مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری
دوره ۹، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲
صفحات ۲۹۰-۲۷۸

Online ISSN: 4493-2476
Print ISSN: 2020-2538
www.irijournals.com

فراوانی آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) در کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه های بالینی به روش PCR

احسان امیدی

کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی گرایش میکروبیولوژی،میکروب های بیماریزا

چکیده

مصرف روز افزون مواد ضد میکروبی بتالاکتام در درمان عفونت های باکتریای سبب افزایش مقاومت بر علیه آنها شده است. هم اکنون یکی از معضلات در درمان عفونت های بیمارستانی مقاومت آنزیمی به بتالاکتاماز های وسیع الطیف در میان ایزوله های بالینی به ویژه کلبسیلا پنومونیه می باشد. به همین جهت مطالعه تحت عنوان بررسی فراوانی آنزیم های بتالاکتاماز های وسیع الطیف و همچنین شناسایی ژن های TEM و SHV در نمونه های جدا شده از نمونه های بالینی به روش PCR صورت گرفت. مواد و روش کار: در این مطالعه، ۱۶۰ نمونه بالینی از بیمارستان و آزمایشگاه های طبی سطح شهر میاندوآب اخذ و با کشت باکتریای تعیین هویت شدند. پس از جداسازی ۱۲۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده مقاومت آنها نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم، ایم پنم، سفتازیدیم و آموکسی سیلین به روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. سپس در سویه های مولد بتالاکتاماز های وسیع الطیف، وجود ژن TEM و SHV با روش PCR بررسی شد. یافته ها: نتایج نشان داد کلبسیلا پنومونیه با ۵۴/۱ درصد و ۵۳/۴ بیشترین مقاومت را نسبت به سفوتاکسیم و آموکسی سیلین را داشتند. همچنین کلبسیلا پنومونیه با ۶۹/۱ درصد و ۵۷/۵ درصد نسبت به ایمی پنم و سیپروفلوکساسین حساس بودند. نتایج PCR نشان داده شد که ۵۹/۱ درصد از موارد مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف بوده که از این میان ۶۳/۳ درصد حاوی ژن TEM و ۵۹/۳ درصد حای SHV بوده است. نتیجه گیری: ژن های بتالاکتاماز TEM و SHV از شیوع بالایی در ایزوله های مولد بتالاکتاماز های وسیع الطیف برخوردار بودند و این آنزیم ها نقش مهمی در مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام بازی می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، TEM، SHV، PCR

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یک باکتری گرم منفی روده ای و عضو خانواده انتروباکتریاسه است که جزیی از میکروفلور طبیعی بدن انسان را تشکیل می دهد و حدود یک سوم افراد، ناقل روده ای این میکروب هستند .میزان استقرار این باکتری در بیماران بستری شده در بیمارستان بیشتر از بیماران سرپایی است. طیف بیماری زایی کلبسیلا معمولاً وسیع بوده شامل باکتریمی، پنومونی و عفونت مجاری ادراری می‌باشد .در بیمارستان همه گیری شدید بین نوزادان و عفونت‌های آندمیک در بخش بیماران کلیوی رخ می دهد. پنومونی کلبسیلایی بخش کوچکی از موارد پنومونی را تشکیل می‌دهد ولی میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا و حدود ۹۰ % است(۱, ۲). انتروباکتریاسه ها بزرگترین مجموعه ناهمگون از باسیل های گرم منفی در پزشکی می باشند که حدود ۴۰ جنس و ۱۵۰ گونه از آنها شناسایی شده است. این مجموعه به عنوان قسمتی از فلور نرمال روده ای بیشتر حیوانات و انسان ها هستند.این باکتری ها در انسان مسول ۳۰ تا ۳۵ درصد از سپتی سمی ها،بیش از ۷۰ درصد عفونت های ادراری و بسیاری از عفونت های روده ای می باشند. بعضی از انواع انها شامل اشرشیا کلای، کلبسیلا، پروتوس، سالمونلا و شیگلا میباشد. تمامی اعضای گروه انتروباکتریاسه در شرایط هوازی و بی هوازی رشد می کنند(۱۱). برای درمان عفونت‌های کلبسیلایی از آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام بخصوص سفالوسپورین‌ها استفاده می شود که در سال‌های اخیر مقاومت کلبسیلا نسبت به بتالاکتام‌ها افزایش چشمگیری داشته است(۳). امروزه با بروز مقاومتهای دارویی در میان باکتریهای بیماریزا، درمان این دسته از بیماریهای عفونی با مشکلات فراوانی مواجه شده است. از دیرباز آنتی بیوتیکهای بتالاکتام از مرسومترین درمان عفونتهای باکتریایی محسوب می شدند.باکتریها با تولید آنزیمهای بتالاکتاماز توانسته اند به این کلاس از آنتی بیوتیکها مقاومت یابند(۱, ۴).

