

تشخیص مولکولی ژن‌های بتالاکتامازی CTX-M، bla_{TEM}، bla_{SHV} و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های بالینی در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان نمازی شیراز

طلیعه آرچین^۱، عصمت افزلیان^{۲*}، محمد کارگر^۳، یونس قاسمی^۱

^۱بخش بیوتکنولوژی دارویی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، ^۲مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، ^۳گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۴/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: باکتری‌های مولد بتالاکتامازهای طیف گسترده، به طور وسیعی در سراسر جهان گسترش یافته‌اند. تولید این آنزیم‌ها سبب ایجاد مقاومت باکتری‌ها نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود که منجر به محدود شدن راه‌های کنترل عفونت و گزینه‌های درمانی صحیح شده است. هدف این مطالعه بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و تحقیق پیرامون وجود ژن‌های بتالاکتامازی CTX-M، TEM، SHV. در نمونه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان نمازی شیراز بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی حساسیت باکتری‌های جدا شده نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک با روش انتشار دیسک بر اساس دستورالعمل CLSI تعیین شده و سویه‌ها با روش سینرژی دو دیسک از نظر وجود آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده بررسی شدند و حداقل غلظت بازدارندگی نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با استفاده از نوارهای E-test تعیین شد. ژن‌های CTX-M، TEM، SHV در ایزوله‌ها با روش مالتی پلکس PCR شناسایی و تعدادی از آنها نیز تعیین توالی شد. داده‌ها با آزمون آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: بیشترین درصد مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین ۱۰۰ درصد و میزان حساسیت ایزوله‌ها به ایمی‌پنم ۱/۶۶ درصد بود. در این مطالعه ۶۰ درصد سویه‌ها مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بودند. ژن TEM در ۳۸/۳۴ درصد و هر سه ژن CTX و TEM و SHV در ۱۳/۳۳ درصد ایزوله‌ها یافت شدند.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر حاکی از آن است که کلبسیلا پنومونیه مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز و در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه از شیوع بالایی برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: کلبسیلا، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، حساسیت آنتی‌بیوتیکی

*نویسنده مسئول: عصمت افزلیان، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، معاونت پژوهشی

E-mail: es.afzalian@gmail.com

جهت تهیه فایل **WORD** این مقاله به سایت **DaneshResan.com** مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به عنوان یک مشکل اساسی در درمان و کنترل عفونت‌ها محسوب می‌شوند. در سال‌های اخیر باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف^(۱) در سراسر جهان شیوع فراوانی یافته‌اند به طوری که کاربرد داروهای ضد میکروبی با وجود این آنزیم‌ها مورد تحلیل زیادی قرار گرفته‌اند. باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف به واسطه توانایی هیدرولیز اکثر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به عنوان یک مشکل اساسی در جوامع پزشکی مطرح هستند^(۱). بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) گروهی از آنزیم‌ها هستند که نخستین بار در اواسط دهه ۱۹۸۰ در غرب اروپا و در باکتری کلبسیلا جداسازی شد. سپس در گونه‌های مختلف انتروباکتریاسه نیز یافت گردیدند^(۲). بنابراین از زمان شناسایی این آنزیم‌ها در سال ۱۹۸۳ به علت انتشار سریع آنها، شاهد شیوع فراوانی از آنها در سراسر جهان هستیم. به دنبال رشد روزافزون ارگانسیم‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف، امروزه شاهد گزارش‌های متعددی مبنی بر شیوع گسترده آنها در بخش‌های مراقبت ویژه (ICU) هستیم که این امر غالباً به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای بتالاکتام وسیع الطیف در این بخش می‌باشد^(۳). آنزیم بتالاکتامازهای وسیع الطیف غالباً بر روی پلاسمیدها واقع شده‌اند که مقاومت متقاطع نسبت به کلاس‌های دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها را هم ممکن می‌سازد، که این امر موجب

محدودیت در انتخاب درمان آنتی‌بیوتیکی صحیح می‌شود^(۴ و ۵).

