



Scan online to view this article

## Evaluating the antibiotic resistant pattern and detecting the presence of class 1 integron genes among *Klebsiella pneumoniae* isolated from urine samples in Alborz province

Leila Jabalameli\*, Mahyar Rahmatpanah,

Hossein Gomar, Mohammad Shokrgozar Ashkarmeidani, Javad Jamali Pabandi

Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

### Abstract

**Aim and Background:** *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) is one of the important human pathogens among which emergence of antibiotic resistant results in many problems in therapeutic process. Class 1 integron genes may facilitate the conferring of antibiotic resistance among bacterial population. In the present study, isolation of *K. pneumoniae* from urine samples, determining the antibiotic resistant pattern, and evaluating the presence of class 1 integron genes were investigated.

**Materials and Methods:** The obtained isolated bacteria were confirmed via biochemical tests. Evaluating the bacterial resistance against 10 different antibiotics was performed by agar disk diffusion method and antibiotic resistant pattern was also determined. PCR method was used in order to detect the presence of class 1 integron genes among isolates.

**Results:** 80 *K. pneumoniae* were isolated from the urine sample of attendees of clinical laboratories in Karaj. Meropenem and Nitrofurantoin were the most and least effective antibiotics, respectively. 16 isolates were considered as multi drug resistance (MDR) among which resistance to all 10 tested antibiotics was also observed. 29 isolates were also positive in terms of class 1 integron genes.

**Discussion:** Treatment with the following antibiotics; Meropenem, Levofloxacin, Imipenem, and Gentamicin, may be successful, since more than 80% of the isolates were susceptible to them. However, presence of MDR as well as detecting class 1 integron genes may be an alarming for infections caused by *K. pneumoniae*.

**Conclusion:** Knowing about the increase in the antibiotic resistance among *K. pneumoniae* isolates, the presence of MDR isolates, and also detecting the presence of genes involved in dissemination of resistant isolates may help to choose the more effective therapies.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, class 1 integron genes, PCR, . Iau Science

Corresponding author:

Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Email: laji85@yahoo.com



برای مشاهده این مقاله به صورت  
آنلاین اسکن کنید

## بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و حضور ژن های اینتگرون کلاس ۱ در جدایه های کلبسیلا پنومونیه به دست آمده

### از نمونه های ادرار در استان البرز

لیلا جبل عاملی\*، مهیار رحمت پناه، حسین گمار، محمد شکرگزار اشکرمیدانی، جواد جمالی پابندی

گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

#### چکیده

**سابقه و هدف:** کلبسیلا پنومونیه یکی از انواع باکتری های بیماری زای انسانی مهم است که پیدایش مقاومت آنتی بیوتیکی در بین آن ها مشکلات درمانی زیادی را ایجاد کرده است. ژن های اینتگرون کلاس ۱ می توانند ضمن جابه جایی بین باکتری ها، اعطای مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها را در جمعیت تسهیل کنند. در این مطالعه، جداسازی باکتری های کلبسیلا پنومونیه از ادرار، تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و ارزیابی حضور ژن های اینتگرون کلاس ۱ صورت گرفت.

**مواد و روش ها:** جدایه های باکتریایی دریافت و تأیید آن ها با استفاده از تست های بیوشیمیایی تکمیلی صورت گرفت. ارزیابی مقاومت نسبت به ۱۰ آنتی بیوتیک مختلف به روش انتشار دیسک در अगर انجام و الگوی مقاومت نیز اعلام شد. از روش PCR برای تعیین حضور ژن های اینتگرون کلاس ۱ در این جدایه ها استفاده گردید.

**یافته ها:** ۸۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه از ادرار افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه های تشخیص طبی در کرج، به دست آمد که دو آنتی بیوتیک مروپنم و نیتروفورانتوئین به ترتیب دارای بیشترین و کمترین اثر بر روی جدایه ها بودند. ۱۶ جدایه به عنوان باکتری های مقاوم به چند دارو تشخیص داده شدند که برخی از آن ها به هر ۱۰ آنتی بیوتیک مورد ارزیابی مقاومت نشان دادند. ۲۹ جدایه نیز از نظر حضور ژن های اینتگرون کلاس ۱ مثبت بودند.

**بحث:** با توجه به نتایج می توان درمان با آنتی بیوتیک های مروپنم، لووفلوکساسین، ایمپنم و جنتامیسین که دارای درصد حساسیت بیش از ۸۰ هستند را موفقیت آمیز دانست. البته حضور جدایه های مقاوم به چند دارو و هم چنین تأیید وجود ژن های اینتگرون در جدایه های به دست آمده نیز می تواند زنگ خطری برای مقابله با عفونت های ناشی از کلبسیلا پنومونیه باشد.

**نتیجه گیری:** اطلاع از افزایش روز افزون مقاومت در بین جدایه های کلبسیلا پنومونیه ادراری و همین طور حضور موارد مقاوم به چند دارو و تأیید وجود ژن های دخیل در انتشار جدایه های مقاوم می تواند به انتخاب روش های درمانی مؤثرتر کمک کند.

