مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره سی ام - بهار۱۳۹۷

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی شیوع و فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی SHV / CTX-M / TEM در کلبسیلا و اشریشیاکلی‌های جدا شده از نمونه‌های کلینیکی در آزمایشگاه کهورستان بندرعباس

سمیه شبان پیشه، عباسعلی رضائیان*

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: امروزه وجود بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در باکتری‌های جدا شده از بیماران بستری که مقاومت چندگانه دارویی را بیان می‌کنند، یک واقعیت و معضل مهم بهداشتی در اکثر کشورها محسوب می‌گردد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۳۴۶ سویه انترو باکتریاسه از نمونه‌های مختلف درکهورستان جداسازی شد. برای تعیین مقاومت نمونه‌ها، تست آنتی‌بیوگرام انجام شد. در نهایت ایزوله‌های ESBL مثبت، توسط روش PCR از نظر ژن‌های TEM، CTX-M، SHV مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از ۳۴۶ ایزوله مورد بررسی، ۱۶۲ ایزوله کلبسیلا و۱۳۲ ایزوله اشریشیاکلی به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم یا سفوتاکسیم و یا هر دو آن‌ها مقاوم بودند. هم‌چنین ۸۲ (۴۲/۲۶٪) ایزوله مولد ESBL بودند.

بحث: با توجه به درصد بالای مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم انجام دقیق آزمایش‌های آنتی‌بیوگرام قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک در عفونت‌های ناشی از ارگانیسم‌های تولید کننده ESBL ضرورت دارد.

واژه‌های کلیدی: بتالاکتامازهای وسیع الطیف، اشریشیاکلی، عفونت ادراری، TEM ، CTX-M، SHV.

مقدمه

روش‌های مختلفی توسط باکتری‌ها به‌کار گرفته می‌شود تا از اثرهای مضر آنتی‌بیوتیک‌ها مصون بمانند یکی از مهم‌ترین این روش‌ها، که در باکتری‌های گرم منفی علیه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به‌کار می‌رود تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی می‌باشد (۹). بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs:Extended Spetrum Beta Lactamases)گروه بزرگ و در حال رشدی از آنزیم‌های بتالاکتاماز هستند که به‌وسیله باکتری‌های گرم منفی تولید می‌شوند. این آنزیم‌ها توانایی هیدرولیز تمامی سفالوسپورین‌ها و آزترونام‌ها را داشته و توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازها مانند اسید کلاوولانیک مهار می‌شوند (۱۰). اولین ارگانیسم تولید کننده ESBls از اعضای خانواده انتروباکتریاسه در سال ۱۹۸۳ در آلمان شناسایی شد از آن زمان به بعد افزایش چشم‌گیر این سویه‌ها در سراسر جهان گزارش گردیده است (۴).

اگرچه بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به‌صورت غالب در گونه‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه مشاهده می‌شوند اما این آنزیم‌ها در جنس‌های دیگر انتروباکتریاسه مانند سراشیا، سیتروباکتر، سالمونلا، پروتئوس و انتروباکتر هم دیده شده‌اند (۱).

آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری‌ها متنوع هستند و در پاسخ به فشار انتخابی آنتی‌بیوتیک‌ها، مرتب در حال موتاسیون و جایگزین کردن اسیدهای آمینه به‌ویژه در جایگاه فعال آنزیم هستند به‌طوری‌که باعث ایجاد انواع جدیدی از بتالاکتامازهای با طیف وسیع شده‌اند (۲۰).

