مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۱۸۶/هفته چهارم خرداد ماه ۱۳۹۱

مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۶

تشخیص مولکولی بروز هم‌زمانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک و فلزات سنگین در کلبسیلا پنومونیه‌های جدا شده از عفونت ادراری

علی‌یار پیروزی[۱]، محمد جعفری[۱]، مهدی کارگر[۲]، مهدی محسن زاده[۱]، دکتر محمد مهدی فیض‌آبادی[۳]، روحی افکاری[۴]

چکیده

مقدمه: میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و فلزات سنگین از عفونت‌های ادراری و بیمارستانی جدا شده‌اند. بیشترین عامل عفونت‌های بیمارستانی از جمله کلبسیلا پنومونیه‌ی مقاوم به فلزات سنگین، پلاسمیدهایی با اندازه‌ی مولکولی متفاوتی را حمل می‌کنند. هدف از این مطالعه، تشخیص مولکولی بروز هم‌زمانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فلزات سنگین در کلبسیلا پنومونیه‌های جدا شده از عفونت ادراری بود.

روش‌ها: ۱۴۴ سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های عفونت مجاری ادرای جمع‌آوری شده از بیمارستان و آزمایشگاه درمانی جدا شدند. انتخاب اولیه‌ی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بر اساس روش‌های CLSI (Clinical and laboratory standards institute)، دیسک ترکیبی و روش دابل دیسک سینرژیسم انجام گردید. همچنین به منظور تشخیص ژن‌های TEM-1 و SHV-1 عمل PCR (Polymerase chain reaction) انجام شد، سپس MIC (Minimum inhibitory concentration) فلزات سنگین برای Hg^{2+}، Cu^{2+}، Pb^{2+} و Cd^{2+} انجام گردید.

یافته‌ها: ۶۱/۸۱ درصد از سویه‌های جدا شده، مقاوم به آنتی‌بیوتیک بودند که ۴۲/۶۹ درصد آن‌ها سویه‌های تولیدکننده‌ی آنزیم β–لاکتام بودند. پس از انجام PCR از ۳۸ سویه‌ی ESBL (Extended-spectrum beta-lactamase) مثبت، ۲۸/۹۴ درصد از سویه‌های کلبسیلای حامل ژن SHV-1 و ۳۴/۲۱ درصد حامل ژن TEM-1 بودند. بیشترین مقدار فلزات سنگین که سویه‌ها به آن مقاومت نشان دادند شامل جیوه ۳۵ میلی‌گرم در لیتر، مس ۶۵۰ میلی‌گرم در لیتر، سرب ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر، کادمیم ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. تفاوت قابل توجهی بین سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و فلزات سنگین مشاهده شد ($P < ۰/۰۱۲$).

نتیجه‌گیری: ایزوله‌های حامل پلاسمید که به فلزات سنگین مقاومت نشان دادند به شدت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها مقاوم بودند. نتایج نشان داد که این احتمال وجود دارد که پلاسمید حامل ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک و فلزات سنگین با هم در بین سویه‌های باکتریایی جابه‌جا شوند.

واژگان کلیدی: فلزات سنگین، ژن TEM، ژن SHV، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، MIC

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها ترکیبات طبیعی، سنتزی و با خاصیت ضد میکروبی هستند که به طور وسیعی در دنیای پزشکی بر علیه عوامل بیماری‌زا در انسان و یا حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱). امروزه افزایش سریع مقاومت به طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها در بین میکروارگانیسم‌ها از مشکلات عمده‌ی پزشکی مدرن به شمار می‌آید (۲–۱).

مطالعات نشان می‌دهد که بیشترین مقاومت دارویی در بین باکتری‌های گرم منفی مانند اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروجینوزای ایجاد کننده‌ی عفونت‌های بیمارستانی، عفونت‌های مجاری ادراری و

[۱] مربی، گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات، دانشکده‌ی پیراپزشکی امام جعفر صادق (ع)، گراش، ایران
[۲] مربی ،گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی فارس، شیراز، ایران
[۳] دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
[۴] گروه میکروبیولوژی، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: روحی افکاری
Email: r_afkari78@yahoo.com

www.mui.ac.ir

باکتریمی دیده می‌شود که می‌توان علت عمده‌ی آن را تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز در آن‌ها دانست (۳).

این باکتری‌ها با داشتن ژن کد کننده‌ی آنزیم‌های بتالاکتاماز بر روی پلاسمید و یا کروموزوم، آن را به طور سریع در بین سویه‌های باکتریایی انتشار می‌دهند و سبب مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف می‌شوند. این آنزیم با تخریب حلقه‌ی بتالاکتام در داروها، از تأثیر ضد میکروبی دارو بر سنتز دیواره‌ی باکتری‌ها جلوگیری می‌کند (۴). پلاسمیدهای مربوط به بتالاکتامازها که بیشتر در اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه دیده می‌شوند، SHV-1 و TEM-1 می‌باشند. انتشار سریع آنزیم SHV-1 و TEM -1 در باکتری‌های ایجاد کننده‌ی عفونت‌های بیمارستانی، عفونت‌های مجاری ادراری و باکتریمی سبب مقاومت سریع آنتی‌بیوتیکی در این سویه‌ها گردیده است؛ به طوری که گاهی علت بیش از ۹۰ درصد مرگ و میرها طی عفونت هستند (۷-۵).

در همین راستا Nakahara و همکاران دریافتند که مقاومت چندگانه‌ی آنتی‌بیوتیکی به همراه مقاومت به فلزات سنگین دیده می‌شود (۸).

