دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هیجدهم– شماره ۹۶
دی ۱۳۹۰

دریافت: ۱۳۹۰/۸/۲۷
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۰/۱۱/۵
پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۷

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی بتالاکتامازهای طیف وسیع تیپ CTX-M در جدایه‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه شهر مشهد

نویسندگان: محبوبه نخعی مقدم*[۱]، سحر نادریفر[۲]، محمدرضا ذوالفقاری[۳]، سعید عامل جامه دار[٤]، مهرداد هاشمی[٥]

۱. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست‌شناسی، مشهد، ایران
۲. دانشجوی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروب‌شناسی، قم، ایران
۳. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروب‌شناسی، قم، ایران
٤. استادیار، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی مشهد، ایران
۵. دانشجوی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات فارس، گروه بیوشیمی، شیراز، ایران
* نویسنده مسئول: دکتر محبوبه نخعی مقدم E-mail: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: بتالاکتامازهای طیف وسیع (ESBLs)، آنزیم‌هایی هستند که توانایی هیدرولیز اکسی- ایمینوسفالوسپورین‌ها را دارند. فشار انتخابی استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌های جدید، ظهور انواع جدید بتالاکتاماز را به همراه داشته‌است. هدف از انجام این تحقیق، شناسایی سویه‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتاماز طیف وسیع تیپ CTX-M و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آنها بود.

مواد و روش‌ها: باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه در سال ۱۳۸۹ از نمونه‌های ادراری ارسالی به آزمایشگاه‌های دو بیمارستان مشهد جدا و شناسایی شدند. بعد از انجام آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار در آگار، شناسایی فنوتیپی تولید بتالاکتاماز با آزمایش احتمالی دیسک دوتایی و آزمایش تأییدی CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام‌شد. برای شناسایی ژن bla_{CTX-M} از پرایمر اختصاصی و روش واکنش زنجیره پلیمراز استفاده‌شد.

نتایج: از صد نمونه ادرار بررسی‌شده، نوزده باکتری کلبسیلا پنومونیه جدا شد که ۴۷/۴ درصد آنها مولد ESBL بودند و تمامی آنها از نظر ژن bla_{CTX-M} مثبت بودند. درصد زیادی از جدایه‌های مولد ESBL در مقایسه با انواع غیرمولد ESBL، نسبت‌به کوتریموکسازول، جنتامیسین و نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند که اختلاف برای جنتامیسین معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع به‌نسبت بالای باکتری‌های مولد ESBL در جامعه مورد بررسی، توجه به غربالگری عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها می‌تواند اهمیت بسزایی در درمان صحیح آنها داشته‌باشد.

واژگان کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، حساسیت آنتی‌بیوتیکی، بتالاکتامازهای طیف وسیع، تیپ CTX-M