بتالاکتامازهای با طیف گسترش یافته نیز به دنبال مصرف فراوان آنتی بیوتیک‌های گسترده طیف، در اوایل دهه ۱۹۸۰ در اروپا شناسایی شدند و اولین بتا لاکتامازهای وسیع الطیف در سال ۱۹۸۳ در آلمان شناسایی گردیدند.بتالاکتامازهای با طیف گسترش یافته در برخی از اعضاء خانواده انتروباکتریاسه یافت می شود .عمدهترین باکتری‌های مولد بتا لاکتامازهای با طیف گسترش یافته عبارتند از: اشریشیاکلی و کلبسیلا پونومونیا و سایر گونه‌های کلبسیلا(۵, ۶). متأسفانه مصرف بی رویه ی آنتی بیوتیک‌ها در دهه‌های اخیر باعث افزایش ظهور سویه‌های مقاوم با مقاومت چند گانه در کلبسیلا پنومونیه تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز با طیف وسیع (ESBLs)شده است. ژن‌های کدکننده ESBLs معمولاً به روی پلاسمید یافت می‌شوند و توانایی انتقال به سویه‌های گرم منفی دیگر را دارند . در دو دهه اخیر، انواع زیادی از ESBLs شناسایی شده اند، تاکنون ۴۰۰ تیپ گوناگون بتا لاکتامازها از نمونه‌های کلینیکی جداشده است(۷).

آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتریها بسیار متنوعند و در پاسخ به فشار انتخابی آنتی بیوتیک، دائماً در حال موتاسیون و یا جایگزینی اسیدهای آمینه به ویژه در جایگاه فعال آنزیم هستند به طوریکه باعث ظهور انواع جدیدی از بتا لاکتامازهای با طیف گسترش یافته (ESBL) شده است(۸).

بیش از ۱۵۰ نوع ESBL از کشورهای مختلف گزارش شده است که غالباً باکتریهای انتروباکتریاسه مولد آن هستند. بتالاکتامازهای با طیف وسیع آنزیمهایی هستند که علاوه بر ایجاد مقاومت به پنیسیلینها، واسطه ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورینهای نسل سوم مثل سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفترياکسون و مونوباکتامها مثل آزترئونام محسوب میشوند.بر خلاف موارد بالا معمولاً مقاومت نسبت به سفامایسینها مثل سفوکسیتین و سفوتتان و نیز کارباپنمها مثل ایمیپنم و

مرپنم در این دسته باکتریها مشاهده نمیشود. عوامل بازدارنده بتالاکتامازها مانند کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام اثر بازدارندگی بر عملکرد این آنزیمها دارند(۸, ۹).

درمان عفونتهای حاصل از باکتریهای مولد این آنزیمها بغرنج است چون از یک سو مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورینها مشاهده میشود و از سوی دیگر بسیاری از ژنهای ESBL به روی پلاسیمدهای بزرگی (بیش از 100 کیلوباز) قرار دارد که همزمان حامل ژنهای مقاومت به سایر عوامل ضدمیکروبی مثل آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، سولفونامیدها و تتراسایکلین نیز است. این عفونتها دارای رابطه معنی داری با میزان مرگ و میر بیماران است و بار مالی زیادی را در پی دارد. این پلاسمیدهای کونژوگاتیو به راحتی میتوانند از یک سویه به سویه ی دیگر و یا حتی به گونه‌های دیگری منتقل شوند(۸, ۱۰).

از آنجائیکه وجود مقاومت وابسته به ESBLs در مناطق مختلف جهان متفاوت بوده و سویه‌های دارای ESBLs در شرایط in vivo علاوه بر آنتی بیوتیکهای بتالاکتام به گروههای دیگر آنتی بیوتیکی نیز مقاومت نشان می‌دهند بر آن شدیم تا شیوع کلبسیلا پنومونیه مولد ESBLs جدا شده از نمونه های بالینی و دارای ژن های مقاوم TEM و SHV در شهر میاندوآب با کمک PCR مورد بررسی قرار داده تا با استفاده از نتایج بدست آمده و در صورت شیوع زیاد ESBLs در نمونه‌های بالینی در خصوص انتخاب آنتی بیوتیک مناسب قدم های موثرتری برداریم. در مطالعات شیبل و همکاران در سال ۲۰۱۲ در عربستان از ۶۰ نمونه بالینی ۳۹ مورد حامل ژن بتالاکتامازی و ۱۲ مورد حامل ژن کارباپنماز بودند(۵۱). در مطالعه دیگری که توسط لشگری و همکاران در سال ۱۳۹۳ در شهر تهران صورت گرفته بود نتایج نشان داد از بین ۱۰۰ نمونه کلبسیلا مورد بررسی ۳۶ باکتری تولید کننده ESBLs بودند(۵۲).

