● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌وسوم، شمارهٔ ۵، ص ۵۹۵-۵۸۵، ۱۳۹۵

مقالهٔ پژوهشی

فراوانی بتالاکتامازهای نوع TEM و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی چهار کلاس مختلف آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه در بیمارستان‌های بروجرد

محسن میرزائی*[1]، منیر بلوچی[2]

خلاصه

مقدمه: ارگانیسم‌های تولید کننده بتالاکتاماز TEM در سراسر جهان به‌عنوان منبع مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مانند سفالوسپورین‌های نسل سوم در حال شکل‌گیری هستند. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف با واسطه ژن TEM و الگوی مقاومت ضد میکروبی آنها در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیمارستان‌های مختلف شهرستان بروجرد بود.

روش: در این مطالعه، ۱۰۰ کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان‌های مختلف شهر بروجرد جمع‌آوری شد. آزمایش‌های فنوتیپی و تأییدی برای تشخیص تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) طبق دستورالعمل‌های موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) اجرا گردید. حداقل غلظت مهارکنندگی آزترونام، آمیکاسین، سیپرفلوکساسین و مروپنم به‌وسیله روش میکرو براث دایلوشن تعیین گردید. تمام ایزوله‌های تولیدکننده ESBL به‌وسیله PCR از لحاظ وجود ژن TEM بررسی گردیدند.

یافته‌ها: آزمایش‌های فنوتیپی اولیه مشخص کرد که ۴۱ درصد (n =۳۱) از ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه، تولیدکننده ESBL هستند. در آزمایش‌های تأییدی با استفاده از اسید کلاوولانیک، تولید ESBL در همه ایزوله‌ها با آزمایش مثبت اولیه تأیید گردید. از میان تمام ایزوله‌های تولیدکننده ESBL، ۳۱ ایزوله دارای ژن TEM بودند. در این مطالعه حساسیت بالا نسبت به مروپنم و آمیکاسین، حساسیت پائین به سیپروفلوکساسین و کمترین حساسیت برای آزترونام مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: همان‌طور که مشاهده می‌شود جدایه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف علاوه بر مقاومت نسبت به بتالاکتام‌ها می‌توانند دارای مقاومت ترکیبی در برابر کلاس‌های دیگر آنتی‌بیوتیکی نیز باشند، که این امر نشان‌دهنده مقاومت چندگانه در این باکتری‌ها است. از طرفی آنتی‌بیوتیک مروپنم می‌توانند گزینه‌های درمانی مناسبی به‌منظور مهار عفونت‌های ناشی از ارگانیسم‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف باشد.

واژه‌های کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، مقاومت میکروبی

۱- استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران ۲- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: mirzaei.iaub@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۴/۹ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۹/۳ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۱