**واژگان کلیدی:** کلبسیلا پنومونیه، مقاومت آنتی بیوتیکی، ژن های اینتگرون کلاس ۱، PCR، Iau Science.

#### مقدمه

*Klebsiella pneumoniae* یک باکتری گرم منفی فرصت طلب است که اگرچه به عنوان فلور طبیعی دهان، پوست و دستگاه گوارش شناخته می شود اما عامل بسیاری از عفونت های بیمارستانی و همین طور اکتسابی است. از جمله بیماری های ایجاد شده توسط این باکتری می توان به پنومونی، آبسه کبدی، مننژیت، عفونت های خونی و عفونت دستگاه ادراری اشاره کرد

#### نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران  
پست الکترونیکی: laji85@yahoo.com  
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۸  
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۸

توجه به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی، اهمیت اینتگرون ها در اعطای مقاومت و مطالعه هایی که نشان دهنده فراوانی بالای اینتگرون های کلاس ۱ و ۲ در جدایه های کلینیکی باکتری های گرم منفی هستند (۱۹، ۱۸)، این مطالعه به بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و هم چنین ارزیابی حضور ژن های اینتگرون کلاس ۱ در جدایه های به دست آمده از نمونه ادرار افراد مراجعه کننده به مراکز تشخیص طبی واقع در استان البرز می پردازد.

## مواد و روش ها

**مواد:** تمامی محیط های کشت و مواد شیمیایی استفاده شده در این تحقیق از شرکت Merck (کشور آلمان) تهیه گردید. دیسک های آنتی بیوتیک از شرکت MAST (کشور انگلستان) تهیه شدند.

### جدایه های باکتریایی به دست آمده از نمونه ادرار افراد مراجعه کننده

در این مطالعه که به صورت مقطعی - توصیفی و در بازه زمانی ۶ ماهه صورت پذیرفت، با رعایت اصول اخلاقی در مجموع ۸۰ جدایه باکتریایی به دست آمده از نمونه ادرار افراد مبتلا به عفونت ادراری از چندین آزمایشگاه تشخیص طبی در استان البرز جمع آوری شدند. با وجود این که آزمایشگاه های مربوطه با انجام تست های بیوشیمیایی، هویت این باکتری ها را به عنوان کلبسیلا پنومونیه اعلام نمودند، به منظور حصول اطمینان از هویت قطعی باکتری ها پس از تحویل، تست های بیوشیمیایی متداول از جمله رنگ آمیزی گرم، رشد بر روی محیط مک کانکی، تست های اکسیداز، SIM، OF، TSI، VP، MR، تجزیه سیترات و اوره نیز صورت گرفت. هم چنین، اطلاعاتی مانند جنسیت و رده سنی افراد مراجعه کننده در این مطالعه جمع آوری شدند.

### تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه های کلبسیلا پنومونیه

به این منظور، از روش انتشار دیسک در آگار (Kirby-Bauer Disk diffusion method) مطابق با دستورالعمل موسسه استاندارد CLSI استفاده شد (۲۰). بدین ترتیب که سوسپانسیون جدایه های باکتریایی با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند (معادل  $1/5 \times 10^8$  باکتری) در محیط کشت مولر هینتون اگر تلقیح شدند و پس از آن سپس دیسک های آنتی بیوتیک در فواصل مشخص روی محیط کشت قرار داده شدند. بعد از گرماگذاری پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و به مدت ۱۸ ساعت، قطر

(۳-۱). عفونت های مجاری ادراری با تحت تأثیر قرار دادن سالانه ۱۵۰ میلیون نفر در دنیا، به عنوان متداول ترین عفونت های باکتریایی شناخته می شوند (۴)، که به طور عمده ناشی از آلودگی با باکتری های اشرشیاکلی (۶۰ تا ۸۰٪) و کلبسیلا پنومونیه (۳ تا ۱۰٪) هستند (۷-۵). فاکتورهای ویروالانس کلبسیلا پنومونیه که منجر به محافظت باکتری در برابر سیستم ایمنی میزبان می شوند، متعدد بوده و شامل پلی ساکاریدهای کپسولی، آدهسین ها و عوامل کسب آهن هستند (۸). افزایش مقاومت کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی بیوتیک ها، یکی از مشکلات درمان بیماری های ناشی از این باکتری است، به طوری که امروزه بروز چشم گیر مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های حائز اهمیت در درمان مثل آمینوگلیکوزیدها در بین این باکتری ها نیز گزارش شده است (۹). عوامل متنوعی در ایجاد و انتشار مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها دخیل هستند که در این بین اکتساب ژن های مسئول ایجاد مقاومت از طریق عناصر ژنتیکی قابل تحرک به عنوان مهم ترین عامل شناخته شده اند (۱۰). از طرف دیگر، پیدایش کلبسیلا پنومونیه های مقاوم به چندین دارو (MDR) نیز مشکلات درمانی ناشی از این باکتری را بیش تر و پیچیده تر کرده است (۱۱). اینتگرون ها یکی از عناصر ژنتیکی قابل تحرک مهم هستند که ضمن استقرار بر روی پلاسمیدها، ترانسپوزون ها و جزایر بیماری زایی می توانند به راحتی بین انواعی از باکتری ها جا به جا شوند (۱۲). بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن اینتگراز، ۵ کلاس از اینتگرون ها شناسایی شده اند (۱۳) که در بین جدایه های کلینیکی کلبسیلا پنومونیه اینتگرون کلاس ۱ فراوان ترین نوع بوده در حالی که کلاس ۲ گاهی اوقات و کلاس ۳ به ندرت در این باکتری ها گزارش شده اند (۱۴). از نظر ساختاری، اینتگرون ها از دو قطعه حفاظت شده به نام -های  $5'-CS$  و  $3'-CS$  تشکیل شده اند که به ترتیب در دو انتهای  $5'$  و  $3'$  توالی قرار داشته و ناحیه متغیر مرکزی یا کاست های ژنی مسئول مقاومت آنتی بیوتیکی را احاطه می کنند (۱۵). در  $5'-CS$  واقع در اینتگرون ها ژن اینتگراز (*IntI*)، محل نوترکیبی (*attI*) و پروموتور مشترک (*Pc*) قرار دارند، در حالی که در ناحیه  $3'-CS$  ژن های *qacEΔ1* و *sulI* که به ترتیب مسئول مقاومت نسبت به مواد شوینده و سولفونامیدها هستند، واقع هستند (۱۶). در کاست های ژنی علاوه بر ژن های مسئول مقاومت، یک محل نوترکیبی به نام *attC* نیز واقع است که وقوع نوترکیبی بین *attI* و *attC* منجر به ورود کاست ژنی در ناحیه فرودست پروموتور توسط *IntI* می گردد (۱۷). با