مبین و همکاران در سال ۱۳۸۶در تبریز در رابطه با آنزیم بتالاکتاماز طیف گسترده (ESBL)درسویه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه در بیمارستان‌های آموزشی شهر تبریز به این نتیجه رسیدند که مقاومت سویه‌ها نسبت به سفالوسپورین‌های مختلف۸۶ -۸۷٪، یوریدوپنی سیلین‌ها ۸۹٪ و کینولون‌ها ۲۶٪-۲۳٪ تعین شد. در مقایسه با روشهای مختلف۹۷/۷- ۹۰/۹٪ از سویه‌ها به عنوان مولد ESBL شناخته شد(۱۵).

Herwana و همکاران در سال ۲۰۰۸ در جاکارتای اندونزی در رابطه با شیوع بتالاکتاماز با طیف گسترش یافته (ESBL) در *کلبسیلا پنومونیه* به این نتیجه رسیدند که از ۷۸ نمونه *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از خون بیماران تب دار ۱۳ نمونه در محیط کشت رشد نکردند بنابراین فقط ۶۵ نمونه برای ارزیابی ESBL جدا شدند. از این ۶۵ نمونه نتایج ارزیابی ESBL نشان داد که ۸ مورد (۱۲,۳٪) بر علیه سفتازیدیم,سفکسیم و آزترئونام ESBL تولید می کردند.در نتایج مشابه یافت شده برای سفتریاکسون ۷ نمونه(۱۰,۸٪) ESBL تولید می کردند(۲).

گارگی دانگری-مودی(Gargi Dangre-Mudey) و همکاران در سال ۲۰۱۲در ماهاراشترای هند در رابطه با مقاومت چند دارویی و تولید بتالاکتاماز با طیف گسترش یافته(ESBL) در گونه‌های کلبسیلا جدا شده از موارد سپتی سمی نوزادان به این نتیجه رسیدند که از میان ۳۹۶ نمونه خونی موارد مشکوک به سپتی سمی نوزادان در NICU ۱۰۰ سوش کلبسیلا جدا شدکه ۹۶٪ مقاومت چند دارویی داشتند.بیشترین مقاومت به آمپی سیلین مشاهده شد (۱۰۰٪) و بعد سفوروکسیم(۸۶٪) و کوتریموکسازول(۸۰٪). به وسیله غربالگری ۹۵ ٪ نمونه‌ها ESBL تولید کردند و با تست تاییدی ۷۵ ٪ ESBL تولید کردند، همه نمونه‌های تولید کننده ESBL مقاومت چند دارویی داشتند. از میان نمونه‌های تولید کننده ESBL بیشترین مقاومت مشاهده شده با آمپیسیلین(۱۰۰٪) , سفوروکسیم(۹۰,۶۶٪) و کوتریموکسازول(۸۶,۶۶٪) بود. از میان تولید کنندگانESBL ، ۹۶٪گونه‌ها حساس به ایمیپنم، ۳۳,۳۳٪ حساس به آمیکاسین و ۳۲٪ حساس به سیپروفلوکساسین بودند(۵۴).

در مطالعه مرادی و همکاران که در سال ۱۳۹۵ بر روی ۱۱۱ نمونه کلبسیلا پنومونیه جداشده از نمونه های بیمارستانی شهر کرمان صورت گرفته بود نتایج نشان داد بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی بیوتکی آمپی سیلین به میزان ۹۲/۵ درصد بوده است و موثرترین آنتی بیوتیک علیه نمونه های کلبسیلا پنومونیه مربوط به آنتی بیوتیک ایمی پنم با میزان حساسیت ۸۹ درصد بوده است. همچنین میزان مقاومت به تمامی آنتی بیوتیک ها در نمونه های که تولید کننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف می باشد بیشتر از نمونه هایی بوده اند که فاقد این آنزیم ها بوده است. نتایج دیسک های ترکیبی جهت شناسایی فنوتیپی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه نشان داد که ۵۳/۱ درصد نمونه ها دارای آنزیم ESBLs بودند. از این تعداد ۷۶/۷ درصد دارای ژن TEM و ۹۶/۴ درصد دارای ژن SHV بودند(۵۵).

در مطالعه دیگری که توسط پیمانی و همکاران در سال ۱۳۹۲ در شهر قزوین صورت گرفته بود نتایج نشان داد از مجموع ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۴۵ ایزوله (۴۵ درصد) تولید کننده ESBLs بودند. همچنین نتایج حاصل از PCR نشان داد که ۵۸ درصد ایزوله های ESBLs مثبت دارای ژن TEM و ۴۲ درصد دارای ژن SHV بودند. همچنین ۲۴/۴ درصد نیز ار نظر حضور هم زمان هر دو ژن مثبت بودند. همچنین در مطالعه دیگری که توسط ناصحی و همکارانش صورت گرفته بود میزان جداسازی ژن های TEM و SHV را به ترتیب ۱۸ و ۲۶ درصد گزارش کردند که در مقایسه با مطالعات حاضر از شیوع کمتری برخوردار است(۵۶). فیض آبادی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ فراوانی ژن های TEM و SHV را در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۶۷/۴ و ۴۶/۵ درصد گزارش کردند(۵۷). در مطالعه دیگری که توسط بالی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در ترکیه صورت گرفته بود میزان جداسازی ژن های TEM و SHV در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جمع آوری شده از بیمارن بستری را به ترتیب ۷۳/۴ و ۲۱/۸ درصد گزارش کردند(۵۸).