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه و هدف

بتالاکتامازهای طیف وسیع (ESBLs)، آنزیم‌هایی هستند که توانایی هیدرولیز اکسی‌ایمینوسفالوسپورین‌ها را دارند و با بازدارنده‌های بتالاکتاماز مهارمی‌شوند (۱). مقاومت غیرمنتظره نسبت‌به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام حتی قبل از کشف اولین آنتی‌بیوتیک، یعنی پنی‌سیلین ظاهر شد و اولین بتالاکتاماز در باکتری اشریشیا کلی، پیش از کاربرد پنی‌سیلین در پزشکی شناسایی‌شد (۲). طی بیست سال گذشته، بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام جدید، معرفی و طراحی‌شدند تا در برابر عملکرد هیدرولیزی بتالاکتامازها مقاوم باشند. اگرچه هر رده آنتی‌بیوتیکی که برای درمان بیماران استفاده‌شد، ظهور بتالاکتامازهایی جدید مقاومت به آن دسته دارویی را باعث شدند و احتمال‌دارد فشار انتخابی استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌های جدید در درمان عفونت‌ها، ظهور انواع جدید بتالاکتاماز را به همراه داشته‌باشد؛ یکی از این آنتی‌بیوتیک‌ها اکسی‌ایمینوسفالوسپورین‌ها بودند که به‌طور وسیعی در درمان عفونت‌های حاد باکتری‌های گرم منفی در دهه ۱۹۸۰ مورد استفاده قرارگرفتند. تعجبی‌ندارد که مقاومت ناشی از بتالاکتامازها نسبت‌به این آنتی‌بیوتیک‌ها به‌سرعت ایجادشد و توسعه‌یافت (۱ و۳). امروزه بیش از ۱۵۰ نوع بتالاکتاماز طیف وسیع توصیف و در سراسر دنیا در بسیاری از جنس‌های انتروباکتریاسه و سودوموناس ائروجینوزا شناسایی-شده‌اند (۲)؛ اغلب این آنزیم‌ها از طریق پلاسمیدها کد-می‌شوند که به‌راحتی میان باکتری‌ها انتشارمی‌یابند و مقاومت چندگانه را هم به همراه دارند که درمان عفونت را مشکل‌ترمی‌کند (٤). شیوع ESBL و انواع آن، بسته به ناحیه جغرافیایی متفاوت است و گزارش‌ها از گسترش آنها در بعضی از جوامع حکایت‌دارند. باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتامازهای طیف وسیع تیپ CTX-M از سراسر دنیا گزارش‌شده‌اند و به‌نظرمی‌رسد شیوع آنها رو به گسترش است (۱). به دنبال جستجوی انجام‌شده در مقالات، شیوع این باکتری‌ها در بعضی از مناطق ایران، مانند تهران (۵)، تبریز (٦)، خرم آباد (۷) و شهرکرد (۸) گزارش‌شده‌است. ازآنجاکه اطلاعات کافی دربارهٔ شیوع بتالاکتامازهای طیف وسیع تیپ CTX-M در میان جدایه‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه در مشهد وجودنداشت و شناسایی سویه‌های مولد ESBL در آزمایشگاه‌ها مرسوم نیست، هدف تحقیق حاضر، تعیین شیوع بتالاکتامازهای طیف وسیع در جدایه‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه در دو بیمارستان دانشگاهی مشهد و تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آنها بود و در ادامه، میزان شیوع ژن bla_{CTX-M} در میان جدایه‌های مولد ESBL مورد بررسی قرارگرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری باکتری‌ها

در این تحقیق، باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه از تاریخ مهر ۱۳۸۹ تا بهمن ۱۳۸۹ از نمونه‌های ادراری ارسالی (نمونه‌گیری تصادفی) به آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های آموزشی قائم و ۱۷ شهریور مشهد جدا شدند. نمونه‌ها مربوط به بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها یا بیماران سرپایی مراجعه‌کننده به آزمایشگاه بیمارستان‌ها بودند و نمونه‌های تکراری حذف‌شدند. باکتری‌هایی به‌عنوان عامل عفونت ادراری درنظرگرفته‌شدند که به تعداد 10^4 یا 10^5 باکتری در هر میلی‌لیتر ادرار جدا شدند. باکتری‌ها با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی افتراقی، شامل آزمایش‌های اکسیداز، اندول، متیل‌رد، وگس‌پروسکایر، حرکت، تولید سولفید هیدروژن، سیترات، اوره و لیزین دکربوکسیلاز شناسایی‌شدند (۹).

آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جداشده با استفاده از آزمایش انتشار در آگار و استانداردهای مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی[1] (CLSI) تعیین‌شد (۱۰)؛ برای این منظور از کلنی خالص باکتری، سوسپانسیون میکروبی معادل غلظت ۰/۵ مک فارلند تهیه

1. Clinical and Laboratory Standards Institute

Archive of SID

www.SID.ir

و به‌طور یکنواخت به محیط مولرهینتون آگار (شماره محصول ۱۰۵٤۳۷۰۵۰۰-Merck- آلمان) تلقیح‌شد. پس از قراردادن دیسک‌های آنتی بیوتیکی با فاصله استاندارد، روی سطح محیط، پلیت در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت قراردادهشد. آزمایش‌ها سه بار تکرارشدند و میانگین قطر هالهٔ عدم رشد برحسب میلی‌متر درنظر-گرفته‌شدند. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده عبارت بودند از: جنتامیسین (۱۰µg)، کوتریموکسازول (۲۵µg)، نیتروفورانتوئین (۳۰µg)، نالیدیکسیک‌اسید (۳۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفتازیدیم (۳۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg) و ایمی‌پنم (۱۰µg). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از کارخانه MAST انگلستان تهیه‌شدند.