Zeroual و همکاران نیز گزارش دادند مقاومت به غلظت‌های متفاوت فلزات سنگین نظیر جیوه، سرب، مس، کادمیم در بعضی از باکتری‌های ایجاد کننده‌ی عفونت بیمارستانی به طور همزمان با بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک رخ می‌دهد و می‌تواند دلیلی بر این باشد که ژن‌های شاخص در مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فلزات سنگین اغلب بر روی یک پلاسمید قرار دارند و با یکدیگر قابل انتقال هستند (۹). هدف از این مطالعه، تشخیص مولکولی بروز همزمان مقاومت به آنتی‌بیوتیک و فلزات سنگین در کلبسیلا پنومونیه‌های جدا شده از عفونت ادراری بود.

روش‌ها

این پژوهش به صورت توصیفی- تحلیلی در سال ۸۹-۱۳۸۸ به مدت ۶ ماه بر روی ۸۴۵ فرد مراجعه کننده به بخش‌های اورولوژی، زنان و زایمان بیمارستان امیرالمؤمنین علی (ع) و درمانگاه شهرستان گراش انجام گردید. از تمامی این افراد طبق دستور پزشک نمونه‌ی ادراری تهیه شد. نمونه‌ها در اسرع وقت و با رعایت شرایط بهداشتی به آزمایشگاه منتقل شد.

برای جدا سازی باکتری‌های موجود در ادرار، نمونه‌های ادراری بر روی محیط‌های EMB، Blood agar و TSI کشت شدند. ایزوله‌های جدا شده برای شناسایی در محیط سیمون سیترات، MRVP، SIM، اوره براث، لیزین دکربوکسیلاز کشت داده شدند و آزمایشات تکمیلی تخمیر تک قندی سوکروز، لاکتوز و گلوکز بر روی آن‌ها انجام شد. بر اساس تست‌های افتراقی با استفاده از روش استاندارد تشخیصی و بیوشیمیایی، سویه‌های کلبسیلا پنومونیه تعیین هویت گردیدند (۱۰).

برای تشخیص جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک، چند کلنی از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه خالص در لوله‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون مایع تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷-۳۶ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس سوسپانسیون با سواپ روی محیط مولر هینتون آگار (شرکت Merck) پخش گردید و از دیسک‌های آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، تری‌متوپریم (۵ میکروگرم)، سولفامتاکسازول (۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، اسید نالیدیسیک (۳۰

www.mui.ac.ir

میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۱۰ میکروگرم)، و سفالوتین (۳۰ میکروگرم) و بر اساس روش استاندارد، دیسک دیفیوژن CLSI (Clinical and laboratory standards institute) انجام گردید. با استفاده از دو روش دیسک سینرژیسم دابل (Double disk synergy) و روش دیسک ترکیبی (Oxoid combining disk method) مقاومت جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی تولید کننده‌ی ESBL (Extended-spectrum beta-lactamase)، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامایسین، سفکسیم، سولفامتاکسازول و ایمی‌پنم ارزیابی شدند (۱۱). در روش دیسک سینرژیسم دابل از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و کوآموکسی کلاو (۱۰ میکروگرم) که به فاصله‌ی ۲۰ میلی‌متری از یکدیگر در یک پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار قرار داشتند، استفاده شد. همچنین در روش دیسک ترکیبی از دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) و سفتازیدیم به همراه اسید کلاوولونیک (۱۰ میکروگرم) در یک محیط مولر هینتون آگار، به فاصله‌ی ۲۰ میلی‌متری از یکدیگر استفاده گردید. در نهایت پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون و اندازه‌گیری قطر هاله‌ی عدم رشد، سویه‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده‌ی ESBL بر طبق ضابطه‌ی NCCLS تعیین شدند (۱۱).

به منظور تهیه‌ی پلاسمید باکتری با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Biospin plasmid DNA Extraction از شرکت Bioflux ژاپن)، چند کلنی از باکتری خالص شده‌ی کلبسیلا پنومونیه‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک (شناسایی با روش دیسک سینرژیسم و ترکیبی) در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت Trypitcase soy Broth (شرکت Merck) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷-۳۶ درجه‌ی سانتی‌گراد تلقیح گردید. سپس سوسپانسیون باکتری به میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل و با دور rpM ۱۰۰۰۰ به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ شدند تا محلول رویی جدا گردد. تمامی مراحل بعدی استخراج DNA پلاسمیدی نیز طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت.

سپس مراحل PCR، مقدار ۳ میکرولیتر از نمونه‌ی DNA پلاسمید استخراج شده به همراه ۰/۵ میکرولیتر از هر جفت پرایمرهای اختصاصی دو ژن SHV-1 و TEM-1 برای هر سویه‌ی باکتری تحت شرایط دمایی انجام گردید. مواد مورد استفاده در مراحل PCR از شرکت سیناژن تهیه شد.

مخلوط واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۷۵ میکرولیتر $Mgcl_2$، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۵ میکرولیتر از هر جفت پرایمر، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز و ۳ میکرولیتر از DNA پلاسمیدی تهیه گردید. در تمامی مراحل از سویه‌ی استاندارد Klebsilla pneumonia ATTC700603 و E.coli ATCC35218 به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده گردید. در نهایت محصول PCR روی ژل ۱/۵درصد آگاروز الکتروفروز شد و باندهای bp ۱۰۱۶ و bp ۱۰۷۴ که به ترتیب نشان دهنده‌ی وجود ژن‌های SHV-1 و TEM-1 بودند با استفاده از دستگاه ژل داک (Gel document، شرکت Bio RAD) تحت نور ماورای بنفش قابل رؤیت شدند (۱۵-۱۲). پرایمرهای مورد استفاده برای ردیابی ژن TEM-1 (1074 bp) به ترتیب F: 5′-GAAGACGAAAGGGCCTCGTG-3 و R: 5′-GGTCTGACAGTTACCAATGC-3 و برای

www.mui.ac.ir

ژن (1016 bp) SHV-1 به ترتیب F: 5′-CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC-3′ و R: 5′-TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA-3 بود.

