Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

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 Pormohammad[2], Mohammad Ahangarzadeh Rezaee[2], Mohammad Reza Nahaei[2], Mohammad Hossein Soroush barhaghi[2], Akbar Hasani[3]

[1]Research Center of Infectious and Tropical Diseases, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3]Department 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-lactmase 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 ß-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.

© 2017 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

فراوانی بتالاکتاماز های وسیع الطیف و بررسی اینتگرون کلاس ۱ در درکلبسیلا پنومونیه های تولید کننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف در بیمارستان سینای تبریز- ۱۳۹۱

آلکا حسنی[۲،۱]، فروغ شمس[۲،۱*]، علی پورمحمد[۲]، محمد رضایی آهنگرزاده[۲]، محمد رضا نهایی[۲]، محمد حسین سروش برحقی[۲]، اکبر حسنی[۳]

[۱]مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
[۲]گروه میکروب و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
[۳]گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
[*]نویسنده رابط؛ ایمیل: froogh.shams@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۳/۸/۲۸ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۱۸ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۶/۶
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۶ مهر و آبان؛ ۳۹(۴):۲۹-۳۵

چکیده

زمینه: حضور بتالاکتاماز ها در میان باکتری های گرم منفی از جمله کلبسیلا پنومونیه، که به عنوان پاتوژن مهم در عفونت های بیمارستانی معرفی گشته، از مهمترین عوامل مقاومت به آنتی بیوتیک های خانوادهی بتالاکتام می باشد. اینتگرون کلاس ۱ از عناصر متحرک ژنتیکی است که بیشتر در باکتری های مقاوم به دارو شیوع دارد. این مطالعه به منظور تعیین فراوانی فنوتیپی و ژنوتیپی سویه های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف و نیز تعیین شیوع اینتگرون کلاس ۱ در سویه های تولید کننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف انجام گردید.

روش کار: تعداد ۶۳ ایزولهی کلبسیلا پنومونیه که توسط تست های بیوشیمیایی و فنوتیپی تأیید گردید، در طی ۶ ماه جمع آوری گشت. آزمون تعیین حساسیت توسط روش دیسک دیفیوژن انجام گرفت و فراوانی سویه های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف، با روش دیسک ترکیبی تعیین گردید. حضور ژن های خانواده *bla TEM* ، *bla SHV* و *اینتگرون کلاس ۱* به روش *PCR* بررسی گشت.

یافته ها: از میان نمونه ها ، ۴۵ (۷۱/۴٪) ایزوله مولد بتا لاکتامازهای وسیع الطیف بودند. ژن های خانواده *TEM* و *SHV* به ترتیب در ۶۶/۶٪ و ۶۸/۹٪ از ایزوله *های* تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف حضور داشتند و اینتگرون کلاس ۱ به ترتیب در۲۴ (۶۵ .٪) و۱۹ (۶۳/۳٪) مورد از سویه های دارای *SHV* و *TEM* مشاهده شد.

نتیجه گیری: در مطالعه حاضر، شیوع رو به افزایش سویه های تولید کننده بتا لاکتامازهای وسیع الطیف تأیید گردید. هم چنین این مطالعه اهمیت ویژه اینتگرون در انتشار بتالاکتامازهای وسیع الطیف مولد مقاومت در میان ایزوله های بیمارستانی را بیان می‌کند. به طور کلی استفاده از روش درمانی مناسب بر پایه تعیین الگوی آنتی‌بیوگرام سویه‌ها، به طور خاص توصیه می‌گردد.