آزمایش‌های فنوتیپی تولید ESBL

در ابتدا آزمایش احتمالی دیسک دوتایی[1] (DDT) روی محیط مولر هینتون آگار انجام‌شد؛ برای این منظور، بعد از کشت یکنواخت غلظت استاندارد باکتری، دیسک سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) با فاصله ۱۵ میلی‌متری از دیسک آگمنتین (۱۰/۲۰ میکروگرم) قرارگرفت. بعد از ۱۸ تا ۲٤ ساعت قراردادن در انکوباتور، اگر هاله مهاری به سمت دیسک حاوی کلاوولانات گسترش‌یافته‌بود، آزمایش مثبت درنظرگرفته‌می‌شد (۱۱)؛ سپس برای باکتری‌ها آزمایش تأییدی تولید ESBL براساس استانداردهای CLSI گذاشته‌شد؛ برای این آزمایش، دیسک سفتازیدیم با فاصله ۱۵ میلی‌متری از دیسک حاوی سفتازیدیم و کلاوولانات (۱۰/۳۰ میکروگرم) روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح‌شده با باکتری خالص قراردادهشد؛ اگر بعد از رشد ۱۸ تا ۲٤ ساعته باکتری، قطرهاله عدم رشد در اطراف دیسک حاوی کلاوولانات و سفتازیدیم حداقل ۵ میلی‌متر بیشتر از دیسک حاوی سفتازیدیم به تنهایی بود، آزمایش مثبت درنظرگرفته‌می‌شد (۱۲).

شناسایی تأییدی جدایه‌ها با کیت میکروژن

تمامی سویه‌های مولد ESBL با کیت شناسایی میکروژن[2] (شماره محصول MGMID-64– ساخت کشور انگلستان) از نظر جنس و گونه که کلبسیلا پنومونیه هستند، مورد تأیید قرارگرفتند (شکل۱). آزمایش‌ها مطابق دستور کار کیت انجام و سپس نتایج با کمک نرم‌افزار محصول خوانده‌شدند.

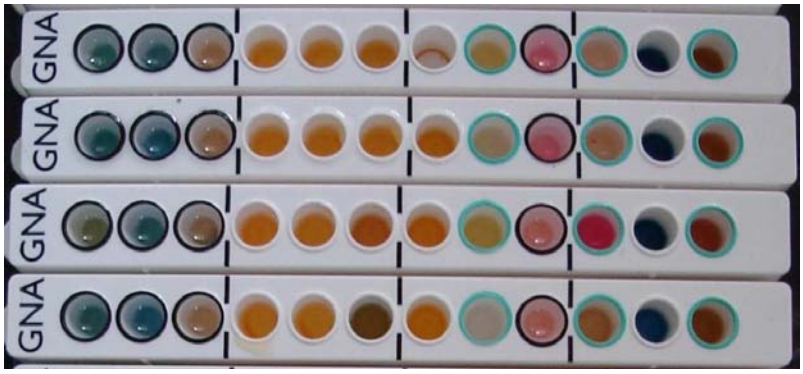
شناسایی ژن bla_{CTX-M} با روش واکنش زنجیره پلیمراز

برای ردیابی ژن پلاسمیدی bla_{CTX-M} در میان جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به استخراج پلاسمید از جدایه‌ها نیاز بود؛ بنابراین کلنی تازه و خالص باکتری‌ها از روی محیط ائوزین‌متیلن بلوآگار به محیط لوریابرتانی[3] (Biomark-B699– هندوستان) حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپی‌سیلین تلقیح‌شد. لوله‌ها در انکوباتور شیکردار ۳۷°C به مدت ۱٦ ساعت قراردادهشدند. سپس DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت mini Kit-5 Prime[4] (شماره سریال ۲۳۰۰۱۰۰– آمریکا) مطابق دستور استخراج‌شد؛ برای ارزیابی مراحل استخراج صحیح پلاسمید، DNA روی ژل آگاروز۲ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز گردید. از پرایمرهای CTX-MU1 (5′-ATGTGCAGYACCAGTAARGT-3′) و CTX-MU2 (5′-TGGGTRAARTARGTSACCAGA-3′) (ساخت شرکت Metabion– آلمان) برای تکثیر یک قطعه ۵۹۳ جفت بازی ژن bla_{CTX-M} استفاده‌شد (۱۳). DNA با کمک دستگاه ترموسایکلر (Kyratec– ساخت کشور کره) با شرایط نشان‌داده‌شده در جدول ۱ تکثیرشد (۱۳). از اشریشیا کلی حاوی bla_{CTX-M} که از انستیتو پاستور تهران تهیه‌شده‌بود، به‌عنوان کنترل مثبت استفاده‌شد.

