

The evaluation of connection between integrons class I and II and ESBL-producing and Non-ESBL *klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples, Kerman

Majid Taati Moghadam, Hossien Hossieni Nave, Samaneh Mohebi, Amin Norouzi

Department of Microbiology, Kerman Medical Students Research Committee, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2015/07/22
Accepted: 2016/01/20
Available online: 2016/10/16

Article Subject:

Medical Bacteriology

IJMM 2016; 10(4): 01-09

Corresponding author at:

Mr. Amin Norouzi

Department of Microbiology,
Kerman Medical Students
Research Committee, Kerman
University of Medical Sciences,
Kerman, Iran

Tel: 0989356560981

Email:

a_norouzi@kmu.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Genes encoding ESBL are usually located on conjugative plasmids, although ESBL genes are found within integron-like structures. The main purpose of current study was to detect a relationship between integrons class I and II and ESBL-producing, Non-ESBL *Klebsiella pneumoniae*.

Materials and Methods: In the current study, 58 samples of *K. pneumoniae* were collected from urine, blood, and wound in Kerman hospitals. Then antibiotic susceptibility test was carried out by using disc diffusion method. ESBLs producing *K. pneumoniae* determined using phenotypic confirmatory test. Detection of *bla-TEM*, *bla-CTXM*, *bla-SHV*, *intI*, and *intII* genes was done by PCR. Eventually, data analysis were performed using SPSS-22.

Results: Antibiotic susceptibility test was showed that antibiotic resistance patterns are different between ESBL-producing and Non-ESBL *K. pneumoniae*. Effective antibiotic against *K. pneumoniae* isolates was imipenem (57.8%) and 55 isolates (94.8%) were resistance to ampicillin which more than others antibiotics. Also, 35 (60.3%) isolates were produced ESBL-enzymes. 37 (63.7%) isolates included *intI* while just 3 (5.1%) isolates had *intII* genes. In this study, we observed a significant association between ESBL and integron class I.

Conclusions: High prevalence of integron and ESBLs in *K. pneumoniae* demonstrated that following health recommendations in hospitals and prescribing correct antibiotics can prevent the antibiotic resistance in the future.

KeyWords: *Klebsiella pneumoniae*, Disc diffusion, Imipenem, ESBL

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Taati Moghadam M, Hossieni Nave H, Mohebi S, Norouzi A. The evaluation of connection between integrons class I and II and ESBL-producing and Non-ESBL *klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples, Kerman. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (4):1-9

بررسی ارتباط اینتگرون کلاس I و II با ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده و فاقد آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستانهای کرمان

مجید طاعتی مقدم، حسین حسینی نوه، سمانه محبی، امین نوروزی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: ژن‌های کدکننده آنزیم‌های ESBL معمولاً بر روی یک پلاسمید کانجوگتیو قرار دارند، اما بیشتر ژنهای ESBL که اخیراً مطرح شده‌اند به طور مکرر در ساختارهای شبه اینتگرون یافت شده‌اند. هدف از این مطالعه بررسی نقش آنزیم‌های ESBL و اینتگرونهای کلاس I و II در ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک ها می‌باشد.

مواد و روش کار: ۵۸ کلبسیلا پنومونیه از ادرار، خون و زخم نمونه‌های بالینی بیمارستان کرمان جمع آوری گردید. آنتی بیوگرام ایزوله ها با روش دیسک دیفیوژن انجام شد. برای شناسایی ایزوله‌های تولید کننده ESBLs ابتدا، تست دیسک ترکیبی فنوتیپی و برای شناسایی ژنها *bla-CTXM* و *bla-SHV* *bla-TEM* *intI* *intII*، روش PCR انجام شد. از نرم افزار SPSS-22 برای آنالیز رابطه بین اطلاعات استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج آنتی بیوگرام الگوی مقاومتی متفاوتی را در ایزوله‌های تولید کننده ESBLs و فاقد ESBLs نشان داد. موثرترین آنتی بیوتیک علیه ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه آنتی بیوتیک ایمپنم (۷۵/۸٪) بود و بیشترین مقاومت به آمپی سیلین (۹۴/۸٪) مشاهده شد. ۳۵ ایزوله (۶۰/۳٪) تولید کننده ESBL بودند، همچنین ۳۷ (۶۳/۷٪) ایزوله دارای اینتگرون کلاس I، اما تنها ۳ (۵/۱٪) ایزوله دارای اینتگرون کلاس II بودند و ارتباط معنی داری بین اینتگرون کلاس I و II و آنزیم‌های ESBL مشاهده گردید ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: شیوع بالای آنزیم‌های ESBL و اینتگرون کلاس I در کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های بالینی نشان داد که به کار گیری سیاست‌ها جهت کنترل عفونت‌های ناشی از باکتری‌های تولیدکننده این عوامل بیماری‌زایی بسیار با اهمیت است.

