

## Correlation of Antibiotic Resistance with SHV, CTX-M and TEM Extended-Spectrum Beta Lactamases Genes among *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Patients in Kermanshah Hospitals

Sarvazad H<sup>1</sup>, Darbouy M<sup>1\*</sup>

1. Department of Cellular and Molecular Biology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran

\*Corresponding author. Tel: +987136410041, Fax: +987136410059, E-mail: mojtabadarbouy@gmail.com

Received: Aug 21, 2017      accepted: Feb 18, 2017

### ABSTRACT

**Background & objectives:** One of the main problems in the control of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* is increase of antimicrobial resistance and prevalence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLs) producing isolates. The aim of this study was to investigate the correlation of antibiotics resistance with SHV, CTX-M and TEM extended-spectrum beta lactamases genes among *Klebsiella pneumoniae* isolates isolated from the patients in Kermanshah hospital.

**Methods:** The clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* were collected during the spring from Kermanshah hospitals, and identification of *Klebsiella pneumoniae* strains was performed using standard microbiological and biochemical tests. Antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolates was determined using disk diffusion method. Then, the presence of CTX-M, SHV, and TEM was investigated using multiplex-PCR method. Finally, the relationship between variables was analyzed by SPSS-22 software using logistic regression and chi-square.

**Results:** A total of 98 isolates out of 112 samples were identified as *Klebsiella pneumoniae*. Also, 82.8% of isolates were resistant to cefotaxime, 40.2% to ceftriaxone, 62.88% to ceftazidime, 3.9% to imipenem, 39.17% to cefepime, 64.94% to cefixime and 26.8% to amikacin. Further, 35.55% of isolates had CTX-M gene, 63.91% of isolates had SHV gene and 9.27% of samples had TEM gene.

**Conclusion:** The presence of CTX-M, SHV and TEM genes along with high antibiotic resistance are very concerning, indicating the importance of rational use of antibiotic for the treatment of infectious diseases.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*; Extended-Spectrum Beta Lactamase; Antibiotic Resistance; CTX-M; TEM; SHV

## بررسی ارتباط مقاومت آنتی‌بیوتیکی با حضور ژن‌های بتالاکتاماز طیف وسیع CTX-M، SHV و TEM در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری‌شده از بیماران بیمارستان‌های کرمانشاه در سال ۱۳۹۵

حسنا سروآزاد<sup>۱</sup>، مجتبی داریبوی<sup>۱\*</sup>

۱. گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران  
\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۷۱۳۶۴۱۰۰۴۱، فاکس: ۰۷۱۳۶۴۱۰۰۵۹، پست الکترونیک: mojtabadarbouy@gmail.com

### چکیده

**زمینه و هدف:** یکی از مشکلات عمده در کنترل عفونت‌های بیمارستانی ناشی از کلبسیلا پنومونیه بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و شیوع سویه‌های دارای ژن‌های بتالاکتاماز با طیف اثر گسترده می‌باشد. هدف از این مطالعه تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی حضور ژن‌های SHV، CTX-M و TEM در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده از نمونه‌های مختلف بالینی به روش PCR می‌باشد.

**روش کار:** جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان‌های مختلف شهرستان کرمانشاه در طی فصل بهار جمع‌آوری شد و تعیین هویت سویه‌های کلبسیلا پنومونیه با کمک تست‌های استاندارد میکروب‌شناسی و بیوشیمیایی انجام گرفت. سپس تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه با روش انتشار دیسک انجام شد. در نهایت با کمک روش Multiplex-PCR حضور ژن‌های SHV، CTX-M و TEM مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** ۹۷ نمونه از ۱۱۲ نمونه بالینی جمع‌آوری شده به عنوان کلبسیلا پنومونیه شناسایی شد. ۶۰/۸۲ درصد جدایه‌ها مقاوم به سفوتاکسیم، ۴۰/۲ درصد جدایه‌ها مقاوم به سفتریاکسون، ۶۲/۸۸ درصد جدایه‌ها مقاوم به سفتازیدیم، ۳/۰۹ درصد جدایه‌ها مقاوم به ایمی‌پنم، ۳۹/۱۷ درصد جدایه‌ها مقاوم به سفپیم، ۶۴/۹۴ درصد جدایه‌ها مقاوم به سفکسیم، ۲۶/۸ درصد جدایه‌ها مقاوم به آمیکاسین بودند. ۳۵/۰۵ درصد جدایه‌ها دارای ژن CTX-M و ۶۳/۹۱ درصد جدایه‌ها دارای ژن SHV و ۹/۲۷ نمونه دارای ژن TEM می‌باشد. در نهایت ارتباط بین متغیرها توسط نرم‌افزار SPSS-22 با آزمون رگرسیون لجستیک و مربع کای<sup>۱</sup> بررسی گردید.

