

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و وجود ژن های بتالاکتامازی bla_{CTX-M} ، bla_{TEM} ، bla_{SHV} در سویه های کلبسیلا

مولد ESBL از نمونه های بالینی در بابل

احمد صالحی گتابی، فاطمه زابلی*

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت اله آملی، آمل، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۷/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۵

زمینه و هدف: مقاومت آنزیمی بتالاکتاماز طیف گسترده (ESBL) یکی از شایع ترین مکانیسم های مقاومت آنزیمی بتالاکتاماز در باکتری های عامل عفونت های بیمارستانی است. از مهم ترین عوامل این نوع مقاومت دارویی، مصرف خودسرانه و یا بیش از حد آنتی بیوتیک ها می باشد. الگوی مقاومت سویه های باکتریایی مولد عفونت های بیمارستانی با مکانیسم ESBLs در مناطق مختلف ایران در دسترس نمی باشد و شیوع آن در فصل های سال متفاوت بوده و موارد مقاومت آن در حال افزایش می باشد. هدف از این مطالعه، تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و وجود ژن های بتالاکتامازی SHV، TEM، CTX-M در سویه های کلبسیلا مولد ESBL از نمونه های بالینی در بیمارستان یحیی نژاد بابل بود.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی تحلیلی در مقطع زمانی شش ماهه در سال ۱۳۹۳ انجام گرفت. از میان ۲۰۷۵ نمونه های بالینی (ادرار، خون، ترشحات برونش، لوله تراشه، زخم، مایعات پلور، CSF، آسیت، مفصل، مغز استخوان) تعداد ۳۹ ایزوله سویه های کلبسیلا شناسایی شد و با روش انتشار دیسک بر اساس دستورالعمل (CLSI) الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی انجام و سپس سویه ها با روش سینرژیک دودیسک از نظر وجود ESBL بررسی شدند. در مرحله بعد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از نظر حضور ژن های SHV، TEM، CTX-M به روش PCR بررسی گردید. داده ها با استفاده از آزمون های آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: فراوانی سویه های تشخیص داده شده شامل ۳۱ (۷۹/۴۹ درصد) ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۵ (۱۲/۸۲ درصد) ایزوله کلبسیلا اکسی توکا، ۳ (۷/۶۹ درصد) ایزوله کلبسیلا اوزنه بود. از میان ایزوله های کلبسیلا ۱۹ (۴۸/۷۲ درصد) ایزوله مقاوم به سفوتاکسیم، ۱۴ (۳۵/۹۰ درصد) ایزوله مقاوم به سفتانیدیم، ۱۸ (۴۶/۱۶ درصد) ایزوله مقاوم به آمیکاسین، ۱۳ (۳۳/۳۴ درصد) ایزوله مقاوم به مروپنم، ۱۸ (۴۶/۱۵ درصد) ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۲۶ (۶۶/۶۷ درصد) ایزوله مقاوم به سفتریاکسون، ۱۲ (۳۰/۷۷ درصد) ایزوله مقاوم به پنی سیلین تازوباکتام و ۱۶ (۴۱/۰۳ درصد) ایزوله مقاوم به آمپی سیلین سولباکتام بودند. تعداد ۱۰ (۲۵/۶۴ درصد) ایزوله کلبسیلا پنومونیه ESBL مثبت بودند، که ۱۰ (۱۰۰ درصد) ایزوله ها ژن bla SHV، ۶ (۶۰ درصد) ایزوله ژن bla TEM و ۴ (۴۰ درصد) ایزوله ژن bla CTX-M را داشتند.

نتیجه گیری: با توجه به درصد بالای مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم، انجام دقیق آنتی بیوگرام و پرهیز از تجویز بی رویه آنتی بیوتیک ها در عفونت های ناشی از ارگانیزم های تولید کننده ESBL و غربالگری نمونه های بالینی از لحاظ مقاومت به ESBL و همچنین راهکارهای لازم جهت کمک به پزشکان در تشخیص بیماری و استفاده از درمان مناسب از اهمیت زیادی برخوردار است.

واژه های کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، مقاومت آنتی بیوتیکی، آنزیم بتالاکتاماز طیف گسترده

* نویسنده مسئول: فاطمه زابلی، آمل، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت اله آملی، دانشکده صنایع غذایی، گروه میکروبیولوژی
Email: m.zaboli1379@yahoo.com

مقدمه

امروزه به دلیل ظهور سویه‌های مقاوم میکروبی، شاهد بروز انواع مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها هستیم. از مهم‌ترین عوامل مقاومت‌های دارویی مصرف خودسرانه و یا بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. اعضای جنس کلبسیلا از پاتوژن‌های فرصت طلب بیمارستانی هستند. در جنس کلبسیلا، مهم‌ترین گونه، کلبسیلا پنومونیه است. مهم‌ترین دلیل اهمیت این باکتری ایجاد پنومونی باکتریایی اکتسابی از بیمارستان و به ویژه در افراد الکلی‌های مزمن است (۱). این باکتری به عنوان یک میکروارگانیسم ساپروفیت در نازوفارنکس و در روده انسان زندگی می‌کند. همچنین در افراد ضعیف با ضعف سیستم ایمنی باعث انواع مختلفی از عفونت‌ها می‌گردد. به ویژه در نوزادان موجب پنومونی، سپتی سمی، اسهال، ایجاد آبسه در کبد، اندوفتالمیت، مننژیت، عفونت‌های ادراری و باکتری می‌گردد. بیشترین میزان مرگ و میر در نوزادان مربوط به عفونت‌های پنومونی، سپتی سمی، مننژیت و اسهال می‌باشد (۱). آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با اتصال به پروتئین باند شونده به پنی سیلین سبب تخریب دیواره سلولی و به دنبال آن از بین رفتن باکتری می‌شود. بیشتر ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چندین دارو تهدید جدی برای زندگی به حساب آید (۲).

بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف (ESBL)^(۱) بر اساس ساختار اولیه به چهار کلاس مولکولی تقسیم می‌شوند. با تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی و از طریق هیدرولیز هسته

مرکزی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، باعث غیر فعال شدن آنها می‌گردد (۳ و ۴). از لحاظ عملکردی بتالاکتام‌ها شامل سفالوسپورین‌هایی هستند که به خوبی به وسیله کلانولانیک اسید مهار نمی‌شوند. گروه دوم شامل پنی‌سلین‌ها و سفالوسپورین‌ها یا هر دو به وسیله مهار کننده‌های بتالاکتاماز مهار می‌شوند، بتالاکتام‌های این گروه شامل SHV^(۲)، TEM^(۳)، CTX-M^(۴) می‌باشد (۵). ژن‌های بتالاکتامازی در ایزوله‌های مختلف می‌توانند پنی‌سیلین و سفالوسپورین‌ها را هیدرولیز کند. شایع‌ترین ESBL‌های گزارش شده از کشورهای غربی و آسیایی SHV، TEM و CTX-M می‌باشد که بر روی پلاسمیدهای بزرگ قرار دارند (۶). مطالعه‌های اخیر نشان دهنده گسترش و پراکندگی ژن‌های بتالاکتامازی SHV، TEM و CTX-M در نقاط مختلف جهان است. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۷ در ۱۱ بیمارستان اسپانیایی از ۳۲ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۵۳/۱ درصد ایزوله مولد ESBL شناسایی گردید (۸).

در مطالعه‌ای در ۱۰ بیمارستان از کشور تایوان، ۵۰ درصد ایزوله‌های ESBL مثبت گزارش شد (۹). در مطالعه‌های متعدد از کشورهای نروژ، هند، برزیل، اسپانیا و عربستان سعودی بین ۸/۴ تا ۴۳/۷ درصد از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه ESBL مثبت بودند (۱۰-۱۵). در مطالعه‌های انجام شده در ایران در شهرهای تهران، تبریز، شیراز و

1-Extended Spectrum Betalactamase
2-Sulphydryl Variable
3-Temoneira.
4-Cefotaxime- Munich

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و وجود ژن های بتالاکتامازی درسویه های کلبسیلا

مایعات(پلور، مایع مغزی نخاعی، آسیت، مفصل، مغز استخوان) از بیمارستان یحیی نژاد در مقطع زمانی ۶ ماهه در سال ۱۳۹۳ (از تیر ۱۳۹۳ تا آذر ۱۳۹۳) جمع آوری شدند. جهت شناسایی ایزوله های کلبسیلا، کشت بر روی محیط های انتخابی بلاد آگار، EMB، شکلات آگار، تایو گلی کولات(مرک، آلمان) و کشت خون دی فازیک(بهارافشان، ایران) انجام شد. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته از کلنی های مشکوک به کلبسیلا واکنش های بیوشیمیایی بر روی محیط های؛ سیمون سیترات، SIM، اوره، متیل رد، و گس پروسکوئر، آرژنین دهیدرولاز، اورنیتین دکربوکسیلاز و لیزین دکربوکسیلاز(مرک آلمان) جهت تأیید نهایی استفاده شد(۲۰). جدایه ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند(۱۶). بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش دیسک آگار دیفیوژن و بر اساس دستورالعمل مؤسسه استاندارد آزمایشگاهی بالینی CLSI انجام شد.

جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی، کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند ساخته و تلقیح بر روی پلیت مولر هینتون آگار، کشت انجام شد. با قرار دادن ۸ دیسک آنتی بیوتیک شامل؛ مروپنم(MEM) ۱۰ ماکروگرم، آمیکاسین(AK) ۱۰ ماکروگرم، سفوتاکسیم(CTX) ۳۰ ماکروگرم، سیپروفلوکسولون(CIP) ۵ ماکروگرم، سفتازیدیم(CAZ) ۳۰ ماکروگرم، سفتریاکسون(CRO) ۳۰ ماکروگرم، پیپیراسیلین تازوباکتام(PTZ) ۱۰ ماکروگرم،

کاشان این میزان بین ۲۳ تا ۹۷/۸۷ درصد گزارش شده است(۱۹-۱۶).

