مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۸، شماره ۱۰، بهمن۱۳۹۲(شماره پی در پی۸۲)

# تشخیص مولکولی ژن‌های بتالاکتامازی $bla_{CTX-M}$ ، $bla_{TEM}$ ، $bla_{SHV}$ 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 افضلیان[۲*]، محمد کارگر[۳]، یونس قاسمی[۱]**

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

تاریخ دریافت:۱۳۹۲/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/٤/۱۷

**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 می شود که منجر به محدود شدن راه‌های کنترل عفونت و گزینه های درمانی صحیح شده است. هدف این مطالعه بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و تحقیق پیرامون وجود ژن‌های بتالاکتامازیCTX-M،TEM،SHV، درنمونه‌های بالینی کلبسیلاپنومونیه جداشده 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 پلکسPCR 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 ایمی پنم ۱/۶۶ درصد بود. در این مطالعه ۶۰ درصد سویه‌ها مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند. ژن TEM در ۳۸/۳۴ درصد و هرسه ژن TEM و CTX و SHV در ۱۳/۳۳ درصد ایزوله‌ها یافت شدند.

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

**واژه‌های کلیدی**: کلبسیلا، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، حساسیت آنتی‌بیوتیکی

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

**E-mail:** es.afzalian@gmail.com

**مقدمه**

مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به عنوان یک مشکل اساسی در درمان و کنترل عفونت‌ها محسوب می‌شوند. در سال‌های اخیر باکتری‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف[1] در سراسر جهان شیوع فراوانی یافته‌اند به طوری که کاربرد داروهای ضدمیکروبی با وجود این آنزیم‌ها مورد تحلیل زیادی قرار گرفته‌اند. باکتری‌های تولید کننده 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 ارگانیسم‌های تولید کننده 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 برروی 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(۵ و۴).

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 کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌شوند. اغلب بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به واسطه ایجاد جهش در ژن‌های SHV و TEM به وجود آمده‌اند(۶).

ارگانیسم‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف 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 ارگانیسم‌ها ضروری است. لازم است که شیوع باکتریهای تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در هر ناحیه‌ای مشخص شود تا تدابیر درستی برای درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این ارگانیسم‌های مقاوم اتخاذ شود. بنابراین هدف این مطالعه بررسی الگوهای فنوتیپی و ژنوتیپی ژن‌های بتا

1- Extended Spectrum β Lactamases (ESBL)

لاکتامازهای وسیع الطیف 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 ماه۱۳۸۹ تعداد ۵۷۱ نمونه بالینی از بخش های 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 ومقاومت آنتی‌بیوتیکی به وسیله روش انتشار دیسک(Kirby-Baur) صورت گرفت(۸). دیسک‌های مورد استفاده تهیه شده از شرکت هایمدیای هند به شرح زیر بودند؛ سفتازیدیم ۳۰ ماکروگرم، سفوتاکسیم ۳۰ ماکروگرم ، سفپیم ۳۰ ماکروگرم، آزترونام۳۰ ماکروگرم، ایمی پنم ۱۰ ماکروگرم، تری متوپریم سولفامتوکسازول ۲۵ ماکروگرم، آمپی سیلین ۱۰ ماکروگرم، جنتامایسین۱۰ ماکروگرم، امیکاسین۳۰ ماکرو گرم، سیپروفلوکساسین۵ 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، تستMIC با استفاده از نوارهای (E.test strip AB Biodisk, selona, sweden) برروی 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 سفتازیدیم و قطرهاله 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 آموکسی کلاو با فاصله ۲۰ میلی‌متر از دیسک‌های سفتازیدیم، سفوتاکسیم و آزترونام جهت تأیید تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف غربالگری شدند(۹).

برای استخراج DNA و انجام مالتی پلکسPCR 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 پلکسPCR برای شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی(۹۷۳bp) SHV، (۴۴۵bp) TEM ، (۵۹۳bp) CTX-M با استفاده از پرایمرهای یونیورسال انجام شد(۱۲ و۱۱).