**نتیجه‌گیری:** حضور ژن‌های SHV، CTX-M و TEM همراه با مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی بسیار نگران‌کننده است که اهمیت درمان منطقی آنتی‌بیوتیکی را مورد توجه قرار می‌دهد

**واژه‌های کلیدی:** کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتاماز با طیف اثر گسترده، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن‌های SHV، TEM و CTX-M

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۳۰

دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰

### مقدمه

یکی از نگرانی‌های مهم برای سلامت انسان افزایش روز افزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های فرصت‌طلب می‌باشد. یکی از پاتوژن‌های فرصت‌طلب که باعث ایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌شود؛ کلبسیلا پنومونیه است. این باکتری با کسب ژن‌های

کدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs)<sup>۱</sup> نسبت به بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز از عوامل باکتریکش هستند [۱]. تمامی داروهای بتالاکتاماز، مهارکننده‌های انتخابی سنتز دیواره سلولی بوده و بنابراین علیه باکتری‌های در حال رشد فعال هستند [۲]. دفاع اصلی باکتری‌های

<sup>۱</sup> ESBLs: Extended-Spectrum Beta-Lactamase

بتالاکتاماز TEM رایجترین بتالاکتاماز در باکتری‌های گرم منفی است [۱۴] و اولین بار در گونه اشیریشیا کلی جدا شده از کشت خون بیماری یونانی به نام Temoniera یافت گردید و از این رو TEM-I نامیده شد. TEM-2 اولین مشتق TEM-1 است دارای یک جایگزین اسید آمینه از بتالاکتاماز اصلی است [۱۳]. که در نقطه ایزو الکتریک، انتقالی از ۵/۴ به ۵/۶ صورت می‌گیرد، اما در جایگاه فعال آنزیم تغییری مشاهده نمی‌شود. TEM-3 که در ابتدای سال ۱۹۸۹ گزارش گردید. اولین بتالاکتاماز از نوع TEM است که نمایانگر فنوتیپ ESBL است. در طی این سال‌ها، از زمان رسیدن اولین گزارش تاکنون بیش از ۹۰ مشتق دیگر TEM مشخص گردیده است [۱۲]. پلاسמיד و ترانسپوزون گسترش TEM به سایر گونه‌های باکتری را تسهیل می‌نمایند. تنها پس از گذشت چند سال از زمان مشاهده اولین جدایه، بتالاکتاماز TEM-I در سرتاسر جهان گسترش یافت و امروزه آن را در بسیاری از گونه‌های مختلف باکتریایی از قبیل سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتریاسه، هموفیلوس آنفلوانزا، نایسریا گونوره آ می‌توان یافت [۱۳].

این آنزیم اغلب به‌صورت پلاسמידی وجود دارد و سبب مقاومت به پنی‌سیلین و سفالوسپورین‌های اولیه نظیر سفالوتین و سفالوریدین می‌گردد [۱۴]. کلبسیلا پنومونیه در اوروفارنکس افراد طبیعی به میزان ۶-۱ درصد وجود دارد ولی در بیماران بستری در بیمارستان این میزان تا ۲۰ درصد افزایش می‌یابد [۱۰] و باعث پنومونی، عفونت خونی و عفونت‌های دستگاه ادراری می‌شود. در دهه‌های اخیر به‌علت مصرف بی‌رویه و ناصحیح آنتی‌بیوتیک‌ها شاهد ظهور و گسترش جدایه‌های مقاوم کلبسیلا پنومونیه هستیم هدف از انجام این مطالعه بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ارتباط آن با حضور ژن‌های بتالاکتاماز طیف وسیع CTX-M، SHV و TEM جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه گردآوری شده از بیماران بیمارستان‌های شهرستان کرمانشاه می‌باشد.

گرم منفی در مقابل این آنتی‌بیوتیک‌ها، تولید بتالاکتاماز می‌باشد [۳]. بتالاکتامازها آنزیم‌هایی هستند که توسط بعضی از باکتری‌ها تولید شده و با شکستن حلقه lactam- خاصیت باکتریوسیدی بتالاکتام‌ها را غیر فعال می‌کند [۴]. اکثر ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه کد کننده بتالاکتامازهای CTX-M، SHV و TEM می‌باشند [۵،۶]. بتالاکتامازهای CTX-M به صورت تکاملی به خانواده‌های TEM و SHV ارتباط ندارند؛ آنها به وسیله پلاسמידها از آنزیم‌های Ampc گونه‌های کلویورا کسب شده اند [۷]. آنزیم‌های CTX-M به ۵ گروه اصلی تقسیم می‌شوند: الف\_ گروه ۱ و ۳ شامل انواع CTX-M-1,3,10,12,15,22,23,28, ب\_ گروه ۲ شامل انواع CTX-M-2,4,5,6,7,20، ج\_ گروه ۸ شامل CTX-M-8، د\_ گروه ۹ شامل انواع CTX-M-9,13,14,16,17,19,21,24,27 و ه\_ گروه ۲۵ شامل CTX-M-25,26 می‌باشد [۸-۱۰]. عموماً اعضای خانواده CTX-M، سفوتاکسیم و سفتریاکسون را بهتر از سفتازیدیم هیدرولیز می‌کنند. آنها به وسیله تازوباکتام بیشتر از اسید کلاوولانیک مهار می‌شوند [۷].