این پلاسمیدها به راحتی در میان گونه‌های باکتریایی قابل انتقال می‌باشند. بنابراین بتالاکتامازهای وسیع الطیف گروهی از آنزیم‌های سریع در حال تکامل هستند که به وسیله باکتری‌های گرم منفی ایجاد می‌گردند و دارای توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌ها و آزترونام می‌باشند. که عمدتاً به وسیله مهارکننده‌های بتالاکتاماز از جمله کلولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌شوند. اغلب بتالاکتامازهای وسیع الطیف به واسطه ایجاد جهش در ژن‌های SHV و TEM به وجود آمده‌اند^(۶).

ارگانسیم‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف از لحاظ بالینی بسیار بااهمیت هستند، زیرا الگوی مقاومت دارویی گسترده‌ای از خود نشان می‌دهند و باعث افزایش مرگ و میر بیماران به ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌ها می‌شوند^(۷)، لذا لزوم به کارگیری راهکارهای درمانی بهینه و ابزارهای مناسب کنترل عفونت جهت کاهش شیوع این ارگانسیم‌ها ضروری است. لازم است که شیوع باکتریهای تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف در هر ناحیه‌ای مشخص شود تا تدابیر درستی برای درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این ارگانسیم‌های مقاوم اتخاذ شود. بنابراین هدف این مطالعه بررسی الگوهای فنوتیپی و ژنوتیپی ژن‌های بتا

1- Extended Spectrum β Lactamases (ESBL)

نوارهای (E.test strip AB Biodisk, selona, sweden) بر روی سوش‌های مقاوم و هم‌چنین نیمه حساس کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم صورت گرفت.

هدف از تست فنوتیپی تأییدی جداسازی

سوش‌های تولید کننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف بود. برطبق دستورالعمل (CLSI)، قطر هاله مهار رشد کمتر از ۲۲ میلی‌متر برای سفنازیدیم و قطر هاله مهار رشد کمتر از ۲۷ میلی‌متر برای سفوتاکسیم و آزترونام برای غربالگری سویه‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به کار گرفته شد. سپس سویه‌های فوق با آزمایش سینرژی دو دیسک (DDST) با قرار دادن دیسک آموکسی‌کلاو با فاصله ۲۰ میلی‌متر از دیسک‌های سفنازیدیم، سفوتاکسیم و آزترونام جهت تأیید تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف غربالگری شدند (۹).

برای استخراج DNA و انجام مالتی پلکس PCR

ابتدا نمونه‌های باکتریایی در ۲۱۵ سی‌سی محیط LB مایع به صورت شبانه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس مقدار ۱۰۰ ماکرو گرم از کشت‌های باکتریایی در داخل میکرو تیوپ‌های استریل ریخته شدند و DNA هریک از ایزوله‌ها به روش جوشاندن استخراج گردید (۱۰). تست مالتی پلکس PCR برای شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی (۹۷۳bp) SHV، (۴۴۵bp) TEM، (۵۹۳bp) CTX-M با استفاده از پرایمرهای یونیورسال انجام شد (۱۲ و ۱۱).

لاکتامازهای وسیع‌الطیف در نمونه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بخش‌های مراقبت ویژه (ICU) بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی در طول مدت ۶ ماه از دی ماه ۱۳۸۸ تا خرداد ماه ۱۳۸۹ تعداد ۵۷۱ نمونه بالینی از بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستان نمازی شیراز جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها شامل ادرار، خون، مایع مغزی نخاعی، خلط و تراشه، زخم و ترشحات چشمی بودند که در آزمایشگاه کلیه سوش‌ها بعد از شناسایی دقیق و انجام تست‌های بیوشیمیایی استاندارد در ۸۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تعیین حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی به وسیله روش انتشار دیسک (Kirby-Baur) صورت گرفت (۸). دیسک‌های مورد استفاده تهیه شده از شرکت هایمدیای هند به شرح زیر بودند؛ سفنازیدیم ۳۰ ماکروگرم، سفوتاکسیم ۳۰ ماکروگرم، سفپیم ۳۰ ماکروگرم، آزترونام ۳۰ ماکروگرم، ایمی پنم ۱۰ ماکروگرم، تری متوپریم سولفامتوکسازول ۲۵ ماکروگرم، آمپی سیلین ۱۰ ماکروگرم، جنتامایسین ۱۰ ماکروگرم، امیکاسین ۳۰ ماکروگرم، سیپروفلوکساسین ۵ ماکروگرم.

بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه نتایج آنتی‌بیوگرام بر اساس دستورالعمل CLSI ثبت گردید. به منظور تعیین حداقل غلظت آنتی‌بیوتیک که مانع رشد باکتری شود، تست MIC با استفاده از

ایزوله مربوط به زخم، ۶ (۱۰ درصد) ایزوله مربوط به مایع مغزی نخاعی، ۳ (۵ درصد) ایزوله مربوط به ترشحات چشمی و ۲ (۳۳/۳ درصد) ایزوله مربوط به خون بود. بررسی میزان مقاومت ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه با استفاده از روش انتشار دیسک نشان داد که کمترین و بیشترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به ایمی پنم (۱/۶۶ درصد) و آمپی‌سیلین (۱۰۰ درصد) بود. میزان مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز به شرح زیر بود. سفوتاکسیم ۳۴ (۵۶/۶۶ درصد)، سفپیم ۲۹ (۴۸/۳۴ درصد)، سفنازیدیم ۲۸ (۴۶/۶۷ درصد)، تری متوپریم سولفامتوکسازول ۲۶ (۴۳/۳۳ درصد) آزترونام ۱۹ (۳۱/۶۷ درصد)، سیپروفلوکساسین ۱۳ (۲۱/۶۶ درصد)، جنتامیسین ۸ (۱۳/۳۴ درصد)، آمیکاسین ۵ (۸/۳۴ درصد) (جدول ۱).
بر اساس نتایج حاصل از آزمون تأییدی فنوتیپی سینیژژی دو دیسک (DDST)، ۶۰ درصد از سوش‌های باکتریایی کلبسیلا پنومونیه تولید کننده نهایی بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند. مقاومت به کوتریموکسازول و سیپروفلوکساسین میان سوش‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف به ترتیب (۲۷/۷۸ درصد)، (۱۶/۶۷ درصد) بود. مقاومت به جنتامیسین و آمیکاسین در این ایزوله‌ها نیز به ترتیب (۱۱/۱۲ درصد) و (۸/۳۴ درصد) بود. هیچ سوش مقاوم به ایمی پنم در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف دیده نشد. میانگین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) با استفاده از نوارهای E-test در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم و نیمه حساس نسبت به سفوتاکسیم ۲۴/۸ ماکروگرم بر میلی‌لیتر بود که در محدوده حد واسط قرار داشت.

واکنش مالتی پلکس PCR در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد. یک سیکل ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (دنا تورا سیون اولیه) سپس ۳۰ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و مرحله طویل شدن ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و نهایتاً یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۱۱).

به منظور تأیید و شناسایی بیشتر ماهیت و مشخصات ژن‌های بتالاکتاماز شناسایی شده در سنجش مالتی پلکس PCR، آنالیز توالی DNA نیز انجام گرفت. لازم به ذکر است که از کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی تهران و اشریشیاکلی (ATCC 35218) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران به عنوان روش‌های کنترل مثبت و منفی به ترتیب استفاده گردید. همچنین ژل آگارز ۱ درصد برای الکتروفورز محصولات PCR و نیز از سایز مارکر (SMO323) 100bp ladder fermentase استفاده شد.

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

یافته‌ها

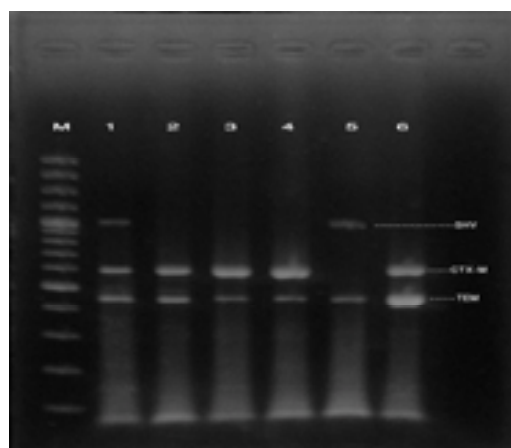
از ۶۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری و تأیید شده به روش‌های بیوشیمیایی ۱۲ (۲۰ درصد) ایزوله مربوط به نمونه‌های تنفس (خلط و تراشه)، ۳۱ (۵۱/۶۷ درصد) ایزوله مربوط به ادرار، ۶ (۱۰ درصد)