کلید واژه ها: بتالاکتاماز وسیع الطیف، کلبسیلا پنومونه، اینتگرون کلاس ۱

نحوه استناد به این مقاله: حسنی آ، شمس ف، پورمحمد ع، رضایی آهنگرزاده م، نهایی م، سروش برحقی مح، حسنی ا. فراوانی بتالاکتاماز های وسیع الطیف و بررسی اینتگرون کلاس ۱ در درکلبسیلا پنومونیه های تولید کننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف در بیمارستان سینای تبریز- ۱۳۹۱. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۶؛ ۳۹(۴): ۲۹-۳۵

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی 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 سپسیس ناشی از باسیل های گرم منفی می باشد (۱). کشف آنتی بیوتیک ها و گسترش رواج استفاده از آنها در درمان بیماری های ناشی از عفونت های باکتریایی، باعث به وجود آمدن مقاومت نسبت به مواد ضد باکتریایی شده است. استراتژی‌های مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها مختلف و متفاوت هستند و یکی از این مکانیسم ها تولیدآنزیم های بتالاکتاماز در باکتری‌ها می‌باشد (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 آنزیم ها می باشد، به چهار کلاس A تا D تقسیم می شوند (۳). با مصرف روزافزون سفالوسپورین ها، در سال ۱۹۸۰ دسته ی دیگری از آنزیم ها 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 خانواده-های آنزیمی (Temoneria) *TEM*, (Sulfhidril variable) *SHV*) , (Oxacilin) *OXA* 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 باسیل های گرم منفی به حساب می آید (۶). در سال‌های اخیر مقاومت دارویی باکتری‌ها به بیش از دو رده مختلف آنتی‌بیوتیکی که اصطلاحاً "مقاومت دارویی چندگانه" یا Multi-Drug Resistance گفته می‌شود، در میان ایزوله‌های بیمارستانی افزایش یافته است. عوامل ایجاد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها اکثراً بر روی عناصر ژنتیکی متحرک مانند پلاسمید، ترانسپوزون و اینتگرون حمل می‌شوند که در این میان اینتگرون‌ها بدلیل توانایی انتقال مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی چندگانه بر روی یک واحد ژنی از جایگاه ویژه ای برخوردار هستند (۷). اینتگرون‌های کدکننده مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها 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 *sulI* می‌باشند. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی کلبسیلاهای تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف و هم چنین ارزیابی ملکولی بتالاکتازهای *SHV* ، *TEM* و تعیین شیوع اینتگرون کلاس ۱ در نمونه های 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 عفونت های مختلف کلبسیلاپنومونیه به پزشک کمک نمود.

روش کار

در این مطالعه ازمیان ۴۸۵ نمونه ی 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 تست های بیوشیمیایی و فنوتیپی تأیید گردید. از کلنی های ظاهر شده‌ی کلبسیلا، سوسپانسیونی بر اساس استاندارد نیم مک فارلند تهیه کرده و بر روی محیط مولرهینتون فعالیت ایزوله ها به صورت in vitro در برابر ۱۰آنتی بیوتیک تهیه شده از شرکت MAST شامل: جتامایسین (۱۰میکروگرم)، کوتریموکسازول (۱/۲۵میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۱۰میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفامندل (۳۰ میکروگرم)، سفتیزوکسیم (۳۰ میکروگرم) مورد بررسی قرار گرفت. میزان حساسیت یا مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها بر مبنای CLSI گزارش شد (۸). تولید آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف با استفاده از روش دیسک ترکیبی و آنتی بیوتیک های تهیه شده از شرکت MASTشامل: سفوتاکسیم، سفپیم، سفپوداکسیم و سفتازیدیم به تنهایی و همراه با کلاولانیک اسید تعیین گردید. هدف از انجام آزمون دیسک ترکیبی جداسازی سوش های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف بود. در این تست از دیسک های سفتازیدیم ۳۰ میکروگرم، سفتازیدیم + کلاولانیک اسید (۳۰-۱۰ میکروگرم) ؛سفوتاکسیم ۳۰میکروگرم، سفوتاکسیم+کلاولانیک اسید (۳۰–۱۰میکروگرم) ؛و سفپیم ۳۰ میکروگرم، سفپیم+ کلاولانیک اسید (۳۰–۱۰میکروگرم) ؛ و سفپوداکسیم ۳۰ میکروگرم، سفپوداکسیم+ کلاولانیک اسید (۳۰–۱۰میکروگرم) و آزترونام (۳۰ میکروگرم) که به فاصله ۲۰ میلی متری از یکدیگر قرار گرفتند، استفاده شد. بعد از انکوباسیون به مدت۱۸–۲۴ساعت در ۳۷درجه سانتی گراد، تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف از طریق افزایش قطر هاله ی عدم رشد به اندازه ۵ میلی متر یا بیشتر در اطراف دیسک های آنتی بیوتیک همراه با کلاولانیک اسید تعیین گردید. از سویه کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 و اشرشیاکلی با ATCC25922 به ترتیب جهت کنترل مثبت و منفی برای تایید و عدم تایید سویه های تولید کننده ESBL استفاده شد. استخراج DNA ژنومی سویه های موجود، توسط روش SDS-Proteinase K اصلاح شده با CTAB صورت گرفت و سپس عمل PCR به جهت شناسایی بتا لاکتاماز های *TEM*، *SHV* و ژن اینتگراز ۱ انجام پذیرفت (جدول۱).