بتالاکتاماز SHV در کلبسیلا پنومونیه اغلب به‌صورت کروموزومی در تعداد محدودی از باکتری‌ها همچون اشیریشیا کلی و سالمونلا انتریکا سروواریته تیغی‌موریوم یافت می‌شوند [۱۱،۸]. بتالاکتاماز SHV مسبب ۲۰ درصد مقاومت پلاسמידی آمپی‌سیلین مشاهده شده در این گونه است [۱۲]. اولین آنزیمی که قابلیت هیدرولیز بتالاکتام‌های جدید را داشت، SHV-I بود که در یک گونه کلبسیلا اوزونا جدا شده در آلمان یافت گردید. مشتقات نسبتاً کمی از SHV-1 وجود دارد [۱۲]. به علت افزایش طیف فعالیت این آنزیم‌ها خصوصاً برای مقابله با اکسی‌مینو- سفالوسپورین‌ها، آنها را بتالاکتامازهای با طیف اثر گسترده می‌نامند. این بتالاکتامازها در سرتاسر جهان در بسیاری از جنس‌های مختلف انتروباکتریاسه و سودوموناس آئروژینوزا یافت می‌شوند [۱۳].

## روش کار

## نمونه‌های بالینی و تست‌های تشخیصی

در این مطالعه ۱۱۲ نمونه بالینی از زخم، خون، ادرار، مدفوع و ترشحات ریه افراد مشکوک به عفونت کلبسیلا پنومونیه در بهار سال ۱۳۹۵ از بیمارستان‌های کرمانشاه جمع‌آوری شد. جداسازی و شناسایی کلبسیلا پنومونیه با استفاده از تست‌های باکتری‌شناسی و بیوشیمیایی صورت گرفت. ابتدا نمونه‌های جمع‌آوری شده توسط روش‌های میکروبی‌شناسی غنی‌سازی شدند و بر روی محیط کشت‌های EMB و بلاد آگار کشت داده شدند. ظاهر کلنی‌های رشد کرده مورد بررسی قرار گرفت. سپس رنگ آمیزی گرم انجام شد. در نهایت کلنی‌هایی که از لحاظ ظاهری شبیه به کلبسیلا بوده وارد مراحل شناسایی شدند و تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، سیترات، اندول، اوره‌آز، MRVP، TSI بر روی آنها انجام شد. همچنین هر کلنی در دو دمای ۴۴/۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد (کلبسیلا پنومونیه زیرگونه پنومونیه در هر دو دما رشد می‌کند).

## حساسیت‌های آنتی‌بیوتیکی

سپس تست حساسیت ضد میکروبی توسط روش انتشار دیسک با استانداردهای CLSI<sup>۱</sup> انجام شد. دیسک‌های سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم، ایمپنم، سفپیم، سفکسیم، آمیکاسین، جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید، سفپودوکسیم، نیتروفورانتوئین مورد استفاده قرار گرفت.

## تست Multiplex-PCR

برای تمامی ۹۷ سویه جداسازی شده تست PCR انجام شد. برای انجام تست Multiplex-PCR ابتدا DNA به کمک کیت سیناژن استخراج گردید. DNA استخراج شده جهت شناسایی ژن‌های CTX-M، SHV و TEM با کمک روش Multiplex-PCR مورد استفاده قرار گرفت. غلظت مواد مورد استفاده در

واکنش به ترتیب: PCR Master mixed به میزان ۱۲/۵، آب مقطر ۴/۵، هر یک از پرایمرها ۱، DNA الگو ۲ می‌باشد. واکنش PCR با دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه (واسرشته‌سازی اولیه) آغاز شد، سپس ۳۵ سیکل PCR به ترتیب واسرشته‌سازی ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸°C به مدت ۲ و طویل‌سازی در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت و در نهایت یک مرحله طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصول حاصل از واکنش PCR در آگارز ۱ درصد به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد. جهت تعیین اندازه محصول PCR از مارکر ۱۵۰۰ bp استفاده شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در PCR [۱۵].