1. Double Disk Approximation Test

2. Microgen GNA-ID System
3. Luria Bertani Broth
4. PerfectPrep™ Spin Mini Kit

Archive of SID
www.SID.ir



شکل شماره ۱. کیت میکروژن GNA-ID برای شناسایی تأییدی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه

جدول شماره ۱. چرخه‌های تکثیری و زمان و دمای هر چرخه برای تکثیر ژن bla_{CTX-M}

مراحل	درجه حرارت (°C)	زمان	تعداد چرخه
شروع	۹٤	۵ دقیقه	۱
واسرشت	۹٤	۳۰ ثانیه	
اتصال	۵۰	۳۰ ثانیه	۳۰
طویل شدن	۷۲	۳۰ ثانیه	
طویل شدن نهایی	۷۲	۳ دقیقه	۱

محاسبات آماری

برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱٦ استفاده‌شد. درصد حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر-اساس میانگین قطر هاله عدم رشد پس از سه بار تکرار مشخص شد. برای آنالیز آماری مقاومت نسبت‌به آنتی-بیوتیک‌های غیر بتالاکتام بین دو گروه باکتری‌های $ESBL^+$ و $ESBL^-$ از آزمون کای اسکویر[1] استفاده‌شد و نتایج با p value کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار[2] درنظرگرفته‌شد.

نتایج

از صد نمونه ادراری، نوزده باکتری کلبسیلا پنومونیه جدا شد. تولید بتالاکتاماز طیف وسیع با روش‌های فنوتیپی در ٤۷/٤ درصد (۹ از ۱۹) باکتری‌ها شناسایی شد که پنج جدایه از نمونه ادرار بیماران بستری و چهار جدایه از بیماران سرپایی بود. حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مولد ESBL و جدایه‌های غیرمولد بتالاکتاماز در جدول ۳ نشان‌داده‌شده‌است؛ همان‌طورکه در جدول نشان‌داده‌شده، میزان حساسیت جدایه‌های مولد ESBL نسبت‌به ایمی‌پنم، نیتروفورانتوئین و آمیکاسین ۱۰۰ درصد بود. کمترین میزان حساسیت جدایه‌های $ESBL^+$ نسبت‌به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول بود. تمامی باکتری‌های مولد ESBL نسبت‌به سفوتاکسیم مقاوم بودند؛ درحالی‌که ۳۳/۳ درصد این جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی به سفتازیدیم حساسیت نشان‌دادند.

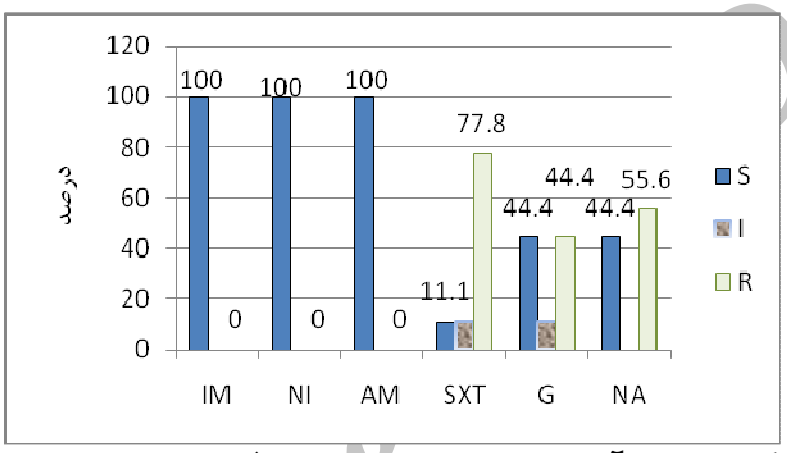
نمودارهای ۱ و ۲، مقایسه جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL و فاقد ESBL را از نظر میزان حساسیت یا مقاومت نسبت‌به آنتی‌بیوتیک‌های غیربتالاکتام نشان‌می‌دهد؛ همان‌طورکه در نمودار مشخص است، درصد بیشتری از جدایه‌های مولد بتالاکتاماز طیف وسیع نسبت‌به سه آنتی‌بیوتیک غیر-بتالاکتام، جنتامیسین، کوتریموکسازول و نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند که اختلاف برای جنتامیسین معنی‌دار بود ($p<0/05$). هیچ‌یک از جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه نسبت‌به ایمی‌پنم و نیتروفورانتوئین مقاوم نبودند و از این نظر، میان دو گروه $ESBL^+$ و $ESBL^-$ اختلافی نبود.