واکنش PCR برای ژن اینتگراز ۱ در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در هر ویال شامل:

۱/۲میکرولیتر $MgCl_2$، ۲/۸میکرولیتر بافر x۱۰، ۰/۵ میکرولیتر از استوکdNTP، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم Taq Polymerase، ۱۶میکرولیتر H_2O ، ۱میکرولیتر از هر پرایمر،۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده و تحت برنامه زمانی برای ۳۵ سیکل شامل: مرحله

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 پرایمر ها ۱ دقیقه در دمای ۶۰ °C، مرحله طویل شدن رشته هدف ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ °C و مرحله طویل 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 *TEM* و *SHV* در حجم ۲۵ میکرولیتر در هر ویال شامل:

۱/۲میکرولیتر $MgCl_2$، ۲/۸میکرولیتر بافر ۱۰x ۰/ ۵ میکرولیتر از استوک dNTP، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم Taq Polymerase، ۱۴میکرولیتر H_2O ، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۲جفت)، 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 داده‌ها 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 کلبسیلا پنومونیه جدا شد که ۴۱/۲ درصد (۲۶) نمونه‌ها 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 آنتی‌بیوتیکی(Multi-Drug Resistance) مقاوم بودند. نتایج حاصل از آزمایش دیسک ترکیبی(Combined disk) نشان داد که از میان ۶۳ سویه کلبسیلا، ۴۵ (۷۱/۴٪) ایزوله مولد 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٪)، سفتازیدیم ۵۵ (۸۷٪)، سفوتاکسیم ۵۴ (۸۵٪) و سفپیم ۱۵(۲۳٪). قابل توجه است که بیشترین مولّدین آنزیم های بتالاکتامازی ۷۶/۹٪ و ۷۵٪ به ترتیب متعلق به نمونه های زخم و ادرار بودند.

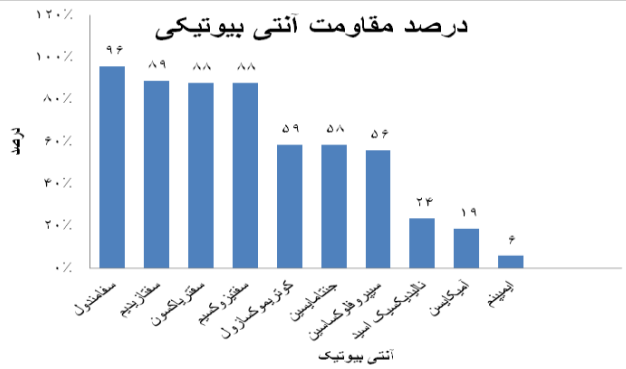
در آزمایش PCR برای تشخیص ژن های *TEM* و *SHV* مشخص گردید که به ترتیب ۶۳/۳۰ و ۶۳/۳۷ از نمونه ها حاوی ژن های مورد نظر بودند که البته در ایزوله های تولید کننده ESBL ، فراوانی *TEM* (۴۵/۳۰) ۶۶/۶٪ و *SHV* (۴۵/۳۱) ۶۸/۹٪ گزارش گردید (شکل ۱). اینتگرون کلاس ۱ در (۴۵/۲۶) ۵۷/۸٪ از نمونه های مولد آنزیم های بتالاکتاماز که به صورت فنوتیپی بررسی شده بودند، وجود داشت. هم چنین اینتگرون کلاس کلاس ۱ در سویه های دارای خانوادهای ژنی *SHV* و *TEM* به ترتیب در ۶۵٪ (۲۴) و ۶۳/۳٪ (۱۹) از موارد حضور داشت (جدول ۲).