هاله عدم رشد توسط خط کش اندازه گیری شده و ضمن مقایسه با جدول CLSI، تفسیر نتایج صورت پذیرفت. در این مطالعه از سویه *E.coli* ATCC 25922 به عنوان کنترل استفاده شد و آنتی بیوتیک های مورد ارزیابی نیز شامل: مروپنم، ایمپنم، سفتریاکسون، سفتازیدیم، پیپراسیلین-تازوباکتام، لووفلوکساسین، توبرامایسین، نیتروفرانتوئین، جنتامیسین، کلرامفنیکل بودند.

### ارزیابی وجود ژن های اینتگرون کلاس ۱ در جدایه های کلبسیلا پنومونیه

ابتدا DNA باکتری از طریق روش جوشاندن استخراج شد (۲۱). به این ترتیب که سوسپانسیونی از کشت شبانه جدایه ها در ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلیسیوس قرار گرفتند و پس از سانتریفیوژ مایع رویی به عنوان الگو در واکنش زنجیره ای پلی مرار (PCR) به کار گرفته شد. از

پرایمرهای اختصاصی hep58 با توالی ۳' ۵' TCATGGCTTGTATGACTGT و hep59 با توالی 3' GTAGGGCTTATTATGCACGC برای تکثیر ژن های اینتگرون کلاس ۱ در PCR استفاده شد (۲۲). محتویات مخلوط واکنش و شرایط دمایی انجام آن مطابق با منابع مرتبط بودند (۲۲، ۲۳). در نهایت، محصولات PCR توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده و مورد ارزیابی قرار گرفتند.

### یافته ها

در این مطالعه ۸۰ جدایه باکتریایی به واسطه انجام تست های بیوشیمیایی تأییدی به عنوان کلبسیلا پنومونیه شناسایی شدند که ۳۵ نمونه (٪ ۴۳/۷۵) آن ها از مراجعه کنندگان مرد و مابقی (۴۵ نمونه) از زنان به دست آمد، که محدوده سنی آن ها نیز در جدول ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱. رده سنی افراد مراجعه کننده به مراکز درمانی جهت جداسازی باکتری های کلبسیلا پنومونیه از ادرار

| محدوده سن مراجعه کنندگان (سال) | تعداد جدایه های کلبسیلا پنومونیه به دست آمده |
|--------------------------------|----------------------------------------------|
| ۰-۱۹                           | ۱۸                                           |
| ۲۰-۴۰                          | ۱۷                                           |
| ۴۱-۶۰                          | ۱۸                                           |
| ۶۱-۸۰                          | ۱۹                                           |
| ۸۱-۹۲                          | ۸                                            |

مقاومت چند دارویی آن ها نیز در جدول ۳ نمایش داده شده است. همان طور که در این جدول مشخص است، ۲۵٪ از جدایه های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو در این مطالعه به هر ۱۰ آنتی بیوتیک مورد ارزیابی مقاومت نشان دادند و در میان ۱۰ الگوی مقاومتی حاصل از این مطالعه، مقاومت هم زمان نسبت به دو آنتی بیوتیک سفتازیدیم و سفتریاکسون در ۸ الگو مشاهده شد. از دیگر آنتی بیوتیک های مشاهده شده در اغلب الگوهای مقاومتی می توان به نیتروفرانتوئین و پیپراسیلین/ تازوباکتام که به ترتیب در ۹ و ۸ الگو قرار داشتند، اشاره کرد.

### تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه های کلبسیلا پنومونیه

ارزیابی جدایه های مورد مطالعه از نظر حساسیت و مقامت نسبت به آنتی بیوتیک ها در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج بیانگر آن است که مروپنم به عنوان مؤثرترین آنتی بیوتیک با میزان حساسیت ۹۰٪ است، به طوری که فقط ۷ جدایه نسبت به این آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند. بیشترین مقاومت نیز نسبت به نیتروفرانتوئین دیده شد به طوری که بیش از نیمی از جدایه ها (٪ ۷۵) نسبت به آن مقاوم بودند. سه آنتی بیوتیک ایمپنم، جنتامیسین و کلرامفنیکل نیز تأثیرگذاری به نسبت یکسانی بر روی جدایه ها داشتند (با میزان حساسیت حدودا ٪ ۸۰).