در مطالعه ای که توسط lai و همکاران در سال ۲۰۰۷ صورت گرفته بود نتایج نشان داد از بین ۲۰۴ نمونه کلبسیلا پنومونیه جداشده، ۱۷۵ نمونه حداقل به یکی از آنتی بیوتیک های سفالوسپورین نسل سوم مقاوم بوده اند. همچنین در ۱۷۰ مورد از آنها (۹۷/۱ درصد) از نظر ESBLs مثبت بوده اند. همچنین بررسی های PCR نشان داد ۶۷/۳ درصد از موارد دارای هر دو ژن TEM و SHV بوده است(۵۹).

آرچین و همکاران در سال ۱۳۹۲ مطالعه ای در خصوص تشخیص مولکولی ژن های بتالاکتامازی و الگوی مقاومت آنتی بیوتیک ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه های بالینی در شهر شیراز انجام گرفته شد نتایج نشان داد از ۶۰ مورد کلبسیلا پنومونیه جداشده، تمامی موارد نسبت به آمپی سیلین مقاوم (۱۰۰ درصد) بوده اند و همچنین میزان ۹۸/۳۴ درصد نسبت به آنتی بیوتیک ایمی پنم حساس بوده اند. از ایزوله های شناسایی شده ESBLs مثبت در ۳۸/۳۴ درصد از موارد دارای ژن TEM و در ۱۳/۲۳ درصد از موارد دارای هر دو ژن TEM و SHV بوده است(۶۰).

در مطالعه دیگری که توسط تاوفیک و همکاران در سال ۲۰۱۱ صورت گرفت نتایج نشان داد از بین ۴۳۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه،۲۵/۶ درصد از موارد مولد ESBLs بوده است. همچنین تمامی موارد نسبت به آنتی بیوتیک ایمی پنم حساس بوده اند. ۸۷/۳ درصد از موارد نسبت به جنتامایسین، ۱۰ درصد نسبت به

ن و ۹/۱ درصد نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم بوده اند. نتایج PCR حاکی از آن بوده است که ۷۰/۹ درصد دارای ژن TEM و ۸۹/۱ درصد دارای ژن SHV بوده اند(۳۷).

روش تحقیق

مطالعه از نوع توصیفی- تحلیلی بود که به روش مقطعی از بخش های عفونی و آزمایشگاه های طبی واقع در سطح شهر میاندوآب جمع آوری و مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه برداری به روش تصادفی از تعداد ۱۶۰ مراجعه کننده به بخش عفونی بیمارستان و آزمایشگاه های طبی واقع در سطح شهر میاندوآب با استفاده از وسایل استریل جمع آوری و جهت جداسازی باکتری کلبسیلا پنومونیه با استفاده از محیط های کشت باکتریایی جهت ارزیابی به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ملکان ارسال گردید. به منظور جداسازی اولیه باکتری کلبسیلا پنومونیه از موارد نمونه برداری شده، ابتدا در محیط کشت EMB آگار در کنار شعله توسط آنس حلقه به منظور حصول پرگنه های تک داده شد. بعد از اتمام کشت، محیط مذکور به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون در کنار حرارت شعله بوسیله آنس خنجری از پرگنه های تک حاصل شده برداشته شده و به روش کشت عمقی در محیط کشت TSA کشت داده شد. سپس محیط کشت مذکور جهت انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. کلبسیلا پنومونیه به دلیل دارا بودن فرم تخمیر کننده کلونی های صورتی تشکیل می دهند. با استفاده از آنس سوزنی استریل خنک، کلونی مورد نظر را به سطح شیب دار محیط کشت TSI آگار انتقال و با حرکت آنس در امتداد سطح شیب دار، کشت داده شد و سپس عمق با سوراخ کردن محیط، تلقیح گردید.لوله ها با درپوش شل شده به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۶ درجه در اتمسفر هوازی انکوبه گردید.این محیط کشت جهت تفکیک ارگانیسم ها به ویژه انتروباکتریاسه بر اساس تولید اوره از به کار می رود. باکتری در محیط اوره که دارای معرف فنل رد می باشد به صورت مایع یا آگار کشت داده شد. پس از ۱۸ الی ۲۴ ساعت در صورتی که باکتری قادر به شکستن اوره باشد با تولید آمونیاک باعث قلیایی شدن محیط و موجب تغییر رنگ معرف فنل رد از رنگ قرمز به رنگ ارغوانی پر رنگ می شود.

