تحقیقی

دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

فراوانی *جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه* مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف از نمونه‌های بالینی

حسام علیزاده
دانشجوی مقطع دکتری باکتری‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

فردوس مومنی
کارشناس ارشد باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان ، ایران

رضا قنبرپور
استاد میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

لیلا دولتشاه
کارشناس ارشد باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

نویسنده مسئول: حسام علیزاده

پست الکترونیک:alizade.h2000@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۳۲۴۵۶۵۶۲

آدرس: مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دریافت:۹۲/۹/۲۰
ویرایش پایانی:۹۲/۱۰/٦
پذیرش:۹۲/۱۰/۸

چکیده

زمینه و هدف: *کلبسیلا پنومونیه یکی از عوامل شایع در عفونت‌های بیمارستانی است. هدف از این تحقیق تعیین فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز و تایید فنوتیپی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف از نمونه‌های بالینی بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه ۱۲۲ کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی شهرستان خرم آباد جداسازی شد و براساس تست‌های استاندارد باکتری‌شناسی تایید شدند. حضور آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف به روش انتشار دیسک ترکیبی مشخص شد. از پرایمرهای اختصاصی در آزمایش PCR جهت تعیین ژن‌های bla_{SHV}، bla_{TEM}، $bla_{CTX\text{-}15}$ و $bla_{CTX\text{-}M}$ در جدایه‌های تایید شده استفاده گردید.*

یافته‌ها: *از ۱۲۲ جدایه کلبسیلا پنومونیه ۷۸ جدایه (۶۴/۱۸ درصد) در روش انتشار دیسک و از نظر تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت بودند. برطبق نتایج آنتی بیوگرام، ۱۰/۶۵ درصد جدایه‌ها مقاوم به سفوتاکسیم، ۳/۲۷ درصد به سفتازیدیم و ۶۸/۰۳ درصد مقاوم به هر دو آنتی‌بیوتیک بودند. نود جدایه (۶۴/۱۸ درصد) مقاوم به سفوتاکسیم و سفتاریدیم به طور همزمان نسبت دیسک‌های سفوتاکسیم/ کلاولانیک اسید و سفتازیدیم/کلاولانیک حساس بودند که این جدایه‌ها به عنوان جدایه‌های بتالاکتامازهای وسیع الطیف در نظر گرفته شدند. در آزمایش PCR فراوانی ژن‌های $bla_{CTX\text{-}15}$، bla_{SHV}، $bla_{CTX\text{-}M}$ و bla_{TEM} به ترتیب در ۷۸/۶۸ درصد، ۴۰/۱۶ درصد، ۲۶/۲۲ درصد و ۲۲/۱۳ درصد از جدایه‌ها شناسایی شدند. ده الگوی مقاومت ژنی شناسایی شد.*

نتیجه‌گیری: *درصد قابل توجهی از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی در شهرستان خرم آباد دارای ژن‌های آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند که در این میان دسته CTX-M بیشترین فراوانی ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها را داشت.*

واژه‌های کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتاماز وسیع الطیف، مقاومت آنتی‌بیوتیکی*

آدرس مقاله:
علیزاده ح، مومنی ف، قنبرپور ر، دولتشاه ل" فراوانی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف از نمونه‌های بالینی" مجله علوم آزمایشگاهی،بهار ۱۳۹۳، دوره هشتم(شماره۱): ۶۴-۷۱