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

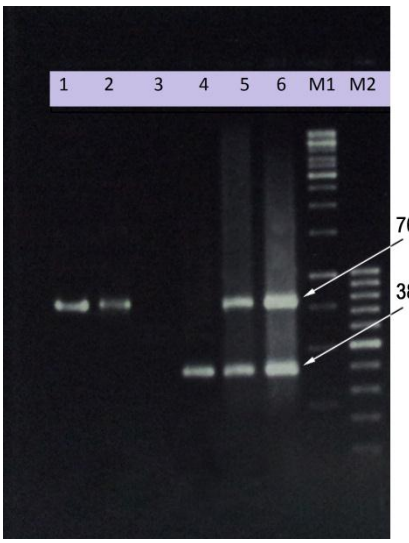
ژن	توالی نوکلئوتیدی پرایمر (3′–5′)	اندازه قطعه (bp)	منبع
IntI1 F	GCATCCTCGGTTTTCTGG	۴۷۵	(۹)
IntI1 R	GGTGTGGCGGGCTTCGTG		
SHV F	GGGAAACGGAACTGAATGAG	۳۸۰	(۲۸)
SHV R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG		
TEM F	AGATCAGTTGGGTGCACGAG	۷۶۹	(۱۰)
TEM R	TGCTTAATCAGTGAGGCACC		

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

	ژن *SHV* (n=۳۷)	ژن *TEM* (n=۳۰)	*SHV, TEM* (n=۱۲)
اینتگرون کلاس I (n=۲۶)	۲۴(۳۷) ٪۶۵	۱۹(۳۰) ٪۶۳/۳	۷(۱۲) ٪۵۸/۳



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



شکل ۱: نتیجه آزمون PCR جهت حضور *SHV* و *TEM*. M_1 : مارکر (۱Kbp). M_2 : مارکر(۱۰۰bp) خط ۱،۲،۵،۶: نمونه مثبت برای *TEM* (۷۶۹bp) خط ۴،۵،۶: نمونه مثبت برای *SHV* (۳۸۰bp) .

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 بتا لاکتام 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 سیپروفلوکساسین مقاوم گشته و باانتقال ژن کدکننده 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، مهارکننده 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 بتالاکتامازهای 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 (۹۷/۵۶٪)ESBL 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 دربیمارستان ولیعصر تهران صورت گرفت، از میان ۷۶ نمونه بالینی *E.coli* ، ۴۷ (۶۰٪) ایزوله حاوی ژن *TEM* بودند که این میزان بسیار مشابه با نتایج حاصل از این تحقیق بود (۱۶). هم چنین مسجدیان و رستگار لاری در مطالعه خود نشان دادند که درمیان سویه های اشرشیا کلی، ۸۵/۶٪ ایزوله ها ژن *TEM* را دارا بودند (۱۷).

در مورد ژن *SHV* نتایج قابل تأمل و جالبی در PCR این ایزوله‌ها 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 اشرشیا کلی 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 اشرشیا کلی 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 ای 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 اشرشیا کلی 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 اشرشیا کلی 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 بیوتیک‌های وسیع الطیف و سایر آنتی بیوتیک ها هم مقاومت نشان می دهند. به سبب نقش مهم اینتگرون ها در انتشار مقاومت-های وسیع الطیف، بررسی وجود ژن اینتگراز ۱ در ایزوله های تولید کننده ESBL دارای اهمیت است. زیرا ESBL ها می توانند به عنوان بخشی از مجموعه اینتگرون ها باشند که منجر به تسهیل درامر انتقال آنها می گردد (۱).