شکل ۱-سمت راست کشت کلبسیلا پنومونیه در نوترین آگار، سمت چپ کشت کلبسیلا پنومونیه در EMB آگار

- محیط کشت مولر-هینتون آگار

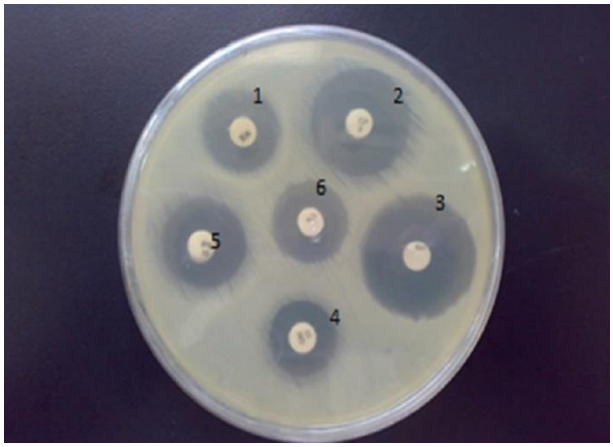
مولر هینتون یک محیط شفاف و مفید برای تعیین حساسیت ارگانیسم ها به آنتی بیوتیک است. این محیط همچنان برای ازمایش هیدرولیز نشاسته نیز مفید است.

این محیط کشت امروزه بیشتر در ارتباط با دیسک های آنتی بیوتیکی با توان بالا برای تعیین الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی با تکنیک کرابی-بایر به کار می رود. در پایان پس از کشت در محیط های عمومی و افتراقی همچون محیط EMB، TSI، SIM، MR-VP، سیمون سیترات و اوره تعداد ۱۲۵ نمونه کلبسیلا پنومونیه بدست آمد.

سنجش حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها

پس از تایید و جداسازی باکتری های کلبسیلا پنومونیه، به پیشنهاد سازمان جهانی CLSI به منظور غربالگری اولیه ارگانیسم های تولید کننده ESBL، از آزمون دیسک آگار دیفیوژن استفاده گردید(۶۱). در این روش پس از تهیه محیط مولر هینتون آگار، سوسپانسیون میکروبی استاندارد با غلظت نیم مک فارلند تهیه گردید. ۱۵ دقیقه پس از پخش کردن کامل سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط مذکور، دیسک های جنتامایسین(۱۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول(۱/۲۵ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید(۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفوتاکسیم(۳۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم(۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم(۳۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین(۳۰ میکروگرم) که از شرکت پادتن طب تهیه شده بودند مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، با استفاده خط‌کش، هاله عدم رشد اطراف دیسک ها اندازه گیری و با استاندارد های جهانی CLSI مقایسه شده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده دیسک ها، نمونه های مورد نظر به صورت مقاوم(R)، نیمه حساس(I)، و حساس (S)گزارش گردید. هرگونه کاهش حساسیت در این سویه ها می تواند گواهی بر وجود این مقاومت باشد.

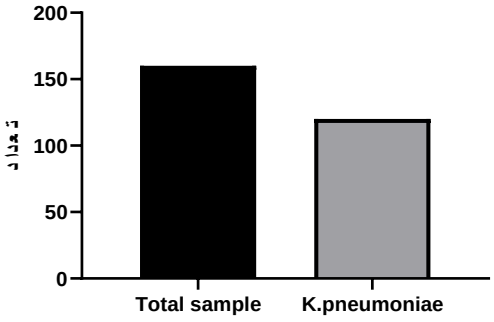
شکل ۲-تصویر یک نمونه از تست آنتی بیوگرام صورت گرفته



شکل ۳- تصویر یک نمونه از تست آنتی بیوگرام صورت گرفته

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد از تعداد ۱۶۰ نمونه بالینی بدست آمده، پس از کشت باکتریای، تعداد ۱۲۰ مورد (۷۵ درصد) از آنها وجود کلبسیلا پنومونیه مورد تایید گردید.



نمودار ۱-فراوانی کلبسیلا پنومونیه حاضر در مطالعه

محل نمونه برداری کلبسیلا پنومونیه های حاضر در مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بوده است که ۵۵/۸۴ درصد از موارد از ادرار، ۲۴/۱۶ درصد از ترشحات و خلط و ۲۰ درصد از زخم، خون و یا کاتتر از بیماران اخذ شده است.

جدول ۱- فراوانی نوع نمونه های حاضر در مطالعه

نوع نمونه	فراوانی	درصد
ادرار	۶۷	۵۵/۸۴
زخم، خون و کاتتر	۲۴	۲۰/۰۰
ترشحات و خلط	۲۹	۲۴/۱۶
حجم کل	۱۲۰	۱۰۰

نتایج بدست آمده از ۱۲۰ نمونه تایید شده توسط محیط های کشت، در مجموع کلبسیلا پنومونیه های حاضر در مطالعه، کلبسیلا پنومونیه با ۵۴/۱ درصد نسبت به سفوتاکسیم و ۵۳/۴ درصد نسبت به آموکسی سیلین بیشترین میزان مقاومت از خود نشان دادند. همچنین کلبسیلا پنومونیه با ۶۹/۱ درصد نسبت به ایمی پنم بیشترین حساسیت را از خود نشان دادند. همچنین ۵۷/۵ درصد نسبت به سیپروفلوکساسین حساس بودند.