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه (Klebsiella pneumoniae) یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از عوامل شایع عفونت های بیمارستانی به شمار می آید که باعث ایجاد بیماری های مختلفی از قبیل عفونت مجاری ادراری، سپتی سمی، عفونت دستگاه تنفس، اسهال و سایر بیماری ها می شود. همچنین در طی دو دهه گذشته جدایه های کلبسیلا پنومونیه مهاجم اکتسابی از جامعه که بیماری های عفونی نوظهوری را در کشورهای آسیایی ایجاد کرده اند گزارش شده است (۲،۱). امروزه شیوع پاتوژن های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف(Extended Spectrum Beta-Lactamases, ESBLs) باعث افزایش نگرانی ها شده است، به طوری که عفونت با این باکتری ها با میزان مرگ و میر، افزایش شیوع بیماری ها و افزایش هزینه های درمانی مرتبط است. گرچه بتالاکتامازهای وسیع الطیف اکثرا در گونه های *اشریشیاکلی (Escherichia coli)* و *کلبسیلا پنومونیه* مشاهده می شوند اما این آنزیم ها در دیگر جنس های خانواده *انتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae)*مانند *انتروباکتر (Enterobacter)*، *سیتروباکتر (Citrobacter)*، *پروتئوس (proteus)* و *سالمونلا (Salmonella)* نیز مشاهده شده اند (۳). این آنزیم ها از طریق هیدرولیز هسته مرکزی در آنتی بیوتیک های بتالاکتام باعث غیرفعال شدن آن ها می شوند (۴). بتالاکتامازهای وسیع الطیف انواع مختلفی دارند که از آن جمله می توان به آنزیم های TEM، SHV و گروه CTX-M اشاره کرد. ژن-های تولید کننده این آنزیم ها به نام های bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{CTX-M} جزء ژن هایی هستند که بر روی پلاسمید قرار گرفته اند. آنزیم بتالاکتاماز TEM یکی از مهم ترین بتالاکتامازهای پلاسمیدی در باکتری های خانواده انتروباکتریاسه می باشد و از علل مهم بروز مقاومت های چند دارویی در عفونت های بیمارستانی به شمار می آید (۵). انواع ژن های bla_{SHV} در جدایه های مختلف باکتری ها مشاهده شده اند و بین تعداد کپی ژن های کد کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف و سطح مقاومت آن ها رابطه مستقیمی وجود دارد (۶). ژنbla_{SHV-1} می تواند پنی سیلین و سفالوسپورین ها را هیدرولیز کند، اما قادر به هیدرولیز آنتی بیوتیک های وسیع الطیف مانند اکسی ایمونوسفالوسپورین ها و مونوباکتام ها نیست (۷). مقاومت به سفوتاکسیم در اکثر گونه های کلبسیلا ناشی از وجود ژن بتالاکتاماز bla_{SHV-2} می باشد که از ژن bla_{SHV-1} مشتق می شود. بررسی ها نشان می دهد که ژن bla_{SHV-1} شایع ترین بتالاکتاماز وسیع الطیف در نمونه های بالینی کلبسیلا بوده و ۱۱ تا ۷۳ درصد سویه ها دارای این آنزیم می باشند (۸). آنزیم های CTX-M در کلاس ملکولی A بتالاکتامازها قرار می گیرند (۹). برخلاف ژن های بتالاکتامازی bla_{TEM} و bla_{SHV}، بتالاکتامازهای bla_{CTX-M}، اثر تخریبی بیشتری بر آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفتریاکسون نسبت به سفتازیدیم دارند (۱۰). اگر چه بعضی از ژن های $blaC_{TX-M}$ از قبیل ژن های $bla_{CTX-M-15}$ و $bla_{CTX-M-19}$ قادر به هیدرولیز سفتازیدیم نیز می باشند. در میان ژن های bla_{CTX-M} ژن $bla_{CTX-M-15}$ بیشترین فراوانی را دارد و از مناطق جغرافیایی مختلفی در سرتاسر جهان گزارش شده است (۱۱). بروز و انتشار ژن های بتالاکتاماز وسیع الطیف مختلف می تواند مقاومت های چندگانه دارویی ایجاد کنند. برای کنترل انتشار این گونه مقاومت ها و درمان سریع و مناسب عفونت هایی که مشکوک به ارگانیسم های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف هستند و همچنین جهت کسب آگاهی بیشتر از میزان شیوع ژن های مختلف این آنزیم ها در هر منطقه باید بررسی های ملکولی صورت گیرد. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی ژن های bla_{SHV}، bla_{TEM}، bla_{CTX-M} و bla_{CTX-15} و همچنین تایید فنوتیپی جدایه های کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف از نمونه های ادرار، زخم و خون در شهرستان خرم آباد بود.