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه پاتوژن فرصت‌طلبی از خانواده انتروباکتریاسه است که موجب سپتی سمی، باکتریمی، مننژیت، عفونت‌های دستگاه ادراری و بافت‌های نرم می شود.این باکتری جزء فلورطبیعی دهان، پوست و روده بوده و شایع ترین گونه در بین سایر گونه های جنس کلبسیلا می‌باشد (۱). در باکتری‌های گرم منفی سیستم اصلی دفاعی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، آنزیم‌های بتالاکتاماز هستند که یک اتصال آسیل کووالانت را از طریق گروه کربوکسیل حلقه بتالاکتام به‌وجود می آورند که حاصل آن باز شدن حلقه بتالاکتام و غیرفعال شدن دارو است (۲). کلبسیلا پنومونیه با داشتن ژن کدکننده آنزیم های بتالاکتاماز بروی پلاسمید و یا کروموزوم آن را به‌طور سریع در بین سویه‌های باکتریایی انتشار داده و مقاومت چندگانه به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف را سبب می‌شود. بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در کلبسیلا پنومونیه اولین بار در سال ۱۹۸۳ در آلمان بلافاصله بعد از معرفی اکسی ایمینیوسفالوسپورین های جدید مثل سفوتاکسیم، سفتازیدیم وآزترونام جدا شدند (۳). این آنزیم‌ها از بتالاکتامازهای گروه A بوده که سفالوسپورین‌های وسیع الطیف با یک زنجیره جانبی اکسیمینو را هیدرولیز می کنند و باعث بروز مقاومت باکتریایی به پنی سیلین ها، سفالوسپورین‌های نسل اول، نسل دوم، نسل سوم و آزترئونام به جز سفامایسین ها و کارباپنم به‌وسیله هیدرولیز این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند و توسط مهارکننده‌های بتالاکتاماز مانند کلاوولانیک اسید مهار می‌شوند (۴). ازجمله مهم‌ترین آنزیم‌های مرتبط با بتالاکتامازهای با طیف گسترده در کلاسA، بتالاکتاماز TEM است. این آنزیم نخستین بار در سال۱۹۶۵ از باکتری اشرشیا کلی جداشده از کشت خون فردی به نام Temoneria در آتن یونان گزارش شد و به پیشنهاد دانشمندان نام TEM (سه حرف اول نام بیمار) را بر روی این آنزیم نهادند (۵). پس از شناسایی این تیپ در نمونه خونی Temoneria، آنزیم بتالاکتامازی تیپ TEM-1 به سرعت درمیان سویه های بالینی در تمام جهان گسترش یافت. به‌طوری که امروزه این تیپ آنزیمی به‌عنوان یکی از مکانیسم های مقاومتی در برابر آنتی بیوتیک های خانواده بتالاکتام، در میان باکتری های گرم منفی به حساب می آید. ژن این آنزیم معمولا به صورت یک فاکتور R (Resistant) بر روی یک ترانسپوزون قرار گرفته که می تواند به راحتی از طریق آن به سایر سویه‌ها و دیگر باکتری‌ها مهاجرت و در نهایت منجر به مقاوم شدن آنها نیز گردد. این آنزیم قادر به هیدرولیز پنی سیلین‌ها و سفالوسپورین‌های اولیه از قبیل سفالوتین و سفالوریدین است (۶). امروزه تعداد ارگانیسم‌های مولد TEM در حال افزایش بوده و این مسئله به‌عنوان یکی از بحران‌های موجود در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها مطرح است(۷). لذا هدف از این مطالعه شناسایی ژن TEM و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌باشد.

روش بررسی

در یک مطالعه مقطعی - توصیفی تعداد ۱۰۰ باکتری کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های مختلف کلینیکی (تراشه، ادرار، خون، نلاتون و بافت) از بیمارستان‌های مختلف شهرستان بروجرد جمع‌آوری و با آزمایش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. بررسی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف با روش دیسک ترکیبی با استفاده از دیسک‌های سفوتاکسیم(۳۰µg)، سفوتاکسیم/کلاوولانیک

اسید(۳۰+۱۰µg)، سفتازیدیم(۳۰µg) و سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید(۳۰+۱۰µg) تهیه شده از شرکت پادتن طب مورد مطالعه قرار گرفت. برای کنترل کیفیت از سویه رفرانس *E. coli* ATCC 25922 و سویه کنترل تولید کننده ESBL (*E. coli* ATCC 35218) برای بررسی کیفیت و نتایج حاصل از آزمایش انتشار از دیسک و تعیین حداقل غلظت مهار کننده آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده گردید.

در این روش سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه و روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به فاصله حداقل ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر در سطح پلیت قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و تولید ESBL از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلیمتر یا بیشتر در اطراف دیسک سفتازیدیم/ کلاوولانیک اسید یا سفوتاکسیم کلاوولانیک اسید بر طبق ضوابط CLSI مشخص گردید (۹-۸).

حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC)

حداقل غلظت مهارکنندگی به روش میکروبراث دایلوشن برای آنتی‌بیوتیک‌های آزترونام، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین و مروپنم انجام شد. از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ۲۷۸۵۳ و اشریشیاکلی ۲۵۹۲۲ به‌عنوان کنترل کیفی روش MIC استفاده شد. در این روش از میکروپلیت‌های استریل ۹۶ خانه استفاده شد. از دو ردیف چاهک به‌عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی استفاده گردید. ابتدا از آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین و آزترونام (سیگما) غلظت‌های ۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه گردید. از نمونه‌های استوک ۲۵۶ تهیه شده به روش سریال دایلوشن، غلظت‌های مورد نظر (۱۲۸-۶۴-۳۲-۱۶-۸-۴-۲-۱-۰۵/-۰/۲۵) ساخته شد. برای انجام MIC در ابتدا ۵۰ میکرولیتر از محیط MHB به خانه‌های اول تا دوازدهم اضافه شد. سپس از رقت‌های مختلف برای هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌ها به چاهک‌های مربوط به آن رقت که قبلاً شماره‌گذاری شده بود، ۵۰ میکرولیتر اضافه شد. در چاهک کنترل مثبت آنتی‌بیوتیک اضافه نشد. بعد از افزودن محیط و آنتی‌بیوتیک به چاهک‌ها، باکتری را به معادل نیم مک فارلند رسانده و در غلظت نهایی 1×10^5 Cfu/ml از باکتری به همه چاهک‌ها به جز چاهک کنترل منفی افزوده و در پایان پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