کلبسیلاپنومونیه دارای مقاومت دارویی چندگانه (MDR) در ۲۴ (۴۰ درصد) ایزوله‌های مورد مطالعه یافت شد که بیشترین باکتری‌های مقاومت دارویی چندگانه MDR از بخش مراقبت‌های ویژه داخلی (۳۳/۳۴ درصد) در این تحقیق جدا شده بود. جهت تعیین ژن‌های CTX-M, SHV, TEM از مالتی پلکس PCR استفاده شد. (۳۸/۳۴ درصد) ۲۳ از نمونه‌ها دارای ژن TEM به تنهایی، (۳/۳۳ درصد) ۲ دارای ژن CTX-M به تنهایی، (۳/۳۳ درصد) ۲ دارای ژن‌های SHV و TEM،

(۲۸/۳۴ درصد) ۲۳ دارای ژن‌های CTX-M و TEM، (۱۳/۳۳ درصد) ۸ دارای هر سه ژن SHV و TEM و CTX-M بودند. آنالیز تعیین توالی DNA ژن‌های مورد مطالعه به صورت تصادفی بر ما وجود ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف را تأیید کرد. تمام سویه‌هایی که تست تأییدی فنوتیپی آنها مثبت بود در واکنش مالتی پلکس PCR نیز ژن بتالاکتاماز را داشتند (تصویر ۱).

جدول ۱: مقایسه فراوانی نسبی (تعداد و درصد) حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های کلبسیلاپنومونیه جدا شده از بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستان نمازی شیراز

آنتی بیوتیک	حساس	نیمه حساس	مقاوم
سفتازیدیم	۲۴ (۴۰)	۸ (۱۳/۳۳)	۲۸ (۴۶/۶۷)
سفتواکسیم	۱۶ (۶۷/۲۶)	۱۰ (۱۶/۶۷)	۳۴ (۵۶/۶۶)
سفیپم	۲۳ (۳۸/۳۳)	۸ (۱۳/۳۳)	۲۹ (۴۸/۳۴)
ازترونام	۲۸ (۴۶/۶۷)	۱۳ (۲۱/۶۶)	۱۹ (۳۱/۶۷)
آمپی‌سیلین	۰ (۰)	۰ (۰)	۶۰ (۱۰۰)
آمیکاسین	۵۲ (۸۶/۶۶)	۳ (۵)	۵ (۸/۳۴)
جنتامیسین	۴۵ (۵۷)	۷ (۱۱/۶۶)	۸ (۱۳/۳۴)
کوتریموکسازول	۳۲ (۵۳/۳۴)	۲ (۳/۳۳)	۲۶ (۴۳/۳۳)
سیپروفلوکساسین	۴۵ (۷۵)	۲ (۳/۳۴)	۱۳ (۲۱/۶۶)
ایمی پنم	۵۹ (۹۸/۳۴)	۰ (۰)	۱ (۱/۶۶)



تصویر ۱: محصول واکنش الکتروفورز روی ژل آگارز

نمونه‌های ۶، ۴، ۳، ۲ دارای ژن‌های CTX-M(593), TEM(445). نمونه ۱ دارای ژن‌های CTX-M(593), TEM(445), SHV(973) و نمونه ۵ دارای ژن‌های CTX-M(593), TEM(445), SHV(973) M سایزمارکر ۱۰۰ bp

بحث

بتالاکتامازهای وسیع الطیف در دو دهه‌ی اخیر افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته‌اند. این باکتری‌ها به علت غیرفعال‌سازی طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام به ویژه نسل سوم سفالوسپورین‌ها و مونوباکتام‌ها، مشکلات فراوانی را برای درمان ایجاد کرده‌اند. پیدایش و انتشار این باکتری‌ها به نظر می‌رسد که غالباً ناشی از استفاده گسترده داروهای بتالاکتام وسیع الطیف در بخش‌های مختلف بیمارستان باشد به طوری که امروزه شاهد افزایش روزافزون باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتام‌های وسیع الطیف در بخش‌های مراقبت ویژه هستیم. بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه غالباً به علت ضعف سیستم ایمنی و بیماری‌های شدیدی که از آنها رنج می‌برند مستعد آلوده شدن با ارگانسیم تولیدکننده بتالاکتام‌های وسیع الطیف هستند (۱۳). هدف از این مطالعه تعیین شیوع کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتام‌های وسیع الطیف و تشخیص مولکولی ژن‌های بتالاکتاماز blaTEM، blaCTX-M، blaSHV آنها از بخش‌های مراقبت ویژه بود.