واکنش مالتی پلکس PCR در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد. یک سیکل ۱۵ دقیقه در ۹۵درجه سانتی‌گراد(دناتوراسیون 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 کلبسیلاپنومونیه ATCC 700603 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی تهران واشریشیاکلی(ATCC 35218) تهیه شده از انستیتوپاستور 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 100bp ladder fermentase (SMO323) استفاده شد.

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

**یافته‌ها**

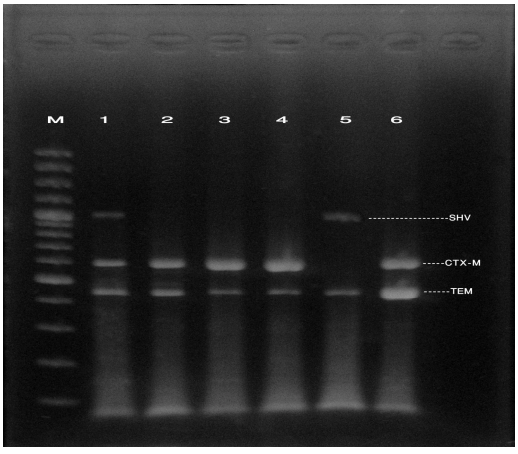
از ۶۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری و تأیید شده به روش‌های بیوشیمیایی۱۲(۲۰ درصد) ایزوله مربوط به نمونه‌های تنفس (خلط و تراشه)، ۳۱ (۵۱/۶۷ درصد) ایزوله مربوط به ادرار، ۶(۱۰ درصد) ایزوله مربوط به زخم، ۶ (۱۰درصد) ایزوله مربوط به مایع مغزی نخاعی، ۳ (۵ درصد) ایزوله مربوط به ترشحات چشمی و ۲(۳/۳۳ درصد) ایزوله 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)، سفتازیدیم ۲۸ (۴۶/۶۷ درصد)، تری متوپریم سولفامتوکسازول ۲۶ (۴۳/۳۳ درصد) آزترونام ۱۹(۳۱/۶۷ درصد)، سیپروفلوکساسین ۱۳ (۲۱/۶۶ درصد)، جنتامایسین ۸ (۱۳/۳۴ درصد)، آمیکاسین ۵ (۸/۳۴ درصد)(جدول ۱).

بر اساس نتایج حاصل از آزمون تأییدی فنوتیپی سینرژی 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 جنتامایسین 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 وسیع‌الطیف دیده نشد. میانگین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) با استفاده از نوارهای E.test در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم و نیمه حساس نسبت به سفوتاکسیم ۲۴/۸ماکروگرم بر میلی‌لیتر بود که در محدوده حد واسط قرار داشت.

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 TEM, SHV, CTX-M از مالتی پلکسPCR استفاده شد. (۳۸/۳۴ درصد)۲۳ از نمونه‌ها دارای ژن TEM به تنهایی، (۳/۳۳درصد)۲ دارای ژن CTX-M به تنهایی، (۳/۳۳درصد) ۲دارای ژن‌های SHV و TEM ، (۳۸/۳۴ 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 سویه هایی 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 سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بخش های مراقبت ویژه بیمارستان نمازی شیراز**

| آنتی بیوتیک | حساس | نیمه حساس | مقاوم |
|---|---|---|---|
| سفتازیدیم | ۲٤(۴۰) | ۸(۱۳/۳۳) | ۲۸(۴۶/۶۷) |
| سفوتاکسیم | ۱٦(۶۷/۲۶) | ۱۰(۱۶/۶۷) | ۳۴(۵۶/۶۶) |
| سفپیم | ۲۳(۳۸/۳۳) | ۸(۱۳/۳۳) | ۲۹(۴۸/۳۴) |
| ازترونام | ۲۸(٤٦/٦۷) | ۱۳(۲۱/۶۶) | ۱۹(۳۱/۶۷) |
| آمپی‌سیلین | ۰(۰) | ۰(۰) | ۶۰(۱۰۰) |
| آمیکاسین | ۵۲(۸۶/۶۶) | ۳(۵) | ۵(۸/۳۴) |
| جنتامایسین | ٤۵(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**