برای تعیین Minimum inhibitory concentration (MIC) فلزات سنگین در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک، سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های یاد شده که از نظر وجود ژن‌های بتالاکتامازی مثبت بودند، انتخاب شدند. سویه‌های انتخاب شده به محیط LB براث با حداکثر غلظت فلز سنگین مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت تلقیح و سپس به محیط LB براث با غلظت کمتر از آن فلز سنگین منتقل شدند تا در غلظت‌های مختلف مقاومت و تلورانت نسبت به غلظت فلزات سنگین، مورد ارزیابی قرار گیرند.

در این پژوهش از نمک‌های فلزات سنگین جیوه ($HgCl_2$)، سرب ($PbNo_3$)، کادمیم (Cdo_4) و مس ($Cuso_4$) در لوله‌های حاوی غلظت‌های متفاوت یعنی از بالاترین غلظت تا پایین‌ترین غلظت استفاده گردید تا MIC باکتری نسبت به فلزات سنگین ارزیابی گردد. برای جیوه از غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۵، ۶۵ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر، کادمیم از غلظت‌های ۴۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر، برای سرب از غلظت‌های ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰، ۵۰۰، ۶۵۰، ۸۰۰ و ۹۵۰ میلی‌گرم در لیتر و برای مس از غلظت‌های ۲۰۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۵۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید (۱۷-۱۶).

بررسی آماری نتایج توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون ANOVA انجام گرفت. آنالیز آماری در حد $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی گردید.

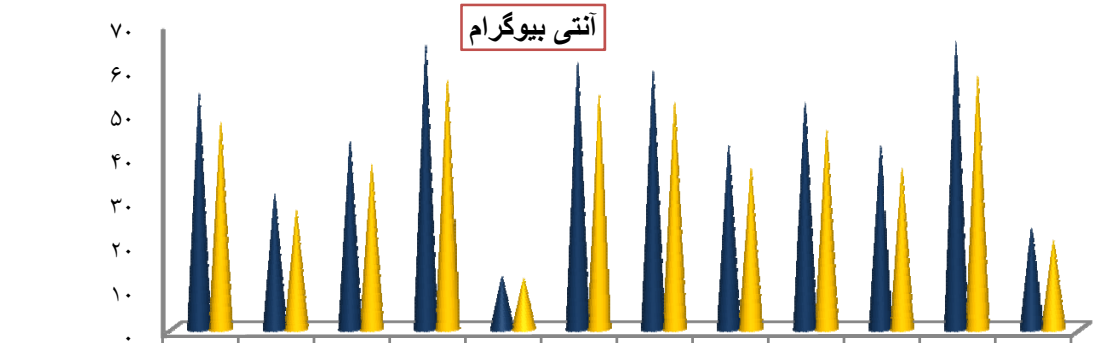
یافته‌ها

در این پژوهش از ۳۲۸ باکتری جدا شده، ۱۴۴ مورد (۳۴/۷۵ درصد) سویه‌های کلبسیلا پنومونیه شناسایی شد. طی تست آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه نسبت به آمیکاسین (۵۳/۵۰ درصد)، تری متوپریم (۵۷/۸۹ درصد)، سیپروفلوکساسین (۳۶/۸۴ درصد)، سولفامتاکسازول (۴۵/۶۱ درصد)، تتراسایکلین (۴۷/۳۶ درصد)، سفالکسین (۵۱/۷۵ درصد) و جنتامایسین (۵۷/۰۱ درصد) مشاهده گردید؛ به طوری که در ۸۹ سویه (۶۱/۸۱ درصد) مقاومت آنتی‌بیوتیکی دیده شد. همچنین کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ایمی‌پنم (۱۱/۵۵ درصد) و نالیدیکسیک اسید (۲۷/۱۹ درصد) بود. سپس با استفاده از روش‌های دیسک سینرژیسم دابل و روش دیسک ترکیبی ۳۸ مورد (۴۲/۶۹ درصد) سویه‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های یاد شده از نظر وجود ESBLS، مثبت شناسایی شدند (شکل ۱).

از ۳۸ سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه‌ی ESBLS مثبت، با روش PCR در ۲۴ مورد (۶۳/۱۶ درصد) ژن‌های بتالاکتامازی (TEMو SHV-1) مشاهده شد که از این تعداد، ۱۴مورد (۵۸/۳۴ درصد) از ژن‌ها پلاسمیدی و ۱۰ مورد (۴۱/۶۶ درصد) از ژن‌ها کروموزمی بودند و ۲۵ درصد ژن SHV-1 و ۱۶/۶۶ درصد ژن TEM-1 کروموزومی بودند. با استفاده از آزمون ANONA بین سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و وجود ژن‌های بتالاکتامازی ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($P < ۰/۰۰۳$) (جدول ۱).