با انجام آزمون تأییدی بر روی ارگانسیم‌های غربالی مولد بتالاکتام‌های وسیع الطیف به روش سینرژی دو دیسک DDST، ۶۰ درصد نمونه‌ها تولیدکننده نهایی بتالاکتام‌های وسیع الطیف بودند. این در حالی است که در مطالعه میرصالحیان و همکاران در سال ۸۶، ۷۶/۷۴ درصد از کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بخش‌های مراقبت ویژه مولد بتالاکتام‌های وسیع

الطیف بودند (۱۳). نتایج منتشر شده در تحقیقات علمی مختلف مربوط به ژن‌های بتالاکتام‌های وسیع الطیف نشان می‌دهند که بالاترین درصد سویه‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتام‌های وسیع الطیف در کشورهای آمریکای لاتین ۵۴/۴ درصد، اروپا ۲۲/۶ درصد و حوزه غربی آرام ۲۴/۶ درصد می‌باشد (۱۴). درصد تولید بتالاکتام‌های وسیع الطیف در کلبسیلا پنومونیه در بعضی از کشورهای آسیا از جمله کره ۴/۸ درصد، تایوان ۸/۵ درصد، هنگ کنگ ۱۲ درصد گزارش شده است (۱۵) و (۱۶). نتایج حاصل از این مطالعه در مقایسه با سایر مطالعات ذکر شده، شیوع کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتام‌های وسیع الطیف در بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستان ما که از بزرگترین و مهم‌ترین بیمارستان در جنوب کشور می‌باشد بیش از نتایج به دست آمده سایر مطالعات انجام شده است. مقایسه این نتایج نشان می‌دهد که میزان بتالاکتام‌های وسیع الطیف در سوش‌های جدا شده از کشورهای مختلف و همچنین در یک کشور از یک بیمارستان با بیمارستان دیگر متفاوت می‌باشد که این مسئله بستگی به سیستم کنترل عفونت و رژیم درمانی دارد. در این مطالعه ۳۳/۳۴ درصد نمونه‌های جدا شده ادراری تولیدکننده بتالاکتام‌های وسیع الطیف بودند و حالت مربوطه موجود در آمریکای لاتین، آمریکا، ایتالیا به ترتیب ۲۷، ۲ و ۱۹ درصد گزارش شده است (۱۷ و ۱۸).

بر اساس یافته‌های آزمایشگاهی حاضر ایمی‌پنم ۱۰۰ درصد از مؤثرترین آنتی‌بیوتیک علیه کلبسیلا پنومونیه تولید کننده بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف بود و بعد از آن آمیکاسین (۸۶/۱۱ درصد) قرار داشت.

بررسی مولکولی سویه‌های مورد آزمایش از نظر وجود ژن‌های بتالاکتاماز TEM، SHV، CTX-M، نشان داد که ژن TEM بیشترین ژن در سویه‌های تولید کننده بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف بود. شیوع ژن TEM و SHV به ترتیب ۹۳/۳۳، ۱۶/۶۶ درصد بود که متفاوت با نتایج تحقیق چند ملیتی به ترتیب ۱۶ و ۶۷ درصد بود (۱۹).

در بین سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۳ برنامه SENTRY ناحیه آسیای آرام گزارش داد که ۲۵ درصد سویه‌ها دارای آنزیم CTX-M بودند، در صورتی که در مطالعه حاضر ۵۵ درصد از سویه‌ها حاوی ژن CTX-M بودند. تعداد بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف نوع CTX-M به سرعت در حال توسعه می‌باشند. آنها در برخی نواحی جغرافیایی شناسایی شده‌اند و امروزه از متداولترین نوع بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف در سرتا سر جهان محسوب می‌شوند (۲۰).