کلمات کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، دیسک دیفیوژن، ایمپنم، ESBL

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

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۳۱

پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲۹

انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۰۷/۲۵

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM 1395; 10(4): 01-09

نویسنده مسئول:

آقای امین نوروزی

دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی کرمان، کرمان، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۳۵۶۵۶۰۹۸۱

پست الکترونیک:

a_norouzi@kmu.ac.ir

مقدمه

حاصل از باکتری‌های مولد این آنزیم‌ها بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) بسیار مشکل است، چون از یک سو مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین ها مشاهده می‌شود و از سوی دیگر هم‌زمان باعث مقاومت به سایر عوامل ضد میکروبی مثل آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، سولفونامیدها و تتراسایکلین نیز است. این عفونت‌ها رابطه معنی‌داری با میزان مرگ‌ومیر بیماران داشته و بار مالی زیادی را در پی دارند (۳). ژن‌های کد کننده آنزیم‌های ESBL معمولاً بر روی یک پلاسمید کانجوگتیو قرار دارند، اما بیشتر ژن‌های ESBL که اخیراً مطرح شده‌اند به طور مکرر در ساختارهای شبه اینتگرون یافت شده‌اند. بنابراین ژن‌های

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک مشکل اساسی در درمان و کنترل عفونت‌ها می‌باشد و استراتژی‌های مختلفی توسط باکتری‌ها به کار گرفته می‌شود تا از اثرات زیان‌بار آنتی‌بیوتیک‌ها مصون بمانند، یکی از این مکانیسم‌ها که در باکتری‌های گرم منفی علیه آنتی‌بیوتیک‌ها به کار گرفته می‌شود، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشد (۱). این آنزیم‌ها از طریق هیدرولیز حلقه بتالاکتام منجر به ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند (۲). از نمونه این بتالاکتامازها می‌توان به TEM (Temoneira)، CTX-M (Cefotaxime hydrolyzing capabilities) و SHV (Sulphydryl variable) اشاره کرد. درمان عفونت‌های

این‌تگرونها‌های کلاس I و II در ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری

در این مطالعه توصیفی مقطعی ۵۸ نمونه کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان‌های افضل‌پور، شفا، باهنر و سیدالشهدای شهر کرمان از نمونه‌های، زخم، سوختگی و ادرار جداسازی شد و به بخش میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه کرمان انتقال داده شد و سپس با توجه به روش‌های استاندارد تشخیصی و بیوشیمیایی تعیین گونه گردیدند (۵). پس از ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، برای کلنی‌هایی که ویژگی‌های کلنی کلبسیلا پنومونیه را داشتند تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل TSI، SIM، MR-VP، سیترات و اوره در آزمایشگاه گروه میکروب‌شناسی صورت گرفت و باکتری کلبسیلا پنومونیه جداسازی شد. محیط کشت‌های مصرفی از شرکت Merck (آلمان) و Himedia (هند) خریداری شد.

تست تعیین حساسیت دارویی (آنتی‌بیوگرام)

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جداسازی شده به روش استاندارد دیسک CLSI (Clinical and laboratory standard institute) دیفیوژن بر اساس دستورالعمل CLSI سال ۲۰۱۳ انجام شد و آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده شامل دیسک‌های ایمپی پنم (۱۰۰µg)، سفتازیدیم (۳۰۰µg)، جنتامایسین (۱۰۰µg)، کلرامفنیکل (۳۰۰µg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰۰µg)، کوتریموکسازول (۱۲۵/۲۳۷۵µg)، سفتریاکسون (۳۰۰µg)، تتراسایکلین (۳۰۰µg)، آزترونام (۳۰۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰۰µg)، آمپی‌سیلین (۱۰۰µg)، آمیکاسین (۳۰۰µg) و سیپروفلوکساسین (۵۰µg) بودند که از شرکت Himedia هند خریداری شد.