اندازه قطعات	توالی پرایمر (۵' ۳')
۷۵۹bp	CTX-M-F ACGCTGTTGTTAGGAAGTG CTX-M-R TTGAGGCTGGGTGAAGT
۹۲۸ bp	SHV-F GGGTTATTCTTATTTGTCGC SHV-R TTAGCGTTGCCAGTGCTC
۱۰۸۰ bp	TEM-F ATAAAATTCTGAAGACGAAA TEM-R GACAGTTACCAATGCTTAATCA

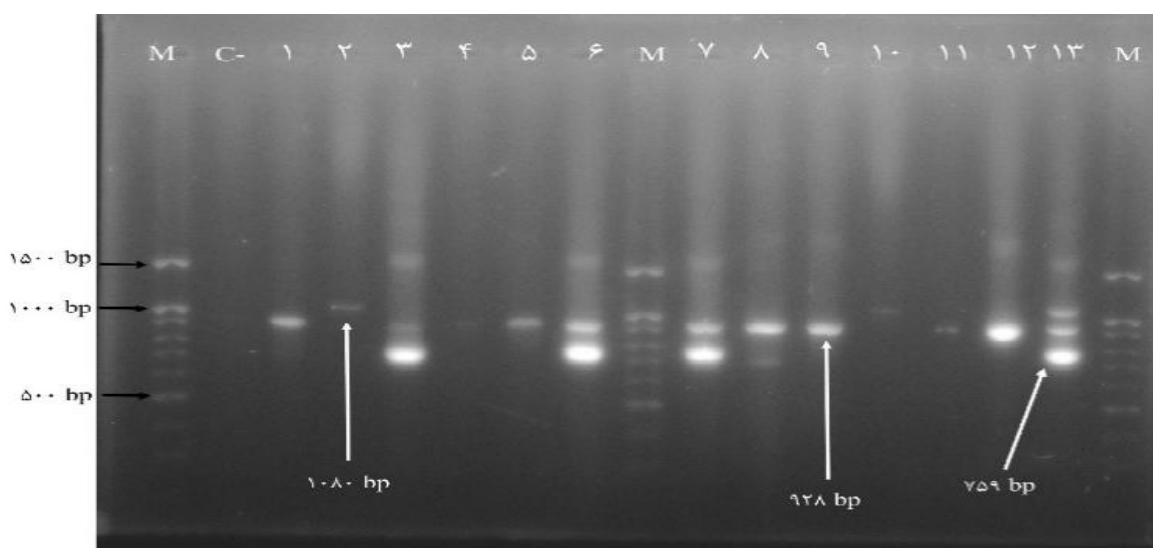
## یافته‌ها

۹۷ نمونه از ۱۱۲ نمونه بالینی جمع‌آوری شده به عنوان کلبسیلا پنومونیه شناسایی شد. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به نالیدیکسیک اسید با میزان ۷۴/۲۲ درصد و سپس سفکسیم با ۶۴/۹۴ درصد بود. کمترین میزان مقاومت نیز مربوط به ایمپنم با مقدار ۳/۰۹ درصد بود (جدول ۲). نتایج تست PCR ۹۷ سویه جداسازی شده به این صورت است: از میان ۹۷ سویه مورد بررسی ۳۴ سویه (۳۵/۰۵٪)، ۹ سویه (۹/۲۷٪) و ۶۲ سویه (۶۳/۹۱٪) به ترتیب دارای ژن CTX-M، TEM و SHV بودند. ۲ سویه به صورت همزمان دارای ژن‌های CTX-M و TEM بودند (۲/۰۶٪). تعداد ۲۴ سویه به صورت همزمان دارای ژن‌های CTX-M و SHV بودند (۲۴/۷۴٪). تعداد ۳ سویه به صورت همزمان دارای ژن‌های SHV و TEM بودند (۳/۰۹٪). تعداد ۲ سویه

<sup>۱</sup> CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

سنجیده شد،  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد. در جدول ۳  $p$ -value برای تک تک آن‌ها آورده شده است. میان حضور ژن CTX-M و سفوتاکسیم، سفتریاکسون، ایمی‌پنم، سفپیم، سفکسیم آمیکاسین و جنتامایسین، میان ژن TEM و سفکسیم و همچنین میان ژن SHV و سفپیم، آمیکاسین و جنتامایسین رابطه معنی‌دار یافت شد (جدول ۳).

به صورت همزمان دارای ژن‌های CTX-M، TEM و SHV بودند (۲/۰۶٪). یکی از اهداف این مطالعه بررسی ارتباط بین حضور ژن‌های CTX-M، TEM و SHV با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج بود. در این مرحله با استفاده از آزمون‌های مربع کای و فیشر رابطه بین حضور ژن‌های CTX-M، TEM و SHV و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها با محاسبه  $p$ -value



شکل ۱. ژل الکتروفورز. سایز باندهای ژن CTX-M ۷۵۹ bp، سایز باندهای ژن TEM ۱۰۸۰ bp، سایز باندهای ژن SHV ۹۲۸ bp می‌باشد. چاهک M معرف 1500bp ladder جفت بازی، چاهک C معرف کنترل منفی و چاهک‌های ۱ تا ۱۳ معرف محصول Multiplex-PCR هر سه ژن است.