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

**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 تولید کننده بتالاکتامازهای 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 ارگانیسم تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف هستند(۱۳). هدف از این مطالعه تعیین شیوع کلبسیلا پنومونیه تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف و تشخیص مولکولی ژن‌های بتالاکتاماز blaCTX-M، blaTEM، blaSHV انها ازبخش های مراقبت ویژه بود.

با انجام آزمون تأییدی بر روی ارگانیسم‌های غربالی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف به روش سینرژی دو دیسک DDST، ۶۰ درصد نمونه‌ها تولید کننده نهایی بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند. این در حالی است که در مطالعه میرصالحیان و همکاران در سال ۸۶، ۷۶/۷۴ درصد از کلبسیلاپنومونیه جدا شده از بخش های مراقبت ویژه مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند(۱۳). نتایج منتشر شده در تحقیقات علمی مختلف مربوط به ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع الطیف نشان می‌دهند که بالاترین درصد سویه‌های کلبسیلاپنومونیه تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در کشورهای آمریکای لاتین ۵۴/۴ درصد، اروپا ۲۲/۶ درصد و حوزه غربی آرام ۲۴/۶ درصد می‌باشد(۱۴). درصد تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف در کلبسیلاپنومونیه 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 کلبسیلاپنومونیه مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف در بخش های 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 بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف 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 جداشده ادراری تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند و حالت مربوطه موجود در آمریکای لاتین، آمریکا، ایتالیا به ترتیب ۲۷، ۲ و ۱۹ درصد گزارش شده است(۱۸ و ۱۷).

میـــزان مقاومـــت کلـــی ســـوش‌هـــای کلبسیلاپنومونیه مورد تحقیق قرار گرفتـه بـسیار بـالا بـــود. مقاومـــت بـــه سفوتاکـــسیم ۵۶/۶۶ درصـــد ، سیپروفلوکـساسین ۲۱/۶۶ درصـــد، تـــری متـــوپریم سولفامتوکسازول ۴۳/۳۳ درصد یافت شد. ایزوله‌های کلبـــسیلاپنومونیه تولیـــد کننـــده بتالاکتامازهـــای وسیع‌الطیف در این تحقیق مشخص شده است کـه بـه کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی مختلـف نیـز مقاومـت متقـاطع نشان می‌دهند که این نـشان دهنـده انتقـال هماهنـگ و همـراه ژن‌هـایی اسـت کـه در ایجـاد مقاومـت بـه ایـن آنتی‌بیوتیک‌ها شرکت دارند. در تحقیق حاضر آزمـون حـساسیت بـه مـواد ضـد میکروبـی نـشان داد کـه ۴۰ درصد سوش ها دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند که همه آن سوش‌ها نیـز تولیـد کننـده بتالاکتامازهـای وسـیع الطیـف بودنـد. متأسـفانه پیـدایش سـویه‌هـای کلبـسیلای چنـد مقـاومتی بـا پایـداری نـسبتاً بـالای پلاسمیدهای کـد کننـده بتالاکتامازهـای وسـیع‌الطیـف ESBL همراه است حتی سـال‌هـا بعـد از قطـع مـصرف سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیـف، ادامـه کلونیزاسـیون سـویه‌هـای کلبـسیلای تولیـد کننـده بتالاکتامازهـای وســیع‌الطیــف در بیمــاران بــستری گــزارش شــده است(۱۵). این میزان بالای مقاومت دارویی جـدا شـده در یک بیمارستان اهمیت انجـام یـک بررسـی ملـی در سطح کشور را جهت بررسی میزان شیوع مقاومت در ایـن بـاکتری‌هـاو یـا سـایر بـاکتری‌هـای خـانواده انتروباکتریاسه را خاطر نشان می‌سازد.

