESBLs توجیه کننده مقاومت بالا به آنتی بیوتیک های بتالاکتام و سفالوسپورین های نسل سوم است که متأسفانه تولید میزان بالای ESBLs نشان دهنده این موضوع است که سویه های کلبسیلاپنومونیه تولید کننده آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف در چند دهه اخیر رو به افزایش بوده اند (۱۲). با توجه به این گزارش ها به نظر می رسد که میزان شیوع سویه های تولید کننده ESBLs در سویه های کلبسیلاپنومونیه شهرستان بروجرد در سطح جهانی بوده و از بعضی نقاط ایران مانند اصفهان (۱۵)، کرمانشاه (۳۲)، تبریز (۲۲)، شهرکرد (۳۱) بیش تر است که گمان می رود به دلیل مصرف زیاد آنتی بیوتیک ها توسط بیماران و عدم انجام تست های اختصاصی تحت نظر پزشک است. در این مطالعه تعداد ۷۳ جدایه (۰/۷۷/۶) تولید کننده ESBLs بودند که از این تعداد ۴۹ جدایه (۰/۵۲/۱) افراد مؤنث و تعداد ۴۵ جدایه (۰/۴۷/۸) از افراد مذکر جدا شده بودند. Khorshidi در ۱۳۸۸ نشان داد که ۰/۳۲٪ سوش های

کلبسیلاپنومونیه تولید کننده ESBLs هستند و از میان آن ها ۰/۵۲/۵٪ بیماران مذکر و ۰/۴۷/۵٪ مؤنث بودند که نشان دهنده آن است که در طی این چند سال میزان سویه های کلبسیلاپنومونیه تولید کننده ESBLs از لحاظ جنسیت تفاوت چندانی نکرده است (۱۷). در ادامه مشخص شد که ۰/۳۶/۱٪ جدایه های تولید کننده ESBLs به طور مشابه از بخش های ICU و داخلی جمع آوری شدند، که به نظر می رسد بستری طولانی مدت بیماران و وخیم بودن بیماری، به کارگیری ابزارهای تهجمی و مواجهه طولانی با داروهای عمده مصرفی در این بخش از جمله عوامل تأثیرگذار در حضور قابل توجه این ارگانسیم های مقاوم هستند (۲۲). هم چنین در این مطالعه در ۹ جدایه که پس از انجام آزمون تأییدی ESBLs مثبت بودند، دو ژن مورد اشاره شناسایی نشدند که به نظر می رسد ژن های دیگری در تولید ESBLs نقش دارند.

در مطالعه حاضر فراوانی دو ژن *TEM* و *IMP-1* با استفاده از آزمون PCR در جدایه های تولید کننده ESBLs به ترتیب ۰/۸۷/۶٪ و ۰/۴۷/۹٪ گزارش گردید. در مطالعه های انجام شده در سال های گذشته فراوانی ژن *TEM* در کلبسیلا با توجه به جامعه آماری زیاد بوده به طوری که در مطالعه Pornour و همکاران در سال ۱۳۸۹ در شهر تبریز و در مطالعه Zamanzad در سال ۱۳۸۷ میزان شیوع *TEM* به ترتیب ۰/۷۴/۴٪ (۲۷) و ۰/۵۸/۳٪ (۳۶) گزارش گردید. هم چنین در مطالعه Ehlers و همکاران در سال ۲۰۰۹ و در مطالعه Bali و همکاران در سال ۲۰۱۰ فراوانی ژن *TEM* به ترتیب ۲۴٪ و ۷۴/۴ درصد گزارش گردید (۵، ۱۱). در مطالعه Akpaka و همکاران از ۶۵ ایزوله کلبسیلا بررسی شده با روش Multiplex PCR ۰/۸۴/۳٪ حاوی ژن *TEM* بودند (۱). این اختلاف شیوع می تواند به دلیل تفاوت در بیماری زایی این باکتری در مناطق مختلف باشد.

در مطالعه حاضر فراوانی ژن *IMP-1* ۰/۴۷/۹٪ گزارش شد که در مقایسه با پژوهشی که توسط azizi و همکاران در سال ۱۳۹۶ بر روی ۱۰۰ سویه ایزوله های سودوموناس *آئروژینوزوای* جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان شهید بهشتی شهرستان قم انجام شد بیش ترین فراوانی ژنی متعلق به ژن *IMP-1* به میزان ۲۵ درصد و کم ترین

برای کنترل و پیش‌گیری از عفونت‌های ناشی از ارگانسیم‌های تولیدکننده ESBLs به‌کار گرفته شوند.

## تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافی در تحقیق حاضر وجود ندارد.

## سپاسگزاری

نویسندگان از کارشناسان آزمایشگاه تحقیقاتی بیولوژی سلولی مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد کمال تشکر و قدردانی را دارند. پژوهش انجام شده حاصل داده‌های پایان‌نامه خانم لیلا گودرزی با کد مصوب ۱۱۲۳۰۵۱۳۹۶۱۰۰۳ است.

فراوانی مربوط به ژن *VIM-1* به میزان ۱۲/۵ درصد مشاهده شد (۱۳).

مطالعه‌های مشابه انجام شده سایر نقاط جهان مانند یونان، آلمان، آمریکا، و برزیل نتایج متفاوتی را گزارش می‌دهند. ژن *IMP-1* در هیچ‌کدام از جدایه‌های کلبسیلاپنومونیه مورد بررسی مشاهده نگردید (۷،۸،۱۰). نتایج این بررسی‌ها برای ژن *IMP-1* در مقایسه با مطالعه حاضر نشان دهنده شیوع بالای انتشار این ژن در میان جدایه‌های کلبسیلاپنومونیه در منطقه مورد بررسی است علاوه بر این ذکر این نکته ضروری است که فراوانی ژن‌های *IMP-1* در قاره آسیا به‌صورت اندمیک بیش‌تر در کشورهای آسیای شرقی و هندوستان گزارش شده است (۲۳). این تنوع در شیوع می‌تواند در هر منطقه‌ای بنا بر شرایط محیطی و مواد غذایی که برای کلبسیلاپنومونیه حیاتی است در بیان ژن‌های مقاومتی مرتبط با بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و متالوبتالاکتامازها متفاوت عمل کند اما حضور هم‌زمان این دو بتالاکتاماز می‌تواند خطرات زیادی را در بین بیماران بستری داشته باشد که بدون اطلاع از حضور هم‌زمان این دو ژن برای آن‌ها اقدام به تجویز آنتی‌بیوتیک می‌شود.

## نتیجه‌گیری

شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تولید ESBLs در منطقه مورد مطالعه، نشان‌دهنده نیاز به غربالگری نمونه‌های کلینیکی از نظر ESBLs توسط آزمایشگاه و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب با قدرت ممانعت‌کنندگی بتالاکتامازی و آنتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت ترکیب با کلانولانیک توسط پزشکان است. طی سال‌های اخیر با افزایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها مواجه بودیم که منجر به افزایش مشکلات درمانی و هزینه‌های درمانی می‌شود. استریلیزاسیون صحیح محیط بیمارستانی، رعایت بهداشت توسط پرسنل بهداشتی - درمانی، الگوی صحیح برای مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، عدم خوددرمانی و یا درمان‌های ناقص با آنتی‌بیوتیک‌ها، محدود نمودن استفاده از سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف و آگاهی پزشکان در ارتباط با میزان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی از جمله راه‌کارهایی هستند که می‌توانند

1. Akpaka PE, Legall B, Padman J. Molecular detection and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes prevalent in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from Trinidad and Tobago. West Indian Med J. 2010. 59(6):591-6.
2. Alamri AM. Factors affecting gene expression following horizontal gene transfer studied using the blaIMP-1 gene cassette as a model system: University of Bristol. 2012.
3. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, group ESoC-PEEW et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. Euro Surveill 20. 2015. 20(45):1-18.
4. Arvanitidou M, Katikaridou E, Douboyas J, Tsakris A. Prognostic factors for nosocomial bacteraemia outcome: a prospective study in a Greek teaching hospital. J Hosp Infect. 2005; 61:219-224.
5. Bali EB, Acik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended spectrum-lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. Afr J Microbiol Res. 2010; 4(8):650-4.
6. Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. Lancet. 1987. 2(8554):302-6.
7. Cabral AB, Melo RDCDA, Maciel MAV, Lopes ACS. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2012; 45(5):572-78.
8. Carvalhaes CG, Picao RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: Be aware of false positive results. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(2): 249-51.
9. Compain F, Babosan A, Brisse S, Genel N, Audo J, Ailloud F, et al. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2014. 52(12):4377-80.
10. Correa L, Martino MDV, Siqueira I, Pasternak J, Gales AC, Silva CV, et al. A hospital-based matched case-control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. BMC Infect Dis. 2013; 13(1):1-8.
11. Ehlers MM, Veldsman C, Makgotlho EP, Dove MG, Hoosen AA, Kock MM. Detection of bla<sub>SHV</sub>, bla<sub>TEM</sub> and bla<sub>CTX-M</sub> antibiotic resistance genes in randomly selected bacterial pathogens from the Steve Biko Academic hospital. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009. 5(3):191-96.
12. Feizabadi MM, Mohammadi-Yeganeh S, Mirsalehian A, Azimi P, Mirafshar S-M, Mahboobi M, et al. Genetic characterization of ESBL-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* from Tehran hospitals. J Infect Dev Ctries. 2010. 4(10):609-15.
13. Ghasem azizi A, Jamshidi L, Mirzaee M. The study phenotype and genotype bla (IMP) and bla(VIM) metallo- $\beta$ -lactamases genes and pattern antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical samples Beheshti hospital in the city of Qom. Yafte. 2018; 20(1):32-40.



14. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Yip K, Wong SS, Que TL. CTX-M type beta lactamases among fecal *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008. 41(5):428-32.
15. Jazi Masjedian F, Valle F, Talebi A, Rstgarlary A. Molecular evaluation of resistance to broad spectrum antibiotics in *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iranian J Med Microbiol.* 2007; 1(2):24-27.
16. Kargar M, Baghernejad M, Ghorbani-Dalini S, Hashemizadeh Z. Evaluation of molecular mechanisms resistance to macrolide by *S. pneumoniae* strains isolated from Nemazee and Shahid Faghihi Hospitals in Shiraz. *Scientific J Kurdistan Uni Medical Scientific.* 2012. 16(4):83-91.
17. Khorshidi A, Moazen Z, Rohani M, Moniri R, Shajari Gh, Mousavi Gh. Prevalence of TEM1 and SHV1 genes in  $\beta$ -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Military Med.* 2009. 11(3):149-53.
18. Koh TH, Babini GS, Woodford N, Sng LH, Hall MLC, Livermore DM. Carbapenem hydrolyzing IMP-1 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Singapore. *Lancet.* 1999. 353(9170): 2162.
19. Lashgari NV, Yousefi J, Siadat SD, Shahcheraghi F, Khosravi M, Vakili H, Moshiri A, Zanganeh M, Bahremnd AR. Identification of bla-CTX-M  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates by polymerase chain reaction. *Med Sci J.* 2014. 24(3):148-152.
20. Lin J-C, Koh TH, Lee N, Fung C-P, Chang F-Y, Tsai Y-K, et al. Genotypes and virulence in serotype K2 *Klebsiella pneumoniae* from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan. *Gut pathogens.* 2014;6(1):1.
21. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007. 59(2):165-74.
22. Mirsalehan A, Akbari-Nakhjavani F, Peymani A, Kazemi B, Jabal Ameli F, Mirafshar S.M. Prevalence of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing Enterobacteriaceae by Phenotypic and Genotypic Methods in Intensive Care Units in Tehran, Iran. *Daru.* 2008. 16(3):169-73.
23. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011. 17(10):1791-98.
24. P. Bailey & Scott's. diagnostic microbiology. 13rd ed. Elsevier Health Sciences; 2013.
25. Padmini S, Raju B. Evaluation of CIVA agar for rapid detection of extended spectrum beta lactamases (ESBL) among isolates of Enterobacteriaceae. *Indian J Med Res.* 2008 Feb. 127:195-197.
26. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med.* 2010. 362(19):1804-1813.
27. Pornour M, Reza NM, Mobayen H, Mobasher A. Molecular study of TEM type Extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Med Tabriz Uni Med Sci.* 2010. 23(2):30-34.
28. Silvestri L, Van Seane H. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med.* 2010. 363(15):1482-1486.
29. Sturenburg E, Mack D. Extended spectrum beta lactamases: implication for the clinical microbiology, therapy and infection control. *J Infect.* 2003 Nov. 47:273-95.

30. 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.
31. Torshizi R, Zaman Zad B, Mokhtarian K, Karimi A. Study frequency of prevalence of CTXM genes in ESBL-producing intestinal bacteria by PCR. J Shahrekord Univ Med Sci. 2011. 13(3): 9-17.
32. Vaziri S, Mansouri F, Abiri R, Alvandi A, Mortazavi SH, Ahmadi K, et al. Prevalence study of extended spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumonia* isolated from patients with ventilator associated Pneumonia in Kermanshah city, Iran. J Isfahan Med Sch. 2017; 35(444): 1113-9.
33. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-betalactamases: The quiet before the storm? Clin Microbiol Rev. 2005. 18(2):30.
34. Winkelmann G. Microbial siderophore-mediated transport. Biochemical Society Transactions. 2002;30(4):691-6.
35. Yousefi Fatmesari G, Hemmati M, Mortazavi SH, Mansouri F, Azizi M, Etemadimajd M, et al. Frequency of blaCTX-M, blaTEM, and blaSHV Genes in *Escherichia coli* isolated from urine samples of children in Kermanshah City, Iran. J Isfahan Med Sch. 2017. 35(430):551-7.
36. Zamanzad B, Deyham B, Nafisi M, Karimi A, Farokhi E. The Frequency of TEM-1 Gene in extended spectrum  $\beta$ - lactamases producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and Enterobacter strains isolated from hospital clinical samples using PCR. 2008. 14(4): 19-25.