ارزیابی ژن *bla-ctx-m-type* در سویه‌های کلبسیلاپنومونیه چند مقاومتی جدا شده از نمونه‌های کلینیکی

*دکتر قربان بهزادیان‌نژاد I
عباس عبداللهی II
دکتر شهین نجار پیرایه III
هما فروهش تهرانی IV

چکیده

زمینه و هدف: کلبسیلاپنومونیه، یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌زا به‌خصوص در بیماران بستری در بیمارستان به شمار می‌رود. اخیراً مقاومت دارویی آن، به‌ویژه به چندین آنتی‌بیوتیک از دسته‌های دارویی مختلف مورد توجه قرار گرفته است که این مقاومت به گونه‌ای است که از عوامل ویرولانس باکتری به حساب می‌آید. هدف از این تحقیق، ارزیابی ژن *bla-ctx-m-type* در سویه‌های کلبسیلاپنومونیه چند مقاومتی جدا شده از نمونه‌های کلینیکی است.

روش بررسی: در این مطالعه که از انواع مطالعات مقطعی- تحلیلی می‌باشد، ۲۸۰ مورد کلبسیلاپنومونیه از بیماران جدا شد. ابتدا با روش انتشار از دیسک، حساسیت دارویی آن‌ها بررسی شد؛ سپس توسط روش E-test، Minimum Inhibitory Concentraion (MIC) موارد مقاوم تعیین گردید. با استفاده از دیسک‌های ESBL جهت بررسی آنزیم بتالاکتاماز به روش Double Disc، وجود بتالاکتاماز وسیع الطیف در انواع مقاوم تعیین شد؛ این مقاومت‌ها در نهایت با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت، اطلاعات جمع‌آوری شده توسط نرم افزار آماری SPSS کلبسیلاپنومونیه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: از ۲۸۰ مورد کلبسیلاپنومونیه، ٦۲ مورد (۲۲/۱٤٪) دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند؛ از این میان ٤۰ ایزوله تماماً به سفالوسپورین‌های مصرفی مقاوم بودند. همچنین، همگی این نمونه‌ها در بررسی با روش Double disc برای اثبات وجود ESBL مثبت بودند. این نتایج، در نهایت توسط روش PCR و تعیین توالی (Sequencing) بررسی شد.

نتیجه‌گیری: جداسازی ۲۲/۱٤٪ مقاومت در کلبسیلاپنومونیه جدا شده و اثبات وجود بتالاکتاماز وسیع الطیف در انواع مقاوم، توجه ویژه به مصرف سفالوسپورین‌های وسیع الطیف را خاطرنشان می‌سازد.

کلیدواژه‌ها: ۱ـ کلبسیلاپنومونیه ۲ـ بتالاکتامازهای وسیع الطیف ۳ـ مقاومت چند دارویی ٤ـ آنزیم CTX-M

مقدمه

مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، حتی پیش از کشف و گسترش کاربرد آن‌ها آغاز گردیده بود[۱]. اولین بتالاکتاماز موجود در باکتری‌های گرم منفی یعنی TEM-1 (ابتدای نام بیمار Temoniera)، در اوایل سال‌های ۱۹٦۰ مشخص گردید. تنها پس از گذشت چند سال از زمان مشاهده این ایزوله، وجود بتالاکتاماز TEM-1 در سرتاسر جهان گزارش گردید و امروزه آن را در بسیاری از گونه‌های خانواده انتروباکتریاسه می‌توان یافت[۲و۳]. بتالاکتاماز رایج دیگری که در کلبسیلاپنومونیه یافت می‌شود، SHV-1 (Solphydryl Variable) است؛ بتالاکتاماز SHV-1 در اکثر ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه به صورت کروموزومی کد می‌شود[٤و۵]

طی ۲۰ سال گذشته، آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام جدید بسیاری تهیه شدند که در برابر فعالیت‌های هیدرولیزی بتالاکتامازها مقاوم بودند؛ اما با به‌کارگیری هر گروه جدید جهت درمان بیماران، بتالاکتامازهای جدیدی بوجود می‌آمدند که نسبت به آن گروه جدید داروها مقاومت نشان می‌دادند. احتمالاً مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌های جدید جهت درمان بیماران و فشار انتخابی بر باکتری، بر تولید بتالاکتامازهای جدید توسط

* این مقاله خلاصه‌ای است از پایان‌نامه آقای عباس عبداللهی جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی به راهنمایی دکتر قربان بهزادیان‌نژاد و مشاوره دکتر شهین نجار پیرایه و خانم هما فروهش تهرانی.