شناسایی فنوتیپی بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)

برای شناسایی ایزوله‌های تولیدکننده ESBLs از تست تاییدی فنوتیپی شامل دیسک‌های ترکیبی سفتازیدیم/کلاولانیک اسید در مقایسه با سفتازیدیم، سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید در مقایسه با سفوتاکسیم، سفودوکسیم/کلاولانیک اسید در مقایسه با سفپیم و سفپیم/کلاولانیک اسید در مقایسه با سفپیم استفاده شد، بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس نمونه‌های تولیدکننده ESBLs دارای قطر هاله عدم رشد به اندازه ۵ میلی‌متر یا بیشتر در اطراف دیسک‌های سفتازیدیم

ESBL می‌توانند بر روی این‌تگرونها قرار گیرند و به راحتی توسط این عناصر ژنتیکی گسترش پیدا کنند (۴). مطالعات مختلف نشان می‌دهند که مقاومت چند دارویی در باکتری‌ها به صورت قابل ملاحظه‌ای در ارتباط با وجود این‌تگرونها و کاست‌های ژنی می‌باشند. این‌تگرونها دارای توالی‌هایی از DNA حفاظت شده بنام *int* می‌باشند که ژن این‌تگراز را کد می‌کنند و باعث انتقال و الحاق کاست‌های ژنی از طریق مکانیسم‌های نوترکیبی در جایگاه ویژه می‌شوند بر اساس تفاوت در سکانس ۵' ناحیه حفاظت شده DNA در این‌تگراز تاکنون چهار گروه اصلی این‌تگرونها در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش شده است و شباهت بین کلاس این‌تگرونها از ۴۵ تا ۵۸ درصد است. کلاس IV این‌تگرونها تنها در ویبریوکلا/ دیده شده است. بنابراین کلاس‌های I، II و III این‌تگرونها از لحاظ مقاومت دارویی بیشتر مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته‌اند، تمام این‌تگرونها دارای ناحیه حفاظت شده (CS3') و حاوی ژن‌های *intI* و *attI* می‌باشند (۵،۶). نقش این‌تگرونها، مخصوصاً این‌تگرونها کلاس I، در گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها در دهه گذشته مطالعه شده است. مطالعات اخیر حضور این‌تگرونها‌های جدید کلاس II را در نمونه‌های بالینی نشان داده است و در نتیجه اهمیت این کلاس از این‌تگرونها به شدت افزایش می‌یابد (۷).

این‌تگرون کلاس I شایع‌ترین این‌تگرونها در بین باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که ناحیه محافظت‌شده 3' آن حاوی ژن‌هایی است که سبب مقاومت به ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی و سولفونامیدها می‌شود. این‌تگرون کلاس II در ترانسپوزون ۷ و مشتقات آن یافت می‌شود. برای تشخیص حضور این‌تگرونها‌های کلاس I و II محققین از دو ناحیه به عنوان نواحی هدف برای شناسایی در باکتری‌ها استفاده کرده‌اند. یکی از این نواحی ژن کدکننده آنزیم این‌تگراز است که هدف خوبی برای شناسایی این‌تگرونها‌های کلاس I و II در نمونه و همچنین تشخیص کلاس این‌تگرونها‌های موجود می‌باشد. یکی دیگر از نواحی مورد استفاده ناحیه متغیر در بین دو ناحیه حفاظت شده در ساختار این‌تگرونهاست. ناحیه متغیر این‌تگرونها محل قرارگیری کاست‌های ژنی می‌باشد که توسط دو ناحیه حفاظت شده CS-3' و CS-5' احاطه شده‌اند (۸). از آنجاییکه اطلاعات محدودی در زمینه ارتباط این‌تگرونها با آنزیم‌های ESBL وجود دارد و به دلیل اهمیت حیاتی که این ژن‌ها در مقاومت دارند هدف از این مطالعه بررسی نقش بااهمیت آنزیم‌های ESBL و

کلاولانیک اسید در مقایسه با سفتازیدیم و یا سفوتاکسیم
کلاولانیک اسید در مقایسه با سفوتاکسیم بودند.

PCR جهت شناسایی ژن های *bla-TEM* *intI* *intII* و *bla-SHV*

پس از تعیین ایزوله هایی که از نظر ESBLs مثبت بودند، DNA نمونه های شناسایی شده به عنوان ESBLs با استفاده از روش جوشاندن جداسازی شد که در این روش مقداری از کلنی های باکتری کلبسیلا پنومونیه را به داخل یک اپندورف حاوی ۱ میلی لیتر آب مقطر انتقال داده شد و یک سوسپانسیون بوجود آمد و سپس اپندورف حاوی سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت و بعد از آن در دستگاه سانتریفیوژ (مدل Sigma کشور آلمان) با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ گردید، محلول رویی حاوی DNA مورد نظر بوده که جهت انجام PCR (Gradient PCR کشور آلمان) استفاده شد.