روش بررسی

در این بررسی ۱۲۲ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* از بیماران

بستری و سرپایی مبتلا به عفونت های ادراری (۷۱ جدایه)، عفونت زخم ها (۲۵ جدایه)، ترشحات تنفسی (۱۳ جدایه)، عفونت خون (۷ جدایه)، مایع مغزی نخاعی (۳ جدایه) و کاتتر (۳ جدایه) جدا گردید. از نمونه های جمع آوری شده ۶۵ مورد از مردان و ۵۷ مورد از خانم ها جدا شده بود. نمونه ها پس از کشت در محیط های اختصاصی با انجام تست های استاندارد بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. از هر نمونه یک جدایه *کلبسیلا پنومونیه* تایید شده انتخاب گردید و تا زمان شروع آزمایشات ملکولی و تست تاییدی جدایه های مولد ESBLs در محیط تریپتیک سوی براث (ایتالیا، میلان، Biolife Laboratory) به همراه ۳۰ درصد گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره سازی شدند. تست تـایید فنوتیپی جدایه های مولد ESBLs براساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) و به روش دیسک ترکیبی (Combined disk method) انجام شد. در این روش از دیسک های ۳۰ میکروگرمی سفوتاکسیم (Cefotaxime) و سفتازیدیم (Ceftazidime) و دیسک های ۳۰/۱۰ میکروگرمی سفوتـاکسیم/کلاولانیک اسید(Cefotaxime–clavulanic acid)وسفتازیدیم/کلاولانیک اسید(Ceftazidime-clavulanic acid) از شرکت پادتن طب براساس روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. سویه مولد ESBLs براساس دستورالعمل CLSI مثبت در نظر گرفته شد (۱۲). با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در آزمایش PCR ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M} و bla_{CTX-15} مورد بررسی قرار گرفتند(جدول۱). از روش لیز با NaOH نیم نرمال برای استخراج DNA جدایه ها استفاده گردید (۱۳). آزمایش مولتی پلکس PCR جهت شناسایی ژن های bla_{TEM} و bla_{SHV} طبق روش پیشنهادی Sharma و همکاران (۲۰۱۰) و همچنین جهت شناسایی ژن های bla_{CTX-M} و bla_{CTX-15} از روش پیشنهادی Messai و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد (۱۴،۱۵). از سویه استاندارد *اشریشیاکلی* ATCC 35218 به عنوان کنترل مثبت جهت شناسایی ژن bla_{TEM} و سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603 جهت شناسایی ژن های bla_{SHV}، bla_{CTX-M} و bla_{CTX-15} استفاده گردید. از سویه استاندارد *اشریشیاکلی* ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی در این مطالعه استفاده شد.

جدول ۱- الیگونوکلئوتید های اختصاصی و وزن ملکولی محصولات آزمایشات PCR

ژن	پر ایمر اختصاصی (۳'-۵')	وزن محصول (جفت باز)
bla_{TEM}	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA GACAGTTACCAATGCTTAATC	1080 bp
bla_{SHV}	GGGTAATTCTTATTTGTCGC TTAGCGTTGCCAGTGCTC	928 bp
$bla_{CTX-M-15}$	CGCTTTGCGATGTGCAG ACCGCGATATCGTTGGT	550 bp
bla_{CTX-M}	CCAGAATAAGGAATCCCATG GCCGTCTAAGGCGATAAAC	947 bp

جدول ۲ - فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف در نمونه‌های بالینی

نمونه بالینی	bla_{TEM}	bla_{SHV}	$bla_{CTX-M-15}$	bla_{CTX-M}	کل
عفونت ادراری	۹	۲۷	۳۶	۱۳	۸۵
زخم	۱۳	۱۳	۱۶	۱۱	۵۳
ترشحات تنفسی	۳	۷	۹	۶	۲۵
خون	۱	-	۳	۱	۵
مایع مغزی نخاعی	-	۱	۱	۱	۳
کاتتر	-	۱	-	-	۱
کل	۲۶	۴۹	۶۵	۳۲	-

جدول ۳- ترکیب مقاومت ژنی در رابطه با الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی

ترکیب مقاومت ژنی	ترکیب مقاومت آنتی‌بیوتیکی	تعداد کل
bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, bla_{CTX-15}	CTX, CAZ, CTX/C, CAZ/C	٤
bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-15}	CTX, CAZ, CTX/C, CAZ/C	١
bla_{TEM}, bla_{CTX-M}, bla_{CTX-15}	CTX, CAZ, CTX/C, CAZ/C	٦
bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, bla_{CTX-15}	CTX, CAZ, CTX/C, CAZ/C	٨
bla_{TEM}, bla_{SHV}	CTX, CAZ, CTX/C, CAZ/C	١
bla_{TEM}, bla_{CTX-15}	CTX, CAZ, CTX/C, CAZ/C	٨
bla_{SHV}, bla_{CTX-15}	CTX, CAZ, CTX/C, CAZ/C	١٠
bla_{CTX-M}, bla_{CTX-15}	CTX, CAZ, CTX/C, CAZ/C CTX, CTX/C, CAZ/C	١٣ ١
bla_{SHV}	CTX, CAZ, CTX/C, CAZ/C CTX, CTX/C CTX/C, CAZ/C CTX	١٠ ١ ١ ٣
bla_{CTX-15}	CTX, CAZ, CTX/C, CAZ/C	١١
تعداد کل		٧٧

یافته ها

نتایج آزمایش تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ۱۲۲ جدایه نشان داد ۸۱/۹۶ درصد از جدایه ها نسبت به یکی از آنتی بیوتیک‌های سفوتاکسیم یا سفتازیدیم مقاوم بودند که ۱۳ جدایه (۱۰/۶۵ درصد) مقاوم به سفوتاکسیم، ۴ جدایه (۳/۲۷ درصد) مقاوم به سفتازیدیم و ۸۳ جدایه (۶۸/۰۳ درصد) مقاوم به هر دو آنتی بیوتیک شناسایی شد. از جدایه‌های مورد بررسی ۹۰ جدایه (۶۴/۱۸ درصد) بر اساس قطر هاله عدم رشد دیسک های سفوتاکسیم کلاولانیک اسید و سفتازیدیم کلاولانیک اسید ESBLs مثبت بودند. روش فنوتیپی دیسک دیفیوژن مورد استفاده در این مطالعه یک تست غربالگری و تاییدی برای تعیین جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* دارای آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف می باشد که طبق دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی توصیف شده است. نتایج آزمایش PCR نشان می‌دهد که ۹۶ جدایه (۷۸/۶۸ درصد) حداقل نسبت به یکی از ژن های bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M} و bla_{CTX-15} مثبت بودند(جدول۲). براساس نتایج ۵۳/۲۷ درصد (۶۵ جدایه) دارای ژن bla_{CTX-15}، ۴۰/۱۶ درصد (۴۹ جدایه) دارای ژن bla_{SHV}، ۲۶/۲۲ درصد (۳۲ جدایه) دارای ژن bla_{CTX-M} و ۲۱/۳۱ درصد (۲۶ جدایه) دارای ژن bla_{TEM} بودند. ده الگوی ترکیب مقاومت ژنی شناسایی شد (جدول۳) بیشترین ژن های کد شده توسط جدایه های ESBLs مثبت که از نظر فنوتیپی تایید شدند به ترتیب شامل ژن های bla_{CTX-15} (۵۱/۶۳ درصد)، bla_{SHV} (۳۱/۱۴ درصد)، bla_{CTX-M} (۲۲/۴۰ درصد) و bla_{TEM} (۲۰/۴۹ درصد) بودند. در میان الگوهای ترکیب مقاومت ژنی الگوهای bla_{CTX-M}, bla_{CTX-15} و همچنین bla_{SHV} بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفوتاکسیم/کلاونیک اسید و سفتازیدیم/کلاونیک اسید از خود نشان دادند(جدول۳).