بعد از گذشت ۱۸ ساعت از انکوباسیون پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده و به تمام چاهک‌ها رنگ تترازولیوم افزوده شد. بعد از افزودن رنگ به تمام چاهک‌ها، پلیت‌ها به‌مدت یک ساعت در انکوباتور۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. اولین رقتی که هیچ گونه رشدی از باکتری مشاهده نشد به‌عنوان MIC گزارش گردید.

روش PCR برای شناسایی ژن blaTEM

برای ایزوله‌های ESBL مثبت استخراج DNA به‌روش Boiling انجام شد. به این صورت که باکتری‌ها در محیط LB براث کشت داده شدند و به‌مدت ۲۰ساعت در انکوباتور۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از گذشت زمان انکوباسیون، اپندورف‌ها در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از اتمام سانتریفیوژ در زیر هود مایع رویی خارج و رسوب در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. سپس اپندورف‌ها در دستگاه ترموبلاک در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. محلول

حاصل در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس در زیر هود مایع رویی در دو اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری برای هر نمونه پخش شد. مایع رویی حاوی DNA استخراج شده است که به‌عنوان الگو در روش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. برای این منظور مستر میکس (Amplicon)، DNA تهیه شده در مرحله قبل و آب مقطر استریل طبق دستورالعمل شرکت سازنده تهیه گردید. سپس. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد. یک سیکل ۳ دقیقه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد (دناتوراسیون اولیه) سپس ۳۰ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن ۶۰ ثانیه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال ۶۰ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و مرحله طویل شدن ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و نهایتاً یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. به‌منظور تائید و شناسایی بیشتر ماهیت ومشخصات ژن های بتالاکتاماز شناسایی شده در سنجش PCR تعیین توالی (sequencing) نیز انجام گرفت. در این مطالعه از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC 25922 به‌عنوان کنترل منفی و سویه اشریشاکلی ATCC 35218 به‌عنوان کنترل مثبت واجد ژن *bla*TEM استفاده شد.

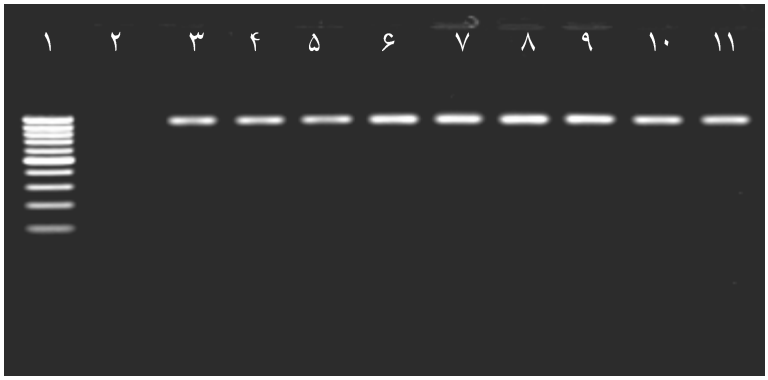
نتایج

از ۱۰۰ ایزوله مورد بررسی، ۵۲ ایزوله جدا شده از زنان و ۴۸ ایزوله جدا شده از مردان بود. همچنین ۷۹ نمونه از ادرار، ۱۱ نمونه از ترشحات لوله تراشه، ۴ نمونه نلاتون، ۳ نمونه خون و ۳ نمونه از بافت بودند. از جدایه‌های مورد بررسی ۴۱ جدایه بر اساس قطر هاله عدم رشد دیسک‌های سفوتاکسیم/کلاوولانیک اسید و سفتازیدیم کلاوولانیک اسید ESBL مثبت بودند که شامل ۳۵ نمونه ادرار، ۵ نمونه تراشه و ۱ نمونه خون بودند.