جدول ۲- نتایج آنتی بیوگرام نمونه های کلبسیلا پنومونیه حاضر در مطالعه

نتایج PCR

ردیف	نام آنتی بیوتیک	مقاوم (درصد)	نیمه حساس (درصد)	حساس (درصد)
۱	جنتامایسین	۴۱/۶	۱۲/۶	۴۵/۸
۲	کوتریموکسازول	۵۰/۴	۸	۴۱/۶
۳	نالیدیکسیک اسید	۵۱/۶	۴/۳	۴۴/۱
۴	سیپروفلوکساسین	۳۳/۳	۹/۲	۵۷/۵
۵	سفوتاکسیم	۵۴/۱	۴/۳	۴۱/۶
۶	ایمی پنم	۲۵	۵/۹	۶۹/۱
۷	سفتازیدیم	۴۵/۸	۳/۸	۵۰/۴
۸	آموکسی سیلین	۵۳/۴	-	۴۶/۶

نتایج بدست آمده از PCR نشان داده شد که از بین ۱۲۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه حاضر در مطالعه تعداد ۷۱ مورد (۵۹/۱) درصد از کلبسیلا پنومونیه ها مولد بتالاکتاماز های وسیع الطیف بوده اند. پس از طی پروسه PCR برای شناسایی ژن های SHV و TEM مشخص گردید از ۷۱ نمونه بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت، ۴۵ مورد (۶۳/۳ درصد) از نمونه ها حاوی TEM و ۴۰ مورد (۵۶/۳ درصد) حاوی SHV بوده است.

جدول ۳-فراوانی نسبی آنزیم بتالاکتاماز با طیف گسترده در نمونه های حاضر در مطالعه

ESBLs / کلبسیلا پنومونیه	فراوانی	درصد
دارای آنزیم	۷۱	۵۹/۱۶
فاقد آنزیم	۴۹	۴۰/۸۴
مجموع	۱۲۰	۱۰۰

نتیجه گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر ژن های مولد بتالاکتاماز TEM و SHV که جزئی از خانواده بزرگ بتالاکتاماز های وسیع الطیف هستند درصد قابل توجهی را در مطالعه حاضر به خود اختصاص داده است. نتایج آنتی بیوگرام نشان داده است کلبسیلا پنومونیه های های جداسازی شده نسبت به مطالعات سالهای قبل محققین روز به روز در حال افزایش میزان مقاومت خود نسبت به آنتی بیوتیک های رایج در عفونت ها میباشد. در نهایت این مطالعه نشان داد که سویه های تولید کننده بتالاکتاماز

های وسیع الطیف یک معضل جدی و رو به پیشرفت است. بنابر این ضرورت دارد تا با اتخاذ راه کارهای علمی مناسب در مورد درمان آنتی بیوتیکی، تجهیز آزمایشگاه ها به روش های تشخیصی فنوتیپی و در کنار آن تکنیک های مولکولی میزان شیوع سویه های مقاوم باکتری ها مورد بررسی قرار گیرد و تدابیر لازم جهت درمان بیماران و کنترل مقاومت در باکتری ها صورت گیرد. همچنین با توجه به درصد بالای مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم، انجام دقیق آنتی بیوگرام و پرهیز از تجویز بی رویه آنتی بیوتیک ها در عفونت های ناشی از ارگانیسم های تولید کننده ESBLs و غربالگری نمونه های بالینی از لحاظ مقاومت به ESBLs و همچنین راهکار های لازم جهت کمک به پزشکان متخصص در تشخیص بیماری و استفاده از درمان مناسب از اهمیت زیادی برخوردار است.

منابع

1. 1. Al-Agamy MH, Shibl AM, Tawfik AF. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in Riyadh, Saudi Arabia. Annals of Saudi medicine. 2009;29(4):253-7.
2. 2. Herwana E, Yenny Y, Pudjiadi L, Surjawidjaja JE, Lesmana M. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase in Klebsiella pneumoniae. Universa Medicina. 2016;27(3):98-105.
3. 3. Nasehi L, SHAH CF, Nikbin V, Nematzadeh S. PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae isolated from Tehran, Iran. 2010.
4. 4. Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Infection, Genetics and Evolution. 2011;11(7):1499-504.
5. 5. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clinical microbiology reviews. 1995;8(4):557-84.
6. 6. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology: Elsevier Health Sciences; 2015.
7. 7. Gniadkowski M, Schneider I, Jungwirth R, Hryniewicz W, Bauernfeind A. Ceftazidime-Resistant EnterobacteriaceaeIsolates from Three Polish Hospitals: Identification of Three Novel TEM-and SHV-5-Type Extended-Spectrum β-Lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1998;42(3):514-20.
8. 8. Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases. Bmj. 2003;327(7425):1209-13.
9. 9. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β-lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(3):969-76.
10. 10. Ramazanzadeh R. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase production in clinical isolates of Klebsiella spp. African Journal of Microbiology Research. 2010;4(13):1359-62.
11. 11. Pitout JD. Infections with extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae. Drugs. 2010;70(3):313-33.

