مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۱، شماره۱، فروردین ۱۳۹۵(شماره پی در پی۱۰۸)

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و وجود ژن های بتالاکتامازی bla SHV ،bla TEM ،bla CTX -M درسویه های کلبسیلا مولدESBL از نمونه‌های 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 شایع‌ترین مکانیسم‌های مقاومت آنزیمی بتالاکتاماز در باکتری‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی است. از مهم‌ترین عوامل این نوع مقاومت دارویی، مصرف خودسرانه و یا بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. الگوی مقاومت سویه‌های باکتریایی مولد عفونت‌های بیمارستانی با مکانیسم ESBLs در مناطق مختلف ایران در دسترس نمی‌باشد و شیوع آن در فصل‌های سال متفاوت بوده و موارد مقاومت آن در حال افزایش می‌باشد. هدف از این مطالعه، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و وجود ژن‌های بتالاکتامازیSHV، TEM، CTX -M در سویه‌های کلبسیلا مولد ESBL از نمونه‌های بالینی در بیمارستان یحیی‌نژاد بابل بود.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی تحلیلی در مقطع زمانی شش ماهه در سال۱۳۹۳ انجام گرفت. از میان ۲۰۷۵ نمونه‌های بالینی(ادرار، خون، ترشحات برونش، لوله تراشه، زخم، مایعات پلور،CSF، آسیت، مفصل، مغز استخوان) تعداد ۳۹ ایزوله سویه‌های کلبسیلا شناسایی شد و با روش انتشار دیسک بر اساس دستورالعمل(CLSI) الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی انجام وسپس سویه ها با روش سینرژیک دودیسک از نظروجودESBL بررسی شدند. درمرحله بعد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از نظر حضور ژن‌هایSHV، TEM، CTX -M به روش PCR بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون های آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: فراوانی سویه‌های تشخیص داده شده شامل۳۱(۷۹/۴۹ درصد) ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۵(۱۲/۸۲ درصد) ایزوله کلبسیلا اکسی توکا، ۳(۷/۶۹ درصد) ایزوله کلبسیلا اوزنه بود. از میان ایزوله‌های کلبسیلا ۱۹(۴۸/۷۲ درصد) ایزوله مقاوم به سفوتاکسیم، ۱۴(۳۵/۹۰ درصد) ایزوله مقاوم به سفتازیدیم، 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 پنی‌سیلین تازوباکتام و ۱۶(۴۱/۰۳ درصد) ایزوله مقاوم به آمپی‌سیلین سولباکتام بودند. تعداد ۱۰(۲۵/۶۴ درصد) ایزوله کلبسیلا پنومونیهESBL مثبت بودند، که۱۰(۱۰۰ درصد) ایزوله‌ها ژنbla SHV، ۶(۶۰ درصد)ایزوله ژنbla TEM و ۴ (۴۰ درصد) ایزوله ژن bla CTX-M را داشتند.

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 ارگانیسم‌های تولید کنندهESBL و غربالگری نمونه‌های بالینی از لحاظ مقاومت به ESBL وهمچنین راهکارهای لازم جهت کمک به پزشکان در تشخیص بیماری و استفاده از درمان مناسب از اهمیت زیادی برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: *کلبسیلاپنومونیه*، مقاومت آنتی بیوتیکی، آنزیم بتالاکتاماز طیف گسترده

*نویسنده مسئول: **فاطمه زابلی**، آمل، دانشگاه آزاداسلامی 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 می گردد. به ویژه در نوزادان موجب پنومونی، سپتی سمی، اسهال، ایجاد آبسه در کبد، اندوفتالمیت، مننژیت، عفونت های ادراری و باکتریمی می گردد. بیشترین میزان مرگ و میر در نوزادان مربوط به عفونت‌های پنومونی، سپتی سمی، مننژیت و اسهال می باشد(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 ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چندین دارو تهدید جدی برای زندگی به حساب آید(۲).

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف(ESBL)[1] 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 می گردد(۴ و۳). از لحاظ عملکردی بتالاکتامازها شامل سفالوسپورینازهایی هستند که به خوبی به وسیله کلاولانیک اسید مهار نمی شوند. گروه دوم شامل پنی‌سلیناز و سفالوسپوریناز یا هر دو به وسیله مهار کننده‌های بتالاکتاماز مهار می‌شوند، بتالاکتامازهای این گروه شامل SHV[2]، TEM[3]، CTX-M[4] می‌باشد(۵). ژن‌های بتالاکتامازی درایزوله های مختلف می توانند 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 مولدESBL 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(۱۵-۱۰) در مطالعه‌های انجام شده در ایران در شهرهای تهران، تبریز، شیراز و

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

کاشان این میزان بین ۲۳ تا ۹۷/۸۷ درصد گزارش شده است(۱۹ـ۱۶).