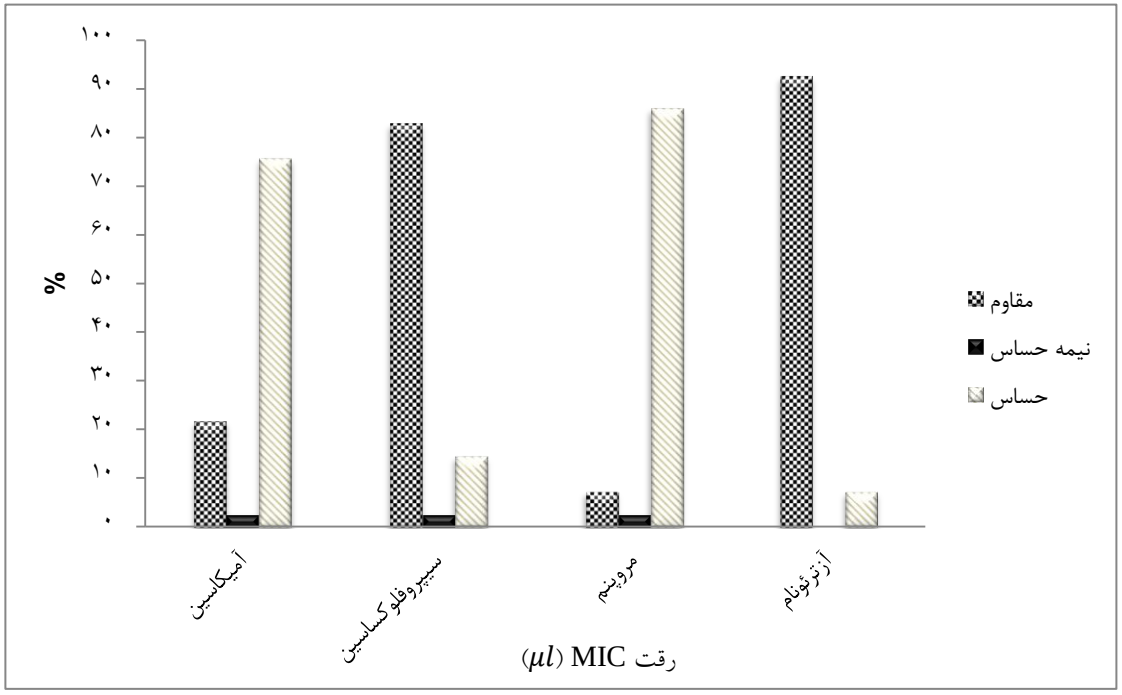
در آزمایش PCR، ۳۱ (۷۵ درصد) جدایه‌های مولد ESBL حاوی ژن TEM بودند (شکل ۱). آنالیز تعیین توالی DNA ژن‌های مورد مطالعه به‌صورت تصادفی وجود ژن TEM-79 را تأیید کرد. حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) به‌روش میکروبراث دایلوشن انجام شد. نتایج MIC ۴ آنتی‌بیوتیک به شرح زیر گزارش گردید (نمودار ۱): سیپروفلوکساسین ۳۴ (۸۲/۹٪) مقاوم، ۱ (۲/۴٪) حد واسط و ۶ (۱۴/۶٪) حساس، مروپنم ۳ (۷/۳٪) مقاوم، ۱ (۲/۴٪) حدواسط و ۳۷ (۸۶/۱٪) حساس، آمیکاسین ۹ (۲۱/۸٪) مقاوم، ۱ (۲/۴٪) حد واسط، ۳۱ (۷۵/۸٪) حساس و آزترونام ۳۸ (۹۲/۶٪) مقاوم، ۰ (۰٪) حدواسط، ۳ (۷/۳٪) حساس.

جدول ۱. *مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلی مراز*

Primer	Sequence (5' to 3')	Nucleotide numbers	Amplicon	Reference
TEM-F2	TCG GGG AAA TGT GCG CG	۹۰– ۱۰۵	۹۷۱ bp	۲۹
TEM-R2	TGC TTA ATC AGT GAG GCA CC	۱۰۶۲–۱۰۴۲		



شکل ۱: *بررسی حضور ژن TEM در کلبسیلا پنومونیه با روش PCR. ردیف ۱ سایز مارکر bp ۱۰۰، ردیف‌های ۱۱- ٤ ایزوله‌های بالینی واجد ژن TEM (۹۷۱ bp)، ردیف ۳، کنترل مثبت برای ژن TEM و ردیف ۲ کنترل منفی.*



نمودار ۱: *توزیع فراوانی حداقل غلظت مهارکننده سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، مروپنم و آزترئونام برای جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBLs*