12. 12. Ryan KJ, Ray CG. Medical microbiology. McGraw Hill. 2004;4:370.
13. 13. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of Klebsiella pneumoniae nosocomial isolates. Journal of clinical microbiology. 2005;43(8):4178-82.
14. 14. O'Leary WM. Practical handbook of microbiology: CRC press; 1989.
15. 15. Liberati A, D'Amico R, Pifferi S, Leonetti C, Torri V, Brazzi L, et al. Antibiotic prophylaxis to reduce respiratory tract infections and mortality in adults receiving intensive care. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2000(1).
16. 16. Kaoutar B, Joly C, L'Hériteau F, Barbut F, Robert J, Denis M, et al. Nosocomial infections and hospital mortality: a multicentre epidemiological study. Journal of hospital infection. 2004;58(4):268-75.
17. 17. Berhe M, Edmond MB, Bearman GM. Practices and an assessment of health care workers' perceptions of compliance with infection control knowledge of nosocomial infections. American journal of infection control. 2005;33(1):55-7.
18. 18. Van Saene H, Damjanovic V, Murray A, de La Cal M. How to classify infections in intensive care units—the carrier state, a criterion whose time has come? journal of Hospital Infection. 1996;33(1):1-12.
19. 19. Baran Jr J, Muckatira B, Khatib R. Candidemia before and during the fluconazole era: prevalence, type of species and approach to treatment in a tertiary care community hospital. Scandinavian journal of infectious diseases. 2001;33(2):137-9.
20. 20. Sinha M, Srinivasa H. Mechanisms of resistance to carbapenems in meropenem-resistant Acinetobacter isolates from clinical samples. Indian journal of medical microbiology. 2007;25(2):121.
21. 21. Yan J-J, Hsueh P-R, Ko W-C, Luh K-T, Tsai S-H, Wu H-M, et al. Metallo-β-Lactamases in ClinicalPseudomonas Isolates in Taiwan and Identification of VIM-3, a Novel Variant of the VIM-2 Enzyme. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001;45(8):2224-8.
22. 22. Sh J, Kasra Kermanshahi R, Nouhi A, Zarkesh Esfahani H, Abousaeidi H. Comparing the Frequence of â-lactamase Enzyme in Isolated Nosocomial Infectious Bacteria. Journal Of Rafsanjan University Of Medical Science. 2009;8(3):32.
23. 23. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology E-Book: Elsevier Health Sciences; 2020.
24. 24. Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. Annual review of biochemistry. 1983;52(1):825-69.
25. 25. Bruggink A, Roos EC, de Vroom E. Penicillin acylase in the industrial production of β-lactam antibiotics. Organic Process Research & Development. 1998;2(2):128-33.
26. 26. Riaz S, Faisal M, Hasnain S. Antibiotic susceptibility pattern and multiple antibiotic resistances (MAR) calculation of extended spectrum β-lactamase (ESBL) producing Escherichia coli and Klebsiella species in Pakistan. African Journal of Biotechnology. 2011;10(33):6325-31.
27. 27. Brook I. The role of beta-lactamase-producing-bacteria in mixed infections. BMC Infectious Diseases. 2009;9(1):202.

28. 28. Yao JD, Moellering RC. Antibacterial agents. Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition: American Society of Microbiology; 2011. p. 1043-81.
29. 29. Mendiratta D, Deotale V, Narang P. Metallo-[beta]-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in a hospital from a rural area. Indian Journal of Medical Research. 2005;121(5):701.
30. 30. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β-lactamases. Clinical microbiology reviews. 2007;20(3):440-58.
31. 31. Dugal S, Fernandes A. Carbapenem hydrolysing metallo–b–lactamase: a review. International Journal of Current Pharmaceutical Research. 2011;3(3):9-16.
32. 32. Thomson KS. Extended-spectrum-β-lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. Journal of clinical microbiology. 2010;48(4):1019-25.
33. 33. El-Shaboury SR, Saleh GA, Mohamed FA, Rageh AH. Analysis of cephalosporin antibiotics. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2007;45(1):1-19.
34. 34. Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman NO. Risk factors and clinical impact of Klebsiella pneumoniae carbapenemase–producing K. pneumoniae. Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America. 2009;30(12):1180.
35. 35. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1995;39(6):1211.
36. 36. 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. Iranian Journal of Pathology. 2014;9(3):199-205.
37. 37. Tawfik AF, Alswailem AM, Shibl AM, Al-Agamy MH. Prevalence and genetic characteristics of TEM, SHV, and CTX-M in clinical Klebsiella pneumoniae isolates from Saudi Arabia. Microbial Drug Resistance. 2011;17(3):383-8.
38. 38. Bonomo RA, Rice LB. Inhibitor resistant class A beta-lactamases. Front Biosci. 1999;4:34-41.
39. 39. Duttaroy B, Mehta S. Extended spectrum b lactamases (ESBL) in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. Indian J Pathol Microbiol. 2005;48(1):45-8.
40. 40. Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology. Curr Issues Mol Biol. 2015;17(1):11-22.
41. 41. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. Saudi journal of biological sciences. 2015;22(1):90-101.
42. 42. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome research. 1996;6(10):986-94.
43. 43. Erlich HA. PCR technology: Springer; 1989.
44. 44. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends in molecular medicine. 2002;8(6):257-60.