I) استاد باکتری‌شناسی، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، پل نصر (گیشا)، تهران، ایران (مؤلف مسوول)
II) دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
III) استادیار گروه باکتری‌شناسی، دانشکده پزشکی، گروه باکتری‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
IV) مربی و کارشناس ارشد میکرب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-27]

باکتری‌ها مؤثر است. یکی از این گروه‌های جدید اکسی‌مینو- سفالوسپورین‌هایی بودند که برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی در اوایل سال‌های ۱۹۸۰ مورد استفاده قرار گرفتند[۶].

به علت افزایش طیف فعالیت این آنزیم‌ها، خصوصاً برای مقابله با اکسی مینو- سفالوسپورین‌ها، آن‌ها را بتالاکتامازهای وسیع الطیف می‌نامند (Extended Spectrum Beta Lactamase - ESBL). امروزه، میزان بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مختلف رو به فزونی است؛ به گونه‌ای که در سرتاسر جهان در بسیاری از جنس‌های مختلف باکتری‌ها (مانند خانواده انتروباکتریاسه) یافت می‌شوند[۶].

در سال‌های اخیر، خانواده جدیدی از ESBLهای پلاسمیدی تحت عنوان CTX-M شناسایی شده است[۷و۸]، که عمدتاً در خانواده انتروباکتریاسه تجلی می‌یابند. این آنزیم‌ها ارتباطی با بتالاکتامازهای TEM یا SHV ندارند و تنها حدود ۱۴٪ با این دو بتالاکتاماز همانندی دارند[۹].

از بررسی‌های سینتتیکی مشخص می‌شود که بتالاکتامازهای نوع CTX-M، سفالوتین یا سفالوریدین را بهتر از بنزیل پنی‌سیلین هیدرولیز می‌کنند و ترجیحاً سفوتاکسیم را بیشتر از سفتازیدیم هیدرولیز می‌نمایند. آنزیم‌های CTX-M به ۵ گروه اصلی تقسیم می‌شوند: گروه ۱، شامل انواع CTX-M-1,3,10,12,15,22,23,28؛ گروه ۲، شامل انواع CTX-M-2,4,5,6,7,20؛ گروه ۸، شامل CTX-M-8؛ گروه ۹، شامل انواع CTX-M-9,13,14,16,17,19,21,24,27 و گروه ۲۵، شامل CTX-M-25[۶،۱۰و۱۱].

گونه‌های واجد بتالاکتامازهای نوع CTX-M از بسیاری از بخش‌های جهان ایزوله شده‌اند، اما در اروپای شرقی، آمریکای جنوبی، ژاپن و انگلیس شیوع بیشتری دارند. گزارش‌های اندکی نیز مبنی بر وجود این آنزیم‌ها در ایزوله‌های بیماران ساکن اروپای غربی وجود دارد که عمدتاً به ایزوله‌های کسب شده از مهاجرانی مربوط می‌شوند که از مناطقی با شیوع بالا نقل مکان کرده‌اند. براساس گزارش‌های اخیر، ایزوله‌های واحد بتالاکتاماز CTX-M-9 در کشور اسپانیا، رو به فزونی است؛ علاوه بر این اخیراً ایزوله‌های تولید کننده CTX-M-3 از انتروباکتریاسه در فرانسه ایزوله شده است. بنابراین به نظر می‌رسد که این آنزیم در اروپای غربی نیز به صورت بومی وجود دارد. با توجه به گزارش‌های به دست آمده از چندین مؤسسه واقع در مناطقی که شیوع این آنزیم‌ها زیاد است، مشخص شده است که، آنزیم نوع CTX-M، یکی از رایج‌ترین ESBLهای ایزوله شده در میان نمونه‌های بالینی آزمایشگاه‌های این مناطق محسوب می‌گردد[۱۲-۱۶].

بنابر اهمیت موضوع، هدف از انجام این پژوهش ارزیابی آنزیم CTX-M در ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه، از لحاظ آنالیز فنوتیپی و ژنوتیپی است.

روش بررسی

مشخصات ایزوله‌ها و روش بررسی آن‌ها: این مطالعه که از انواع مطالعات مقطعی – تحلیلی می‌باشد، در یک مقطع زمانی از فروردین ۱۳۸۵ لغایت فروردین ۱۳۸۶ انجام پذیرفت. تعداد ۴۷۰۸ نمونه کلینیکی ارسالی به آزمایشگاه، مورد آزمایش قرار گرفت. این نمونه‌ها شامل: ادرار، خون، مدفوع، زخم، ترشحات دستگاه تنفسی و سایر ترشحات چرکی و مایعات استریل بدن بود. نمونه‌ها بر اساس مکان جداسازی بر روی محیط‌های بلاد آگار، شکلات آگار، ائوزین متیلن بلو آگار، تایو گلیکولات و مک کانکی آگار کشت داده شدند. کلنی‌های رشد یافته‌ای که خصوصیاتی مشابه کلبسیلا پنومونیه داشتند جدا گردیدند. این کلنی‌ها با انجام تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل: چگونگی تخمیر قندها در محیط TSI، دکربوکسیلاسیون اسید آمینه لایزین در محیط لایزین آیرون آگار (LIA)، تولید اندول (Indol) و عدم حرکت در محیط SIM، نحوه واکنش در محیط VP,MR، رشد در محیط سیمون سیترات و اوره آگار و در نهایت بررسی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-27]

نتـایج بـا اسـتفاده از جـداول اسـتاندارد شناسـایی گردیدند[۱۷].