1. Chi square
2. Significant

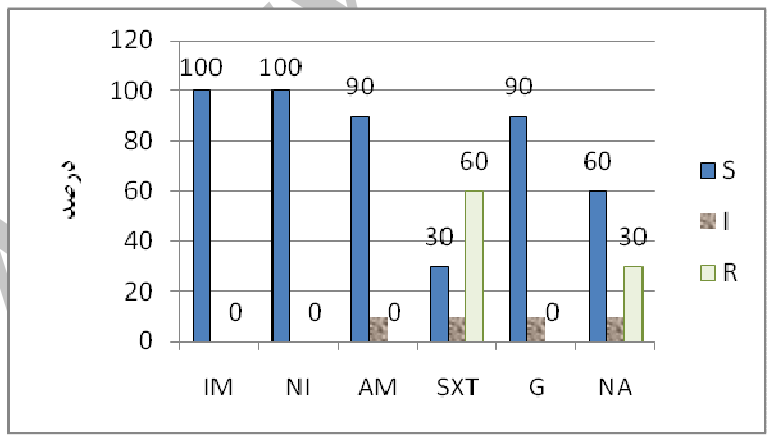
Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۲. حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL و فاقد ESBL نسبت‌به آنتی بیوتیک‌های غیر بتالاکتام

آنتی‌بیوتیک	$ESBL^+$ (درصد)	$ESBL^-$ (درصد)
ایمی‌پنم	۱۰۰	۱۰۰
نالیدیکسیک اسید	٤٤/٤	٦۰
آمیکاسین	۱۰۰	۹۰
کوتریموکسازول	۱۱/۱	۳۰
جنتامیسین	٤٤/٤	۹۰
نیتروفورانتوئین	۱۰۰	۱۰۰



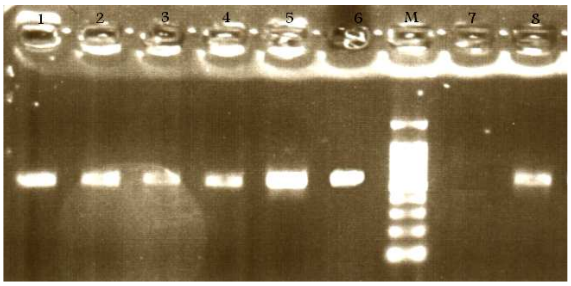
نمودار شماره ۱. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مولد ESBL (IM.= ایمی‌پنم، NI= نیتروفورانتوئین، AM = آمیکاسین، SXT = کوتریموکسازول، G = جنتامیسین، NA = نالیدیکسیک اسید، S= حساس، I= بینابینی، R= مقاوم)



نمودار شماره ۲. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های فاقد ESBL (IM.= ایمی‌پنم، NI= نیتروفورانتوئین، AM = آمیکاسین، SXT = کوتریموکسازول، G = جنتامیسین، NA = نالیدیکسیک اسید، S= حساس، I= بینابینی، R= مقاوم)

تمامی باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتاماز طیف وسیع که با روش فنوتیپی ردیابی شده‌بودند، ژن bla_{CTX-M} را داشتند (شکل ۱).

www.SID.ir



شکل شماره ۱. محصولات PCR ژن bla_{CTX-M} روی ژل آگارز (M= مارکر استاندارد ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۷ کنترل منفی، شماره ۸ کنترل مثبت، شماره‌های ۶-۱ شش مورد از نمونه‌ها)

تمامی باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتاماز طیف وسیع که با روش فنوتیپی ردیابی شده‌بودند، ژن bla_{CTX-M} را داشتند (شکل ۱).