45. 45. Parashar D, Chauhan D, Sharma V, Katoch V. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. Indian Journal of Medical Research. 2006;124(4):385.
46. 46. Lagally ET, Emrich CA, Mathies RA. Fully integrated PCR-capillary electrophoresis microsystem for DNA analysis. Lab on a Chip. 2001;1(2):102-7.
47. 47. Ünlü M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis. 1997;18(11):2071-7.
48. 48. Wiktorowicz JE, Raysberg Y. Electrophoresis apparatus and method. Google Patents; 2000.
49. 49. Mirsalehian A, AKBARI NF, Peymani A, Kazemi B, JABAL AF, Mirafshar S. Prevalence of extended spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae by phenotypic and genotypic methods in intensive care units in Tehran, Iran. 2008.
50. 50. Behrooozi A, Rahbar M, Jalil V. Frequency of extended spectrum beta-lactamase (ESBLs) producing Escherichia coli and Klebseilla pneumonia isolated from urine in an Iranian 1000-bed tertiary care hospital. African Journal of Microbiology Research. 2010;4(9):881-4.
51. 51. Shibl A, Al-Agamy M, Memish Z, Senok A, Khader SA, Assiri A. The emergence of OXA-48-and NDM-1-positive Klebsiella pneumoniae in Riyadh, Saudi Arabia. International Journal of Infectious Diseases. 2013;17(12):e1130-e3.
52. 52. Lashgari N, Vand Yousefi J, Siadat SD, 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 JOURNAL. 2014;24(3):148-52.
53. 53. Shahcheraghi F, Nasiri S, Naviri H. Evalouation of presence the bla-SHV and bla-TEM β-Lactamase genes in clinical isolates resistant Escherichia coli to antibiotics from Tehran hospital. Iran J Med Microbiol. 2007;1(3):1-8.
54. 54. Dangre-Mudey G, Tankhiwale NS, Fule R. Multidrug Resistance and Extended Spectrum Beta Lactamase Production in Klebsiella Species Isolated From Cases of Neonatal Septicaemia. Journal of Life Sciences. 2012;4(1):59-62.
55. 55. Moradi M, Norouzi A. Prevalence of bla-CTX-M, bla-SHV, and bla-TEM Genes and Comparison of Antibiotic Resistance Pattern in Extended-spectrum β-lactamase producing and non-producing groups of Klebsiella pneumoniae Isolated from Clinical Samples in Kerman Hospitals. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2016;6(1):120-8.
56. 56. Peymani A M-RM, Sanikhani, Pahlevan AA. Extended Spectrum β-lactamases and TEM and SHV Genotypes in Klebsiella pneumoniae. Iranian Journal of Infectious Diseases. 2013;18(60):15-20.
57. 57. 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 Klebsiella pneumoniae at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. Microbial drug resistance. 2010;16(1):49-53.

58. 58. Bali EB, Accedil 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. African Journal of Microbiology Research. 2010;4(8):650-4.
59. 59. Lal P, Kapil A, Das BK, Sood S. Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum b-lactamases (ESBLs) producing Klebsiella sp. isolated from a tertiary care hospital. Indian Journal of Medical Research. 2007;125(2):173.
60. 60. 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. Armaghane danesh. 2014;18(10):816-25.
61. 61. Mirzaee M, Pourmand M, Chitsaz M, Mansouri S. Antibiotic resistance to third generation cephalosporins due to CTX-M-Type extended-spectrum β-lactamases in clinical isolates of Escherichia coli. Iranian Journal of Public Health. 2009:10-7.
62. 62. Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum β-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. Drugs. 2003;63(4):353-65.
63. 63. Masjedian F, Valehi F, Talebi A, Rastegar Lari A. Evaluation of wide broad spectrum antibiotic resistance of E. coliand Klebsiella pneumonia. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2007;1(2):27-34.
64. 64. Mobaiyen H NM, Amirmozafari N, Moaddab R, Monesi Sh, Safaeyan F, Anguti G, Dehgan L. CTX-M extended-spectrum b- lactamase among clinical isolates of Klebsiella pneumoniae strains isolated from intensive care units in Tabriz. Iranian Journal of Infectious Diseases And Tropical Medicine. 2007;12(38):25-.