هم چنین بنابر تعریف، جدایه هایی که به سه یا بیش از سه خانواده آنتی بیوتیکی مقاوم بودند (۲۴) نیز به عنوان جدایه های مقاوم به چند دارو یا MDR در نظر گرفته شدند که تعداد آن ها در این مطالعه ۱۶ بود و الگوی

جدول ۲. مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های کلبسیلا پنومونیه

| آنتی بیوتیک ها          | تعداد جدایه های باکتریایی (%) |           |            |
|-------------------------|-------------------------------|-----------|------------|
|                         | مقاوم                         | میان      | حساس       |
| سفتازیدیم               | ۲۱ (۲۶/۲۵)                    | ۲ (۲/۵)   | ۵۷ (۷۱/۲۵) |
| سفتریاکسون              | ۲۱ (۲۶/۲۵)                    | ۱۸ (۲۲/۵) | ۴۱ (۵۱/۲۵) |
| کلرامفنیکل              | ۱۴ (۱۷/۵)                     | ۲ (۲/۵)   | ۶۴ (۸۰)    |
| جنتامیسین               | ۹ (۱۱/۲۵)                     | ۶ (۷/۵)   | ۶۵ (۸۱/۲۵) |
| ایمی پنم                | ۸ (۱۰)                        | ۷ (۸/۷۵)  | ۶۵ (۸۱/۲۵) |
| لووفلوکساسین            | ۱۲ (۱۵)                       | ۰         | ۶۸ (۸۵)    |
| مروپنم                  | ۷ (۸/۷۵)                      | ۱ (۱/۲۵)  | ۷۲ (۹۰)    |
| پیپراسیلین / تازوباکتام | ۱۷ (۲۱/۲۵)                    | ۱۰ (۱۲/۵) | ۵۳ (۶۶/۲۵) |
| نیتروفورانتوئین         | ۶۰ (۷۵)                       | ۱۴ (۱۷/۵) | ۶ (۷/۵)    |
| توبرامایسین             | ۱۵ (۱۸/۷۵)                    | ۳۲ (۴۰)   | ۳۳ (۴۱/۲۵) |

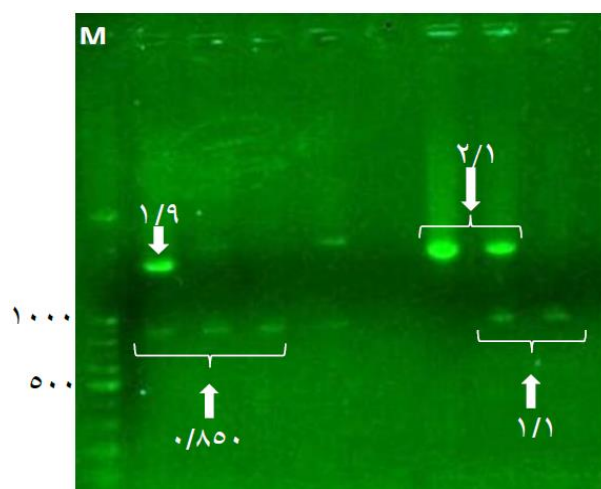
جدول ۳. الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک در جدایه های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو

| تعداد جدایه های مقاوم به چند دارو (%) | تعداد آنتی بیوتیک ها | الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های مقاوم به چند دارو                                                                          |
|---------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ۳ (۱۸/۷۵)                             | ۴                    | سفتازیدیم - سفتریاکسون - پیپراسیلین / تازوباکتام - نیتروفورانتوئین                                                                |
| ۲ (۱۲/۵)                              | ۴                    | سفتازیدیم - سفتریاکسون - نیتروفورانتوئین - کلرامفنیکل                                                                             |
| ۱ (۶/۲۵)                              | ۴                    | کلرامفنیکل - لووفلوکساسین - پیپراسیلین / تازوباکتام - نیتروفورانتوئین                                                             |
| ۱ (۶/۲۵)                              | ۴                    | سفتازیدیم - سفتریاکسون - لووفلوکساسین - پیپراسیلین / تازوباکتام - نیتروفورانتوئین - توبرامایسین                                   |
| ۱ (۶/۲۵)                              | ۷                    | سفتازیدیم - سفتریاکسون - کلرامفنیکل - جنتامیسین - لووفلوکساسین - پیپراسیلین / تازوباکتام - توبرامایسین                            |
| ۱ (۶/۲۵)                              | ۸                    | سفتازیدیم - سفتریاکسون - کلرامفنیکل - جنتامیسین - ایمی پنم - لووفلوکساسین - نیتروفورانتوئین - توبرامایسین                         |
| ۱ (۶/۲۵)                              | ۸                    | کلرامفنیکل - جنتامیسین - ایمی پنم - لووفلوکساسین - مروپنم - پیپراسیلین / تازوباکتام - نیتروفورانتوئین - توبرامایسین               |
| ۱ (۶/۲۵)                              | ۹                    | سفتازیدیم - سفتریاکسون - کلرامفنیکل - جنتامیسین - لووفلوکساسین - مروپنم - پیپراسیلین / تازوباکتام - نیتروفورانتوئین - توبرامایسین |
| ۱ (۶/۲۵)                              | ۹                    | سفتازیدیم - سفتریاکسون - کلرامفنیکل - ایمی پنم - لووفلوکساسین - مروپنم - پیپراسیلین / تازوباکتام - نیتروفورانتوئین - توبرامایسین  |