بحث

آنزیم های بتالاکتاماز یکی از سیستم های مقاومتی اصلی باکتری های گرم منفی در برابر آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام هستند. از زمانی که آنتی بیوتیک های بتالاکتا مورد استفاده قرار گرفتند، بتالاکتامازها به همراه مصرف بیش از حد این آنتی بیوتیک ها تکامل یافتند و نقش مهمی را در شکست اقدامات درمانی ایفا می کنند(۱۶). اغلب عفونت های بیمارستانی *کلبسیلا پنومونیه* به دلیل درمان نادرست، از میزان مرگ و میر بالایی برخوردارند. *کلبسیلا* به عنوان دومین عامل مهم عفونت خونی کشنده

در عفونت های بیمارستانی به ویژه در کودکان مطرح است (۱۷). بیش از پانزده سال است که اپیدمی هایی متعدد از عفونت با باکتری های دارای آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف در سراسر دنیا مشاهده شده است و این پدیده تهدیدی بزرگ در استفاده از سفالوسپورین ها محسوب می شود (۱۸). باکتری های دارای ژن های ESBLs در جدایه های مختلف در سرتاسر جهان انتشار دارند و گزارشات متعددی در این زمینه به چاپ رسیده است در عین حال اطلاعات محدودی در مورد تنوع ژن های مولد ESBLs در جدایه های ایرانی منتشر شده است. مطالعه حاضر به بررسی انتشار چهار ژن bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M} و bla_{CTX-15} می پردازد. براساس نتایج ۷۸/۶۸ درصد از جدایه ها دارای یکی از ژن های مورد بررسی بودند. تحقیقی توسط ناصحی و همکاران در تهران بر روی نمونه های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* نشان داد که ۲۶ درصد از جدایه ها دارای ژن bla_{SHV}، ۲۴/۵ درصد دارای ژن bla_{CTX-M}، ۱۸ درصد دارای ژن bla_{TEM} بودند (۱۹). در مطالعه بهزادیان نژاد و همکاران در تهران بر روی ۲۸۰ نمونه ادرار، خون، مدفوع، زخم، ترشحات دستگاه تنفسی، سایر ترشحات چرکی و مایعات استریل بدن ۴۰ جدایه با روش های فنوتیپی ESBL مثبت در نظر گرفته شدند که ۳۵ جدایه از نظر ژن bla_{CTX-M} مثبت بودند (۲۰). در سال ۲۰۰۵ مطالعه ای بر روی *انتروباکتریاسه ها* (*Enterobacteriaceae*) در بیمارستان های مختلف سه شهر در کشور کره جنوبی انجام شد. در این بررسی ۴۱ جدایه دارای ژن‌های $bla_{CTX-M-3}$، $bla_{CTX-M-9}$، $bla_{CTX-M-14}$ و $bla_{CTX-M-15}$ در پنج جنس متفاوت از خانواده *انتروباکتریاسه* شامل *کلبسیلا پنومونیه*، اشریشیاکلی، سیتروباکتر فروندی (*Citrobacter freundii*)،گونه های انتروباکتر و سراشیا مارسسنس(*Serratia marcescens*) شناسایی شدند (۲۱). مطالعه حاضر نشان داد که تعداد زیادی از جدایه های ESBLs مثبت با تست تاییدی فنوتیپی فاقد ژن bla_{TEM} و همچنین ژن bla_{SHV} هستند با این وجود آنزیم CTX-M بیشتر مشاهده شد. از این رو مطالعاتی در مورد حضور بیشتر آنزیم CTX-M در آسیا گزارش شده است (۲۲). آنزیم بتالاکتاماز CTX-M که قادر به هیدرولیز سفوتاکسیم می باشد به طور رایج در اعضای خانواده *انتروباکتریاسه* در کشورهای اروپایی سرتاسر جهان گزارش می شود (۲۳). در سال ۲۰۰۹ مطالعه ای در عربستان فراوانی ژن های bla_{SHV}، bla_{TEM} و bla_{CTX-M} را به ترتیب ۹۷/۳ درصد، ۸۴/۱ درصد و ۳۴/۱ درصد گزارش کرد (۲۴). بررسی در کشور تایلند توسط Udomsantisuk و همکاران بر روی جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* اخذ شده از نمونه های بالینی انجام گرفت که ۹۰ درصد جدایه ها دارای ژن bla_{SHV}، ۵۰ درصد دارای ژن bla_{TEM} و ۱۵ درصد از نظر ژن $bla_{CTX-M-like}$ مثبت بودند (۲۲). بررسی های اپیدمیولوژیک ملکولی در زمینه مقاومت های آنتی بیوتیکی ناشی از بتالاکتامازها نشان می دهد که در کشورها و مناطق جغرافیایی مختلف فراوانی ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتامازی متفاوت است. فشار انتخابی ایجاد شده توسط استفاده از آنتی بیوتیک های نسل سوم سفالوسپورین ها به عنوان یکی از مهمترین عوامل ظهور مقاومت در باکتری های خانواده انتروباکتریاسه مطرح می باشد (۲۵). در مطالعه حاضر بر اساس تست تایید فنوتیپی ESBLs ۶۴/۱۸ درصد از جدایه ها مثبت برآورد شدند. بهروزی و همکاران (۱۳۸۸) میزان شیوع جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* مولد ESBLs را در بیمارستان میلاد شهر تهران ۱۲ درصد گزارش کردند (۲۶) در مطالعه صادقی و همکاران میزان شیوع جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف در بیماران بستری و سرپایی در شهر تهران به ترتیب ۶/۱ درصد و ۱/۷ درصد و همچنین این شیوع برای شهر تبریز به ترتیب۲۱/۴ درصد و ۹/۱ درصد گزارش شد (۲۷). در مطالعه دیگری در بیمارستان لبافی نژاد شهر تهران فراوانی جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* ESBLs مثبت ۶۹/۷ درصد گزارش شد که ۶۱/۷ درصد آن ها مقاومت نسبت به سفتازیدیم را نشان دادند (۲۸). در حالی که در مطالعه ای فراوانی جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* ESBLs مثبت در آمریکای لاتین ۴۵ درصد، اروپا ۲۳ درصد، آمریکا ۸ درصد و کانادا ۵ درصد گزارش شد (۲۵). مطالعه ای در عربستان نیز آزمایش تاییدی فنوتیپی