بحث

بتالاکتامازها سیستم دفاعی اصلی باکتری‌های گرم منفی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام هستند. از زمانی که آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مورد استفاده قرارگرفتند، بتالاکتامازها به همراه آنها تکامل‌یافتند و نقش اصلی را در شکست درمانی ایفاکردند (۱٤). بیش از پانزده سال است که اپیدمی‌هایی متعدد از عفونت با باکتری‌های بتالاکتاماز در سراسر دنیا مشاهده‌شده‌است و این پدیده تهدیدی بزرگ در استفاده از سفالوسپورین‌ها محسوب‌می‌شود (۱۵)؛ در این تحقیق از میان صد نمونه ادراری مورد بررسی، نوزده باکتری کلبسیلا پنومونیه جدا شد که نه جدایه (٤۷/٤ درصد) مولد بتالاکتاماز طیف وسیع بودند. در مقایسه با گزارش‌های ارائه‌شده از کشورهای تایوان (۸/۵ درصد)، اسپانیا (۳/۲ درصد)، آمریکا (۸ درصد)، کانادا (۵ درصد) و ژاپن (۰/٤ درصد) میزان شیوع جدایه‌های مولد بتالاکتاماز در جامعه مورد مطالعه بیشتر است (۱٦-۱۹). میزان شیوع در آمریکای لاتین، ٤۵ درصد و عربستان ۵۵ درصد گزارش‌شده‌است (۱۷ و۲۰). *بهروزی و همکاران*، میزان شیوع جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL را در بیمارستان میلاد تهران در سال ۱۳۸۸، ۱۲ درصد گزارش‌کردند (۲۱)؛ در تحقیق گزارش‌شده در سال ۱۳۸۷، درصد شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی ناشی از تولید بتالاکتاماز برای گونه‌های کلیسیلا در بیماران بستری و سرپایی تهران به‌ترتیب ٦/۱ درصد و ۱/۷ درصد و برای شهر تبریز این ارقام به‌ترتیب ۲۱/٤ درصد و ۹/۱ درصد به‌دست‌آمد (٦)؛ در تحقیقی دیگر از بیمارستان شهدای عشایر شهر خرم‌آباد که = روی باکتری‌های گرم منفی در سال ۱۳۸۵-۱۳۸٦ انجام‌شد، شیوع جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL، ۸/۹ درصد گزارش‌شده‌است (۷). در گزارش منتشرشده در سال ۱۳۸۹ توسط *فیض آبادی و همکاران*، ٦۹/۷ درصد جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان لبافی‌نژاد تهران دارای ESBL بودند که ٦۱/۷ درصد آنها مقاومت نسبت‌به سفتازیدیم را نشان‌دادند (۲۲). همان‌طورکه از نتایج تحقیقات مختلف مشخص می‌شود به‌نظرمی‌رسد که شیوع جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL بسته به ناحیه، زمان و روش شناسایی می‌تواند متفاوت باشد.

در تحقیق حاضر، میزان مقاومت جدایه‌های مولد ESBL در مقایسه با انواع ESBL-، نسبت‌به کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید و جنتامیسین بیشتر بود که احتمال‌دارد ژن‌های کدکننده مقاومت در برابر این آنتی‌بیوتیک‌ها همراه ژن‌های مولد بتالاکتاماز روی پلاسمید منتقل می‌شوند؛ در این حالت، درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مولد بتالاکتاماز مشکل‌تر خواهدبود. مشابه تحقیق حاضر، مقاومت جدایه‌های مولد بتالاکتاماز طیف وسیع در مقایسه با سویه‌های فاقد ESBL نسبت‌به جنتامیسین در تانزانیا (۲۳) و نسبت‌به سولفامتوکسازول در هند (۲٤) بیشتر گزارش‌شده‌است.

Archive of SID

www.SID.ir

با توجه به حساسیت جدایه‌های مولد ESBL نسبت‌به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، نیتروفورانتوئین و آمیکاسین در تحقیق حاضر می‌توان از این آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها در جامعه مورد مطالعه استفاده‌کرد.

در این تحقیق، تمامی جدایه‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه، ژن bla_{CTX-M} را داشتند. در گزارش *فیض‌آبادی و همکاران* ٤٦/٥١ درصد جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای ژن bla(CTX-M-I) و ۲۹ درصد آنها دارای ژن bla(CTX-M)-III بودند (۲۲). در گزارش *بامری و همکاران* از ١٦٨ جدایه بالینی کلبسیلا پنومونیه، ۸۸ سویه (۷۵/۲ درصد) ژن bla_{CTX-M} گروه ۱، یک سویه (۰/۸۵ درصد) ژن bla_{CTX-M} گروه ۳ و دو سویه (۱/۷ درصد) ژن bla_{CTX-M} گروه ٤ را کدمی‌کردند (۲۵). در گزارش ارائه‌شده از تحقیقی در اسپانیا در سال ۲۰۰۷، ۳۰ درصد جدایه‌های کلبسیلا این ژن را داشتند که نمونه‌ها از خون، زخم و ادرار جدا شده‌بود (۱۸) و ۱۰۰ درصد جدایه‌های ادراری کلبسیلا در گزارشی از هند، ژن CTX-M۱۵ (٢٦) و ۳۷/۵ درصد جدایه‌ها از کشور فرانسه ژن CTX-M (از نمونه‌های خون، ادرار و مجاری تنفسی) را حمل‌می‌کردند (۲۷). تا اواخر سال ۱۹۹۹ گزارش‌ها مربوط به این بود که اغلب باکتری‌های مولد بتالاکتاماز جداشده از بیماران ژن bla_{SHV} و bla_{TEM} را دارند، اما در سال‌های اخیر، بتالاکتامازهای تیپ CTX-M، بتالاکتاماز غالب گزارش‌شده از بیماران است که می‌تواند نشان‌دهنده افزایش شیوع این ژن در میان باکتری‌های گرم منفی باشد؛ این ژن در سرتاسر جهان از اعضای خانواده انتروباکتریاسه جدا می‌شود (۲۸).