واکنش زنجیره ای پلی‌مراز(PCR) یکی از روش‌های 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 گرفته‌اند و قابلیت انتقال به سویه‌های گرم منفی دیگر را نیز دارند و همچنین الگوی مقاومت سویه‌های باکتریایی مولد عفونت‌های بیمارستانی با مکانیسم ESBLs در مناطق مختلف ایران در دسترس نمی‌باشد و شیوع آن در فصل‌های سال متفاوت بوده و موارد مقاومت آن درحال افزایش می باشد. به علاوه درمان آنتی بیوتیکی در بیمارستان‌ها، اغلب با استفاده از تست‌های آنتی بیوگرام موجب راهنمایی دقیق تر برای درمان می شود و مطالعه حاضر می‌تواند از این طریق به جامعه خدمت کند. این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و وجود ژن های بتالاکتامازی SHV، TEM و CTX-M در سویه‌های کلبسیلا مولد ESBL از نمونه‌های 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، مایعات(پلور، مایع مغزی نخاعی، آسیت، مفصل، مغز استخوان) از بیمارستان یحیی نژاد در مقطع زمانی ۶ ماهه در سال۱۳۹۳ (از تیر ۱۳۹۳ تا آذر ۱۳۹۳) جمع‌آوری شدند.

جهت شناسایی ایزوله‌های‌های کلبسیلا، کشت بر روی محیط‌های 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 کلنی‌های مشکوک به کلبسیلا واکنش‌های بیوشیمیایی بر روی محیط‌های؛ سیمون سیترات، SIM، اوره، متیل رد، وگس پروسکوئر، آرژنین دهیدرولاز، اورنیتین دکربوکسیلاز و لیزین دکربوکسیلاز(مرک آلمان) جهت تأیید نهایی استفاده شد(۲۰). جدایه ها در دمای ۲۰ـ درجه سانتی‌گراد 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 آنتی‌بیوتیک شامل؛ مروپنم(MEM)۱۰ماکروگرم، آمیکاسین(AK)۱۰ماکروگرم، سفوتاکسیم(CTX)۳۰ ماکروگرم،سیپروفلو کسا سین(CIP)۵ ماکروگرم، سفتازیدیم (CAZ)۳۰ ماکروگرم، سفتریاکسون(CRO)۳۰ ماکروگرم، پیپیراسیلین تازوباکتام(PTZ)۱۰ ماکروگرم،

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 کننده‌ESBL برطبق دستورالعمل(CLSI) بود. بر این اساس قطر هاله مهار رشد کمتر از ۱۷میلی‌متر 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(CAZ30µg/CA10µg) و سفوتاکسیم کلاولانیک اسید (CTX30µg/CA10µg) 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 تولیدESBL بود(۱۶). همچنین توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده است۲۱، ۱۸ و۱۶). واکنش PCR در جدول ۲، ارایه شده است.

DNA ژنومی تخلیص شده با پرایمر های 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 وbla CTX-M با اندازه ۱۸۵ bp انجام شد. از مارکر SMO323 (Ladder ۱۰۰ bp Fermantase) 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.

جدول۱: جدول توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژنهای مولد بتالاکتاماز

ژن	توالی پرایمر
bla SHV-F	5´ - GATGAACGCTTTCCCATGATG - 3
bla SHV-R	5´ - CGCTGTTATCGCTCATGGTAA - 3´
bla TEM -F	5´ - GAGTATCAACATTTCCGTGTC - 3´
bla TEM -R	5´ - TAATCAGTGAGGCACCTTCTC - 3´
bla CTX-M -F	5´ - CGCTTTGCGATGTGCAG- 3
bla CTX-M -R	5´ - ACCGCGATATCGTTGGT- 3

جدول۲: مراحل آزمایش PCR و دمای به کار رفته برای شناسایی حضور ژن ها

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

یافته‌ها

توزیع فراوانی باکتری‌های جداشده 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، سفتازیدیم وپیپیراسیلین 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 درصـد) ایزولـه عـدم افـزایش هالـه و ESBL

مثبت و منفی بودند.

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

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

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

ژن مولد *ESBL*		جنس		جمع	سطح معنی‌داری
		زن	مرد		
SHV	فراوانی	۶	۴	۱۰	۰/۳۹
	درصد	٪۶۰	٪۴۰	٪۱۰۰	
TEM	فراوانی	۴	۲	۶	
	درصد	٪۴۰	٪۲۰	٪۶۰	
CTX-M	فراوانی	۲	۲	۴	
	درصد	٪۲۰	٪۲۰	٪۴۰	

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

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

جدول۶: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه بر اساس درصد

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

حساس	۵۱/۲۸	۵۱/۲۸	۵۸/۹۷	۴۳/۵۹	۶۴/۱۰	۳۳/۳۳	۶۴/۱۰	۵۶/۴۱
نیمه حساس	۲/۵۶	۰	۷/۶۹	۱۰/۲۵	۰	۰	۵/۱۳	۲/۵۶
مقاوم	۴۶/۱۶	۴۸/۷۲	۳۳/۳۴	۴۶/۱۶	۳۵/۹۰	۶۶/۶۷	۳۰/۷۷	۴۱/۰۳