بـر اسـاس یافتـه‌هـای آزمایـشگاهی حاضـر ایمی‌پنم ۱۰۰ درصد از مـؤثرترین آنتـی‌بیوتیـک علیـه کلبـــسیلا پنومونیـــه تولیـــد کننـــده بتالاکتامازهـــای وسیع‌الطیف بود و بعد از آن آمیکاسین(۸۶/۱۱ درصد) قرار داشت.

بررسی مولکولی سویه‌های مورد آزمـایش از نظـر وجـود ژن‌هـای بتالاکتامـاز CTX-M، SHV، TEM، نشان داد که ژن TEM بیشترین ژن در سویه‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بود. شیوع ژن TEM و SHV به ترتیب ۹۳/۳۳، ۱۶/۶۶ درصد بود که متفاوت با نتایج تحقیق چند ملیتی بـه ترتیـب ۱۶ و ۶۷ درصـد بود(۱۹).

در بـین سـال‌هـای ۱۹۹۸ تـا ۲۰۰۳ برنامـه SENTRY ناحیه آسیای آرام گزارش داد که ۲۵ درصـد سویه‌ها دارای آنزیم CTX-M بودند، در صورتی که در مطالعه حاضر ۵۵ درصد از سویه‌ها حاوی ژن CTX-M بودند. تعداد بتالاکتامازهای وسیع الطیف نـوع CTX-M به سرعت در حال توسعه مـی‌باشـند. آنهـا در برخـی نـواحی جغرافیـایی شناسـایی شـده‌انـد و امـروزه از متداولترین نوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سـرتا سر جهان محسوب می‌شوند(۲۰).

در این مطالعه در میان ایزوله‌هایی که یـک ژن را حمل می‌کردنـد نـسبت ژن TEM بیـشتر از ژن‌هـای SHV و CTX-M بود. تحقیقات حاصل از مناطق مختلـف جهان گزارش داد که ژن SHV در سـویه‌هـای کلبـسیلا پنومونیه بیشتر رایج است(۶). این درحالی است که در مطالعه حاضر ژن SHV در تعداد کمی از سویه‌ها یافت

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.

## تشکروقدردانی

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 می شود.

## 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 therapeuties. Indian J med Microbial 2004; 22(2): 75-80.
5.Sinha M, Srinivasa H, Macaden R. Antibiotic resistance profile and extended spectrum beta lactamas (ESBL) production in Acinetobactre species. Indian J Med Res 2007; 126(1): 63- 7.
6.Prabha L. Arti KB. Occurrence of TEM, SHV gene in extended Spectram β- Lactamases (ESBLs) Producing Klebsiella SP. isolated from atertiary 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, $15^{In}$ 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 **infec** 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, OSTHolM- 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. XiongI Zizhonglili T , xiyuan H. Detection of CTX – M 14 Extended – spectrum β lactamases in shigella sonnei Isolates from china , **J** of **Infect** , 2007 : r 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 unites (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 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.Tofteland 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 E scherichia coli and klebsiella pnemoniae in Norway. J clin Microbiol 2007; 45:199-205
17.Caccmo M, Perilli M, Celenza G, Bonfiglio G,Tempera G, Amicosante G. Occurrence of extended
spectrum β- lactamases among isolates of Enterobacteriacese 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 trecds 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 pneumonia blood stream isolates from seven countries: dominance and Wide Spead 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.

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

**Original Article**

# 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 T[1], Afzalian E[2]*, Kargar M3, Ghasemi Y[1]**

[1]Department of Pharmaceutical Biotechnology, Sciences Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, [2]Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [3]Department 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