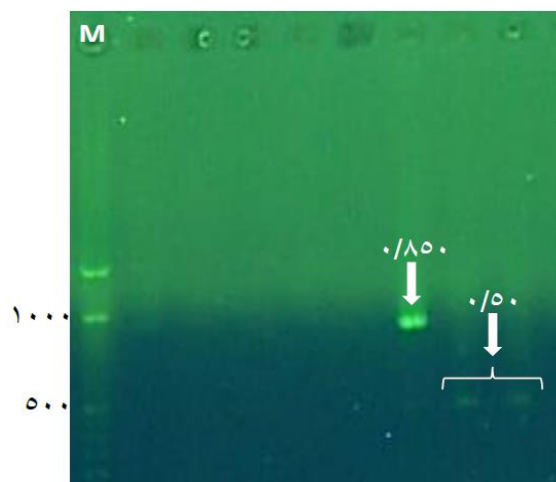
ارزیابی وجود ژن های اینتگرون کلاس ۱ در جدایه های کلبسیلا پنومونیه

از مجموع ۸۰ جدایه مورد ارزیابی ۲۹ جدایه کلبسیلا پنومونیه از نظر وجود اینتگرون های کلاس ۱ مثبت گزارش شدند (۲۵/۳۶٪) که نتایج مربوط به مشاهده این

نتایج مشاهده شده از الکتروفورز محصولات PCR اینتگرون های کلاس ۱ در مجموع نشان دهنده ۵ قطعه تکثیر شده با اندازه های ۲/۱، ۱/۹، ۱/۱، ۰/۸۵ و ۰/۵ کیلو جفت باز در جدایه های مختلف اینتگرون مثبت است



ب



الف

شکل ۱. نتایج مشاهده محصولات PCR مربوط به ژن های اینتگرون کلاس ۱ در جدایه های کلبسیلا پنومونیه. بر روی ژل آگارز ۱٪ (الف) قطعه های تکثیر شده با اندازه های ۵۰۰ و ۸۵۰ جفت باز. (ب) قطعه های تکثیر شده با اندازه های ۲۱۰۰، ۱۹۰۰، ۱۱۰۰ و ۸۵۰ جفت باز. چاهک های علامت گذاری شده با M در هر دو شکل نشان دهنده مارکر DNA (۱۰۰ جفت باز) هستند.

هم چنین، نتایج نشان داد که ۷ جدایه کلبسیلا پنومونیه حامل اینتگرون های کلاس ۱، MDR نیز هستند، به طوری که این جدایه ها الگوهای متفاوتی دارند، یعنی برخی از آن ها مقاوم به هر ۱۰ آنتی بیوتیک مورد ارزیابی بوده و برخی فقط نسبت به ۴ آنتی بیوتیک مقاومت نشان می -

دادند. در واقع نتایج بیانگر آن است که تعداد جدایه های غیر MDR حامل ژن های اینتگرون کلاس ۱ بیش تر از جدایه های MDR دارای این ژن ها هستند. جدول ۴، نتایج تجمیعی این اطلاعات را نشان می دهد.

جدول ۴. نتایج تجمیعی جدایه های MDR در باکتری های کلبسیلا پنومونیه دارای اینتگرون و فاقد اینتگرون

| تعداد جدایه‌های<br>ایننگرون منفی |                | تعداد جدایه‌های<br>ایننگرون مثبت |                | تعداد جدایه‌های MDR (مجموع=۱۶)                   |
|----------------------------------|----------------|----------------------------------|----------------|--------------------------------------------------|
| ۹                                |                | ۷                                |                |                                                  |
| تعداد آنتی‌بیوتیک‌ها             | تعداد جدایه‌ها | تعداد آنتی‌بیوتیک‌ها             | تعداد جدایه‌ها | وضعیت مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی-<br>بیوتیک‌ها |
| ۴                                | ۴              | ۴                                | ۲              |                                                  |
| ۹                                | ۲              | ۶                                | ۱              |                                                  |
| ۱۰                               | ۳              | ۷                                | ۱              |                                                  |
|                                  |                | ۸                                | ۲              |                                                  |
|                                  |                | ۱۰                               | ۱              |                                                  |