جدول ۲. نتایج تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیک به روش انتشار دیسک

آنتی‌بیوتیک	حساس - تعداد (%)	نیمه حساس - تعداد (%)	مقاوم - تعداد (%)
سفوتاکسیم	۳۰ (۳۰/۹۲)	۸ (۸/۲۴)	۵۹ (۶۰/۸۲)
سفتریاکسون	۵۴ (۵۵/۶۷)	۴ (۴/۱۲)	۳۹ (۴۰/۳)
سفتازیدیم	۳۴ (۳۵/۰۵)	۲ (۲/۰۶)	۶۱ (۶۲/۸۸)
ایمی‌پنم	۹۴ (۹۶/۹۰)	۰	۳ (۳/۰۹)
سفپیم	۵۸ (۵۹/۷۹)	۱ (۱/۰۳)	۳۸ (۳۹/۱۷)
سفکسیم	۳۴ (۳۵/۰۵)	۰	۶۳ (۶۴/۹۴)
آمیکاسین	۵۵ (۵۶/۷)	۱۶ (۱۶/۴۹)	۲۶ (۲۶/۸)
جنتامایسین	۶۶ (۶۸/۰۴)	۰	۳۱ (۳۱/۹۵)
نالییدیسیک اسید	۲۰ (۲۰/۶۱)	۵ (۵/۱۵)	۷۲ (۷۴/۲۲)
سفیدوکسیم	۴۵ (۴۶/۳۹)	۳ (۳/۰۹)	۴۹ (۵۰/۵۱)
نیتروفورانئوئین	۶۹ (۷۱/۱۳)	۲ (۲/۰۶)	۲۶ (۲۸/۸)

جدول ۳. مقدار p value برای تعیین رابطه‌ی بین حضور ژن‌ها

SHV	TEM	CTX-M	آنتی‌بیوتیک
۰/۵۷۷	۰/۳۰۸	۰/۰۰۱	سفتوآکسیم
۰/۹۷۵	۰/۱۵۱	<۰/۰۰۱	سفتریاکسون
۰/۳۸۴	۰/۴۷۷	۰/۵۴۳	سفتازیدیم
۰/۲۹۵	۰/۹۹۹	۰/۰۴۱	ایمی‌پنم
۰/۰۰۴	۰/۰۸۵	۰/۰۰۴	سفپیم
۰/۹۰۵	۰/۰۲۵	<۰/۰۰۱	سفکسیم
<۰/۰۰۱	۰/۱۰۷	<۰/۰۰۱	آمیکاسین
<۰/۰۰۱	۰/۰۵۴	<۰/۰۰۱	جنتامایسین
۰/۶۳۶	۰/۶۹۱	۰/۵۴۷	نالییدیسیک اسید
۰/۵۷۷	۰/۹۹۹	۰/۷۲۶	سفپودوکسیم
۰/۸۵۶	۰/۹۹۹	۰/۱۶۵	نیتروفورانتوئین

\*  $p < 0.05$  معنی دار و  $p > 0.05$  معنی دار نبودن رابطه بین حضور ژن و مقاومت به آنتی‌بیوتیک را نشان می‌دهد.

## بحث

حضور ESBLها و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی دیگر در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و همچنین انتقال همزمان آن‌ها به سویه‌های دیگر در شهرستان کرمانشاه بالا بوده که این امر نشان‌دهنده اهمیت درمان آنتی‌بیوتیکی منطقی، جلوگیری از گسترش این سویه‌ها در بیمارستان‌ها و درک پیامدهای بالینی ناشی از عفونت با ارگانیزم‌های مولد ESBL می‌باشد. بر اساس مطالعات دیگر قابل توجه است که همه ارگانیزم‌های مولد ESBL به صورت قابل توجهی فقط به کاربامپنم‌ها حساس باقی مانده‌اند [۱۶]. مطالعات و گزارش‌های متعددی در خصوص افزایش و شیوع رو به رشد ارگانیزم‌های مولد ESBL از مناطق مختلف در کشور وجود دارد. به نحوی که افزایش شیوع ارگانیزم‌های مولد ESBL باعث ایجاد نگرانی شده است. کاربامپنم‌ها به عنوان عوامل دارویی مناسب به منظور درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی دارای مقاومت چند دارویی مطرح می‌باشند [۱۷]. خوشبختانه مقاومت نسبت به کاربامپنم‌ها در کشور در بین اعضای خانواده انتروباکتریاسه در میزان پائینی قرار داشته و درمان موفق عفونت‌های مختلف با استفاده از این عوامل در بالین گزارش می‌گردد [۱۸]. همچنین بر اساس نتایج

مطالعه حاضر می‌توان پیشنهاد نمود که آنتی‌بیوتیک‌هایی از قبیل آمیکاسین و جنتامایسین نیز علاوه بر آنتی‌بیوتیک‌های دسته کاربامپنم‌ها می‌تواند در درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیزم‌ها در بالین مفید باشند.