واکنش زنجیره ای پلی مران(PCR) یکی از روش های ملکولی است که می توان به عنوان یک روش دقیق و حساس استفاده کرد. با توجه به حساسیت تشخیصی بالا، PCR به عنوان روشی مناسب می باشد. ژن های کد کننده ESBL معمولاً روی پلاسمید قرار گرفته اند و قابلیت انتقال به سویه های گرم منفی دیگر را نیز دارند و همچنین الگوی مقاومت سویه های باکتریایی مولد عفونت های بیمارستانی با مکانیسم ESBLs در مناطق مختلف ایران در دسترس نمی باشد و شیوع آن در فصل های سال متفاوت بوده و موارد مقاومت آن در حال افزایش می باشد. به علاوه درمان آنتی بیوتیکی در بیمارستان ها، اغلب با استفاده از تست های آنتی بیوگرام موجب راهنمایی دقیق تر برای درمان می شود و مطالعه حاضر می تواند از این طریق به جامعه خدمت کند. این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و وجود ژن های بتالاکتامازی SHV، TEM و CTX-M در سویه های کلبسیلا مولد ESBL از نمونه های بالینی در بیمارستان یحیی نژاد بابل انجام شد.

روش بررسی

این یک مطالعه توصیفی تحلیلی بوده که در مجموع ۲۰۷۵ نمونه بالینی از بیماران بستری و سرپایی شامل؛ ترشحات (لوله تراشه، برونش، زخم)، ادرار، خون،

آمپی‌سیلین سولباکتام (SAM) ۲۰ ماکروگرم از شرکت Mast انگلستان و به کارگرفته شدند (۲۰).

سویه *K. Pneumoniae* ATCC 700603 جهت کنترل در روش تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و همچنین سویه *K. pneumoniae* PTCC 1290 مولد SHV، TEM و CTX-M تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی تهران به عنوان کنترل مثبت در آزمون PCR استفاده شد (۱۶). هدف از تست تأییدی فنوتیپی سینرژیک دو دیسک، جداسازی سوش‌های تولید کننده ESBL برطبق دستورالعمل (CLSI) بود. بر این اساس قطر هاله مهار رشد کمتر از ۱۷ میلی‌متر برای سفتازیدیم و قطر هاله مهار رشد کمتر از ۲۲ میلی‌متر برای سفوتاکسیم جهت غربالگری سویه‌های تولید کننده ESBL به کار گرفته شد. سفتازیدیم کلاولانیک اسید (CA10µg/CAZ30µg) و سفوتاکسیم کلاولانیک اسید (CA10µg/CTX30µg) تهیه شده از شرکت Mast انگلستان و دیسک‌های سفتازیدیم، سفوتاکسیم بر روی محیط کشت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد افزایش قطر هاله عدم رشد به اندازه ۵ میلی‌متر یا بیشتر در اطراف دیسک‌های ترکیبی در مقایسه با هرآنتی بیوتیک نشان دهنده تولید ESBL بود (۱۶). همچنین توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده است (۲۱، ۱۸ و ۱۶). واکنش PCR در جدول ۲، ارایه شده است.

DNA ژنومی تخلیص شده با پرایمرهای اختصاصی از نظر حضور ژن‌های SHV، TEM و CTX-M با روش PCR بررسی گردید. واکنش PCR درون چاهک‌ها مخلوطی به حجم ۵۰ میکرولیتر شامل؛ ۲۰ میکرولیتر DNA تخلیص شده ژنومی، ۳۰ میکرولیتر مخلوط پرایمر Forward و Reverse، dNTP، $MgCl_2$ و آنزیم Taq Polymerase تهیه شده از شرکت سیناژن ایران بود (۱۶). برنامه در این روش با دستورالعمل استخراج DNA با استفاده از کیت PCR از شرکت سیناژن انجام شد. سپس کیفیت و کمیت نمونه‌های تخلیص شده ارزیابی شد. واکنش PCR به منظور تکثیر ژن‌های SHV، TEM و CTX-M روی نمونه‌های تخلیص شده انجام شد.

در این مطالعه تشخیص حضور ژن‌های bla SHV با اندازه ۲۱۴ bp، bla TEM با اندازه ۴۷۸bp و bla CTX-M با اندازه ۱۸۵ bp انجام شد. از مارکر SMO323 (Ladder Fermantase) ۱۰۰ bp جهت تأیید وزن ملکولی محصولات تکثیر شده به وسیله PCR استفاده شده است (۱۷). محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد به مدت یکساعت در ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و وجود ژن های بتالاکتامازی در سویه های کلبسیلا

جدول ۱: جدول توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژنهای مولد بتالاکتاماز

توالی پرایمر	ژن
5' - GATGAACGCTTTCCCATGATG - 3' 5' - CGCTGTTATCGCTCATGGTAA - 3'	<i>bla SHV-F</i> <i>bla SHV-R</i>
5' - GAGTATCAACATTTCCGTGTC - 3' 5' - TAATCAGTGAGGCACCTTCTC - 3'	<i>bla TEM-F</i> <i>bla TEM-R</i>
5' - CGCTTTGCGATGTGCAG- 3' 5' - ACCGCGATATCGTTGGT- 3'	<i>bla CTX-M-F</i> <i>bla CTX-M-R</i>