تـست تعیـین حـساسیت دارویـی(آنتـی‌بیـوگرام): کلبسیلاپنومونیه به دست آمده با انجـام تـست حـساسیت دارویـی بـا روش اسـتاندارد شـده انتـشار از دیـسک (Kirby-Bauer) مورد بررسی قرار گرفتند[۱۷و۱۸].

دیـسک‌هـای مـصرفی شـامل: سـفتازیدیم ۳۰µg (میکروگـرم)، سفتریاکـسون ۳۰µg، سفوتاکـسیم ۳۰µg، سفیکـسیم ۵µg، سـفالوتین ۳۰µg، سـفتی زوکـسیم ۳۰µg، آموکسی‌سیلین ۲۰µg، آمیکاسـین ۳۰µg، تتراسـیکلین۳۰µg، جنتامیـسین ۱۰µg، کوتریموکـسازول ۲۵µg، نالیدیکـسیک اسـید ۳۰µg، ایمـی‌پـنم ۱۰µg، نیتروفورانتـوئین ۳۰۰µg، و سیپروفلوکساسین ۵µg می‌باشند (شرکت پادتن طب، ایران). با تطابق قطر هاله‌ها با جدول استاندارد و مقایسه بـا سـویه اسـتاندارد *E.coli* ATTC® 25922™، نتـایج بـه صـورت حساس و مقاوم گزارش شد.

E-test: به منظور بررسی حـداقل غلظـت مهارکننـدگی رشد (MIC)، از نوارهای آنتـی‌بیـوتیکی اسـتاندارد شـده E-test، اسـتفاده گردیـد[۱۷]. نـوار مـورد اسـتفاده حـاوی سفوتاکـسیم بـا حـداکثر مقـدار ۲۵۶µg از آنتـی‌بیوتیـک مذکور بود (AB Biodisk, Dalvägen, Sweden).

بررسی تولید بتالاکتاماز توسط دیسک: طبق دسـتورالعمل NCCLS (National Committee of Clinical and Laboratory Standard)، برای اطمینان از وجود صفت فنوتیپی تولید بتالاکتامازهـا از دیسک‌های ESBL که به همین منظور تولید مـی‌شـوند، اسـتفاده شـد (Mast Group Ltd., UK). دیـسک‌هـا حـاوی سفوتاکسیم ۳۰µg/ سفوتاکسیم ۳۰µg+ کلاولانیک اسید ۱۰µg و سفتازیدیم ۳۰µg/ سفتازیدیم ۳۰µg+ کلاولانیک اسـید ۱۰µg بودند؛ این دیسک‌ها باید به فاصله ۳ سانتی‌متر یکدیگر قـرار گیرند تا بتوان به‌راحتی نتایج حاصل (ایجاد هالـه ممانعـت از رشد) را بررسی نمود[۱۷].

بررسی مولکولی ژن *bla-ctx-m-type*: پس از تعیـین ایزوله‌هایی که از نظر فنوتیپیک مثبت بودنـد، ایزولـه‌هـا مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. برای این منظـور، در ابتدا پلاسمید را توسط کیت استخراج پلاسـمید، اسـتخراج نموده (شرکت سیناژن، ایران). واکنش زنجیره‌ای پلیمـراز (Polymerase Chain Reaction - PCR) توسط جفت پرایمر یونیورسالی که سکانسی حفاظت شده را در داخل ژن *bla-ctx-m-type* (با طول ۸۷۹-۸۷۷ جفت بـاز) تکثیـر می‌کرد، انجام گرفت. شرایط بهینـه بـرای انجـام PCR بـه این شرح می‌باشد:

CTX-M-U1;5'ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC (Y=C/T,R=A/G,K=G/T)

CTX-M-U2;5'TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGC GG(R=A/G,S=G/C,Y=C/T)

4.5min at 94°C; 30 cycles of: 50s at 94°C, 50s at 57°C, and 55s at 72°C; and finally, 10min at 72°C.

در نهایت به منظـور تأییـد و اطمینـان از نتـایج PCR، محـصولات PCR بـرای تعیـین تـوالی (Sequencing) بـه شرکت فزاپژوه ارسال شـد. قابـل ذکـر اسـت کـه تمـامی اطلاعات، توسط نرم‌افزارهای آماری SPSS مورد تجزیـه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

در این تحقیق، از ۴۷۰۸ نمونه کلینیکی مـورد بررسـی ۲۸۰ مورد کلبسیلاپنومونیه بوده‌اند.