## بحث

کلبسیلا پنومونیه یکی از عوامل بیماری‌زای شناخته شده است که نه تنها در افراد دچار نقص سیستم ایمنی، بلکه حتی در افراد سالم نیز می‌تواند منجر به ایجاد عفونت‌های شدید و حاد گردد (۲۷-۲۵). افزایش روز افزون و چشم‌گیر مقاومت نسبت به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، اهمیت بررسی الگوی مقاومت در این جدایه‌ها را محرز کرده تا به این ترتیب امکان انتخاب داروهای درمانی با کارایی و موفقیت بیش‌تر میسر شود. هم‌چنین بسیاری از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد ضد عفونی کننده و فلزات سنگین بر روی اینتگرون‌ها حمل می‌شوند و در نتیجه یکی از عوامل مؤثر در ایجاد مقاومت نسبت به ترکیب‌های ضد میکروبی اینتگرون‌ها هستند که در بحث مقاومت آنتی‌بیوتیکی اهمیت می‌یابند (۲۸). در مطالعه حاضر نیز با توجه به این دو مسئله مهم، ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به دست آمده از نمونه ادرار افراد مراجعه کننده به مراکز درمانی و تشخیص طبی در استان البرز صورت گرفت. هم‌چنین، الگوی مقاومتی و نیز بررسی وجود موارد مقاوم به چند دارو نیز انجام شد، و در نهایت تأیید حضور ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ از طریق روش مولکولی (PCR) در جدایه‌های مورد مطالعه صورت پذیرفت. نتایج اولیه مبتنی بر جنسیت افراد نمونه دهنده نشان می‌دهد که تعداد جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه بیش‌تری از زنان (۵۶/۲۵٪) در مقایسه با مردان (۴۳/۷۵٪) به دست آمده است، که این نتیجه هم راستا با مطالعه صورت گرفته توسط Naqid و همکارانش در سال ۲۰۲۰ در کردستان عراق است. البته نتیجه فوق مربوط به نمونه‌های به دست آمده از ادرار بوده، به‌طوری‌که در همین مطالعه، تعداد جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به دست آمده از خلط مردان بیش‌تر از زنان گزارش شده بود (۲۹). در مطالعه فعلی، تفاوت چندانی بین گروه‌های سنی که مورد ارزیابی قرار گرفتند وجود نداشت و در واقع به طور تقریبی از هر گروه سنی مشخص شده در جدول ۱، تعداد یکسانی جدایه به دست آمد (به غیر از محدوده سنی ۸۰ سال به بالا)، این در حالی است که نتیجه مطالعه گسترده‌ای که در شمال ایتالیا انجام شد حاکی از آن بود که بیش‌ترین تعداد نمونه کلبسیلا پنومونیه به دست آمده از افراد ۶۰ سال به بالا بوده و کم‌ترین تعداد نیز از افراد زیر ۱۴ سال جدا شده است (۳۰). در ارتباط با مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه، همان‌طور که در جدول ۲ مشخص است بیش‌ترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک نیتروفرانتوئین (۷۵٪) و سپس با اختلاف زیاد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفترایکسون و پیپراسیلین/ تازوباکتام به دست آمد. در واقع، آنتی‌بیوتیک‌های نام برده، نمی‌توانند گزینه‌های درمانی

مناسبی برای عفونت‌های ادراری ناشی از این جدایه‌ها باشند. حتی در گزارش اعلام شده در سال ۲۰۱۷ در رومانی (۳۱) میزان مقاومت نسبت به نیتروفرانتوئین بیش‌تر بوده (۹۲/۸۶٪)، اما در مطالعه‌ای دیگر میزان مقاومت نسبت به نیتروفرانتوئین به‌طور چشم‌گیر کم‌تر (حدود ۳۰٪) اعلام شده است (۲۹). در این مطالعه میزان مقاومت نسبت به دو آنتی‌بیوتیک سفترایکسون و سفترایکسون به‌طور یکسان (۲۶/۲۵٪) مشاهده شد، در حالی که در مطالعه صورت گرفته در طی چندین سال متوالی (۲۰۱۲ تا ۲۰۱۹) در جنوب غربی چین میزان مقاومت نسبت به سفترایکسون به‌طور تقریبی دو برابر سفترایکسون اعلام شده است (۳۲). با توجه به نتایج ناشی از ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعه فعلی می‌توان درمان با آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم، لووفلوکساسین، ایمینم و جنتامیسین را که به ترتیب دارای درصد حساسیت ۹۰، ۸۵، ۸۱/۲۵ و ۸۵/۲۵ هستند، موفقیت‌آمیز دانست. یکی از مشکلات پیش روی کادر درمان در مواجهه با عفونت‌ها، وجود جدایه‌های مقاوم به چند دارو است که نه تنها رویه درمانی را دچار مشکل می‌کند، بلکه منجر به افزایش آمار مرگ و میر نیز می‌شود، به‌طوری‌که درمان این موارد همواره نیازمند زمان بیش‌تر و دقت کافی در انتخاب آنتی‌بیوتیک‌های مناسب است. چنین مشکلی در انواعی از عفونت‌ها به‌ویژه عفونت‌های ادراری و ریه دیده شده و ارزیابی حضور این باکتری‌ها و همین‌طور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آن‌ها را ضروری می‌سازد (۳۳، ۳۴). به همین دلیل در این مطالعه علاوه بر تعیین میزان جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو (۲۰٪)، الگوی مقاومتی آن‌ها نیز مشخص شد که در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج بیانگر آن است که ۲۵٪ درصد از این جدایه‌ها به هیچ‌یک از آنتی‌بیوتیک‌های مورد ارزیابی حساس نبودند و در حقیقت درمان آنتی‌بیوتیکی موفق‌تری برای آن‌ها وجود نخواهد داشت، چرا که نسبت به هر ۱۰ آنتی‌بیوتیک مورد استفاده مقاوم بودند. البته با توجه به این جدول، موارد مقاوم به تعداد کم‌تری از آنتی‌بیوتیک‌ها هم مشاهده شده است که الگوی مقاومتی متفاوتی دارند، اما به‌طور واضح آنتی‌بیوتیک‌های سفترایکسون، سفترایکسون، نیتروفرانتوئین و پیپراسیلین/ تازوباکتام از جمله آنتی‌بیوتیک‌های حاضر در اغلب الگوها هستند. روند افزایشی بروز جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو در سایر مطالعه‌ها نیز تأیید شده است، به‌طوری‌که نتایج اعلام شده توسط Arana و همکارانش در اسپانیا که در یک بازه زمانی ۱۲ ساله صورت گرفت، نشان‌دهنده افزایش ۴ تا ۸ برابری جداسازی این باکتری‌ها است (۳۵). در مطالعات مشابهی که در ایران (۳۶) و پاکستان (۳۷) صورت گرفته است، درصد حضور جدایه‌های کلبسیلا