در این روش با استفاده از کیت Master mix (شرکت آمپیکون دانمارک) PCR را انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده و همچنین اندازه باندهای محصولات بر روی ژل الکتروفورز بر

جدول شماره ۱: توالی پرایمر ها دمای اشکال و محل قرار گیری ژن ها بر روی ژل آگاروز

ژن	توالی پرایمر	محصول باند (bp)	Tm (°C)	رفرنس
<i>bla-SHV</i>	F: TCAGCGAAAAACACCTTG R: TCCCGCAGATAAATCACC	۴۷۱	۵۶	۱۰
<i>bla-TEM</i>	F- GAGTATTCAACATTTCCGTGTC R- TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	۵۶۱	۵۹	۱۰
<i>bla-CTXM</i>	F- CGCTTTGCGATGTGCAG R- ACCGCGATATCGTTGGT	۵۵۰	۵۹	۱۱
<i>intI</i>	F: CAGTGGACATAAGCCTGTTC R: CCCGAGGCATAGACTGTA	۱۶۰	۵۵	۱۲
<i>intII</i>	F: TTGCGAGTATCCTAACCTG R: TTACCTGCACTGGATTAAGC	۷۸۹	۵۵	۱۲

آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۹۴/۸٪) می باشد. همچنین مقاومت به آنتی بیوتیک های کوتریموکسازول (تری متوپریم/سولفومتوکسازول)، آزترونام، سفتریاکسون، سفتازیدیم و سفوتاکسیم (>۵۰٪) در سطح بالایی می باشد و آنتی بیوتیک هایی نظیر نالیدیکسیک اسید، افلوکساسین، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین، آنتی بیوتیک های موثری علیه ایزوله های کلبسیلا پنومونیه بودند. بیشترین مقاومت حد واسط در میان آنتی بیوتیک های مورد بررسی در این مطالعه نسبت به آنتی بیوتیک ایمی پنم مشاهده شد.

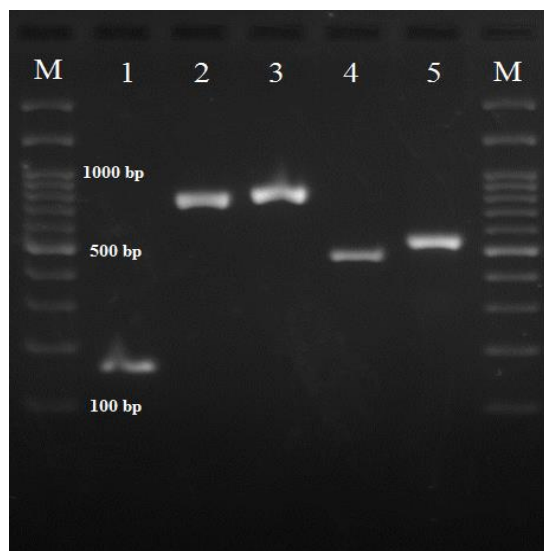
آنالیز داده ها

پس از جمع آوری داده ها، اطلاعات مربوط به هر گونه باکتری وارد نرم افزار SPSS-22 (شرکت نرم نی امریکا) گردید و با استفاده از آزمون آماری Chi-square رابطه بین اطلاعات آنالیز گردید. سطح معنی داری، کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این مطالعه نتایج آنتی بیوگرام نشان می دهد که موثرترین آنتی بیوتیک علیه ایزوله های کلبسیلا پنومونیه آنتی بیوتیک ایمی پنم می باشد بیشترین مقاومت به

مثبت بودند ۳۰ ایزوله دارای اینتگرون کلاس I بودند اما ۳ ایزوله‌ای که دارای اینتگرون کلاس II بودند، در ایزوله‌هایی که فاقد آنزیم ESBL بودند وجود داشتند (جدول ۳). شکل شماره ۱ نشان دهنده محصولات PCR بر روی ژل الکتروفورز می‌باشد.



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های جداسازی شده از کلبسیلا پنومونیه می باشد که چاهک شماره ۱: ژن *intI* (160 bp)، چاهک شماره ۲: ژن *intII* (789 bp)، چاهک شماره ۳: ژن *bla-TEM* (861 bp)، چاهک شماره ۴: ژن *bla-SHV* (471 bp)، چاهک شماره ۵: ژن *bla-CTXM* (550 bp) و M: مارکر را نشان می‌دهد.

بحث

در جهت کاهش هزینه‌های درمانی و شناسایی عوامل مهم بیماری‌زا در بیمارستان و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جهت کنترل شیوع این عوامل، اتخاذ یک استراتژی نوین در درمان و تشخیص این سویه‌ها ضروری می‌باشد. درمان عفونت‌ها، که در سال‌های گذشته به آسانی با آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین قابل درمان بودند، متأسفانه امروزه با کسب انواع مقاومت‌ها از جمله تولید آنزیم‌های ESBL و کاست‌های ژنی بیماری‌زا نظیر اینتگرون‌ها، دارای درمانی مشکل و پر هزینه شده‌اند (۷، ۱۳).