وجود باندهای ژنی bp ۱۰۱۶ و ۱۰۷۴ به ترتیب برای ژن‌های SHV-1 و TEM-1 تأییدی بر جداسازی

www.mui.ac.ir



	تتراسایکلین	نالیدیکسیک اسید	کوتریماکسازول	جنتامایسین	امی پنم	آمیکاسین	سفالکسین	سفکسیم	سولفومتاکسازول	سیپروفلوکساسین	تری متوپریم	آمپی سیلین
تعداد سویه های مقاوم	۵۴	۳۱	۴۳	۶۵	۱۲	۶۱	۵۹	۴۲	۵۲	۴۲	۶۶	۲۳
درصد سویه های مقاوم	۴۷/۳۶	۲۷/۱۹	۳۷/۷۱	۵۷/۰۱	۱۱/۵۵	۵۳/۵	۵۱/۷۵	۳۶/۸۴	۴۵/۶۱	۳۶/۸۴	۵۷/۸۹	۲۰/۱۷

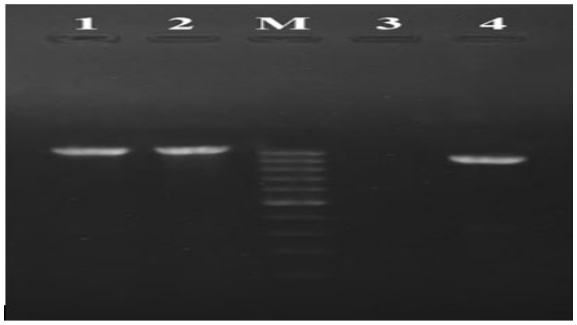
شکل ۱. توزیع فراوانی و درصد سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک

جدول ۱. توزیع فراوانی و درصد ژن‌های TEM-1 و SHV-1 در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی ESBL مثبت

ژن‌ها	ژن TEM-1 تعداد (درصد)	ژن SHV-1 تعداد (درصد)	جمع کل تعداد (درصد)
کروموزومی	۴ (۱۶/۶۶)	۶ (۲۵)	۱۰ (۴۱/۶۶)
پلاسمیدی	۹ (۳۷/۵)	۵ (۲۰/۸۰)	۱۴ (۵۸/۳۴)
جمع	۱۳ (۵۴/۱۶)	۱۱ (۴۵/۸۳)	۲۴ (۱۰۰)

ESBL: Extended-spectrum beta-lactamase

سویه‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک با الگوی پلاسمیدی می‌باشند. همان گونه که در شکل ۲ ملاحظه می‌شود جداسازی ژن‌های TEM-1 و SHV-1 در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی ESBL مثبت به ترتیب بر اساس پرایمرهای اختصاصی TEM-1 و SHV-1 صورت گرفت. در این پژوهش ژن‌های TEM-1 و SHV-1 در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی ESBL مثبت شناسایی شدند. در شکل ۲ خط ۱ نمونه‌ی مثبت مربوط به ژن SHV-1، خط ۲ شاهد مثبت (مربوط به کلبسیلا پنومونیه‌های استاندارد)، خط M سایز مارکر ۱۰۰ bp، خط ۳ شاهد منفی و خط ۴ نمونه‌ی مثبت ژن TEM-1 می‌باشد.



شکل ۲. نتایج حاصل از PCR (Polymerase chain reaction) برای شناسایی کلبسیلاپنومونیه‌ی حاوی ژن SHV-1 و TEM-1

در خط ۱ ۱۰۱۶ bp و در خط ۲ ۱۰۷۴ bp دیده شد که به ترتیب مربوط به ژن‌های SHV-1 و TEM-1 است. تلورانس فلزات سنگین بر روی ۸۹ سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه که نسبت به تست‌های آنتی‌بیوگرام مقاومت نشان دادند، انجام گردید. همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود در ۴۸ مورد در غلظت ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر جیوه، ۳۹ مورد در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کادمیم، ۴۵ مورد در غلظت ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سرب و ۳۸ مورد در غلظت ۶۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مس تحمل کنندگی نشان دادند.

در غلظت‌های یاد شده از ۳۸ سویه کلبسیلا

www.mui.ac.ir

جدول ۲. توزیع فراوانی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک و تحمل‌کننده‌ی غلظت فلزات سنگین

فلزات سنگین	مقاوم به آنتی‌بیوتیک و تحمل‌کننده‌ی فلز تعداد (درصد)	ESBLS مثبت رشدکننده تعداد (درصد)	غلظت قابل تحمل فلزات سنگین (میکروگرم در میلی‌لیتر)
کادمیم	۳۹ (۴۳/۸۲)	۲۱ (۵۵/۲۶)	۲۰۰
جیوه	۴۸ (۵۳/۹۳)	۲۸ (۷۳/۶۸)	۳۵
سرب	۴۵ (۵۰/۵۶)	۱۵ (۳۹/۴۷)	۳۵۰
مس	۳۸ (۴۹/۶۹)	۲۵ (۶۵/۷۸)	۶۵۰

ESBL: Extended-spectrum beta-lactamase

پنومونیه‌ی ESBLS مثبت، به ترتیب ۲۸ مورد در غلظت جیوه، ۲۱ مورد در غلظت کادمیم، ۲۵ مورد در غلظت مس و ۱۵ مورد در غلظت سرب گفته شده رشد نشان دادند. در حالی که سویه‌هایی که از نظر ژن‌های بتالاکتامازی (ESBLS) مثبت بودند، در غلظت‌های بیشتری تحمل فلزی نشان دادند. با استفاده از آزمون ANONA بین سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و مقاومت به فلزات سنگین ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($P < ۰/۰۱۲$) (جدول ۳ و شکل ۳).

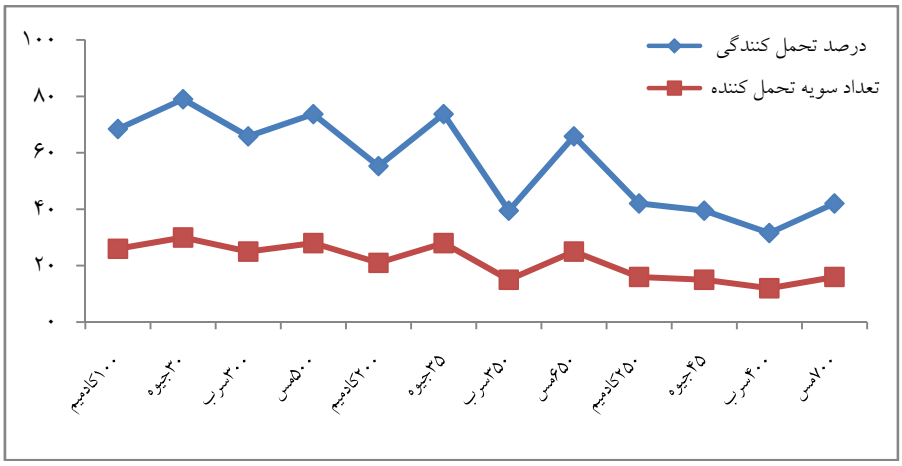
همچنین مشاهده گردید که سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک در مقایسه با سویه‌هایی که مقاوم به آنتی‌بیوتیک نبودند نسبت به غلظت فلزات سنگین تحمل کنندگی یکسانی را نشان ندادند (شکل ۴).