در این مطالعه در میان ایزوله‌هایی که یک ژن را حمل می‌کردند نسبت ژن TEM بیشتر از ژن‌های SHV و CTX-M بود. تحقیقات حاصل از مناطق مختلف جهان گزارش داد که ژن SHV در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه بیشتر رایج است (۶). این در حالی است که در مطالعه حاضر ژن SHV در تعداد کمی از سویه‌ها یافت

میزان مقاومت کلی سوش‌های کلبسیلا پنومونیه مورد تحقیق قرار گرفته بسیار بالا بود. مقاومت به سفوتاکسیم ۵۶/۶۶ درصد، سیپروفلوکساسین ۲۱/۶۶ درصد، تری متوپریم سولفامتوکسازول ۴۳/۳۳ درصد یافت شد. ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف در این تحقیق مشخص شده است که به کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف نیز مقاومت متقاطع نشان می‌دهند که این نشان دهنده انتقال هماهنگ و همراه ژن‌هایی است که در ایجاد مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها شرکت دارند. در تحقیق حاضر آزمون حساسیت به مواد ضد میکروبی نشان داد که ۴۰ درصد سوش‌ها دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند که همه آن سوش‌ها نیز تولید کننده بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف بودند. متأسفانه پیدایش سویه‌های کلبسیلا چند مقاومتی با پایداری نسبتاً بالای پلاسמידهای کد کننده بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف ESBL همراه است حتی سال‌ها بعد از قطع مصرف سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف، ادامه کلونیزاسیون سویه‌های کلبسیلا تولید کننده بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف در بیماران بستری گزارش شده است (۱۵). این میزان بالای مقاومت دارویی جدا شده در یک بیمارستان اهمیت انجام یک بررسی ملی در سطح کشور را جهت بررسی میزان شیوع مقاومت در این باکتری‌ها و سایر باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه را خاطر نشان می‌سازد.

شد. بنابراین تحقیقات مشابهی در مناطق مختلف این کشور باید انجام گیرد تا به شناسایی ژنوتیپ‌های بتالاکتامازهای وسیع الطیف در یک ناحیه‌ی جغرافیایی خاص دست یافت.

نتیجه‌گیری

در مجموع این مطالعه نشان داد که سویه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای طیف گسترده در بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه، یک معضل جدی رو به پیشرفت است بنابراین ضروری است تا با تجهیز آزمایشگاه‌ها به روش‌های تشخیص فنوتیپی مقاومت و تکنیک‌های سریع و دقیق مولکولی، میزان شیوع سویه‌های مقاوم باکتری‌ها را مورد ارزیابی قرار داده و تدابیر لازم جهت درمان بیماران و کنترل مقاومت در باکتری‌ها را اتخاذ نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولان مرکز تحقیقات علوم دارویی بخش بیوتکنولوژی دارویی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به دلیل حمایت مالی و همکاری در اجرای این پروژه قدر دانی می‌شود.