در این مطالعه (۲۶/۴۵) ۵۷/۸٪ از ایزوله های ESBL مثبت حامل ژن اینتگراز ۱ بودند (۱, ۲۳, ۲۴). در ایران بررسی های فراوانی در مورد حضور ژن های اینتگراز صورت گرفته است، همانند مطالعه Derakhshan و همکاران بر روی کلبسیلا که تنها ۸ سویه (۲۵/۸٪) از ۳۱ نمونه دارای اینتگرون کلاس ۱ بودند (۲۵) و هم چنین مطالعه صورت گرفته توسط Ahangarzadeh و همکاران در تبریز نشان داد که اینتگرون کلاس ۱ در۷۸/۵٪ از ایزوله های کلبسیلا وجود داشت (۲۶). اما تأکید مطالعه حاضر، ارتباط ژن های تولید کننده ESBL و حضور اینتگرون کلاس ۱ است. در مطالعه حاضر وجود اینتگرون 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 اینتگرون کلاس ۱ در ژن SHV به ترتیب ۷۳٪ و۷۶٪ گزارش شده است (۲۸-۲۷). در مطالعه حاضر هر دو ژن *SHV* و *TEM* در ۱۲ سویه مشاهده

گردید و حضور اینتگرون کلاس ۱ در این سویه ها (۱۲/۷) ۵۸/۳٪ گزارش گردید.

نتیجه گیری

با مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه و دیگر موارد، گزارشات بدست آمده نشان دهنده آن است که درصد سویه های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف رو به افزایش است و این افزایش می-تواند در نتیجه مصرف بیش از حد و طولانی مدت سفالوسپورین-های وسیع الطیف، طولانی بودن مدت زمان بستری در بیمارستان و استفاده از کاترهای عروقی و ادراری باشد. طبق نتایج حاصل در مورد شش سویه دارای ژن *SHV* و عدم مشاهده فنوتیپ ESBL در میان این سویه ها، مشخص شد روش های فنوتیپی به تنهایی نمی توانند نشان دهندی بتالاکتاماز های وسیع الطیف باشند و منفی کاذب در این روش قطعاً وجود دارد لذا انجام تکنیک های مولکولی از قبیل PCR جهت تشخیص انواع بتالاکتاماز های وسیع الطیف ضروری به نظر می رسد. هم چنین ضرورت شناسایی دقیق سویه های تولید کننده ESBL توسط آزمایشگاه و پزشکان و پیشگیری از انتشار این مقاومت دارویی و تجویز دقیق آنتی بیوتیک ها بر اساس تعیین الگوی حساسیت امری مهم و ضروری تلقی می گردد.

قدردانی

این پژوهش حاصل بخشی از پایان نامه دانشجویی سرکارخانم فروغ شمس به شماره ۳/۵-۹۱/۲ به عنوان طرح تحقیقاتی مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری به شماره ۹۱-۱۷ می‌باشد. لذا بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری به دلیل پشتیبانی مالی و کلیه همکارانی که ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند تشکر و قدردانی می نماییم.

References

1. 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.
2. 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
3. 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
4. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; **33**(3): 259-263. doi: 10.1128/AAC.33.3.259
5. 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
6. 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
7. 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
8. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2011.
9. 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
10. Herra CM. *The Role of β-Lactamase in Low-Level Cephalosporin-resistant Serratia marcesens*: Trinity College Dublin; 2002.
11. 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
12. 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.
13. 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
14. 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 *Esherchia Coli* and *Klebsiella penumoniae* isolated from Medical Centers of Iran. *J Med Microbiol* 2008; **3**(4): 9-17.
16. Hosseini-Mazinani SM, Eftekhar 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 JaziF VF, Talebi A, Rastegar LariA. 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