باتوجه به جدول شماره ۲ مقاومت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها در ایزوله‌های تولید کننده ESBL بیشتر از ایزوله‌های فاقد ESBL می‌باشد و همچنین رابطه معنی داری بین ایزوله‌های تولید کننده ESBL و مقاومت به سفالوسپورین‌ها، بتالاکتام، کارباپنم و فلوروکینولون‌ها در این مطالعه مشاهده شد ($P < 0.05$). مقاومت به بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر آزترونام، جنتامایسین، سفتازیدیم، ایمپنم، سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم و کوتریموکسازول در ایزوله‌های تولید کننده ESBL نسبت به ایزوله‌های فاقد آنزیم ESBL بسیار بالاتر می‌باشد. جدول شماره ۲ جزئیات به دست آمده از نتایج آنتی‌بیوگرام در ایزوله‌های تولید کننده ESBL و ایزوله‌های فاقد ESBL و همچنین سطح معنی داری ایزوله‌ها را با مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان می‌دهد. نتایج بدست آمده از تست دیسک ترکیبی جهت شناسایی فنوتیپی ایزوله‌های ESBL نشان داد که ۳۵ ایزوله (۶۰/۳٪) به طور فنوتیپی تولید کننده ESBL بودند. بعد از انجام PCR برای ایزوله‌هایی که از نظر فنوتیپی مثبت بوده مشخص شد تمامی نمونه‌هایی که از لحاظ فنوتیپی مثبت بودند دارای حداقل یک ژن از سه ژن *bla-TEM*، *bla-SHV* و *bla-CTXM* می‌باشند. بیشترین شیوع را در ایزوله‌های تولید کننده ESBL ژن *bla-SHV* به خود اختصاص داد که ۳۳ (۹۴/۲٪) ایزوله از ۳۵ ایزوله تولید کننده ESBL تولید کننده این ژن بودند و کمترین شیوع را ژن *bla-TEM* که در ۲۶ (۷۴/۲٪) از نمونه‌ها مشاهده شد و ۲۱ (۶۰٪) ایزوله‌های تولید کننده ESBL دارای هر سه ژن به *bla-TEM*، *bla-SHV* و *bla-CTXM* بودند. همچنین بررسی ژن‌های *intI* و *intII* نشان داد که ۳۷ (۶۳/۷٪) ایزوله دارای اینتگرون کلاس I بودند، اما تنها ۳ (۵/۱٪) ایزوله از ۵۸ ایزوله مورد مطالعه دارای اینتگرون کلاس II بودند. آنالیز داده‌ها ارتباط معنی داری را بین حضور اینتگرون کلاس I و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمپنم، سفتریاکسون، کوتریموکسازول، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، آزترونام و کلرامفنیکل اثبات نمود ($P < 0.05$). همچنین در این مطالعه ارتباط معنی داری بین اینتگرون کلاس I و II و آنزیم‌های ESBL مشاهده شد ($P < 0.05$) که از ۳۵ ایزوله‌ای که از نظر آنزیم ESBL