REFERENCES

1. Stureburg E, Mack D. Extended- Spectrum beta Lactamases: implications for the clinical microbiology Laboratory, therapy, and infection control. *J infect* 2003; 47: 273- 95.
2. Nathisuwan S, Burgess DS, Lewis JS. Extended- spectrum beta lactamases: epidemiology, detection, and treatment. *Pharmacotherapy* 2001; 21(8): 920-8.
3. Galas M, Decousser JW, Breton N, Godard T, Allouch Py. College de bacteriology virology hygiene (colBVH) study group. 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.
4. Chaudhary U, Aggarwal R. Extended spectrum beta Lactamases (ESBL)- An emerging threat to Clinical therapeutics. *Indian J med Microbiol* 2004; 22(2): 75-80.
5. Sinha M, Srinivasa H, Macaden R. Antibiotic resistance profile and extended spectrum beta lactamase (ESBL) production in Acinetobacter species. *Indian J Med Res* 2007; 126(1): 63- 7.
6. Prabha L, Arti KB. Occurrence of TEM, SHV gene in extended Spectrum β - Lactamases (ESBLs) Producing Klebsiella SP. isolated from tertiary care hospital. *Indian J Med Res* 2007; 125: 173-8.
7. Colodner R. Extended Spectrum beta lactamases: a challenge for Clinical microbiologists and infection Control specialists. *Am J Infect Control* 2005; 33:104-7.
8. National Committee for Clinical laboratory standards. performance standard for antimicrobial susceptibility testing, 15th information supplement (M100- 315). National committee for Clinical laboratory standards, Wayne, Pa. 2005.
9. Marra AR, Pereira CAP, Castelo JR, Cal RGR, Sader HS, Wey SB. Health and economic outcomes of the detection of *Klebsiella pneumoniae* – produced extended spectrum β lactamases (ESBL) in a hospital with high prevalence of this infection. *Int J of Infect Dis* 2006; 10: 56–60.
10. Madelson G, Hait V, Ben- Israel J, Gronich D, Grant E, Raz R. Prevalence and risk factors of extended Spectrum beta lactamase producing Escherichia Coli and Klebsiella pneumonia in an Israeli long-term care facility. *Eur J clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24(1):17-22.
11. MONTEIN HJ, OSTHOIM- BALKHED A, NILSSON MV, NILSSON M, DORNBUSCH K, NILSSON LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of SHV, TEM, CTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS* 2007; 115: 1400-8.
12. Xiong Z, Zhong L, Li T, Xiyuan H. Detection of CTX – M 14 Extended – spectrum β lactamases in Shigella sonnei Isolates from China. *J of Infect*, 2007 : 125 – e 128 .
13. Mirsalehian A, Akbari Nakhjavani F, Peymani A, Jabal Ameli F. Prevalence of extended spectrum beta lactamases producing Enterobacteriaceae in Intensive care units (ICU). *Tehran Univ* 2007; 65(1): 33-8.
14. Behroozi 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. *African J of microbiology* May 2010; 4(9): 881-4.
15. Daoud Z, Moubareck C, Hakime N, Doucet P, 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.
16. Tofield S, Haldorsen B, Dahl KH, Simonsen GS. 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. *J clin Microbiol* 2007; 45:199-205
17. Caccamo M, Perilli M, Celenza G, Bonfiglio G, Tempera G, Amicosante G. Occurrence of extended spectrum β - lactamases among isolates of Enterobacteriaceae from urinary tract infections in southern Italy. *Microb Drug Resist* 2006; 12: 257-64.
18. Turnidge J, Bell J, Biedenbach DJ, Jones RN. Pathogen occurrence and antimicrobial resistance trends among Urinary tract infection isolates in the Asia- western Pacific region: report from the SENTRY Antimicrobial surveillance program, 1998- 1999. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 20: 10-17.
19. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, Bonomo RA. Extended Spectrum beta lactamases in Klebsiella pneumoniae blood stream isolates from seven countries: dominance and wide spread prevalence of SHV and CTX-M type beta lactamases International Klebsiella Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 45: 3554-60.
20. Paterson DL, Bonomo RA. Extended spectrum beta lactamases: a Clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 657-86.

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

Archin T¹, Afzalian E^{2*}, Kargar M³, Ghasemi Y¹

¹Department of Pharmaceutical Biotechnology, Sciences Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, ²Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ³Department of Microbiology, Islamic Azad University of Jahrom Branch, Jahrom, Iran

Received: 22 April 2013

Accepted: 08 July 2013

Abstract

Background and aim: β -lactamase enzymes producing bacteria ESBL have spread widely throughout the world. The production of enzymes induces bacterial resistance to a wide range of antibiotics which is leading to the limitation of infection control and correct treatment. The aim of the present study was to investigate patterns of antibiotic susceptibility to antibiotics and the presence of β -lactamase genes SHV, TEM, CTX-M, in *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical specimens of intensive care.

Methods: Susceptibility of isolated bacteria against 10 antibiotics was determined by agar disk diffusion method according to the CLSI guidelines. The strains (DDST) were examined for the presence of the spectrum β -lactamase enzymes. Using E-test, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotic was determined to cefotaxime. Moreover, SHV, TEM, CTX-M genes were identified by, Multiplex PCR method, and some of them were sequenced.

Results: The antibiotic resistance against 10 antibiotics was determined. The highest percentage of isolates was resistant to ampicillin (100%) and sensitivity to imipenem was 1.66%. In this study, the majority of strains produced ESBL (60%). TEM gene in 34.38% and all three genes (TEM and SHV and CTX) at 33.13% of isolates were observed.

Conclusion: The present study showed that the *K. pneumoniae* producing ESBL in patients in ICU are common. Therefore, the use of procedures and policies for infection control in hospitals and especially ICU is necessary.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, ESBL, Multiplex PCR, antibiotic sensitivity

*Corresponding Author: Afzalian E, Cellular and molecular research center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Email: es.afzalian@gmail.com