جدول ۲: مراحل آزمایش PCR و دمای به کار رفته برای شناسایی حضور ژن ها

زمان	درجه حرارت (سیلیسیوس)	مراحل آزمایش
۱۲ دقیقه	۹۵	مرحله شروع
۲۰ ثانیه	۹۵	مرحله واسرشت
۴۰ ثانیه	۵۸	مرحله اتصال
۲۰ ثانیه	۷۲	مرحله طولیل شدن
۱۰ دقیقه	۷۲	مرحله طولیل شدن نهایی
۳۳، ۳۳، ۳۵		تعداد سیکل برای شناسایی ژن (<i>CTX-M</i> , <i>TEM</i> , <i>SHV</i>)

یافته‌ها

توزیع فراوانی باکتری‌های جداسده بر حسب نوع نمونه بالینی و منبع جداسازی آنها در جدول ۳ نشان داده شده است. فراوانی سویه‌های شناسایی شده به ترتیب شامل؛ ۳۱ (۷۹/۴۹ درصد) ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۵ (۱۲/۸۲ درصد) ایزوله اکسی توکا و ۳ (۷/۶۹ درصد) ایزوله اوزنه بودند. جدول ۴ و ۵ نشان می دهد؛ بین مقاومت آنتی بیوتیکی کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL و ژن‌های *bla SHV*، *bla TEM*، *bla CTX-M* با جنس و سن

افراد مورد مطالعه ارتباط آماری وجود ندارد. جدول ۶ نشان می‌دهد مروپنم، سفنازیدیم و پیپیراسیلین تازوباکتام مؤثرترین آنتی‌بیوتیک علیه ایزوله کلبسیلا می‌باشد. جدول ۷ نشان می دهد، ۳۹ ایزوله سویه های کلبسیلا با روش دو دیسک ترکیبی، مورد آزمایش قرار گرفت که، ۲۸ (۷۱/۷۹ درصد) ایزوله دارای افزایش هاله و

۱۱ (۲۸/۲۱ درصد) ایزوله عدم افزایش هاله و ESBL

مثبت و منفی بودند.

جدول ۳: توزیع فراوانی باکتری های جدا شده بر حسب نوع نمونه بالینی و منبع جداسازی آنها

درصد	تعداد	میزان فراوانی نمونه از نظریه سوبه های		منبع نمونه بالینی
		کلبسیلا		
		مثبت	منفی	
۸۷/۶۱	۱۸۱۸	۱۷۸۶	۳۲	ادرار
۵/۷۳	۱۱۹	۱۱۹	۰	خون
۲/۴۶	۵۱	۴۹	۲	لوله تراشه
۰/۱	۲	۲	۰	ترشحات برونش
۳/۵۱	۷۳	۶۹	۴	زخم
۰/۱	۲	۲	۰	پلور
۰/۲۹	۶	۶	۰	CSF
۰/۱	۲	۱	۱	مایعات آسیت
۰/۱	۲	۲	۰	مفصل

جدول ۴: توزیع ژن های CTX-M، TEM، SHV بر حسب جنس

سطح معنی داری	جمع	جنس		ژن مولد ESBL	
		مرد	زن		
	۱۰	۴	۶	درصد	درصد
	%۱۰۰	%۴۰	%۶۰		
۰/۳۹	۶	۲	۴	فراوانی	TEM
	%۶۰	%۲۰	%۴۰	درصد	درصد
	۴	۲	۲	فراوانی	CTX-M
	%۴۰	%۲۰	%۲۰	درصد	درصد

جدول ۵: بررسی فراوانی سوبه کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBL بر حسب گروه سنی

سطح معنی داری	جمع	سن (سال)		ژن مولد ESBL	
		۵۰-۱۰۰	۱۰-۵۰		
	۱۰	۵	۵	درصد	درصد
	%۱۰۰	%۵۰	%۵۰		
۰/۲۴	۶	۳	۳	فراوانی	TEM
	%۶۰	%۳۰	%۳۰	درصد	درصد
	۴	۱	۳	فراوانی	CTX-M
	%۴۰	%۱۰	%۳۰	درصد	درصد

جدول ۶: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه بر اساس درصد

انواع دیسک های مورد مطالعه								وضعیت حساسیت یا مقاومت
SAM	PTZ	CRO	CAZ	CIP	MEM	CTX	AK	

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و وجود ژن های بتالاکتامازی در سویه های کلبسیلا

۵۶/۴۱	۶۴/۱۰	۳۳/۳۳	۶۴/۱۰	۴۳/۵۹	۵۸/۹۷	۵۱/۲۸	۵۱/۲۸	حساس
۲/۵۶	۵/۱۳	.	.	۱۰/۲۵	۷/۶۹	.	۲/۵۶	نیمه حساس
۴۱/۰۳	۳۰/۷۷	۶۶/۶۷	۳۵/۹۰	۴۶/۱۶	۳۳/۳۴	۴۸/۷۲	۴۶/۱۶	مقاوم

Note: AN: Amikacin- CTX: Cefotaxime- MEM: Meropenem- CIP: Ciprofloxacin- CAZ: Ceftazidime- CRO: Ceftriaxone- PTZ: Piperacillin Tazobactam- SAM: Ampicilin sulbactam

جدول ۷: نتایج تست تأییدی تولید ESBL در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه با روش دیسک ترکیبی

آنتی بیوتیک دیسک ترکیبی		
سفتاکسیم/کلولانیک اسید (CTX+CV)	سفتازیدیم / کلولانیک اسید (CAZ+CV)	هاله های توقف رشد
۷۱/۷۹	۷۱/۷۹	افزایش هاله
۲۸/۲۱	۲۸/۲۱	عدم افزایش هاله

بحث

تازوباکتام، سولباکتام و کلولانیک اسید می باشد (۲۳).
انتشار این باکتری های فرصت طلب غالباً، ناشی از استفاده
گسترده داروهای بتالاکتام وسیع الطیف در بخش های ICU
بیمارستان می باشد (۲۴).