جدول شماره ۲: درصد مقاومت ایزوله های کلبسیلا پنومونیه علیه آنتی های مختلف

آنتی بیوتیک	حساس (S)	نیمه حساس (I)	مقاوم (R)	کلبسیلا دارای ESBL	کلبسیلا فاقد ESBL	سطح معنی داری
آمپی سیلین	٪۳/۴	٪۱/۷	٪۹۴/۸	٪۱۰۰	٪۸۶/۹	۰/۰۵
آمیکاسین	٪۷۷/۵	٪۵/۱	٪۱۷/۲	٪۲۸/۵	٪۰/۰	۰/۰۰۶
کوتریموکسازول	٪۳۹/۶	٪۰/۰	٪۶۰/۳	٪۸۸/۵	٪۱۷/۳	۰/۰۰۰
نالیدیکسیک اسید	٪۷۷/۵	٪۶/۸	٪۲۰/۶	٪۳۱/۴	٪۴/۳	۰/۰۲
افلوکساسین	٪۶۵/۷	٪۱/۷	٪۳۲/۴	٪۴۷/۸	٪۷/۱	۰/۰۲
کلرامفنیکل	٪۶۰/۴	٪۳/۴	٪۳۶/۱	٪۴۷/۸	٪۱۴/۲	۰/۰۳
آزوترونام	٪۴۵/۹	٪۰/۰	٪۵۴	٪۶۹/۹	٪۰/۰	۰/۰۰۰
جنتامایسین	٪۵۱/۷	٪۰/۰	٪۴۸/۲	٪۸۰	٪۰/۰	۰/۰۰۰
تتراسیکلین	٪۵۹/۴	٪۱/۷	٪۳۸/۸	٪۴۷/۸	٪۲۱/۴	۰/۰۲
سفترایکسون	٪۴۱/۳	٪۰/۰	٪۵۸/۶	٪۹۴/۲	٪۴/۳	۰/۰۰۰
سفتازیدیم	٪۴۳/۲	٪۰/۰	٪۵۶/۷	٪۹۱/۳	٪۰/۰	۰/۰۰۰
سیپروفلوکساسین	٪۷۷/۵	٪۵/۱	٪۱۷/۲	٪۲۸/۵	٪۰/۰	۰/۰۰۴
سفوتاکسیم	٪۳۴/۴	٪۳/۴	٪۶۲	٪۹۷/۱	٪۸/۶	۰/۰۰۰
ایمی پنم	٪۷۵/۸	٪۸/۶	٪۱۵/۵	٪۲۵/۷	٪۰/۰	۰/۰۰۱

جدول شماره ۳: ارتباط ژن های اینتگرون در ایزوله های تولید کننده و فاقد ESBLs

مجموع	ایزوله های فاقد ESBLs	ایزوله های دارای ESBLs	SHV	CTX-M	TEM
ژن <i>intI</i>	۳۷	۷	۳۰	۲۷	۲۳
ژن <i>intII</i>	۳	۳	۰	۰	۰

توجهی وجود داشت که این اطلاعات مشابه نتایج بدست آمده از این مطالعه می باشد (۱۶). با توجه به اینکه در مطالعات چند سال گذشته مقاومتی به آنتی بیوتیک ایمی پنم در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه دیده نشد یا این میزان مقاومت به این آنتی بیوتیک بسیار پایین بود و همچنین مقاومت به سفالوسپورین ها بسیار کمتر از این مطالعه بود، اطلاعات بدست آمده از آنتی بیوگرام در این مطالعه، نشان می دهد که مقاومت به این آنتی بیوتیک ها در حال افزایش می باشد.

همچنین برخی از مطالعات در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه نشان می دهد که مقاومت به اکثر آنتی بیوتیک ها نظیر کینولون ها، فلوروکینولون ها و بتالاکتام ها، در ایزوله های تولید کننده ESBL بیشتر از سویه های فاقد ESBL است که این نتایج با نتایج به دست آمده از این مطالعه دارای مطابقت می باشد (۱۵، ۱۷).

در این مطالعه ۳۵ ایزوله (٪۶۰/۳) تولید کننده ESBL بودند و بیشترین شیوع را در ایزوله های تولید کننده ESBL ژن *bla-SHV* به خود اختصاص داد. مطالعات زیادی در سراسر جهان و نقاط مختلف ایران در زمینه شیوع و فراوانی ژن های ESBL انجام شده است که نشان می دهد شیوع این آنزیم ها در نقاط

در این مطالعه تعیین الگوی مقاومتی نشان داد که موثرترین آنتی بیوتیک علیه ایزوله های کلبسیلا پنومونیه آنتی بیوتیک ایمی پنم و بیشترین مقاومت به آمپی سیلین می باشد. همچنین مقاومت به آنتی بیوتیک های کوتریموکسازول، آزترونام، سفترایکسون، سفتازیدیم و سفوتاکسیم در سطح بالایی است. همچنین در این مطالعه، مقاومت به تمامی آنتی بیوتیک ها در ایزوله های تولید کننده ESBL بیشتر از ایزوله های فاقد ESBL می باشد. مطالعات زیادی در ایران و سایر نقاط جهان صورت گرفت که مشابه با اطلاعات به دست آمده از این مطالعه می باشد. در مطالعه ای که توسط Feizabadi و همکاران در سال ۲۰۱۰ صورت گرفت نشان داده شد تمامی (٪۱۰۰) نمونه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده به آنتی بیوتیک ایمی پنم حساس بودند و موثرترین آنتی بیوتیک علیه این ایزوله ها ایمی پنم می باشد (۱۴). همچنین در مطالعه ای که توسط Ghaforian و همکاران در سال ۲۰۱۱ در شهر تهران صورت گرفت موثرترین آنتی بیوتیک ایمی پنم اعلام شد (۱۵). در مطالعه ای که در هند توسط Subha و همکاران انجام شد تمامی نمونه های کلبسیلا پنومونیه حساس به ایمی پنم بودند و مقاومت به سفالوسپورین ها، در سطح قابل

و همکاران در اسپانیا انجام شد این محققین نیز به ارتباط بین اینتگرون و ESBL اشاره نمودند (۳). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Machado و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام شد این محققین نیز ارتباط بین ESBL و اینتگرون را اثبات نمودند (۲۳). در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که آنزیم‌ها می‌توانند بر روی اینتگرون قرار گیرند و به آسانی در میان باکتری‌های گرم منفی انتقال یابند.