در رابطه با تعیین الگـوی مقاومـت آنتـی‌بیـوتیکی، نتـایج نشان داد که ۶۲ مورد (۲۲/۱٪) ایزوله‌های کلبـسیلاپنومونیه، واجد مقاومت چند دارویی بودند. از این میان، تعداد ۴۰ مورد (۱۴/۲٪) کاملاً (۱۰۰٪) به کلیه سفالوسپورین‌هـا (سـفالوتین، سفیکـسیم، سفتریاکـسون، سفوتاکـسیم، سـفتازیدیم و سفتی‌زوکسیم) مقاوم بودند (جداول شماره ۱ و ۲).

پـس از بررسـی نتـایج مقاومـت توسـط روش آنتی‌بیوگرام، میزان MIC (توسـط E-test)و تولیـد ESBL (توسط دیسک) در ۴۰ ایزوله مقاوم به سفالوسپورین‌هـا، تعیین گردید.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-27]

جدول شماره ۱- نتایج تست حساسیت دارویی (آنتی‌بیوگرام)

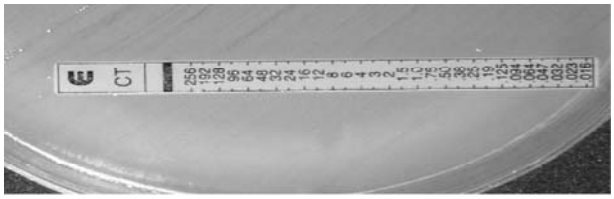
	CFM	CAZ	CRO	CTX	CF	CT	AMX	AN	TE	GM	SXT	NA	IPM	FM	CP
Res.	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪٦۰	٪٥۷/٥	٪۸۲/٥	٪٥۲/٥	٪٤۰	٪۳۰	٪۷۲/٥	٪۱۷/٥
Int.	-	-	-	-	-	-	-	٪۲۰	٪۳۰	٪٥	٪۷/٥	٪٥۷/٥	٪۱۲/٥	٪۱۷/٥	٪۳٥
Sens.	-	-	-	-	-	-	-	٪۲۰	٪۱۲/٥	٪۱۲/٥	٪٤۰	٪۲/٥	٪٥۷/٥	٪۱۰	٪٤۷/٥

CAZ:ceftazidime 30µg; CRO:ceftriaxone 30µg; CTX:cefotaxime 30µg; CFM:cefixime 5µg; CF:cephalotin 30µg; CT:ceftizoxime 30µg; AMX:amoxicillin 20µg; AN:amikacin 30µg; TE:tetracycline 30µg; GM:gentamycin 10µg; SXT:co-trimoxazole 25µg; NA:nalidixic acid 30µg; IPM:imipenem 10µg; FM:nitrofurantoin 300µg; CP:ciprofloxacin 5µg.

جدول شماره ۲- تفکیک ایزوله‌ها براساس تعداد مقاومت‌ها

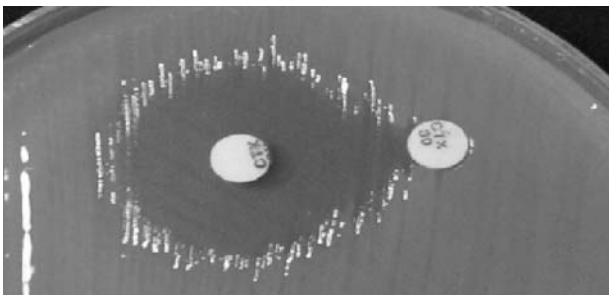
نوع مقاومت	تعداد ایزوله‌ها
۱٥ مقاومتی	۱
۱٤ مقاومتی	۱
۱۳ مقاومتی	٦
۱۲ مقاومتی	۱۱
۱۱ مقاومتی	٥
۱۰ مقاومتی	۹
۹ مقاومتی	۳
۸ مقاومتی	٤

در مورد نتایج E-test، دانستن این نکته قابل توجه بود که هیچ حساسیتی در این ٤۰ ایزوله نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم وجود نداشت (شکل شماره ۱)؛ یعنی غلظت آنتی‌بیوتیک در نوارهای E-test سفوتاکسیم که برابر با میزان ۲٥٦µg می‌باشد، هیچ اثر مهارکنندگی در رشد نداشت.