جدایه های ESBLs مثبت *کلبسیلا پنومونیه* ۵۵ درصد گـزارش نموده است (۲۴). بر اساس نتایج تعدادی از جدایه های دارای ژن های bla_{SHV} و bla_{CTX-15} نسبت به هیچ یک از آنتی بیوتیک های مورد بررسی در آزمایش تاییدی فنوتیپی مقاوم نبودند. با وجود اینکه این جدایه ها دارای ژن های بتالاکتامازی می باشند ولی از لحاظ فنوتیپی به آنتی بیوتیک ها مقاوم نیستند که می توان به علت بیان نشدن ژن های مذبور در باکتری باشد. در مطالعه حاضر ژن bla_{CTX-15} بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده است هر چند که در میان جدایه های دارای فنوتیپ مقاوم به سفوتاکسیم همگی جدایه ها دارای ژن bla_{CTX-15} نبوده اند. این به دلیل حضور گستردگی طیف عمل ESBLs می باشد، بدین معنی که یک باکتری می تواند از طریق تولید ESBLs به جزء آنزیم CTX-M، سفـوتاکسیم را هیدرولیز نماید. با این‌وجود تـاثیر CTX-M تا حدودی اختـصاصی برای سفوتاکسیم می باشد، ولی توانایی هیدرولیز سایر آنتی بیوتیک های خانواده سفالوسپورین ها را نیز دارد.

نتیجه‌گیری

ژن‌های ESBLs در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* از انتشار قابل ملاحظه برخوردارند، که در این میان ژن های خانواده CTX-M دارای بیشترین فراوانی می باشند. بنابراین توصیه می گردد که آزمایشگاه ها برای این چنین نمونه هایی قبل از انجام آزمون رایج آنتی بیوگرام، با انجام آزمون های غربالگری و تاییدی به بررسی توان تولید ESBLs اقدام نمایند.

تشکر و قدرانی

این مطالعه به صورت طرح تحقیقاتی با حمایت مالی دانشگاه شهید باهنر کـرمـان با شماره ۱۳۹۲/۶ انجام گردید.

References

1.Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, et al. *Klebsiella pneumoniae outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in both antimicrobial resistance and virulence.* Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(4):1485-93.