نتایج نشان داد که سویه‌های کلبسیلا پنومونیه که با

جدول ۳. توزیع فراوانی و درصد رشد سویه‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی ESBLS مثبت نسبت به فلزات سنگین با غلظت بالاتر

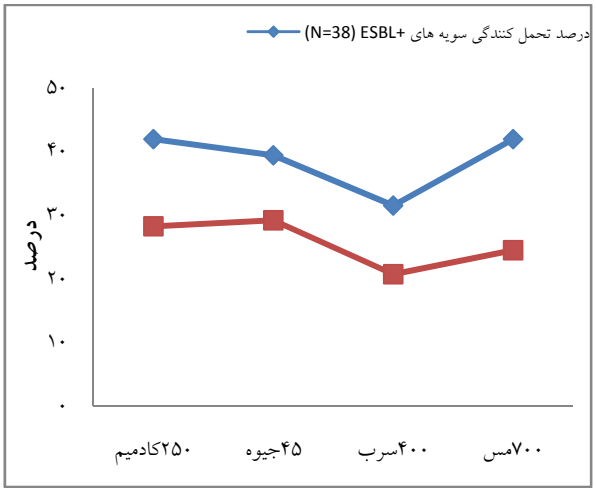
فلزات سنگین	کلبسیلا پنومونیه‌ی واجد ژن TEM و SHV-1 تعداد (درصد)	کلبسیلا پنومونیه‌ی ESBLS مثبت تعداد (درصد)	غلظت قابل تحمل (میکروگرم در میلی‌لیتر)
کادمیم	۱۱ (۴۲/۰۱)	۱۶ (۴۲/۰۲)	۲۵۰
جیوه	۱۰ (۳۹/۴۷)	۱۵ (۳۹/۴۷)	۴۵
سرب	۸ (۲۱/۰۵)	۱۲ (۳۱/۵۵)	۴۰۰
مس	۷ (۳۱/۵۷)	۱۶ (۴۲/۰۲)	۷۰۰

ESBL: Extended-spectrum beta-lactamase



شکل ۳. توزیع فراوانی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک و تحمل‌کننده‌ی غلظت متغیر فلزات سنگین

www.mui.ac.ir



شکل ۴. توزیع فراوانی تحمل‌کنندگی غلظت فلزات سنگین در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی مقاوم (یا عدم مقاوم) به آنتی‌بیوتیک

تست آنتی‌بیوگرام به آنتی بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند (۸۹ مورد)، غلظت‌های فلزی بیان شده در جدول ۲را تحمل می‌کنند؛ در حالی که سویه‌های کلبسیلا پنومونیه که با روش‌های دیسک سینرژیسم دابل و روش دیسک ترکیبی ESBLS مثبت بودند (۳۸ مورد)، در این غلظت‌ها قادر به رشد بودند و در غلظت بالاتری که در جدول ۳ بیان شد، حالت تلورانتی را نشان دادند. همچنین سویه‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی واجد ژن TEM و SHV-1 نیز تحمل غلظت‌های بالای فلزی یاد شده در جدول ۳ را داشتند.

داده‌ها حاکی از آن است که باکتری‌هایی که مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری را نشان می‌دهند، می‌توانند غلظت فلزی بیشتری را تحمل کنند. با استفاده از آزمون Fisher's exact مشخص شد که بین مقاوت آنتی‌بیوتیکی و تلورانس فلزی ارتباط معنی‌داری وجود داشت و یک همبستگی مشاهده شد؛ به طوری که در سویه‌هایی که دارای ژن بتالاکتامازی بودند تحمل فلزی بیشتر مشاهده گردید ($r = ۰/۲۸$، $P < ۰/۰۱۵$) (جدول ۳).

بحث

مقاومت باکتری‌های گرم منفی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها موجب افزایش مرگ و میر در سراسر دنیا شده است و سالانه هزینه‌های هنگفتی صرف درمان این عفونت‌ها می‌گردد. کلبسیلا پنومونیه از باکتری‌های گرم منفی است که از نظر کلینیکی نقش مهمی در ایجاد عفونت بیمارستانی و عفونت مجاری ادراری ایفا می‌کند (۲-۱). متأسفانه مصرف بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها در دهه‌های اخیر موجب افزایش ظهور سویه‌های مقاوم با مقاومت چندگانه‌ی دارویی در باکتری‌های روده‌ای گرم منفی از جمله کلبسیلا پنومونیه شده است (۴-۳)؛ به طوری که این باکتری‌ها با تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLS) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی چون سفالسپورین، پنی‌سیلین، سیپروفلوکساسین و سفوتاکسیم مقاومت نشان می‌دهند. وجود ژن کدکننده‌ی آنزیم‌های بتالاکتامازی و انتقال آن در بین باکتری‌های گرم منفی روده‌ای یک تهدید بزرگ برای مصرف کنندگان سفالسپورین‌های با طیف وسیع به شمار می‌آیند (۵).

بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه نسبت به آمیکاسین، تری‌متوپریم، سیپروفلوکساسین، سولفامتاکسازول، تتراسایکلین، سفالکسین و جنتامایسین مشاهده گردید؛ به طوری که در ۸۹ سویه مقاومت آنتی‌بیوتیکی دیده شد. همچنین حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ایمی‌پنم و نالیدیکسیک اسید بود. سپس با استفاده از روش‌های دیسک سینرژیسم دابل و روش دیسک ترکیبی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های یاد شده از نظر تولید آنزیم بتالاکتاماز، مثبت شناسایی شدند. Aladag و همکاران در ترکیه در ۴۴ درصد از ۸۷ سویه

www.mui.ac.ir

کلبسیلا پنومونیه‌ی جدا شده ESBL شناسایی کردند (۱۸). از دیدگاه تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی در بین باکتری‌های گرم منفی از جمله اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروجینیوزا که در ایجاد عفونت‌ها نقش مهمی ایفا می‌کنند مطالعات گسترده و متعددی گزارش شده است.

Ullah و همکاران از ۹۲ کلبسیلا پنومونیه، ۵۴ مورد (۵۸/۷درصد) واجد ESBL گزارش دادند (۱۹). Al-charrakh و همکاران گزارش دادند که از ۸۸ سویه کلبسیلا پنومونیه، ۶۵ مورد (۷۳/۸ درصد) با تولید ESBL به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم هستند (۷). Manikandan و همکاران نیز با بررسی باکتری‌های گرم منفی روده‌ای ایجاد کننده‌ی عفونت‌های ادراری اظهار داشتند که این باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید، تری‌متوپریم، آموکسی‌سیلین و ایمی‌پنم مقاومت نشان می‌دهند (۲۰). اما در ایران میرصالحان گزارشی داد که تولید آنزیم ESBL در سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه در ایران به ۷۶ درصد رسیده است (۲۱).

در مطالعه‌ی Hujer و همکاران ۴۰ درصد از نمونه‌ی باکتری‌هایی که از بیمارستانی در آمریکا جداسازی شدند، ژن TEM-1 را جدا کردند (۲۲). در حالی که Jin و همکاران گزارش دادند که در ۸۱/۵ درصد از سویه‌ی باکتری‌های بیمارستانی ژن TEM-1 مشاهده شده است (۲۳).

Graham و همکاران با مطالعه بر روی شیوع جهانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها، نتیجه گرفتند که این شیوع به دلیل افزایش سریع و بی‌رویه‌ی استفاده از ترکیبات شیمیایی و کودهایی است که به همراه ترکیبات فلزی در کشاورزی استفاده می‌گردد. با ورود این سم‌ها به آب‌ها و رودخانه سبب افزایش مقاومت‌های دارویی و فلزی در میکروارگانیسم‌ها می‌گردد (۲۴). امروزه بیشتر گزارش‌ها حاکی از آن است که تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه رو به افزایش است؛ به طوری که در ترکیه ۶۳ درصد، تایوان ۱۳/۵ درصد و در آمریکا ۸۳/۴ درصد گزارش شده است (۲۵، ۱۸).

با مقایسه‌ی نتایج حاصل از این پژوهش و دیگر پژوهش‌ها، آمار به دست آمده نشان‌دهنده‌ی آن است که درصد سویه‌های باکتری‌های تولید کننده‌ی بتالاکتاماز وسیع‌الطیف رو به افزایش است و این افزایش می‌تواند در نتیجه‌ی مصرف بیش از حد و طولانی مدت سفالسپورین‌های وسیع‌الطیف باشد. Ram و همکاران (۲۶)، Nathisuwan و همکاران (۲۷) و Galas و همکاران (۲۸) اظهار داشتند که باکتری‌های پاتوژن مقاوم به چند دارو، دارای پلاسمیدهایی با چندین ژن مقاومتی هستند که با انتقال آن بین باکتری‌ها سبب گسترش مقاومت می‌شوند.

نتایج PCR در ارتباط با ردیابی ژن‌های TEM-1 و SHV-1 در سوش‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی واجد ESBL، نشان داد که از ۳۸ سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه‌ی ESBLS مثبت، در ۲۴ مورد ژن‌های بتالاکتامازی (TEM-1 و SHV-1) مشاهده شد که از این تعداد، ۱۴ مورد ژن‌ها پلاسمیدی و ۱۰ مورد ژن‌ها کروموزمی بود. مطالعه‌ای که Spanu و همکاران انجام دادند، ۵۸ درصد از سویه‌های باکتری‌های گرم منفی واجد ژن TEM-1 بودند که در کلبسیلا پنومونیه به ۷۵ درصد می‌رسید (۲۹)؛ در حالی که Song و همکاران با بررسی سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه‌ی ESBL مثبت در ۸۰ نمونه ژن TEM-1 و در ۴۰ نمونه ژن SHV-1 را

www.mui.ac.ir

گزارش دادند (۱۴). Patzer و همکاران نیز در ۵۶ درصد از سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه، ژن SHV-1 را گزارش دادند (۳۰). Tasli و Bahar در ترکیه اظهار داشتند که در ۵۲/۷ و ۳۲/۴۰ درصد سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ژن‌های TEM-1 و SHV-1 شناسایی شدند (۳۱).

همان طور که مشاهده می‌شود در نتایج پژوهش ما سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه واجد ESBL، در ۵۴/۱۶ درصد ژن TEM -1 و ۴۵/۸ درصد ژن SHV-1 شناسایی گردید (جدول ۳).

Rahian و همکاران گزارشی منتشر کردند که حاکی از آن بود که باکتری‌هایی که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند، می‌توانند غلظت‌هایی از فلزات را تحمل کنند. از جمله سودوموناس آئروجینوزا CMG 58 می‌تواند ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جیوه، ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کبالت و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سرب را تحمل کند (۳۲).