شکل شماره ۱: MIC نوار سفوتاکسیم (به مقاومت بالای ایزوله توجه کنید)

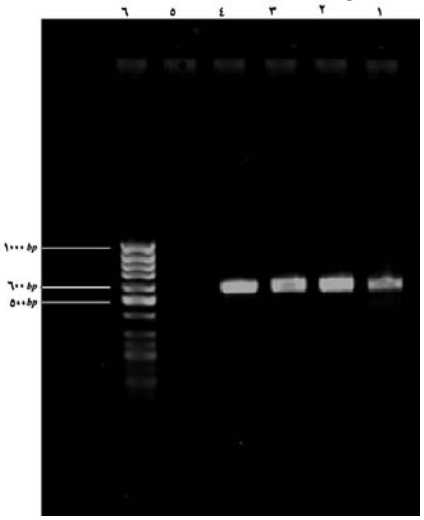
استفاده از دیسک‌های ESBL، وجود بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) را در تمامی ٤۰ مورد کلبسیلاپنومونیه با مقاومت ۱۰۰٪ به تمامی سفالوسپورین‌ها نشان داد (شکل شماره ۲). همان‌طور که در شکل ملاحظه می‌شود در اطراف دیسک سفوتاکسیم هیچ هاله ممانعت از رشدی وجود ندارد (همان طور که در نتایج E-test این مقاومت مشهود بود). در حالی که پیرامون دیسک‌های حاوی سفوتاکسیم/ سفتازیدیم + کلاولانیک اسید، هاله ممانعت از رشد (به معنای حساسیت) به وضوح دیده می‌شود(شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲: نتایج دیسک ESBL، سمت راست: سفوتاکسیم، سمت چپ: سفوتاکسیم+کلاولانیک اسید

پس از طی پروسه PCR، برای اطمینان از تولید محصول و همچنین برای تأیید صحت و سقم قطعه تکثیر یافته، محصول بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ تا ۱٪ الکتروفورز شد. برای تعیین وزن مولکولی محصول، از مارکر وزن ملکولی با قطعات ۱۰۰bp استفاده شد (Fermentas,USA). از میان ٤۰ سویه مورد آزمایش، ۳٥ مورد از حیث وجود قطعه ژنی ***bla-ctx-m-type*** مثبت بودند.

طول قطعه محصول به دلیل تفاوت‌های جزیی در بازهای ژن ***bla-ctx-m-type*** (http://www.lahey.org/Studies/) در حدود ٥۷۰-٥٦۰ bp می‌باشد (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳: نتایج؛ ۱- کنترل مثبت، ۲و۳و٤- نمونه‌های بالینی، ٥- کنترل منفی، ٦- مارکر وزن مولکولی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-27]

```
>   gb|AF305837.1|AF305837  Klebsiella pneumoniae plasmid cefotaxime-hydrolyzing beta-
lactamase gene, complete cds, Length=879, Score =  965 bits (522),  Expect =  0.0,
Identities = 539/547 (98%), Gaps = 2/547 (0%), Strand=Plus/Plus

Query  14   AAGTG-AAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGT  72
|||||  |||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||
Sbjct  258  AAGTGAAAGCGAACCGAGTCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTGGT  317

Query  73   TAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAG  132
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  318  TAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAG  377

.....
.....

Query  493  CAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGATTCTGGTCACCTACTT  552
||||||||||||||||||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||
Sbjct  738  CAACGATATCGCGGTGATTTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGATTCTGGTCACTTACTT  797

Query  553  TCACCCA  559

Sbjct  798  -CACCCA  803
```

برای تأیید و اطمینان از صحت انجام آزمایش، محصولات PCR تعیین توالی (سکانس) شد. پس از دریافت جواب، آن را از طریق برنامه BLAST موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI مورد تجزیه و تحلیل قرار داده که نتیجه آن مشابهت ۹۸٪ نمونه مطالعه حاضر با سکانس ژنی ژن ***bla-ctx-m-type*** بود. خلاصه این نتایج به این شرح می‌باشد:

اندازه قطعه سنتز شده در حدود ۵۶۰ bp بود، که به دلیل داخل ژنی بودن پرایمر استفاده شده در اینجا می‌باشد. قابل ذکر است که اندازه ژن در حدود ۸۷۷bp تا ۸۷۹ می‌باشد.

بحث

با توجه به میزان بالای مقاومت چند دارویی، باید به این نکته اشاره نمود که بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف اغلب پلاسمیدی‌اند و از آنجایی که این پلاسمیدها، به‌راحتی در میان انواع مختلف از باکتری های خانواده انتروباکتریاسه انتقال می‌یابند، تجمع ژن‌های مقاوم منجر به ایجاد سویه‌هایی با مقاومت چند دارویی می‌گردد[۳ و ۶]. پس بی‌دلیل نیست که امروزه ظهور ESBL در سرتاسر جهان یک مسأله حائز اهمیت محسوب می‌شود. پدیده ESBL از اروپای شرقی آغاز گردید، زیرا به احتمال زیاد در این مکان از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در بالین به مقادیر زیاد استفاده می‌شود. اما طولی نکشید که ESBLها در ایالت متحده آمریکا و سایر نقاط جهان نیز شناسایی گردیدند. میزان شیوع ESBLها در میان ایزوله‌های بالینی از کشوری به کشور دیگر متفاوت است[۱۶-۱۲ و ۲۶-۱۸].