بحث

در پانزده سال اخیر اپیدمی‌های متعدد عفونت با ارگانیسم‌های ESBL مثبت در سراسر دنیا گزارش شده است. این شیوع تهدیدی جدی در روند درمان عفونت‌ها محسوب می‌شود. اهمیت کلبسیلا پنومونیه به‌عنوان پاتوژن انسانی، در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. در این مطالعه از مجموع ۱۰۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه جداشده، ۴۱ نمونه تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بودند (۴۱٪). گزارشات مختلفی از سراسر جهان در مورد میزان شیوع باکتری‌های ESBL وجود دارد. در مطالعه خورشیدی و همکاران در سال ۲۰۱۱ میزان شیوع ESBL، ۳۲٪ گزارش شد (۱۰). صادقی و همکاران میزان شیوع ESBL در شهر

تبریز را ۲۳/۳٪ گزارش کردند (۱۱) در حالی که این میزان در مطالعه حاضر ۴۱٪ گزارش شد و نشان‌دهنده این است که در طی سال‌های اخیر میزان ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده ESBL رو به افزایش بوده است. میزان شیوع ESBL توسط ایزدی ۴۳٪ گزارش شد (۱۲) و در مطالعه یوسفی مشعوف و همکاران ۴۶/۷٪ از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به‌عنوان سویه ESBL مثبت شناخته شدند (۱۳) که نتایج این تحقیقات با پژوهش حاضر هم‌خوانی مناسبی دارد. در آسیای جنوب شرقی هر چند میزان شیوع ESBL در برخی مناطق ۲۰٪ گزارش شده، اما در برخی مناطق به ۶۰٪ نیز رسیده است (۱۴). به‌طور میانگین، میزان شیوع ESBL در اروپا ۱۸/۴٪ و در هلند ۴٪ و در سوئد ۳٪ گزارش شده است (۱۵). بنابر نتایج ذکر شده به‌نظر می‌رسد نحوه به کارگیری ابزارهای کنترل عفونت در بخش‌های مختلف بیمارستان و تنوع در الگوی تجویز و مصرف داروهای بتالاکتام دلایل عمده تنوع در میزان شیوع ارگانیسم‌های مولد ESBL در نقاط مختلف جغرافیایی است.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌ها از سال‌های دور یکی از مشکلات بهداشتی درمانی در سطح دنیا بوده است. در این میان برخی از انواع مقاومت‌های دارویی اهمیت فوق العاده‌ای در عفونت‌های بیمارستانی دارند. در مطالعه حاضرمقاومت دارویی کلبسیلا پنومونیه به‌روش میکروبراث دایلوشن مورد بررسی قرار گرفت. یکی از یافته‌های این پژوهش میزان بالای مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بود که در سال‌های اخیر به‌عنوان داروی مؤثر در درمان عفونت ادراری مورد استفاده قرار می‌گیرد. از میان کل ایزوله‌های جمع‌آوری شده نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین ۸۲/۹٪ مقاوم، ۱۴/۶٪ حساس و ۲/۴٪ بینابینی بودند. در مطالعه Khaneja و همکاران درآمریکا، کمتر از ۳ درصد سویه‌های کلبسیلا نسبت به سیپروفلوکساسین از خود مقاومت نشان دادند (۱۶). در مطالعه سلطان دلال و همکاران میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۱٪ گزارش شد (۱۷) در حالی که این میزان در مطالعه حاضر ۸۲/۹٪ بود. با توجه به مصرف بی‌رویه سیپروفلوکساسین در سال‌های اخیر میزان مقاومت به این دارو به شدت افزایش یافته است و نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که کارایی این آنتی‌بیوتیک نسبت به گذشته از بین رفته است و باید از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثرتری در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری کلبسیلا پنومونیه استفاده کرد.