در کل دیده می‌شود اگر رابطه‌ای بین حضور ژن‌های ESBL و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها وجود داشته باشد از نوع مستقیم بوده و فقط در رابطه با ارتباط بین حضور ژن CTX-M و مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفکسیم به صورت معکوس بود؛ بنابراین می‌توان گفت که ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و ژن‌های ESBL مورد بررسی ممکن است توسط مکانیزم‌های مختلف انتقال ژن (ترانسفورمیشن، ترانسداکشن، کانجیوگیشن ترانسپوزیشن)<sup>۱</sup> در بین سویه‌های مختلف گسترش یابند. این امکان دارد که به عنوان مثال ژن مربوط به مقاومت آمیکاسین و CTX-M روی یک پلاسمید باشند و این پلاسمید در سویه‌های مختلف گسترش پیدا کرده باشد. مخصوصاً اینکه مقدار نسبت شانس ( $OR^2$ ) برای رابطه مقاومت آمینوگلیکوزیدی و ژن‌های CTX-M و SHV زیاد بوده احتمال انتقال و حمل همزمان ژن‌های ESBL و

<sup>1</sup> Transformation, Transduction, Conjugation, Transposition

<sup>2</sup> Odds Ratio

آمینو‌گلیکوزیدی توسط یک پلاسمید واحد را بالا می‌برد. علاوه بر این در مطالعاتی گفته شده که مقاومت کروموزومی نسبت به فلوروکینولون‌ها در جدایه‌های مولد ESBL در بین اعضای خانواده انتروباکتریاسه معمول می‌باشد [۱۹]. به تازگی، علیخانی و همکاران در مطالعه‌ای در ایران نشان دادند که ۷۵ درصد حساسیت نسبت به کارباپنم‌ها در میان پاتوژن‌های تولیدکننده ESBL وجود دارد [۲۰]. یکی از یافته‌های مهم و مورد توجه در مطالعه صادق رضایی و همکاران [۲۱] این بود که آن‌ها مقاومت بالا در برابر آنتی‌بیوتیک وسیع الطیف مانند کارباپنم‌ها را در سویه‌های اشریشیا کلی یافتند؛ که این یافته در تضاد با مطالعاتی است که مقاومت کمتری را (حدود ۳۴) به ایمی پنم و مروپنم در هند، مالزی و عربستان سعودی گزارش کرده بودند (۱۵،۲۲،۲۳). همچنین با نتایج مطالعه حاضر نیز متفاوت است که یکی از دلایل این تفاوت می‌تواند تفاوت در منطقه جغرافیایی نمونه‌گیری باشد، یکی دیگر از دلایل می‌تواند تفاوت سویه مورد بررسی باشد که مطالعه حاضر کلبسیلا پنومونیه و آن‌ها اشریشیا کلی را بررسی کردند. دلیل دیگری که می‌توان گفت اصلی‌ترین دلیل برای تفاوت زیاد در میزان مقاومت در میان کشورهای مختلف و مناطق مختلف در داخل یک کشور است؛ استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک وسیع الطیف به خصوص نسل سوم سفالوسپورین‌ها و تداوم وجود گونه‌های مقاوم در مراکز مراقبت‌های بهداشتی است. استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک وسیع الطیف به ویژه سفالوسپورین‌های نسل سوم توسط صالحی فر و همکاران گزارش شد [۲۴]. در مطالعه‌ای که توسط بن‌آمی<sup>۱</sup> و همکاران انجام شد نیز مشابه مطالعه حاضر در جدایه‌های ESBL مثبت، محدوده مقاومت بالاتری نسبت به آمینو‌گلیکوزیدها در مقایسه با جدایه‌های غیر ESBL مشاهده گردید [۲۲]. این تشابهات در نتایج بیان کننده آن است که احتمال

ارتباط بین این ژن‌ها و مقاومت آمینو‌گلیکوزیدی زیاد است.