در بررسی حاضر مشاهده گردید که ۶۲ مورد (۲۲/۱٪) از ۲۸۰ نمونه کلبسیلاپنومونیه، واجد مقاومت چند دارویی می‌باشند. از این میان سویه‌هایی وجود داشتند که تماماً به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سفالوتین، سفکسیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، و سفتی‌زوکسیم مقاوم بودند.

در مطالعات گسترده انجام گرفته مشخص گردید که از اکثر سویه‌های جدا شده از انسان و حیوانات، تقریباً نیمی از آن‌ها به یک یا بیش از یک آنتی‌بیوتیک شامل پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، سولفونامیدها، تتراسیکلین‌ها و آمینوگلیکوزیدها مقاوم بوده‌اند. این اطلاعات با مطالعات قبلی در زمینه مصرف این داروها به عنوان یک فاکتور کلیدی در ظهور مقاومت، مطابقت دارد (همان گونه که در این تحقیق نیز نتایج به وضوح بیانگر همین موضوع بود). در بررسی‌های فوق دیده شد که تقریباً ۴۰٪ سویه‌های مورد مطالعه انسانی به تری‌متوپریم- سولفامتوکسازول (کوتریموکسازول) مقاوم بودند. این بدان علت است که این داروی ترکیبی برای درمان تعداد زیادی از عفونت‌های انسانی توصیه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-27]

می‌شود. البته اکثر نمونه‌های مقاوم به تری‌متوپریم- سولفامتوکسازول در بررسی فوق به سیپروفلوکسابسین حساس بودند (در تحقیق حاضر نیز تقریباً در ۱۵ مورد از ۲۱ مورد نتایج مشابهی وجود داشت)[۲۷و۲۸].

در این ایزوله‌های مقاوم، کمترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین (۱۷/۵٪) و ایمی‌پنم (۳۰٪) مشاهده شد(مشابه با سایر مطالعات بین المللی انجام شده)؛ این به عنوان زنگ خطری برای رژیم دارویی- درمانی بیمارستان‌های ما به شمار می‌آید[۲۴، ۲۵، ۲۹ و ۳۰].

نکته حایز اهمیت در مورد این تحقق، میزان MIC در ایزوله‌ها می‌باشد. همان طور که در بخش نتایج نیز اشاره گردید، میزان MIC به دست آمده از نتایج نوارهای E-test به میزان 256µg می‌باشد، که این میزان مشابه با معیار NCCLS و سایر تحقیقات انجام شده می‌باشد[۱۷و۳۰و۳۱].

قابل ذکر است که در تحقیق حاضر یک مورد از نمونه‌های کلبسیلاپنومونیه مورد بررسی واجد مقاومت منحصر به فردی بود. این ایزوله ۱۰۰٪ به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در تست آنتی‌بیوگرام مقاوم بود. پس از استفاده از دیسک‌های ESBL و انجام E-test، وجود فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع الطیف در این ایزوله محرز گردید؛ که در نهایت پس از انجام PCR وجود ژن *bla-ctx-m-type* اثبات گردید. این نمونه از ادرار نوزادی ۵ روزه به دست آمده بود. مشابه چنین ایزوله‌ای از بیماری در برزیل نیز گزارش شده است[۳۲].

همان‌طور که اشاره گردید در میان ایزوله‌های واجد فنوتیپ مقاوم به سفوتاکسیم در بررسی توسط PCR نشان داده شد که همگی واجد CTX-M نبوده‌اند. دلیل این امر گستردگی طیف عمل ESBLها می‌باشد؛ بدین معنی که یک باکتری می‌تواند از طریق تولید ESBLهایی به جزء آنزیم CTX-M، سفوتاکسیم را هیدرولیز نماید. همچنین هر چند که تأثیر CTX-M تا حدودی اختصاصی برای سفوتاکسیم می‌باشد، ولی توانایی هیدرولیز سایر آنتی‌بیوتیک‌های خانواده سفالوسپورین‌ها را نیز دارد.