علاوه بر سیپروفلوکساسین، مقاومت به آزترونام نیز در این مطالعه چشم‌گیر بود. در مطالعه پناهی و همکاران بر خلاف مطالعه حاضر میزان مقاومت به مروپنم در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جداشده از عفونت‌های ادراری۹۱/۶٪ گزارش شده است (۱۸). این تفاوت ممکن است به دلیل تفاوت‌های منطقه‌ای یا فشار مصرف آنتی‌بیوتیکی یا انتشار کلونال مقاومت در یک منطقه یا بیمارستان باشد. همچنین میزان بالای مقاومت می‌تواند ناشی از تجویز بی رویه و غیرمنطقی این آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. در این مطالعه کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و آمیکاسین مشاهده شد. بهترین آنتی‌بیوتیک که در مراحل بحرانی میتوان از آن استفاده کرد مروپنم است که کمترین مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک مشاهده شده است. البته مصرف ایمی پنم باید کاملاً کنترل شده باشد تا بتوان از این آنتی بیوتیک به‌عنوان یک آنتی بیوتیک مؤثر استفاده کرد. مسئله نگران کننده در این مطالعه وجود چند سویه مقاوم بود که نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها حتی مروپنم مقاومت نشان دادند. می‌توان پیش‌بینی کرد سویه‌هایی از این دسته به زودی به وجود می‌آیند که درمان بیماران، مخصوصاً بیماران با نقص ایمنی را با مشکلات جدی روبرو خواهد کرد.

در مطالعه حاضر فراوانی ژن TEM با استفاده از آزمون PCR در ایزوله‌های تولید کننده ESBL، ۷۵/۶٪ گزارش شد. فراوانی ژن TEM در منطقه القسیم عربستان ۷۰٪ گزارش شده است (۱۹) که مشابه تحقیق حاضر است. در مطالعه‌ای در تایوان ژن TEM در ۳۲ ایزوله یافت شده (۲۰) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در مطالعه Bali و همکاران که در سال ۲۰۱۰ در ترکیه صورت گرفت میزان جداسازی ژن TEM از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه۷۳/۴٪ گزارش شده که هم خوانی نزدیکی با فراوانی ژن TEM در مطالعه حاضر دارد (۲۱). در پژوهش گودرزی و همکاران در خرم آباد روی جدایه‌های اشریشیاکلی مولد عفونت ادراری، ۹۱ جدایه (۴۵/۵٪) در روش انتشار از دیسک، تولیدکننده‌ی ESBLs بودند که در بین آنها، ۶۰ جدایه (۶۵/۹٪) به روش PCR حامل ژن *TEM* بودند (۲۲). حسین زادگان و همکاران فراوانی تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف را در باسیل‌های گرم منفی مورد بررسی قرار داده‌اند که از ۲۲۵ نمونه کشت مثبت باسیل‌های گرم منفی، ۵۳ مورد (۲۳/۵۵٪) از نظر تولید ESBL مثبت بودند. کلبسیلا پنومونیه با ۲۰ مورد (۸/۸ ٪) و اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا هر کدام با ۱۰ مورد(۴/۴۴٪) از فراوان‌ترین باکتری‌های مولد ESBL در مطالعه مذکور بوده‌اند (۲۳). راعی و همکاران با بررسی جدایه‌های ادراری کلبسیلاپنومونیه در شهر تهران، فراوانی ژن TEM را ۶۱/۹٪ گزارش کرده‌اند (۲۴) که همانند این مطالعه نشان‌دهنده فراوانی بالای ژن TEM است. فراوانی ژن TEM توسط ناصحی ۱۳٪ گزارش شده است (۲۵). این میزان توسط بهروزی ۱۲٪ (۲۶) و توسط ریاحی ۲۰/۶٪ گزارش شده است (۲۷). درحالی که در تحقیق حاضر فراوانی ژن TEM، ۷۵٪ گزارش شد. بنابراین برای شناسایی ژنوتیپ بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در یک ناحیه جغرافیایی باید تحقیقات مشابه و بیشتری صورت گیرد. همان‌طور که گفته شد، ژن‌های *bla*TEM مورد شناسایی در مطالعه حاضر که به‌صورت تصادفی تعیین توالی شدند دارای ۱۰۰٪ همولوژی با ژن TEM-79 بودند. این تیپ از ژن TEM در گذشته نیز از ایران گزارش گردیده که می‌تواند نشان دهنده احتمال انتشار کلونال این ژن در بین جدایه‌های بالینی باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه باشد (۲۸). TEM-79 از TEM-1 مشتق شده و در اسید آمینه ۲۴۴ با هم تفاوت دارند، از سوی دیگر طیف اثر TEM-79 در مقایسه با TEM-1 بسیار گسترده‌تر می‌باشد، که این امر توجه بیشتر به احتمال انتشار این آنزیم در کشور را بیش از پیش می کند.