باتوجه به الگوی مقاومتی مختلفی که کلبسیلا پنومونیه در سراسر جهان از خود نشان می‌دهد، درمان آنتی‌بیوتیکی علیه این باکتری‌ها متفاوت و بر اساس شواهد مقاومتی همان منطقه می‌باشد. در این مطالعه شیوع بالای آنزیم‌های ESBL و اینتگرون کلاس I در کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های بالینی نشان می‌دهد که به کارگیری سیاست‌ها جهت کنترل عفونت بسیار با اهمیت است، زیرا مقاومت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر آمپی سیلین و کوتریموکسازول بسیار بالا و این داروها از لیست درمانی علیه کلبسیلا پنومونیه خارج شده است. همچنین به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، ظهور این عوامل بیماری‌زایی باعث مشکلات فراوان در درمان و ایجاد عفونت‌های مقاوم قابل انتقال در میان باکتری‌ها شده است، بنابراین آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی تشخیصی باید تکنیک‌های مناسبی برای شناسایی این عوامل بیماری‌زا داشته باشند. در نهایت پیشنهاد می‌شود با انجام مطالعات مولکولی و اپیدمیولوژی در زمینه شیوع و شناسایی آنزیم‌های ESBL و اینتگرون‌ها و ارتباط این ژن‌ها با عفونت‌ها تا حدودی بتوان از عوارض این عوامل بیماری‌زا جلوگیری نمود.

تقدیر و تشکر

در این مطالعه مراتب قدردانی و تشکر خود را از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به دلیل حمایت مالی و اجرایی اعلام می‌داریم.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

مختلف جغرافیای حتی در شهرهای مختلف یک کشور نیز متفاوت می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Ghaforian و همکاران در سال ۲۰۱۱ در تهران انجام شد این محققین اعلام نمودند که ۷۴٪ از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه دارای آنزیم‌های ESBL بودند (۱۵) این در حالی است که Mashouf و همکاران در سال ۲۰۱۴ در همدان نشان دادند که میزان شیوع کلبسیلا پنومونیه های تولید کننده ESBLs ۴۶/۷٪ بودند (۱۷). همچنین مطالعه‌ای که در ترکیه توسط Aladag و همکاران بر روی ۸۷ سویه کلبسیلا پنومونیه صورت گرفت نشان داد که ۴۴ درصد از این سویه‌ها دارای ESBLs بودند (۱۸). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ توسط Lee و همکاران انجام شد از ۲۱۸ ایزوله کلبسیلا پنومونیه ۹۲ (۴۲/۲٪) ایزوله‌ها دارای آنزیم ESBL بودند (۱۹) مطالعات مختلف نشان می‌دهد که شیوع آنزیم‌های ESBL در نقاط مختلف جغرافیایی جهان و حتی در نقاط مختلف یک کشور متفاوت است در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه افزایش چشمگیری داشته است.

بررسی وجود ژن‌های *intI* و *intII* در این مطالعه نشان داد که ۳۷ (۶۳/۷٪) ایزوله دارای اینتگرون کلاس I بودند، اما تنها ۳ (۵/۱٪) ایزوله از ۵۸ مورد مطالعه دارای اینتگرون کلاس II بودند. Rao و همکارانش در بیمارستان‌های ایالت متحده آمریکا، درصد شیوع ژن اینتگرون کلاس I را در کلبسیلا، ۷۰ درصد گزارش کردند که مقاومت به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین، توبرامایسین، سفپودوکسیم، سفتازیدیم و کوتریموکسازول و حضور اینتگرون کلاس I ارتباط وجود داشت (۲۰). در مطالعه‌ای که توسط Rnajarbaran و همکاران در مازندران بر روی نمونه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه انجام شد ۹۰٪ از نمونه‌ها دارای اینتگرون کلاس I و ۲٪ آن‌ها دارای اینتگرون کلاس II بودند (۲۱). در مطالعه‌ای که توسط Chang و همکارانش روی ایزوله‌های کلبسیلا صورت گرفت فراوانی اینتگرون کلاس I ۳۴/۲٪ گزارش شده است (۲۲).

باتوجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه ارتباط معنی داری بین حضور اینتگرون کلاس I و II و ایزوله‌های تولید کننده ESBL وجود داشت، در مطالعه‌ای که توسط Sturenburg

References

- Pitout JD. Infections with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Drugs*. 2010;70(3):313-33.
- Chaudhary B, Insan NG, Payal N. ESBL & AmpC detection in Klebsiella species by Non Molecular methods. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2014;3(4):323-9.
- Sturenburg E, Mack D. Extended spectrum beta-lactamases: implication for the clinical microbiology, therapy and infection control. *J Infect* 2003;47(4):273-95.
- Machado E, Cantón R, Baquero F, Galán J-C, Rollán A, Peixe L, et al. Integron content of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(5):1823-9.
- Chowdhury PR, Ingold A, Vanegas N, Martínez E, Merlino J, Merkier AK, et al. Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(7):3140-9.
- Rezaee MA, Langarizadeh N, Aghazadeh M. First report of class 1 and class 2 integrons in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from northwest Iran. *Japanese journal of infectious diseases*. 2012;65(3):256-9.
- Ravi A, Avershina E, Ludvigsen J, L'Abée-Lund TM, Rudi K. Integrons in the intestinal microbiota as reservoirs for transmission of antibiotic resistance genes. *Pathogens*. 2014;3(2):238-48.
- Taherikalani M, Maleki A, Sadeghifard N, Mohammadzadeh D, Soroush S, Asadollahi P, et al. Dissemination of class 1, 2 and 3 integrons among different multidrug resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran hospitals. *Iran Pol J Microbiol*. 2011;60(2):169-74.
- Pakzad I, Ghafourian S, Taherikalani M. Qnr prevalence in extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) and none-ESBLs producing *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in central of Iran. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2011;14(5):458.
- Zaniani FR, Meshkat Z, Nasab MN, 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*. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2012;15(1):654.
- Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, Boyer M, Chanal C, Sirot D, et al. CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14 β -lactamases from Enterobacteriaceae isolated in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(2):534-7.
- Yan Z-Q, Shen D-X, Cao J-R, Chen R, Wei X, Liu L-P, et al. Susceptibility patterns and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from three military hospitals in China. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;35(3):269-73.
- Marty I, Jarlier V. Surveillance des bacteries muliresistantes:Justification, role du laboratoire, indicatorurs, donnees franciases reentes, progress en Urlogie1999; 9: 41-49.
- Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, et al. Distribution of bla TEM, bla SHV, bla CTX-M genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. *Microbial drug resistance*. 2010;16(1):49-53.
- Ghafourian S, bin Sekawi Z, Sadeghifard N, Mohebi R, Neela VK, Maleki A, et al. The prevalence of ESBLs producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in some major hospitals, Iran. *The open microbiology journal*. 2011;5:91.
- Subha A, Ananthan S. Extended spectrum beta lactamase (ESBL) mediated resistance to third generation cephalosporins among *Klebsiella pneumoniae* in Chennai. *Indian journal of medical microbiology*. 2002;20(2):92.
- R. Yousefi Mashouf et al. Study of Antibiotic Resistance Pattern and Phenotypic Detection of ESBLs in *Klebsiella Pneumoniae* Strains Isolated from Clinical Samples and Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Imipenem and Ceftazidim Antibiotics. *Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences*. 2014; 20: 295-302.
- Aladag MO, Durak Y, Uysal A. Investigation of imipenem and meropenem suseptibilities, plasmid profiles and ESBL characteristic of *klebsiella pneumoniae*. Isolated from urinary tract infections. *World Applied Sciences Journal* 2009; 7(3): 378-81.
- Lee MY, Ko KS, Kang C-I, Chung DR, Peck KR, Song J-H. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. *International journal of antimicrobial agents*. 2011;38(2):160-3.

20. Rao AN, Barlow M, Clark LA, Boring III JR, Tenover FC, McGowan Jr JE. Class 1 integrons in resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.*, US hospitals. Emerging infectious diseases. 2006;12(6):1011-4.
21. Ranjbaran M, Zolfaghari M, Japoni-Nejad A, Amouzandeh-Nobaveh A, Abtahi H, Nejad M, et al. Molecular investigation of integrons in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2013;23(105):2.
22. Chang C-Y, Fang Y-T, Tsai S-M, Chang L-L, Yu W-L. Characterization of class 1 integrons and gene cassettes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Taiwan. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2009;65(2):214-216.
23. Machado E, Ferreira J, Novais Â, Peixe L, Cantón R, Baquero F, et al. Preservation of integron types among Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(6):2201-4.