در این مطالعه، نتایج به دست آمده از آنتی بیوگرام
با نتایج مطالعه ای در اردن همسو بوده است (۲۵). ولی با
مطالعه ای در تهران تفاوت داشته است، به طوری که،
مقاومت به سفتازیدیم ۲ درصد و آمیکاسین بدون مقاومت
گزارش شد (۲۰).

با انجام آزمون تأییدی بر روی ارگانسیم های
غربالی مولد ESBL به روش سینرژیک دو دیسک،
۱۰ (۲۵/۶۵ درصد) ایزوله تولید کننده نهایی ESBL بود. در
صورتی که در مطالعه ای در شهر اصفهان، ۴۶ (۷۰ درصد)
سویه کلبسیلا ESBL مثبت گزارش شد (۱۴). مطالعه ای در
تبریز نشان دادند که ۶۲/۹ درصد نمونه های کلبسیلا
پنومونیه، دارای ESBL مثبت بود (۲۶). نتایج منتشر شده از

جنس کلبسیلا بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی
طبقه بندی می شوند. تشخیص صحیح آزمایشگاهی، برای
جلوگیری از شکست درمانی، ناشی از انتخاب نامناسب
آنتی بیوتیک، به منظور مطالعه های اپیدمیولوژیکی و پیدا
نمودن منبع و طریقه انتشار این میکروارگانیسم اهمیت
زیادی دارد (۲۲ و ۱۶). نتایج این مطالعه حاکی از مقاومت
سفالوسپورین های نسل سوم، شیوع ESBL و حضور
ژن های بتالاکتامازی CTX-M، TEM، SHV در ایزوله های
مورد بررسی می باشد. بنابراین آنزیم های ESBL از
مهم ترین عوامل مؤثر در افزایش مقاومت نسبت به
سفالوسپورین های وسیع الطیف هستند (۱۶).

ESBL علیه مونوباکتام ها و اکسی
ایمینوسفالوسپورین ها، به استثناء سفامایسین، فعال
هستند (۲۲). یکی از مهم ترین راهکارهای موفق در غلبه بر
مقاومت بتالاکتامازها، استفاده از ممانعت کننده های

تحقیقات علمی مختلف میزان تولید ESBL در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه را بین ۷۵/۷۵ تا ۸/۹ درصد گزارش کردند. در بررسی شیوع مقاومت ESBL بین سویه‌های کلبسیلا در بیماران بستری و سرپایی شهر تهران به ترتیب ۳۱/۴ و ۱۲/۲ درصد و در شهر تبریز به ترتیب ۲۱/۴ و ۹/۱ درصد گزارش کردند (۲۷). در مطالعه‌ای در تهران (۴۶/۹ درصد) جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL گزارش کردند، که با نتایج این مطالعه متفاوت بوده است (۱۶). یکی از دلایل تفاوت احتمالاً مربوط به منبع عفونت و نوع نمونه بررسی شده می‌باشد.

در این مطالعه، ۳۱ (۷۹/۴۹ درصد) ایزوله کلبسیلا پنومونیه بود که از میان ۱۰ (۲۵/۶۵ درصد) ایزوله مولد ESBL مثبت، همه آنها از نوع کلبسیلا پنومونیه بود. مطالعه‌ای در هندوستان میزان شیوع آن ۴۴/۴ درصد، تایلند ۶۴ درصد، ژاپن ۴۰ درصد (۲۸)، کره ۴/۸ درصد، تایوان ۸/۵ درصد، هنگ کنگ ۱۲ درصد (۳۳ و ۱۰) و در ایالات برکلی آمریکا ۴۴ درصد گزارش کردند (۳۰). همچنین در فرانسه میزان بروز این فنوتیپ در بیماران بستری از ۳۰ تا ۴۰ درصد و در بیماران سرپایی ۶ درصد گزارش کردند (۲۹). در آسیای جنوب شرقی میزان شیوع آن ۲۰ درصد گزارش کردند، اما در برخی مناطق به بیش از ۶۰ درصد مشاهده شد (۳۰). همچنین مطالعه‌ای نشان داده که میانگین میزان شیوع ESBL در اروپا ۱۸/۴ درصد، هلند ۴۰ درصد و در سوئد ۳ درصد گزارش کردند (۱۴). نتایج منتشر شده نشان می‌دهند که بالاترین درصد سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL در کشورهای آمریکای لاتین ۵۴/۴ درصد، اروپا ۲۲/۶ درصد و حوزه غربی آرام ۲۴/۶