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

جدول۷: نتایج تست تأییدی تولید ESBL در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه با روش دیسک ترکیبی

هاله های توقف رشد	آنتی بیوتیک دیسک ترکیبی	
	سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید (CTX+CV)	سفتا زیدیم / کلاولانیک اسید (CAZ+CV)
افزایش هاله	۷۱/۷۹	۷۱/۷۹
عدم افزایش هاله	۲۸/۲۱	۲۸/۲۱

بحث

جنس کلبسیلا بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی طبقه‌بندی می‌شوند. تشخیص صحیح آزمایشگاهی، برای جلوگیری از شکست درمانی، ناشی از انتخاب نامناسب آنتی‌بیوتیک، به منظور مطالعه‌های اپیدمیولوژیکی و پیدا نمودن منبع و طریقه انتشار این میکروارگانیسم اهمیت زیادی دارد(۲۲ و۱۶). نتایج این مطالعه حاکی از مقاومت سفالوسپورین‌های نسل سوم، شیوع ESBL و حضور ژن‌های بتالاکتامازی CTX-M ،TEM ،SHV درایزوله‌های مورد بررسی می‌باشد. بنابراین آنزیم‌های ESBL از مهم‌ترین عوامل مؤثر در افزایش مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌های وسیع الطیف هستند(۱۶).

ESBL علیه مونوباکتام‌ها و اکسی ایمینوسفالوسپورین‌ها، به استثناء سفامایسین، فعال هستند(۲۲). یکی از مهم‌ترین راهکارهای موفق در غلبه بر مقاومت بتالاکتامازها، استفاده از ممانعت کننده‌های تازوباکتام، سولباکتام و کلاولانیک اسید می باشد(۲۳). انتشار این باکتری‌های فرصت طلب غالباً، ناشی از استفاده گسترده داروهای بتالاکتام وسیع الطیف در بخش‌های ICU بیمارستان می‌باشد(۲۴).

در این مطالعه، نتایج به دست آمده از آنتی‌بیوگرام با نتایج مطالعه‌ای در اردن همسو بوده است(۲۵). ولی با مطالعه‌ای 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 ارگانیسم‌های غربالی مولد ESBL به روش سینرژیک دو دیسک، ۱۰(۲۵/۶۵ درصد) ایزوله تولید کننده نهایی ESBL بود. در صورتی که در مطالعه‌ای در شهر اصفهان، ۴۶(۷۰ درصد) سویه کلبسیلا ESBL مثبت گزارش شد(۱۴). مطالعه‌ای در تبریز نشان دادند که ۶۲/۹ درصد نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه، دارای ESBL مثبت بود(۲۶). نتایج منتشر شده از

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 ۶۴درصد، 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). میزانESBL 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 ازشیوع کمتر ی برخوردار است که با مطالعه حاضر همسونبوده است. در این پژوهش ژن bla SHV 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

است و بـه سـرعت در میـان پـاتوژن‌هـای بیمارسـتانی و جامعه در حال گسترش است، هم‌خوانی دارد.

نتیجه گیری

بـا توجـه بـه درصـد بـالای مقاومـت بـه سفالوسپورین‌های نسل سوم، انجام دقیق آنتی‌بیـوگرام و پرهیز از تجویز بی‌رویه آنتـی‌بیوتیـک‌هـا در عفونـت‌هـای ناشی از ارگانیسم هـای تولیـد کننـدهESBL و غربـالگری نمونه‌های بالینی از لحاظ مقاومـت بـه ESBL و هـم‌چنـین راهکارهـای لازم جهـت کمـک بـه پزشـکان در تشـخیص بیمـاری و اسـتفاده از درمـان مناسـب از اهمیـت زیـادی برخوردار است.

تقدیر و تشکر

ایـن مقالـه نتیجـه طـرح تحقیقـاتی دانشـگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات آیت الـه آملـی مـی‌باشـد. از مسئولین بیمارستان شهید یحیی نژاد بابل به دلیل حمایـت مالی و همکاری در اجـرای ایـن پـروژه تشـکر و قـدردانی می‌شود.

REFERANCE:

1.Behrouzi A, Rahbar M, Yousefivand J. The prevalence of Extended-Spectrum β-lactamase (ESBLs) producing Klebsiella pneumonia and Eschrrichia 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, Ghuysen 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 pneumonia (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 Microbiologia Clinica 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 pneumonia 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 Esherichia coliand Klebsiella pneumoniaeisolated 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 pneumoniea 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 ^{21}st 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. coliand 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.Behrooozi 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 b-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 pnumoniae clinical isolates by polymerase chain reaction. Medical Sciences Jounal 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.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

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 stains 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 Ampicilin 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.