Zeroual و همکاران گزارش دادند که این سویه به دلیل داشتن آنزیم Mercuric reductase می‌تواند تا غلظت‌های ۲۴۰۰ میکرومول از فلز جیوه را تحمل کند (۳۳). Spangler و همکاران (۳۴)، Filali و همکاران (۳۵) و Zeroual و همکاران (۳۳) گزارش‌هایی منوط به مقاومت فلزاتی چون نیکل، کبالت، سرب، مس، و کادمیم در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی واجد ESBL ارائه دادند. کرباسی‌زاده و همکاران مقاومت و تلورانس سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه را به غلظت‌های جیوه، مس، سرب و کادمیم بررسی کردند (۱۵).

نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌هایی از کلبسیلا پنومونیه که مقاومت بیشتری به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام نشان دادند و دارای ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بودند، توانستند فلزات سنگین چون جیوه، مس، سرب و کادمیم را به ترتیب در غلظت‌های ۴۵، ۷۰۰، ۴۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز تحمل کنند و در غلظت‌های کمتر قابلیت رشد در لوله‌های آزمایش دیده شد. همچنین تمامی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه واجد ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی توانستند در غلظت‌هایی از فلزات رشد کنند؛ در حالی که در سوش‌هایی که ژن‌های مقاومت در آن‌ها مشاهده نگردید، قادر به رشد در غلظت فلزات سنگین نبودند.

نتیجه‌گیری

با بررسی نتایج حاصل از پژوهش‌ها و گزارش‌های دیگران می‌توان به این عقیده رسید که با مصرف بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی به طور سریع‌تر در بین باکتری‌های پاتوژن بیمارستانی انتقال می‌یابند. از طرفی استفاده از ترکیبات فلزی و کودهای شیمیایی در محیط و هم‌زمانی انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مقاومت فلزات سنگین می‌تواند یک تهدید بزرگ برای بیماران مبتلا به عفونت‌های بیمارستانی و عفونت‌های مجاری ادراری باشد که از داروهای بتالاکتامی و سفالسپورین‌های نسل سوم استفاده می‌کنند (۳۶-۳۵). بنابراین با طراحی استراتژی‌های بهتر در کاهش آلودگی فلزی در محیط و شناسایی سوش‌های مقاوم می‌توانیم راه حل درمانی بهتری در برابر پاتوژن‌ها ارائه کنیم.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشکده‌ی پیراپزشکی و بیمارستان امیرالمؤمنین علی (ع) شهرستان گراش به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی این پژوهش اعلام می‌دارند.

www.mui.ac.ir

References

1. Launay FM, Young PB, Sterk SS, Blokland MH, Kennedy DG. Confirmatory assay for zeranol, taleranol and the Fusarium spp. toxins in bovine urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Addit Contam 2004; 21(1): 52-62.
2. Chopra I ,Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev 2001; 65(2): 232-60.
3. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. N Engl J Med 2010; 362(19): 1804-13.
4. Bergogne-Bérézin E. Acinetobacter biology and pathogenesis. New York: Springer; 2008.
5. Subha A, Ananthan S. Extended spectrum beta lactamase (ESBL) mediated resistance to third generation cephalosporins among Klebsiella pneumoniae in Chennai. Indian J Med Microbiol 2002; 20(2): 92-5.
6. Mendelson G, Hait V, Ben-Israel J, Gronich D, Granot E, Raz R. Prevalence and risk factors of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in an Israeli long-term care facility. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005; 24(1): 17-22.
7. Al-Charrakh AH, Yousif SY, Al-Janabi HS. Occurrence and detection of extended-spectrum -lactamases in *Klebsiella* isolates in Hilla, Iraq. African Journal of Biotechnology 2011; 10(4): 657-65.
8. Nakahara H, Ishikawa T, Sarai Y, Kondo I, Kozukue H. Survey of resistance to metals and antibiotics in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae in Japan. Zentralbl Bakteriol Orig A 1978; 240(1): 22-9.
9. Zeroual Y, Moutaouakkil A, Dzairi FZ, Talbi M, Chung PU, Lee K, et al. Purification and characterization of cytosolic mercuric reductase from Klebsiella pneumoniae. Annals of microbiology 2003; 53(2): 149-60.
10. Winn WC, Koneman EW. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. London: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 211, 294.
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): 53-6.
12. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979; 7(6): 1513-23.
13. Kado CI, Liu ST .Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol 1981; 145(3): 1365-73.
14. Song W, Bae IK, Lee YN, Lee CH, Lee SH, Jeong SH. Detection of extended-spectrum beta-lactamases by using boronic acid as an AmpC beta-lactamase inhibitor in clinical isolates of Klebsiella spp. and Escherichia coli. J Clin Microbiol 2007; 45(4): 1180-4.
15. Marty L, Jarlier V. [Surveillance of multiresistant bacteria: justification, role of the laboratory, indicators, and recent French data]. Pathol Biol (Paris) 1998; 46(4): 217-26.
16. Karbasizaed V, Badami N, Emtiazi G. Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. African Journal of Biotechnology 2003; 2(10): 379-83.
17. Calomiris JJ, Armstrong JL, Seidler RJ. Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. Appl Environ Microbiol 1984; 47(6): 1238-42.
18. Aladag MO, Durak Y ,Uysal A. Investigation of imipenem and meropenem suseeptibilties, plasmid profiles and ESBL characteristic of klebsiella pneumoniae. Isolated from urinary tract infections. World Applied Sciences Journal 2009; 7(3): 378-81.
19. Ullah F, Malik SA, Ahmed J. Antimicrobial susceptibility and ESBL prevalence in Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients in the North West of Pakistan. Burns 2009; 35(7): 1020-5.
20. Manikandan S, Ganesapandian S, Singh M, Kumaraguru AK. Emerging of multiclrug resistance human pathogens from urinary tract infections. Current Research in Bacteriology 2011; 4(1): 9-15.
21. Mirsalehan A. Examined the prevalence of enterobacteriaceae producing extended-spectrumâ lactamases in the intensive care unit. Proceedings of the 8th Congress of Microbiology, Iran, 1995.
22. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant Acinetobacter sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(12): 4114-23.
23. Jin H, Xu XM, Mi ZH, Mou Y, Liu P. Drug-resistant gene based genotyping for Acinetobacter baumannii in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial settings. Chin Med J (Engl) 2009; 122(3): 301-6.