با توجه به اینکه میزان مرگ‌ومیر ناشی از باکتری‌های مولد ESBL رو به افزایش است و ازطرفی، ظهور مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، سالانه هزینه‌های گزافی به کشورها تحمیل‌می‌کند، توجه به غربالگری این باکتری‌ها و درمان صحیح عفونت‌های ناشی از آنها و نیز پرهیز از مصرف نابه‌جای آنتی‌بیوتیک‌ها در کشورمان اهمیت‌دارد.

مهم‌ترین محدودیت این تحقیق عبارت بود از بیمارانی که برای معاینه عمومی و تعیین سلامتی به‌عنوان بیمار سرپایی در بیمارستان‌ها پذیرش‌می‌شدند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق نشان‌می‌دهند که در جامعه مورد مطالعه شیوع جدایه‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL در مقایسه با جوامع پیشرفته بالاتر است و تمامی جدایه‌ها ژن CTX-M را داشتند. مقاومت باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL نسبت‌به آنتی بیوتیک‌های کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید و جنتامیسین بیشتر از جدایه‌های فاقد ESBL بود که اختلاف برای جنتامیسین معنی‌دار بود.

تقدیر و تشکر

از سرکار خانم دکتر *فرشته شاهچراغی* که باکتری کنترل مثبت دارای ژن blaCTX-M را در اختیارمان قرار دادند، صمیمانه قدردانی‌می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. AL- Jasser AM. Extended spectrum beta-lactamases (ESBLs): a global problem. Kuwait Med J. 2006; 38: 171-85.
2. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 933-51.
3. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evaluation of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother. 1985; 28: 302-7.
4. Bal S. Beta-lactamase mediated resistance in hospital-acquired urinary tract infections. Hospital today. 2000; 5: 96-101.
5. Amirmozafari N, Tehrani HF, Tavaf Langeroodi Z, Abdullahi A, Survey of drug resistance due to extended spectrum β-lactamases in *K. pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients (Persian). Pejouhesh, 2007; 31:241-5.
6. Sadeghi MR, Nahaei MR, Soltan Dalal MM. Extended-spectrum beta-lactamase resistance in clinical isolates of *K. pneumoniae* and *E. coli* in in-patient and out-patient groups (Persian). Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services. 2008; 30: 79-86.
7. Hosseinzadegan H, Ramezanzadeh R, Hasani A. Cross-sectional study of extended spectrum beta-lactamase producing gram-negative bacilli from clinical cases in Khorramabad, Iran. Iranian J Microbiol. 2009; 1: 16-9.
8. Zamanzad B, Deyham B, Nafisi MR, Karimi ali, Farokhi E. The frequency of TEM-l gene in extended spectrum beta-lactamases producing *E. coli*, *K. pneumoniae* and Enterobacter strains isolated from Shahrekord hospital clinical samples using PCR (Persian). Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences and Health Services. 2008; 14: 19-25.
9. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey and Scott's diagnostic Microbiology, 11th edition. USA: Mosby; 2002: p.37-40.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 12th informational supplement. M100-S12, National Committee for Clinical Laboratory standards. Wayne: Pa. 2002.
11. Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum beta-lactamases in urinary isolates of *Escerichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*- Prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. Indian J Med Microbiol. 2004; 22 (3): 172-4.
12. Linscott AJ, Brown WJ. Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests .J Clin Microbiol. 2005; 43: 1081–5.
13. Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, Romero E, Rossolini GM. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northerm Italy. J Clin Microbiol. 2003; 41: 4264-9.
14. Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *E. coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. J Clin Microbiol. 2008; 46: 707-12.
15. Sanchez UM, Bello TH, Dominguez YM, Mella MS, Zemelman ZR, Gonzalez RG. Transference of extended-spectrum beta-lactamases from nosocomial strains of *K. pneumoniae* to other species of Enterobacteriaceae. Rev Med Chil. 2006; 134: 415-20.
16. Yan J-J, Wu S-M, Tsai S-H, Wu J-J, Su I-J. Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *K. pneumoniae* producing extended-spectrum β-lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8(in southern Taiwan. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44: 1438–42.
17. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. Clin Infect Dis. 2001; 32: S94-S103.
18. Valverde A. Complex molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in *K. pneumoniae*: a long-term perspective from a single institution in Madrid. J Antimicrob Chemother. 2007; 61: 64 -72.
19. Yagi T, Wachino JI, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y. Practical methods using boronic acid compounds for identification of Class C beta-lactamase-producing K. pneumoniae and E. coli. J Clin Microbiol. 2005; 43: 2551-58.
20. Al-Agamy MH, Shibl AM, Tawfik AF. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *K. pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. Ann Saudi Med. 2009; 29 (4): 253–7.
21. Behrooozi A, Rahbar M, Vand Yousefi J, Frequency of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs(producing *E. coli* and *K. pneumonia* isolated from urine in an Iranian 1000-bed tertiary care hospital. Afr J Microbiol Res. 2010; 4 (9): 881-4.
22. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, Parvin M, Yadegarinia D. Distribution of bla(TEM), bla(SHV), bla(CTX-M(genes among clinical isolates of *K. pneumoniae* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. Microb Drug Resist. 2010;16: 49-53.
23. Ndugulile F, Jureen R, Harthug S, Urassa W, Langeland N. Extended spectrum beta-lactamases among Gram-negative bacteria of nosocomial origin from an Intensive Care Unit of a tertiary health facility in Tanzania. BMC Infect Dis. 2005; 5: 86.
24. Goyal A, Prasad KN, Prasad A, Gupta S, Ghoshal U, Ayyagari A. Extended spectrum beta-lactamases in *E. coli* & *K. pneumoniae* & associated risk factors. Indian J Med Res. 2009; 129 (6): 695-700.
25. Bameri Z, Chitsaz M, Owlia P. Detection of CTX-M-beta-lactamases in isolated K. pneumoniae. Iran J Pathol. 2010; 5:137-42.
26. Muzaheed, Yohei D, Adams-Haduch JM, Endimiani A, Sidjabat HE, Gaddad SM, Paterson DL. High prevalence of CTX-M-15-producing K. pneumoniae among inpatients and outpatients with urinary tract infection in Southern India. J Antimicrob Chemother. 2008. 61(6): 1393-4.
27. Galas M, Decousser J, Breton N, Godard T, Allouch YP, Pina P. Nationwide Study of the Prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum- β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in France. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 52 (2): 786-9.
28. Daoud Z, Moubareck C, Hakime N, Doucet-Populaire F. Extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in Lebanese ICU patients: epidemiology and patterns of resistance, J Gen Appl Microbiol. 2006; 52: 169-78.