با توجه به مطالب مذکور، توصیه می‌گردد که با نظارت بر مصرف مواد ضدمیکروبی در درمان عفونت‌هایی که واجد مقاومت‌های دارویی چند گانه می‌باشند، از توسعه مقاومت در باکتری‌ها جلوگیری به عمل آورد. هر چند هزینه تحقیق و بررسی دقیق فنوتیپی و ژنوتیپی بالاست و این خود محدودیتی در عمل ایجاد می‌کند، اما در مراکز درمانی و بیمارستان‌هایی که میزان شیوع مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بالاست، به منظور جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم، تعیین دقیق الگوی مقاومتی باکتری‌ها، لازم به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

جداسازی ۲۲/۱۴٪ مقاومت در کلبسیلاپنومونیه جدا شده و اثبات وجود بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در انواع مقاوم، توجه ویژه به مصرف سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف را خاطرنشان می‌سازد. به طور قطع، مصرف بی‌تدبیرانه آنتی‌بیوتیک‌ها در نقاط مختلف جهان، نقش بسیار مهمی در ایجاد مقاومت‌های دارویی داشته است. پس بنابراین با نظارت بر مصرف مواد ضدمیکروبی در درمان عفونت‌هایی که واجد مقاومت‌های چند دارویی می‌باشند (و در صورت امکان تعیین فنوتیپ و ژنوتیپ سویه‌های مقاوم)، می‌توان تا حدودی از توسعه مقاومت در باکتری‌ها جلوگیری به عمل آورد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از همکاران و کارکنان محترم مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ایران، به علت کمک در جمع‌آوری ایزوله‌ها ابراز می‌دارند.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-27]

فهرست منابع

1-Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature 1940; 146: 837.

2- Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R Factors in Enterobacteriaceae. Nature 1965; 208: 239-244.

3- Medeiros AA. Beta lactamases. Br Med Bull 1984; 40: 18-27.

4- Chanawong A, Zali FHM, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). FEMS Microbiol Lett 2000; 184: 85-89.

5-Shaokat S, Ouellette M, Sirot D, Joly B, Cluzel R. Spread of SHV- I beta-Lactamase in Escherichia coli Isolated from fecal samples in Africa. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 943-945.

6- Bradford PA. Extended-Spectrum beta-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of this important resistance threat. Clin Microb Rev 2001 Oct; 14 (4): 933-951.

7- Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2269-2275.

8- Ma L, Ishii Y, Ishiguro M, Matsuzawa H, Yamaguchi K. Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A beta-lactamase preferentially inhibited by tazobactam. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1181-1186.

9- Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type betalactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. Int J Antimicrob Agents 2000;.14: 137-143.

10- Bradford PA, Yang Y, Sahm D, Grope I, Gardovska D, Storch G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an outbreak of Salmonella typhimurium in Latvia. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1980-1894.

11- Bonnet R, Sampaio ILM, Labia R, Champs CD, Sirot D, Chanel C, et al. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1936-1942.

12- Gazouli M, Sidorenko SV, Tzelepi E, Kozlova NS, Gladin DP, Tzouvelekis LS. A plasmid-mediated beta-lactamase conferring resistance to cefotaxime in a Salmonella typhimurium clone found in St. Petersburg, Russia. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 119-121.

13- Mikiewicz B. Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Poland. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 827-832.

14- Tzouvelekis LS, Gazouli M, Markogiannakis A, Paraskaki E, Legakis NJ, Tzelepi E. Emergence of resistance to third-generation cephalosporins amongst Salmonella typhimurium isolates in Greece: report of the first three cases. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 273-275.

15- Doucet Populaire F, Ghnassia JC, Bonnet R, Sirot J. First isolation of a CTX-M-3 producing Enterobacter cloacae in France. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 3239-3240.

16- Sabate M, Tarraga R, Navarro F, Mira E, Verges C, Barbe J, et al. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase(CTXM-9) from Escherichia coli in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1970-1973.

17- Koneman Elmer W, Allen Stephen D, Janda William M. Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia New-York: Lippincott; 1997. P. 171-241.

18- David LP, Kristine MH, Andrea MH, Bethany Y, Michael DB, Louis B, et al, Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Klebsiella pneumoniae bloodstream isolates from seven countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type Beta-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2003 Nov; 47(11): 3554–3560.

19- Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28: 302-307.

20- Govinden U, Mocktar C, Moodley P, Sturm AW, Essack SY. Geographical evolution of the CTX- M β-lactamase – an update. Afr J Biotechnol 2007 April; 6(7): 831-839.

21- Markovskai R, Schneider I, Keuleyan E,

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-27]

Bauernfeind A. Extended-spectrum Beta-lactamase (ESBL) CTX-M-15-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Sofia, Bulgaria. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 752–755.

22- Zeba B, Simpore J, Nacoulma OG, Frere JM. Prevalence of blaSHV genes in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae at Saint Camille Hospital Center in Ouagadougou; Isolation of blaSHV-I like gene. African J Biotechnol 2004; 3(9): 477-480.