حضور ژن‌های TEM، SHV، CTX-M به همراه عدم نفوذپذیری مناسب دارو در اثر تغییر در غشاء باکتری، ممکن است باعث ایجاد مقاومت نسبت به کارباپنم‌ها نیز شود [۲۵]. احتمال بروز این واقعه در کشور ما که میزان مقاومت با واسطه ESBL بالاست می‌تواند بسیار نگران کننده باشد. این امر نشان دهنده اهمیت درمان آنتی‌بیوتیکی منطقی، جلوگیری از گسترش این سویه‌ها در بیمارستان‌ها و درک پیامدهای بالینی ناشی از عفونت با ارگانسیم‌های مولد ESBL می‌باشد. در مطالعه‌ی فرینچ<sup>۲</sup> و همکاران نشان داده شد که سویه‌های اشریشیا کلی تولیدکننده SHV به همه آمینو‌گلیکوزیدها مقاوم بوده و در برابر سیپروفلوکساسین حساس بودند. در مطالعه حاضر نیز بین حضور ژن SHV و مقاومت به آمینو‌گلیکوزیدها (آمیکاسین و جنتامایسین) رابطه معنی‌داری دیده شد ( $p < 0.001$ ). هرچند گونه‌های باکتریایی متفاوتی در این دو مطالعه بررسی شده است اما تشابه تقریبی نتایج این دو مطالعه نشان‌دهنده‌ی مقاومت نسبتاً بالای سویه‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه (در کل انتروباکتریاسه‌ها) به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینو‌گلیکوزیدی است. در مطالعه‌ای که توسط بابی پادمینی<sup>۳</sup> و همکاران با عنوان فراوانی و الگوی حساسیت بتا لاکتاماز طیف گسترده در ایزوله ادرار اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه در یک بیمارستان با مراقبت‌های ویژه نتایج نشان داده است که درجه بالایی از مقاومت مربوط به نالیدیکسیک اسید، نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین در تولیدکنندگان ESBL وجود دارد [۲۶]. در مقایسه نتایج مطالعه بابی پادمینی با نتایج مطالعه حاضر می‌توان دید که بیشترین حساسیت سویه‌های مولد ESBL در هر دو

<sup>2</sup> Frinche

<sup>3</sup> Babypadmini

<sup>1</sup> Ben-Ami

عمومی و فردی (فرعی)، ۳- الگوی متفاوت در نحوه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها (اصلی) است.

### نتیجه‌گیری

حضور ESBL ها و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی دیگر در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و همچنین انتقال همزمان آن‌ها به سویه‌های دیگر در شهرستان کرمانشاه بالا بوده که این امر نشان‌دهنده اهمیت درمان آنتی‌بیوتیکی منطقی، جلوگیری از گسترش این سویه‌ها در بیمارستان‌ها و درک پیامدهای بالینی ناشی از عفونت با ارگانسیم‌های مولد ESBL می‌باشد.

بالا بودن میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ارگانسیم‌های ایجادکننده عفونت‌های بالینی پیشنهادکننده بررسی مکانیسم‌های موثر در ایجاد مقاومت و بررسی فعالیت ضد میکروبی داروهای جدید در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند به روند درمان مؤثر این عفونت‌ها کمک نماید.

مطالعه مربوط به ایمی‌پنم بوده که نشان می‌دهد ایمی‌پنم هنوز هم می‌تواند به عنوان آنتی‌بیوتیک انتخابی برای درمان عفونت‌های این باکتری‌ها (اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه) عمل کند. هرچند ۳ نمونه مقاوم به ایمی‌پنم در مطالعه حاضر شناسایی شد که این خود می‌تواند نگرانی‌هایی را به همراه داشته باشد چرا که گسترش ژن‌های مقاومت توسط روش‌های مختلف انتقال ژن به راحتی و به سرعت می‌تواند اتفاق بیفتد. همچنین در رابطه با جنتامایسین و نیتروفوران‌توئین نتایج تقریباً مشابهی در این دو مطالعه به دست آمده است؛ اما سویه‌ها در مطالعه حاضر دارای حساسیت نسبتاً پایینی به آمیکاسین در بین ESBL مثبت‌ها می‌باشند اما در مطالعه آن‌ها آمیکاسین دارای حساسیت بالایی (۸۶٪) می‌باشد. در مابقی موارد نیز تقریباً نتایج یکسان به دست آمده است.

دلیل این تفاوت‌ها همانطور که گفته شد: ۱- منطقه جغرافیایی متفاوت (فرعی)، ۲- تفاوت در بهداشت