2.Zhou X, Gaol J, Huang Y, Fu S, Chen H. Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella Pneumonia* and *Enterobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula. *Afr J Microbiol Res* 2011; 5(19): 3073-77.

3.Al-Zarouni M, Senok A, Rashid F, Al-Jesmi SM, Panigrahi D. *Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum beta lactamase producing Enterobacteriaceae in the United Arab Emirates*. *Med Princ Pract*. 2008; 17(1): 32-6.

4.Du B, Long Y, Liu H, Chen D, Liu D, Xu Y, et al. *Extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumonia bloodstream infection: risk factors and clinical outcome.* Intensive Care Med. 2002; 28(12): 1718–23.

5.Jacoby GA, Munoz-Price LS. *The new beta lactamases.* N Engl J Med. 2005; 352(4): 380-91.

6.Hammod DS, Schooneveldt JM, Nimmo GR, Huygens F, Giffard PM. *blaSHV genes in Klebsiella pneumoniae: Different allele distributions associated with different promoters within individual isolates.* Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(1): 256-63.

7.Liu G, Ling BD, Xie YE, Lin L, Zeng Y, Zhang X, et al. *Characterization of CTX-M-22 and TEM-141 encoded by a single plasmid from a clinical isolate of Enterobacter cloacae in china*. Japan J Infect Dis 2007; 60(5): 295-97.

8.Tzouvelekis LS, Bonomo RA. *SHV-type beta-lactamases*. Curr Pharm Des. 1999; 5(1): 847-64.

9.Bonnet R. *Growing group of extended-spectrum β-lactamases: the CTX-M Enzymes*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(1): 1-14.

10.Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. *Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum ß-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Russian hospitals*. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(12): 3724-32.

11.Khalaf NG, Eletreby MM, Hanson ND. *Characterization of CTX-M ESBLs in Enterobacter cloacae, Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae clinical isolates from Cairo, Egypt*. BMC Infect Dis. 2009; 9: 84.

12.Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second. 22th ed. USA, Wayne PA. M100-S22. 2012; 32(3): 50-51.

13.Klintschar M, Neuhuber F. *Evaluation of an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis.* J Forensic Sci. 2000; 45(3): 669–73.

14.Sharma J, Sharma M, Ray P. *Detection of TEM & SHV genes in Escherichia coli & Klebsiella pneumoniae isolates in a tertiary care hospital from India*. Indian J Med Res. 2010; 132: 332-6.

15.Messai Y, Benhassine T, Naim M, Paul G, Bakour R. *Prevalence of beta-lactams resistance among Escherichia coli clinical isolates from a hospital in Algiers*. Rev Esp Quimioter. 2006; 19(2): 144-51.

16.Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. *Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among E. coli isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006*. J Clin Microbiol. 2008; 46(2): 707-12.

17.Damian M, Usein CR, Palade AM, Ceciu S, Cosma M. *Molecular epidemiology and virulence characteristics of Klebsiella pneumoniae strains isolated from hospital-associated infections*. Open Epidemiol J. 2009; 2: 69-78.

18.Sanchez UM, Bello TH, Dominguez YM, Mella MS, Zemelman ZR, Gonzalez RG. *Transference of extended spectrum beta-lactamases from nosocomial strains of K. pneumoniae to other species of Enterobacteriaceae*. Rev Med Chil. 2006; 134(4): 415-20.

19.Nasehi L, Shahcheraghi F, Sadat Nikbin V, Nematzadeh SH. *PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae isolated from Tehran, Iran*. Iran J Basic Med Sci. 2010; 13(3): 111-18.

20.Behzadian Nejad Q, Abdollahi A, Najar Peerayeh SH, Forouhesh Tehrani H. *Evaluation of bla-ctx-m-type gene in multi-drug resistance Klebsiella pneumonia species isolated from clinical samples*. RJMS. 2009; 15(60 and 61): 37-45.[Persian]

21.Kim J, Lim YM, Jeong YS, Seol SY. *Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14 and CTX-M-9 extended-spectrum- ß-lactamase in Enterobacteriaceae clinical isolates in Korea*. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(4): 1572-5.