نتیجه‌گیری

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک مشکل جهانی بهداشت عمومی است و به یک چالش عمده برای جامعه پزشکان تبدیل شده است. مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل تجویز و مصرف بی رویه آنها و همچنین قابلیت انتقال این مقاومت به دیگر سویه‌های باکتری در حال افزایش است. به‌همین دلیل باید یک الگوی درمانی متناسب با نوع منطقه جغرافیایی، سویه و ژنتیک میکروارگانیسم در نظر گرفته شود که این امر مستلزم پژوهش‌های گسترده‌ای می‌باشد.

سپاسگزاری

هزینه اجرای تحقیق حاضر توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد تامین شده است. نویسندگان مراتب قدردانی و سپاس خود را از کارکنان آزمایشگاه تحقیقات میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد واحد بروجرد ابراز می‌دارند.

References

1. Koneman EW, Allen S, Janda WM (editors). Color atlas and text book of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia, Lippincott 1997; PP 171-241.
2. Shahcheraghi NV, shoraj F. Evaluation existance of blaTEM and blashv Beta-lactamase genes in resistance antibiotic Escherichia coli strains isolated from clinical samples obtained from Tehran Hospitals. *J Iran med microbiol* 2007; 1(4): 21-7 [In Persian].
3. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. *Infection* 1983; 11(6): 315-7.
4. Nathisuwan S, Burgess DS, Lewis JS. Extended-spectrum b-lactamases: epidemiology, detection, and treatment. *Pharmacotherapy* 2001; 21: 920-8.
5. Medeiros AA. Beta lactamases. *Br Med Bull* 1984; 40(1): 18-27.
6. Mlynarczyk G, Mlynarczyk A, Bilewska A, Dukaczewska A, Holawski C, Kicman A, et al. High effectiveness of the method with cefpirome in detection of extended-spectrum beta-lactamases in different species of gram-negative bacilli. *Med Dosw Mikrobiol* 2006; 58(1): 59-65.
7. Haghi F, Zeighami H, Keramati N, Hemmati F, Hajiahmadi F. Frequency of TEM extended spectrum beta lactamase producing Escherichia coli in clinical specimens by phenotypic and molecular methods in *Zanjan. Zanjan Univ Med Sci J* 2013; 21(85):55-63.
8. Henshke-Bar-Meir R, Yinnon AM, Rudensky B, Attias D, Schlesinger Y, Raveh D. Assessment of the clinical significance of production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) by Enterobacteriaceae. *Infection* 2006; 34(2): 66-74.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial SusceptibilityTesting. 16th Informational Supplement (M100-S16), CLSI, Wayne, PA 2006; 26(3): 15-100.
10. Khorshidi A, Rohani M, Moniri R. The prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β-lactamases-producing Klebsiella pneumoniae isolates recovered from Kashan hospital university, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2011; 4(4). 289-94 [In Persian].
11. 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.
12. Izadi N, Naderi Nasab M , Harifi Mood E, Meshkat Z. Prevalence of TEM and SHV Genes in Clinical Isolates of Klebsiella Pneumonia From Mashhad, North- East Iran. *Iran J Pathol* 2014; 9 (3): 199.
13. Yousefi Mashouf R, Alijani P, Saidijam M, Alikhani M.Y, Rashidi H. Study of Antibiotic Resistance Pattern and

Phenotypic Detection of ESBLs in Klebsiella Pneumoniae Strains Isolated from Clinical Samples and Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Imipenem and Ceftazidim Antibiotics. *Sci J Hamadan Univ Med Sci* 2014; 20(4): 295-302.