Archive of SID

www.SID.ir

Daneshvar

Medicine

Pattern of antibiotic susceptibility and detection of CTX-M-type extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) in urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Mashhad

Mahboobeh Nakhaee Moghadam[1], Sahar Naderifar[2], Mohammad Reza Zolfaghari[2], Saeid Amel Jamehdar[3], Mehrdad Hashemi[4]

1. Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
2. Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
3. Department of Microbiology and Virology, Emam Reza Hospital, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
4. Department of Biochemistry, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

e-mail: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) are defined as enzymes capable of hydrolyzing oxyimino-cephalosporins. Selective pressure of overuse of new antibiotics may be associated with emergence of new types of beta-lactamases. The aim of this study was to identify urinary isolates of CTX-M ESBL-producing Klebsiella pneumoniae and to detect their pattern of antibiotic susceptibility

Materials and Methods: Bacteria were isolated and identified from the urine samples sent to laboratories of two hospitals in Mashhad in 2010. Isolates were then tested for antimicrobial susceptibility by disc diffusion and examined for beta-lactamase production by double disk approximation test and CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) confirmatory test. The blaCTX-M genes were detected by polymerase chain reaction using specific primer.

Results: Out of 100 studied urinary specimens, 19 bacteria were K. pneumonia, of which 47.4% were ESBL producer and all were positive for blaCTX-M gene. A large percentage of ESBL-producing isolates compared to ESBL-non producers were resistant to co-trimoxazole, gentamicin, and nalidixic acid and the difference for gentamicin was significant.

Conclusion: Due to relatively high prevalence of ESBL-producing bacteria in the studied population, screening of infections caused by these bacteria would be important for appropriate treatment.

Key words: Klebsiella pneumoniae, Antibiotic sensitivity, Extended spectrum beta-lactamases, CTX-M type

Scientific-Research Journal of Shahed University Seventeenth Year, No.96 December, January 2011-2012

Received: 18/11/2011
Last revised: 25/1/2011
Accepted: 27/1/2012

Daneshvar(medicine) shahed University/ 19th year/2011-2012/NO.96

www.SID.ir