22.Udomsantisuk N, Nunthapisud P, Tirawatanapong T, Dansuputra M. *Molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase among clinical isolates Escherichia coli and Klebsiella pneumonia*. J Med Assoc Thai. 2011; 94(12): 1504-12.

23.Kalantar D, Mansouri S. *Emergence of multiple β-lactamases produced by Escherichia coli clinical isolates from hospitalized patient in Kerman, Iran*. Jundishapur J Microbiol. 2010; 3(4): 137-45.

24.Al-Agamy MH, Shibl AM, Tawfik AF. *Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum beta lactamase-producing K. pneumoniae in Riyadh, Saudi Arabia*. Ann Saudi Med. 2009; 29(4): 253–7.

25.Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. *Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region*. Clin Infect Dis. 2001; 32(Suppl 2): S94–103.

26.Behroozi A, Rahbar M, Vand Yousefi J. Frequency of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing *E. coli* and *K. pneumonia* isolated from urine in an Iranian 1000-bed tertiary care hospital. *Afr J Microbiol Res* 2010; 4(9): 881-4.

27.Sadeghi MR, Nahaei MR, Soltan Dalal MM. *Extended spectrum beta-lactamase resistance in clinical isolates of K. pneumoniae and E. coli in in-patient and out-patient groups*. Med J Tabriz Univ Med Sci. 2008; 30(2): 79-86.[Persian]

28.Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, et al. *Distribution of bla(TEM), bla(SHV), bla(CTX-M) genes among clinical isolates of K. pneumoniae at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran*. Microb Drug Resist. 2010; 16(1): 49-53

Prevalence of Extended –Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumonia* Isolates from Clinical Samples

Alizade, H. (MSc)
PhD Student of Bacteriology, Research Center for Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Momeni, F. (MSc)
MSc of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

Ghanbarpour, R. (PhD)
Professor of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

Dolatshah, L. (MSc)
MSc of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

Corresponding Author: Alizade, H.

Email: alizade.h2000@yahoo.com

Received: 11 Dec 2013
Revised: 27 Dec 2013
Accepted: 29 Dec 2013

Abstract

Background and Objective: *Klebsiella pneumonia* (*K.pneumonia*) is one of the common causes of nosocomial infections. The aim of this research was to determine the prevalence of beta-lactamase genes and phenotypic confirmation of extended–spectrum-beta-lactamase (ESBL) producing *K.pneumonia* isolates from clinical samples.

Material and Methods: In this study, 122 *K.pneumonia* were isolated from clinical specimens of Khoramabad city and were confirmed by standard bacteriological tests. The presence of ESBL enzymes was detected by combined disk diffusion method. PCR assay with specific primers was used to determine bla_{SHV}, bla_{TEM}, $bla_{CTX\text{-}15}$ and $bla_{CTX\text{-}M}$ genes in the confirmed isolates.

Results: of 122 *K.pneumonia* isolates, 78 (64.18%) were positive for ESBL, using disk diffusion method. According to antibiogram results, 10.65% of isolates were resistant to cefotaxime, 3.27% to ceftazidime and 68.03% to both antibiotics. Ninety isolates (64.18%) considered as ESBLs isolates, at the same time, with being resistant to cefotaxime and ceftazidime were also sensitive to cefotaxime-clavulanic acid and ceftazidime-clavulanic acid. In PCR assays, blaCTX$_{\text{-}15}$, bla_{SHV}, $bla_{CTX\text{-}M}$ and bla_{TEM} genes were detected in 78.68%, 40.16%, 26.22% and 22.13% of isolates, respectively. Ten resistant patterns of genes were detected.

Conclusion: The significance percentage of antibiotic resistant genes of *K.pneumonia* isolates from clinical samples in Khoramabad city had ESBLs genes; CTX-M category was the most prevalent encoding genes of these enzymes.

Keywords: *Klebsiella Pneumonia*, Extended-Spectrum Beta-Lactamase, Antibiotic Resistance

This paper should be cited as: Dolatshah L, Ghanbarpour R, Momeni F, Alizade H. [Prevalence of Extended –Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumonia* Isolates from Clinical Samples]. MLJ. 2014; 8(1):64-71 [Article in Persian]