14. Pitout JD. Multiresistant Enterobacteriaceae: New threat of an old problem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; 6(5):657-69.
15. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum b-lactamases producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infec* 2008; 14(1): 144-53.
16. Khaneja M, Naprawa J, Kumar A, Piecuch S. Successful treatment of late-onset infection due to resistant *Klebsiella pneumoniae* in an extremely low birth weight infant using ciprofloxacin. *J Perinatol* 1999; 19(4): 311-4.
17. Soltan Dallal MM, Sharifi Yazdi MK, Avadisian S, Agha Mirazaei H, Sabaghi A. Efficacy of Ciprofloxacin, Ceftizoxims and Carbenicillin on Klebsiella species isolated from hospital specimens. *Gorgan Uni Med Sci J* 2013; 15 (3): 77-83.
18. Panahi Y, Mojtahedzadeh M, Safarnejad S, Beiraghdar F. Patterns of antibiotic resistance in strains isolated from urinary tract infections ICU. *Kowsar Med J* 2008; 13(3): 229-38 [In Persian].
19. Tawfik AF, Alswailem AM, Shibl AM, Al-Agamy MH. Prevalence and Genetic Char cteristics of TEM, SHV, and CTX-M in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Saudi Arabia. *Microb Drug Resist* 2011; 17(3): 383-8.
20. Feng-yee-chang, Siu LK, Fung CP, Huang M.H, Ho M. Diversity of SHV and TEM -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: Gene Evolution in Northern Taiwan and Two Novel B-Lactamases, SHV-25 and SHV-26. Antimicrob Agents Chemother. 2016; 60(8): 2407-13.
21. Burcu Bali E, Açik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum–lactamase produced by Escherichia coli, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. *Afr J Microbiol Res* 2010; 4 (8): 650-4.
22. Goudarzi G, Baharvand Ahmadi A. The occurrence of TEM gene among the extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) producing uropathogenic Escherichia coli strains, isolated from Khorramabad city in 2013. *Pajouhandeh J* 2015; 20(1):33-7.
23. Zadegan HH, Ramazanzadeh R, Hasany A. Cross-sectional study of extended spectrum beta-lactamase producing gram-negative bacilli from clinical cases in Khorramabad, Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 2009; 1(3): 16-9.
24. Raei F, Eftekhar F, Feizabadi M. M. Correlation of extended-spectrum β-lactamase phenotype with blaSHV, blaTEM and blaCTX-M gene carriage in urinary isolates of *Klebsiella pneumonia* in Tehran. 2014; 27(1): 35-44
25. Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin V, Nematzadeh S. 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): 111-8.

26. Behroozi A, Rahbar M, Yousefi Vand 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. Riyahi Zaniani F, Meshkat Z, Nasab MN, 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*. *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15(1): 654-60.
28. Feizabadi MM, Mahamadi-Yeganeh S, Mirsalehian A, Mirafshar SM, Mahboobi M, Nili F, et al. Genetic characterization of ESBL producing strains of *Klebsiella pneumoniae* from Tehran hospitals. *J Infect Dev Ctries*. 2010; 4(10): 609-15.
29. Talukdar PK, Rahman M, Rahman M, Nabi A, Islam Z, Hoque MM, et al. Antimicrobial resistance, virulence factors and genetic diversity of Escherichia coli isolates from household water supply in Dhaka, Bangladesh. *Plos one* 2013; 8(4): e61090.

Prevalence of TEM Beta-Lactamases and Determination of MIC of four Different Classes of Antibiotics in *Klebsiella pneumonaia* Clinical Isolates

Mohsen Mirzaee, Ph.D.[1*], Monir Balouchi, M.Sc.[2]

1. Assistant Professor, Department of Lab Sciences, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran

2. Department of Microbiology, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran

* Corresponding author; e-mail: mirzaei.iaub@gmail.com

(Received: 29 June 2015 Accepted: 26 Jan 2016)

Abstract

Background & Aims: Organisms producing TEM-β-lactamase are emerging around the world as a source of resistance to β-lactam antibiotics such as three generation cephalosporins. In this study, we used a polymerase chain reaction (PCR) to identify genes TEM for Extended-spectrum β-lactamase (ESBLs) producing clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* from hospitals of Boroujerd/ Iran.

Method: A total of 100 *K. pneumoniae* isolates were collected from different hospitals in Boroujerd. Phenotypic screening and confirmatory tests for ESBL detection were performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Minimum inhibitory concentration (MIC) of azteronam, amikacin, ciprofloxacin and meropenem were determined by micro broth dilution method. All of the ESBL-producing isolates were examined for the presence of TEM gene by PCR method.

Results: Primary phenotypic tests revealed that 41% (n=31) of *K. pneumonia* isolates produced ESBLs. In confirmatory tests using clavulanic acid, ESBL production was confirmed in 100% of isolates with a primary positive test. Among the ESBL producing *K. pneumoniae*, 31 isolates were positive for *TEM* gene. The study showed excellent susceptibility among the strains to meropenem and amikacin. Low susceptibility to ciprofloxacin and the lowest susceptibility to azteronam were observed.

Conclusion: ESBLs producing isolates can be combined with resistance to other classes of antibiotics such as aminoglycosides. Also, meropenem can be a good treatment options to control infections caused by ESBLs producing organisms.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, beta-Lactamases, TEM, Microbial sensitivity tests, Drug resistance

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23(5): 585-595