درصد مشاهده شد (۳۱). میزان ESBL در سویه‌های جدا شده از کشورهای مختلف و همچنین در یک کشور و در سایر بیمارستان‌ها متفاوت می‌باشد، که این مسئله به سیستم کنترل عفونت و مدت زیاد بستری شدن بیماران، بستگی دارد (۳۲). مطالعه‌ای در شهر قزوین نشان داد ۱۹ (۴۲ درصد) ایزوله دارای ژن bla SHV و ۲۶ (۵۸ درصد) ایزوله دارای ژن bla TEM بودند که نسبت به مطالعه حاضر از شیوع ژن کمتری برخوردار است (۳۳). فیض آبادی و همکاران در مطالعه خود در سال ۲۰۰۹ فراوانی ژن‌های bla SHV و bla TEM را در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۶۷/۴ درصد و ۴۶/۵ درصد گزارش کردند (۳۴). که نسبت به مطالعه حاضر از شیوع کمتری برخوردار است. ناصحی و همکاران میزان جداسازی ژن‌های bla SHV و bla TEM را به ترتیب ۲۶ درصد و ۱۸ درصد گزارش کردند (۳۵). مطالعه‌ای در شهر قم میزان شیوع ژن TEM را ۲۶ درصد گزارش کردند (۳۶)، که نسبت به مطالعه حاضر از شیوع کمتری برخوردار است که با مطالعه حاضر همسو نبوده است. در این پژوهش ژن SHV bla غالب‌ترین نوع بتالاکتاماز بود. افتخار و همکاران در سال ۲۰۱۲ حضور bla SHV (۴۳/۱ درصد)، bla TEM (۵۳/۲ درصد)، bla CTX-M (۳۱/۳ درصد) در کلبسیلا پنومونیه را نشان دادند (۳۷). ریاحی زینانی و همکاران، میزان حضور bla SHV (۲۶ درصد)، bla TEM (۲۴/۵ درصد)، bla CTX-M (۱۸ درصد) گزارش کردند (۳۸). این نتیجه با گزارش‌هایی که نشان می‌دهند ژن bla SHV در برخی از نواحی جغرافیایی به عنوان شایع‌ترین نوع ESBL شناسایی شده

مجله ارمغان دانش - دوره ۲۱ - شماره ۱ - فروردین ۱۳۹۵ (شماره پی در پی ۱۰۸)

است و به سرعت در میان پاتوژن‌های بیمارستانی و جامعه در حال گسترش است، همخوانی دارد.

نتیجه گیری

با توجه به درصد بالای مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم، انجام دقیق آنتی‌بیوگرام و پرهیز از تجویز بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در عفونت‌های ناشی از ارگانسیم‌های تولید کننده ESBL و غربالگری نمونه‌های بالینی از لحاظ مقاومت به ESBL و همچنین راهکارهای لازم جهت کمک به پزشکان در تشخیص بیماری و استفاده از درمان مناسب از اهمیت زیادی برخوردار است.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات آیت اله آملی می‌باشد. از مسئولین بیمارستان شهید یحیی نژاد بابل به دلیل حمایت مالی و همکاری در اجرای این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCE:

1. Behrouzi A, Rahbar M, Yousefivand J. The prevalence of Extended-Spectrum β -lactamase (ESBLs) producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated in Milad hospital of Tehran in 2010. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2010; 4(1): 36-41.
2. Livermore D. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1995; 8(4): 557-84.
3. Ambler R, Coulson A, Frère J-M, Ghuyssen J, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochemical Journal* 1991; 276(1): 269-75.
4. Gupta G, Tak V, Mathur P. Detection of ampc lactamases in gram-negative bacteria. *Journal of Laboratory Physicians* 2014; 6(1): 1-6.
5. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1989; 33(3): 259-65.
6. Fallah F, Hakemi VM, Hashemi A, Shams S. Emergence of novel plasmid-mediated beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* (review article). *Qom University of Medical Sciences Journal* 2013; 16(4): 121-9.
7. Howard C, Van Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard P. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β -lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46(3): 659-64.
8. Diestra K, Coque T, Miró E, Oteo J, Nicolau C, Campos J, et al. Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 11 Spanish hospitals (2004). *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica* 2007; 26(7): 404-10.
9. Chang F, Siu L, Fung C, Huang M, Ho M. Diversity of SHV and TEM lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: gene evolution in northern Taiwan and two novel β -lactamases, SHV-25 and SHV-26. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45(9): 2407-413.
10. Tofteland S, Haldorsen B, Dahl K, Simonsen G, Steinbakk M, Walsh T, et al. Effects of phenotype and genotype on methods for detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45(1): 199-205.
11. Manoharan A, Premalatha K, Chatterjee S, Mathai D. Correlation of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta lactamases among Enterobacteriaceae with their in vitro antimicrobial susceptibility. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2011; 29(2): 161-74.
12. González M, Ramos M, Nadal B, Morffi F, Hernández R, Alvarez A, et al. Phenotypic and molecular identification of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) TEM and SHV produced by clinical isolates *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in hospitals. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2006; 59(1): 52-8.
13. Wollheim C, Guerra I, Conte V, Hoffman S, Schreiner F, Delamare A, et al. Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in southern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2011; 15(2): 138-43.
14. Cantón R, Loza E, Aznar J, Calvo J CE, Cisterna R, Romo FG, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms from intraabdominal infections and evolution of isolates with extended spectrum β -lactamases in the SMART study in Spain (2002-2010). *Rev Esp Quimioter* 2011; 24(4): 223-32.
15. Kader A, Kumar A. Prevalence and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital. *Ann Saudi Med* 2005; 25(3): 239-42.
16. Raei F, Eftekhar F, Feyzabadi M. Correlation of extended-spectrum β -lactamase phenotype with blaSHV, blaTEM and blaCTX-M gene carriage in urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Tehran. *Appliedbiology* 2014; 27(1): 35-44.
17. Mobasher Kare Jeddi A, Nahaei M, Mobayyen H, Pornour M, Sadeghi J. Molecular study of extended-spectrum beta-lactamase (SHVtype) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Medical Centers of Tabriz. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2009; 2(3): 9-17.