### References

- 1- Zinsser H, Wolfgang KJ. Zinsser Microbiology, 19<sup>th</sup> ed. Norwalk, CT: Appleton Lange, 1988:650-652.
- 2- Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S. Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology, 24<sup>th</sup> ed. USA: McGraw-Hill Education, 2007: 161-194.
- 3- Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Rev Infect Dis. 1988 Jul-Aug;10(4):677-8.
- 4- Neu HC. Effect of beta-lactamase location in Escherichia coli on penicillin synergy. Appl Microbiol 1969;Jun; 17 (6): 783-6.
- 5- Shaokat S, Ouellette M, Sirot D, Joly B, Cluzel R. Spread of SHV- I beta-Lactamase in Escherichia coli Isolated from fecal samples in Africa. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31(6): 943-945.
- 6- Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). FEMS Microbiol Lett. 2000 Mar; 184(1): 85-9.
- 7- Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's, Principles and Practice of Infectious Diseases, 8<sup>th</sup> ed. New York: Elsevier, 2015: 235-252.
- 8- Daoud Z, Moubareck C, Hakime N, Doucet - Populaire F. Extended spectrum beta-lactamases producing Enterobacteriaceae in Lebanese ICU patients: epidemiology and patterns of resistance. J Gen Appl Microbiol. 2006 Jun;52(3):169-78.



- 9- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):1-14.
- 10- Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, editors. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6<sup>th</sup> ed. New York: Lippincott Williams and Wilkins, 2005:171-241.
- 11-Yan JJ, Tsai SH, Chuang CL, Wu JJ. OXA-type  $\beta$ -lactamases among extended-spectrum cephalosporin resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a university hospital in southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2006 Apr;39(2):130-4.
- 12-Rubtsova MY, Ulyashova MM, Bachmann TT, Schmid RD, Egorov AM. Multiparametric determination of genes and their point mutations for identification of  $\beta$ -lactamases. *Biochemistry (Mosc)*. 2010 Dec;75(13):1628-49.
- 13-Amir Mozaffari NA, Frouhesh Tehrani H, Tavaf Langeroodi Z, Abdullahi A. A survey of drug resistance due to extended spectrum  $\beta$  lactamases (esbls) in *Escherichia coli* strains isolated from hospitalized patients. *RJMS*. 2008; 15 (59) :39-46.[Full text in Persian]
- 14-Mlynarczyk G, Mlynarczyk A, Bilewska A, Dukaczewska A, Golawski C, Kicman A, et al. Effectiveness of the method with cefpirome in detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in different species of gram-negative bacilli. *Med Dosw Mikrobiol* 2006; 58(1):59- 65. [Full text in Polish]
- 15-Manoharan A, Premalatha K, Chatterjee S, Mathai D; SARI Study Group. Correlation of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum  $\beta$  lactamases among Enterobacteriaceae with their in vitro antimicrobial susceptibility. *Indian J Med Microbiol*. 2011 Apr-Jun;29(2):161-4.
- 16-Geyer CN, Hanson ND. Rapid PCR amplification protocols decrease the turn-around time for detection of antibiotic resistance genes in Gram-negative pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Oct;77(2):113-7.
- 17-Patel TS, Nagel J L. Clinical outcomes of Enterobacteriaceae infections stratified by carbapenem MICs. *J Clin Microbiol*, 2015 Jan; 53(1): 201-205.
- 18-Kazemnia A, Ahmadi M, Dilmaghani M. Antibiotic resistance pattern of different *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Iran Biomed J*. 2014;18(4):219-24.
- 19-Serefhanoglu K, Turan H, Timurkaynak FE, Arslan H. Bloodstream infections caused by ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*: risk factors for multidrug-resistance. *Braz J of Infec Dis*. 2009 Dec; 13(6): 403-7.
- 20-Alikhani MY, Tabar ZK, Mihani F, Kalantar E, Karami P, Sadeghi M, et al. Antimicrobial resistance patterns and prevalence of bla<sub>PER-1</sub> and bla<sub>VEB-1</sub> genes among ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in West of Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2014 Jan; 7(1): 1-11.
- 21-Rezai MS, Salehifar E, Rafiei A, Langae T, Rafati M, Shafahi K, et al. Characterization of multidrug resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* among uropathogens of pediatrics in north of Iran. *BioMed Res Int*. 2014 Nov; 2015(1): 1-7.
- 22-Benenson S, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Adler A, Strahilevitz J, Moses AE, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* endocarditis in a young adult: successful treatment with gentamicin and colistin. *Int J Infec Dis*. 2009 Sep; 13(5):295-298.
- 23-Kader AA, Kumar A K. Prevalence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase among multidrug resistant gram-negative isolates from a general hospital in Saudi Arabia. *Saudi med J*. 2004 May; 25(5): 570-4.

- 24-Salehifar E, Nasehi M, Eslami G, Sahraei S, Alizadeh-Navai R. Determination of antibiotics consumption in Buali-Sina pediatric Hospital, Sari 2010-2011. *Iran J Pharm Res.*2014 Summer; 13(3): 995-1001.
- 25-Livermore D M, Sefton A M, Scott GM. Properties and potential of ertapenem. *J Antimicrob Chemother.*2003 Sep; 52(3): 331-344.
- 26-Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum-lactamases in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*-prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol.*2004 Jul-Sep; 22(3): 172-4.