www.mui.ac.ir

24. Graham DW, Olivares-Rieumont S, Knapp CW, Lima L, Werner D, Bowen E. Antibiotic resistance gene abundances associated with waste discharges to the Almendares River near Havana, Cuba. Environ Sci Technol 2011; 45(2): 418-24.

25. Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. J Clin Microbiol 1996; 34(4): 908-11.

26. Ram S, Gupta R, Gaheer M. Emerging antibiotic resistance among the uropathogens. Indian J Med Sci 2000; 54(9): 388-94.

27. Nathisuwan S, Burgess DS, Lewis JS. Extended-spectrum beta-lactamases: epidemiology, detection, and treatment. Pharmacotherapy 2001; 21(8): 920-8.

28. Galas M, Decousser JW, Breton N, Godard T, Allouch PY, Pina P. Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in France. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(2): 786-9.

29. Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, Toniolo A, Fadda G. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(1): 196-202.

30. Patzer JA, Dzierzanowska D, Pawinska A, Turner PJ. High activity of meropenem against Gram-negative bacteria from a paediatric Intensive Care Unit, 2001-2005 .Int J Antimicrob Agents 2007; 29(3): 285-8.

31. 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): 162-7.

32. Rahian N, Ahmed N, Ali R, Khan N, Ishaq A. Production of exopolysaccharide by an indigenous soil isolate. Journal of Islamic Academy of Sciences 1992; 5(4): 282-5.

33. Zeroual Y, Moutaouakkil A, Blaghen M. Volatilization of mercury by immobilized bacteria (Klebsiella pneumoniae) in different support by using fluidized bed bioreactor. Curr Microbiol 2001; 43(5): 322-7.

34. Spangler WT, Spigeralli JL, Rose JM, Filippin RS, Miller HH. Detoxification of methyl mercury by bacteria isolated from environment samples. Appl mocrobiol 1973; 25: 488-93.

35. Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, Dzairi FZ, Talbi M, Blaghen M. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Curr Microbiol 2000; 41(3): 151-6.

36. Jain PJ, Ramachandran S, Shukla V, Bhakuni D. Characterization of metal and antibiotic resistance in a bacterial population isolated from a Copper mining industry Strain characterization: Gram ' s staining and 16s rRNA sequencing Nucleotide sequence accession Plasmid DNA isolation Transformation and. International Journal of integrative biology 2009; 6(2): 57-61.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 30, No 186, 4th week, June 2012 Received: 2.11.2011 Accepted: 14.2.2012

Molecular Detection of Simultaneous Occurrence of Antibiotic- and Heavy Metal-Resistance in Klebsiella Pneumoniae Isolated from Urinary Tract Infection

Aliyar Pirouzi MSc[1], Mohammad Jafari MSc[1], Mehdi Kargar MSc[2], Mehdi Mohsenzadeh MSc[1], Mohammad Mehdi Feizabadi PhD[3], Rouhi Afkari MSc[4]

Abstract

Background: Microorganisms resistant to both antibiotics and metals have been isolated from nosocomial and urinary tract infection. Most heavy metal-resistant hospital infections including *Klebsiella pneumoniae* (K. *pneumoniae*) harbor plasmids with different molecular sizes. The aim of this study was the molecular detection of simultaneous occurrence of antibiotic and heavy metal resistance in Klebsiella isolated from urinary tract infection (UTI).

Methods: Overall, 144 K. pneumonia strains were isolated from UTI samples in the laboratories of hospitals and clinics. Primary selection of β-lactam-resistant strains was conducted using combined disk and double-disk (DD) synergy methods according to the guidelines of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Polymerase chain reaction (PCR) was also performed to detect TEM-1 and SHV-1 genes in resistant strains. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of the heavy metals were determined for Hg^{2+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}, and Cd^{2+}.

Findings: Among the 61.81% antibiotic-resistant strains, 42.69% were β-lactamase producers. After performing PCR, from 38 positive extended spectrum beta lactamase (ESBL) strains, 28.94% of *Klebsiella* strains harbored SHV gene and ۳۴.۲۱% harbored TEM gene. The highest resistance was to Hg^{2+} (35 mg/L), Cu^{2+} (650 mg/L), Pb^{2+} (350 mg/L), and Cd^{2+} (200 mg/L). A significant difference was observed between antibiotic-resistant and heavy metals-resistant strains (P = 0.012).

Conclusion: Plasmid-carrying isolates that showed resistant to heavy metals were highly resistant to antibiotics. The results showed that it is possible for the plasmids which carry genes for resistance to antibiotics and heavy metals to be exchanged by bacterial strains.

Keywords: Heavy metal, TEM, SHV, Antimicrobial resistance, Minimal inhibitory concentration

[1] Instructor, Department Microbiology, Research Center, Imam Jafar School of Paramedicine, Gerash, Iran
[2] Instructor, Department of Microbiology, Research and Science Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
[3] Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Department of Microbiology, Young Researchers Club, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
Corresponding Author: Rouhi Afkari MSc, Email: r_afkari78@yahoo.com