طرح تحقیقاتی تصویب شده تأمین نمود، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

پنومونیه مقاوم به چند دارو بسیار بیش تر از مطالعه فعلی و به- ترتیب معادل ۴۶/۶٪ و ۷۱/۷۳٪ گزارش شده است. نگرانی‌های موجود بابت پیدایش روزافزون جدایه‌های مقاوم به چند دارو و عدم وجود آنتی‌بیوتیک‌های جدید برای درمان، استفاده از آنتی- بیوتیک‌های قدیمی که هم‌چنان فعالیت خود علیه این جدایه‌ها حفظ کرده‌اند را به‌عنوان یک راهکار معرفی می‌کند (۳۸). با توجه به اهمیت اینتگرون‌ها به‌عنوان عناصر ژنتیکی متحرک در اعطای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و در نتیجه ایجاد مشکلات در روند درمان، حضور ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ در جدایه‌های مورد ارزیابی در این مطالعه نیز تأیید شد و که بنابر نتایج، ۳۶/۲۵٪ از آن‌ها از این نظر مثبت بودند که البته این نتیجه در مقایسه با گزارش اعلام شده توسط Firoozeh و همکاران (۳۹) بسیار کم‌تر بوده، چرا که آن‌ها توانستند حضور ژن‌های مورد نظر را در ۸۲/۸۷٪ از جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه اثبات کنند. هم‌چنین آن‌ها نشان دادند که همه جدایه‌های مقاوم به چند دارو دارای اینتگرون کلاس ۱ هستند (۱۰۰٪)، در حالی که در مطالعه حاضر فقط ۷ (۴۳/۷۵٪) جدایه مقاوم به چند دارو از نظر ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ مثبت گزارش شدند. در واقع، وجود تعداد بیش تر (۵۶/۲۵٪) جدایه‌های فاقد اینتگرون در بین کلبسیلا پنومونیه‌های مقاوم به چند دارو، می‌تواند نشان دهنده مشارکت مکانیسم‌های اعطای مقاومت آنتی‌بیوتیکی غیر وابسته به اینتگرون‌ها باشد، هر چند، احتمال وجود ژن‌های اینتگرون سایر کلاس‌ها نیز منتفی نیست. بنابراین در راستای تکمیل اطلاعات می‌توان بررسی حضور این ژن‌ها را نیز در دستور کار آینده قرار داد.

## نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان‌دهنده روند رو به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به‌دست آمده از نمونه‌های ادراری و حضور قابل توجه جدایه‌های مقاوم به چند دارو است که با در نظر گرفتن و تعیین مکانیسم‌های اعطای مقاومت (به‌ویژه مکانیسم‌های وابسته به اینتگرون‌ها) می‌توان پروتکل‌های درمانی را بر اساس الگوی مقاومتی و هم‌چنین ارزیابی‌های مولکولی مرتبط، تعریف کرد تا به این ترتیب نه تنها روش‌های درمانی با کارایی و موفقیت بیش تر انتخاب می‌شوند، بلکه از پیدایش جدایه‌های مقاوم به دارو نیز جلوگیری خواهد شد.

## سپاسگزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج که ضمن تأمین تجهیزات آزمایشگاهی، هزینه مواد مصرفی بکار گرفته شده را نیز در قالب

1. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11, 589-603.
2. Cristea OM, Avrănescu CS, Bălăsoiu M, Popescu FD, Popescu F, Amzoiu MO. Urinary tract infection with *Klebsiella pneumoniae* in Patients with Chronic Kidney Disease. *Curr Health Sci J*. 2017; 43(2):137-148.
3. Moradigaravand D, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. *mBio*. 2017; 8(1):e01976-16.
4. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13(5):269–284.
5. Koeijers JJ, Verbon A, Kessels AGH, et al. Urinary tract infection in male general practice patients: uropathogens and antibiotic susceptibility. *Urology*. 2010; 76(2):336–340.
6. Sokhn ES, Salami A, Roz AEI, Salloum L, Bahmad HF, Ghssein G. Antimicrobial susceptibilities and laboratory profiles of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates as agents of urinary tract infection in Lebanon: paving the way for better diagnostics. *Med Sci (Basel)*. 2020; 8(3):32–42.
7. Van Driel AA, Notermans DW, Meima A, et al. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from uncomplicated UTI in general practice patients over a 10-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019; 38(11):2151–2158.
8. Hennequin C, Robin F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; 35, 333–341.
9. Zhang X, Li Q, Lin H, Zhou W, Qian C, Sun Z, Lin L, Liu H, Lu J, Lin X, Li K, Xu T, Zhang H, Li C, Bao Q. High-Level Aminoglycoside Resistance in Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Complex Isolates and Characteristics of armA-Carrying IncHI5 Plasmids. *Front Microbiol*. 2021; 7;12:636396.
10. Odumosu BT, Adeniyi BA, Chandra R. Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013;12:29.
11. Lombardi F, Gaia P, Valaperta R, Cornetta M, Tejada MR, Di Girolamo L, Moroni A, Ramundo F, Colombo A, Valisi M, Costa E. Emergence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Progressive Spread and Four-Year Period of Observation in a Cardiac Surgery Division. *Biomed Res Int*. 2015;2015:871947.
12. Deng Y, Bao X, Ji L, Chen L, Liu J, Miao J, et al. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015;14:45.
13. Guerin E, Jove T, Tabesse A, Mazel D, Ploy MC. High-level gene cassette transcription prevents integrase expression in class 1 integrons. *J Bacteriol*. 2011;193:5675–82.
14. Lima AM, de Melo ME, Alves LC, Brayner FA, Lopes AC. Investigation of class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* clinical and microbiota isolates belonging to different phylogenetic groups in Recife, State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 47:165–9.
15. Recchia GD, Hall RM. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*. 1995;141 ( Pt

16. Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999;18(11):761–70
17. Collis CM, Hall RM. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol.* 1992;174(5):1574–85.
18. Jin Y, Ling JM. Prevalence of Integrons in Antibiotic-Resistant Salmonella spp. in Hong Kong. *Jpn J Infect Dis.* 2009; 62(6):432-439.
19. Yu HS, Lee JC, Kang HY, Ro DW, Chung JY, Jeong YS, Tae SH, Choi CH, Lee EY, Seol SY, Lee YC, Cho DT. 2003. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:5429-5433.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne PA, USA 2013. 23th information supplement, M100-S23.
21. Afzali H, Firoozeh F, Amiri A, Moniri R, Zibaei M. Characterization of CTX-Mtype extend-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella* spp. in Kashan, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2015; 8:e27967.
22. White PA, McIver CJ, Deng Y, Rawlinson WD. Characterisation of two new gene cassettes, aadA5 and dfirA17. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 15;182(2):265-9.
23. White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(9):2658-61.
24. Barani A, Tabatabaee Bafroee AS, Jabalameli L. Abundance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes among intestinal *Escherichia coli* strains from drug users. *Arch Microbiol.* 2021; 203(6):3245-3255.
25. Khaertynov KS, Anokhin VA, Rizvanov AA, Davidyuk YN, Semyenova DR, Lubin SA, Skvortsova NN. Virulence Factors and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated From Neonates With Sepsis. *Front. Med.* 2018; 5, 225.
26. Wasfi R, Elkhatib WF, Ashour HM. Molecular typing and virulence analysis of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from Egyptian hospitals. *Sci. Rep.* 2016, 6, 38929.
27. Bandeira M, Carvalho PA, Duarte A, Jordao L. Exploring Dangerous Connections between *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Healthcare-Associated Infections. *Pathogens* 2014; 3, 720–731.
28. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR: Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33:757-784.
29. Naqid IA, Hussein NR, Balatay AA, Saeed KA, Ahmed HA. The Antimicrobial Resistance Pattern of *Klebsiella pneumonia* Isolated from the Clinical Specimens in Duhok City in Kurdistan Region of Iraq, J Kermanshah Univ Med Sci. 2020; 24(2):e106135.
30. Magliano E, Grazioli V, Deflorio L, Leuci AI, Mattina R, Romano P, Cocuzza CE. Gender and age-dependent etiology of community-acquired urinary tract infections. *Sci World J.* 2012; 2012:349597.
31. Cristea OM, Avrănescu CS, Bălăsoiu M, Popescu FD, Popescu F, Amzoiu MO. Urinary tract infection with *Klebsiella pneumoniae* in Patients with Chronic Kidney Disease. *Curr Health Sci J.* 2017; 43(2):137-148.

32. Ding Y, Wang H, Pu S, Huang S, Niu S. Resistance Trends of *Klebsiella pneumoniae* Causing Urinary Tract Infections in Chongqing, 2011-2019. *Infect Drug Resist.* 2021; 9;14:475-481.
33. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, et al.: Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin Infect Dis.* 2004; 1:31-7. 10.1086/420816.
34. Yasin F, Assad S, Talpur AS, Zahid M, Malik SA. Combination Therapy for Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Urinary Tract Infection. *Cureus*; 2017; 22;9(7):e1503.
35. Arana DM, Rubio M, Alós JJ. Evolution of antibiotic multiresistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from urinary tract infections: A 12-year analysis (2003-2014). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017; 35(5):293-298.
36. Moini AS, Soltani B, Taghavi Ardakani A, Moravveji A, Erami M, Haji Rezaei M, Namazi M. Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Patients in Kashan, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2015; 25;8(10):e27517.
37. Ullah F, Malik SA, Ahmed J. Antimicrobial susceptibility pattern and ESBL prevalence in *Klebsiella pneumoniae* from urinary tract infections in the North-West of Pakistan. *Afr J Microbiol Res* 2009; 3(11): 676-680.
38. Mazzariol A, Bazaj A, Cornaglia G. Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *J Chemother.* 2017 ;29(sup1):2-9.
39. Firoozeh F, Mahluji Z, Khorshidi A, Zibaei M. Molecular characterization of class 1, 2 and 3 integrons in clinical multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019; 29;8:59.