23- Ellen SM, Jennifer AB, Jason O, Mark DR, Nancy DH, Kenneth ST. Occurrence of newer Beta-Lactamases in Klebsiella pneumoniae Isolates from 24 US. Hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2002 Dec; 46(12): 3837–3842.

24- Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Perilli M, Amicosante G, et al, CTX-M-type extended-spectrum ß-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. Antimicrob Agents Chemother 2006 Aug; 50(8): 2700-6.

25- Jungmin K, Yu ML, Insoo R, Yeonhee L, Je CL, Sung-Yong S, et al, CTX-M and SHV-12 Beta-lactamases are the most common extended-spectrum enzymes in clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae collected from 3 university hospitals within Korea. FEMS Microbiol Lett 2005; 245: 93–98.

26- Yagi T, Kruokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. A preliminary survey of extended-spectrum beta-Iactamases(ESBLs) in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in Japan. FEMS Microbiol Lett 2000; 184: 53-56.

27- Shroeder CM, Mcdermmott PF, Meng J, Zheo S, Debroy C. Antimicrobial resistance of Escherichia coli O26,O103,O111,O128,and O145 from animals and humans. Emerg Infect Dis 2002 Dec; 9(1): 1-12.

28- Margreet P, Filius G, Kershof IM. Clonization and resistance dynamics of gram negative bacteria in patients during and after hospitalization. J Antimicrob Chemother 2005 July; 49(7): 2879-2886.

29- David LP, Kristine MH, Andrea MH, Bethany Y, Michael DB, Louis B, et al. Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Klebsiella pneumoniae Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type Beta-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2003 Nov; 47(11): 3554–3560.

30- Hyunjoo P, Eun HC. Identification of CTX-M-14 ESBL in Clinical Isolates of Klebsiella pneumoniae and E.coli in Korea. J Clin Microb 2001 Oct; 39(10): 3747-3749.

31- Jungmin K, Yu ML. Occurrence of CTX-M 3,15,14,9 ESBL in Enterobacteriaceae Clinical Isolates in Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005 Apr; 149(4): 1572-1575.

32- Caio M, Carlos K. Klebsiella pneumoniae with Multiple Antimicrobial Resistance. Brazil J Infect Dis 2004; 8(1): 109-111.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-27]

Evaluation of bla-ctx-m-type Gene in Multi Drug Resistance Klebsiella pneumonia Species Isolated from Clinical Samples

***Q. Behzadian Nejad, PhD**[I] **A. Abdollahi, MSc**[II]

SH. Najar Peerayeh, PhD[III] **H. Forouhesh Tehrani, MSc**[IV]

Abstract

Background and Aim: *Klebsiella pneumoniae* (K. Pneumoniae) is one of the prevalent infectious bacteria, especially in hospitalized patients. Recently, its' multi drug resistance (MDR) trait has become more important and regarded as a virulant factor. In this study, we evaluated *bla-ctx-m-type* gene in clinical isolates of *K.pneumoniae* with multi drug resistance.

Materials and Methods: In this descriptive cross-sectional study, a total of 280 *K.pneumoniae* strains were isolated from patients. Initially, we evaluated drug sensitivity with disk diffusion method. Then the minimum inhibitory concentration (MIC) of resistant isolates was determined with E-test stripes. The existence of ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) enzymes was identified by ESBL disks in Double Disk method. These resistances were evaluated with PCR. Finally, results were analyzed by SPSS software.

Results: From total 280 *K.pneumoniae*, 62 samples (22.14%) showed multi drug resistance trait. 40 strains of these MDR isolates were completely resistant to the experimental cephalosporins, and positive in ESBL production by Double Disk methodology. These results were proved and evaluated with PCR and Sequencing.

Conclusion: Detection of 22.14% MDR trait, especially extended spectrum beta-lactamases in resistant clinical *K.pneumoniae* isolates, points to the in usage of extended spectrum cephalosporins.

Key words: 1) *Klebsiella pneumoniae* 2)Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) 3) Multi Drug Resistance (MDR) 4) CTX-M enzyme

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-27]

This article is a summary of thesis by A. Abdollahi for MSc degree in Bacteriology under supervision of Q. Behzadian Nejad, Ph.D. and consultation with SH. Najar Peerayeh, Ph.D. and H. Forouhesh Tehrani MSc (2007).

I) *Professor of Bacteriology, Department of Bacteriology, School of Medicine, Gisha Ave., University of Tarbiat Modarres, Tehran, Iran (*Corresponding Author)*

II) *MSc in Bacteriology, Department of Bacteriology, School of Medicine, University of Tarbiat Modarres, Tehran, Iran*

III) *Assistant Professor of Bacteriology, Department of Bacteriology, School of Medicine, University of Tarbiat Modarres, Tehran, Iran*

IV) *MSc in Microbiology, Instructor, Iran University of Medical Sciences and Health services, Tehran, Iran*