18. Archin T, Afzalian E, Kargar M, Ghasemi Y. Molecular identification of shv, tem, ctx-m β lactamases genes and antibiotics resistance pattern of k. pneumoniae isolates collected from icu patients of namazi hospital, shiraz, iran. *Yasuj University of Medical Sciences Journal* 2014; 18(10): 816-25.
19. Khorshidi A, Moazen Z, Rohani M, Moniri R, Shajari G, Mousavi G. Prevalence of TEM1 & SHV1 genes in *Kelebsiella pneumoniae* with ESBL. *Journal of Military Medicine* 2009; 11(3): 149-53.
20. Soltan Dalal M, Miremadi S, Sharify Yazdi M, Rastegar Lari A, Rajabi Z, Avadis Yans S. Antimicrobial resistance trends of *Klebsiella* Spp. isolated from patients in Imam Khomeini hospital. *Payavard Salamat* 2012; 6(4): 275-81.
21. Zei Q, Ya G, Yung S, Xin L. Laboratory, therapy and infection control Extended – spectrum beta – lactamases implication for clinical microbiology. *J Medical Microbiol* 2005; 54(2): 885-6.
22. Bradford PA. Extended-spectrum lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14(4): 933-51.
23. Pagan-Rodriguez D, Zhou X, Simmons R, Bethel C, Hujer A, Helfand M, et al. Tazobactam Inactivation of SHV-1 and the Inhibitor-resistant Ser130→ Gly SHV-1 β -Lactamase INSIGHTS INTO THE MECHANISM OF INHIBITION. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(19): 19494-501.
24. Mehrgan H, Rahbar M. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008; 31(2): 147-51.
25. Alshara MA. Emerging antimicrobial resistance of *klebsiella pneumonia* strains isolated from pediatric patients in jordan. *The New Iraqi Journal of Medicine* 2011; 7(2): 29-32.
26. Masjedian F, Valehi F, Talebi A, Rastegar L. Evaluation of wide broad spectrum antibiotic resistance of *E. coli* and *Klebsiella pneumonia*. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2007; 1(2): 27-34.
27. Sadeghi M, nahaei M, soltan dalal M. Extended-Spectrum beta-lactamase resistance in clinical isolates of *klebsiella pneumoniae* and *escherichia coli* in in-patient and out-patient groups. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Science & Health Service* 2004; 30(2): 24-9.
28. Hawkey PM. Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(1): 159-65.
29. Sirot D, Goldstein F, Soussy C, Courtieu A, Husson M, Lemozy J, et al. Resistance to cefotaxime and seven other beta-lactams in members of the family *Enterobacteriaceae*: a 3-year survey in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1992; 36(8): 1677-81.
30. Pitout J. Multiresistant *Enterobacteriaceae*: New threat of an old problem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; 6(5): 657-69.
31. Behroozzi A, Rahbar M, Yousefi J. Frequency of extended spectrum beta-lactamase (ESBLs) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from urine in an Iranian 1000-bed tertiary care hospital. *Afr J Microbiol Res* 2010; 4(9): 881-4.
32. Lucet J, Chevret S, Decré D, Vanjak D, Macrez A, Bédos J, et al. Outbreak of multiply resistant *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition. *Clinical Infectious Diseases* 1996; 22(3): 430-6.
33. Peymani A, Moeini Rad M, Naserpour T, Sanikhani R, Javadi A, Pahlavan A. The frequency of TEM and SHV beta-lactamase with a wide range of genotypes in isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples collected from hospitals in Qazvin. *Iranian Journal of Infectious Diseases* 2013; 18(60): 15-20.
34. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N. Distribution of bla(TEM), bla(SHV), bla(CTX -M) genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafinejad hospital Tehran, Iran. *Microb Drug Resist* 2010; 16(2): 49-53.
35. Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin VJ, Nematzadeh S. PER, CTX -M, TEM and SHV Beta -lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Tehran, Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2010; 13(3): 111-8.

36. Bostandoost nikoo S, Shahhosseiny MH, Zolfaghari MR, Rahbar M. Early Detection of blaTEM in Klebsiella Isolates by the Molecular Polymerase Chain Reaction Method. *Journal of Babol University of Medical Sciences* 2015; 17(10): 46-52.
37. Eftekhar F, Rastegar M, Golalipoor M, MansourSamaei N. Detection of extended spectrum β -lactamases in urinary isolates of klebsiella pneumoniae in relation to bla(shv), bla(tem) and bla(ctx-m) gene carriage. *Iranian Journal of Public Health* 2012; 41(3): 127-32.
38. Zaniani Fatemeh R, Meshkat Z, Naderi Nasab M, Khaje-Karamadini M, Ghazvini K, Rezaee A, et al. The prevalence of tem and shv genes among extended-spectrum beta-lactamases producing escherichia coli and klebsiella pneumoniae. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2012; 15(1): 654-60.
39. Iwuji C, Reeves I, Nambiar K, Richardson D. Diagnostic utility of urethral smears in predicting urethral chlamydia in HIV-infected men. *International Journal of STD & AIDS* 2008; 19(11): 741-3.
40. Lashgari N, Vand Yousefi J, Siadat SeyedD, Shahcheraghi F, Khosravi M, Vakili H, et al. Identification of bla-CTX-M β -lactamase in Klebsiella pneumoniae clinical isolates by polymerase chain reaction. *Medical Sciences Journal* 2014; 24(3): 148-52.
41. Mazzariol A, Roelofsen E, Koncan R, Voss A, Cornaglia G. Detection of a new SHV-Type extended-spectrum β -lactamase, SHV-31, in a Klebsiella pneumoniae strain causing a large nosocomial outbreak in the Netherlands. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; 51(3): 1082-4.
42. Lal P, Kapil A, Das B, Sood S. Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing Klebsiella sp. isolated from a tertiary care hospital. *Indian J Med Res Feb* 2007 125(2): 173-8.

Antibiotic Resistance Pattern and Existence of Beta-Lactamase SHV, TEM, CTX-M Genes in ESBL-Producing Klebsiella Strains in the Clinical Samples in Babol, Iran

Salehi Gatabi A, Zaboli F*

Department of Microbiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

Received: 26 Sep 2015

Accepted: 24 Feb 2016

Abstract

Background & aim: Resistance to Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) is one of the most widespread enzymatic beta-lactamase in those bacteria which cause infections in hospitals. One major reason for this type of resistance seems to be the arbitrary and/or excessive use of antibiotics. At present, there is no resistance pattern for bacterial strains which cause infections in hospitals with ESBL mechanism in different regions of Iran, they spread differently in different seasons, and more and more cases of the resistance are being reported. Hence, the present study aimed to determine the antibiotic resistance patterns and bacterial strains and to investigate the presence of Beta-lactamase SHV, TEM, CTX-M genes in those Klebsiella strains which produce ESBL. The clinical samples of the study were collected from Yahyanejad Hospital in Babol.

Methods: The present descriptive-analytical study was carried out in six-months in 2014, and 2075 clinical samples (of blood, urine, respiratory discharge, throat culture, wound culture, pleural fluid culture, CSF, Ascitic fluid culture, Synovial culture, and bone marrow smear) were gathered. 39 Klebsiella strains were identified among the hospitalized and out-patients of Yahyanejad Hospital using disk diffusion method and CLSI instructions. Antibiotic allergy tests were given for all the strains, and all the strains were separated using synergic double discs to check the presence of ESBL. In the next phase of the study, the extracted DNA were examined in terms of the presence of SHV, TEM, CTX-M by using specific primers and employing PCR method. The collected data were analyzed using SPSS and K^2 tests.

Results: The frequencies of the identified strains were: isolated Klebsiella Pneumonia: 31(79.49%), isolated Klebsiella Oxytoca: 5(12.82%), and isolated Klebsiella Ozaenae: 3(7.69%). Among the isolated Klebsiella strains 19(48.72%) were resistant to cefotaxime, 14(35.90%) to ceftazidime, 18(46.16%) to Amikacin, 13(33.34%) to Meropenem, 18(46.15%) to Ciprofloxacin, 26(66.67%) to Ceftriaxone, 12(30.77%) to Piperacillin Tazobactam, and 16(41.03%) to Ampicillin sulbactam. Also, among the 39 isolated Klebsiella Pneumonia, there were 10(25.64%) isolated positive ESBL, all the 10(100%) isolated strains having Beta-Lactamase SHV gene, there were 6(60%) isolated positive TEM gene and there were 4(40%) isolated positive CTX-M gene.

Conclusion: Considering the high rate of resistance to third generation cephalosporin, it is imperative to perform accurate antibiogram and avoid irrational prescription of antibiotics in treating infections due to organisms which produce ESBL. In addition, it is of vital importance to screen the clinical samples in terms of resistance to ESBL, and to prepare guidelines for physicians to help realize the disease and to treat the patients properly. Also, the extracted DNA were examined samples purified in identifying genes SHV, TEM, CTX-M in Klebsiella Pneumonia is possible PCR method.

Key words: *Klebsiella Pneumoniae*, Antibiotic resistance, Extended Spectrum Beta lactamase (ESBL), Polymerase Chain Reaction.

***Corresponding Autor:** Zaboli F, Department of Microbiology, Faculty of Food Industries, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

Email: m.zaboli1379@yahoo.com

Please cite this article as follows:

Salehi Gatabi A, Zaboli F. Antibiotic Resistance Pattern and Existence of Beta-Lactamase SHV, TEM, CTX-M Genes in ESBL-Producing Klebsiella Strains in the Clinical Samples in Babol, Iran. Armaghane-danesh 2016; 21 (1): 71-83.