الگوهای مختلفی برای طبقه‌بندی بتالاکتامازها وجود دارد یکی از این روش‌ها که بیش‌تر از آن استفاده می‌شود به‌وسیله مدیروس و جکوبی ابداع شده است که بر این اساس بتالاکتامازها به چهار گروه اصلی A تا D طبقه‌بندی می‌شوند. آنزیم‌های وسیع‌الطیف در گروه A قرار گرفته‌اند و شامل مشتقات آنزیم‌های موتاسیون یافته SHV و TEM می‌باشند (۲۵،۶). بتالاکتامازها از لحاظ عملکردی به چهار گروه طبقه‌بندی می‌شوند گروه اول: سفالوسپورینازهایی

نویسنده مسئول :
گروه میکروبیولوژی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم،ایران.
پست الکترونیکی: rezaeianfon45@gmail.com
تاریخ دریافت:۱۳۹۴/۹/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۱

که توسط کلاوولانیک اسید به خوبی مهار نمی‌شوند و به کلاس C مولکولار تعلق دارند. گروه دوم: شامل پنی‌سیلیناز و سفالوسپورینیاز یا هر دو که به‌طور کلی توسط مهار کننده‌های بتالاکتاماز مهار شده و به کلاس مولکولار A یا D متعلق هستند. گروه سوم: از یون‌های روی برای تخریب حلقه بتالاکتام استفاده می‌کنند و متالوبتالاکتاماز هستند. گروه چهارم: شامل پنی سیلیناز بوده و توسط کلاوولانیک اسید مهار نمی‌شود (۲۳).

ژن تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف کمابیش بر روی پلاسمیدها واقع شده‌اند که مقاومت متقاطع نسبت به کلاس‌های دیگر آنتی‌بیوتیک را هم ممکن می‌سازند، که این امر موجب محدودیت در انتخاب درمان آنتی‌بیوتیک صحیح می‌شود (۲۲ ، ۷).

این پلاسمیدها به آسانی در میان گونه‌های باکتریایی قابل انتقال هستند. اغلب بتالاکتامازهای وسیع الطیف به‌دلیل ایجاد جهش در ژن‌های SHV و TEM به‌وجود آمده‌اند (۱۸). بخشی از سویه‌های تولید کننده TEM و SHV هم‌زمان آنزیم‌های CTX-M را نیز تولید می‌کنند (۲). شناسایی ژن‌های شایع مولد ESBLs از قبیل TEM,SHV و CTX-M با استفاده از روش‌های مولکولی در باکتری‌های تولید کننده ESBLs و بررسی الگوی مقاومت دارویی آن‌ها می‌تواند اطلاعات مفیدی در رابطه با اپیدمیولوژی و درمان ضد میکروبی منطقی در مقابل ارگانیسم‌های تولید کننده ESBLs فراهم نماید (۱۲). امروزه تعداد ارگانیسم‌هایی که توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف را دارند در حال افزایش است و این مسئله به‌عنوان یکی از بحران‌های موجود در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها مطرح می‌باشد. انتقال و انتشار سریع ارگانیسم‌هایی که آنزیم‌های مذکور را تولید می‌کنند باعث بالا رفتن میزان عفونت‌های بیمارستانی مربوطه در سراسر دنیا شده است (۱۷). بنابراین لازم است که شیوع باکتری‌های تولید کننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف در هر منطقه ای مشخص شود تا تدابیر درستی برای درمان عفونت‌های ایجاد شده به‌وسیله این ارگانیسم‌های مقاوم به‌کار رود. هدف این مطالعه بررسی شیوع و فراوانی ژن‌های مقاومت بتالاکتامازی TEM، SHV و CTX-M در بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه کهورستان بندر خمیر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی- توصیفی در طول مدت ۶ ماه تعداد ۵۰۰ نمونه بالینی از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه کهورستان جمع آوری شد. نمونه‌ها شامل ادرار، خون، مدفوع، ترشحات و خلط بودند که در آزمایشگاه کلیه سوش‌ها بعد از شناسایی دقیق و انجام تست‌های بیوشیمیایی استاندارد در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تعیین حساسیت و مقاومت آنتی-بیوتیکی به روش انتشار دیسک انجام گرفت (۱۶). دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده از شرکت پادتن طب و شامل سفتازیدیم ۳۰ میکروگرم، سفوتاکسیم ۳۰ میکروگرم، سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم، ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم، نالیدیکسیک اسید ۳۰ میکروگرم، جنتامایسین ۱۰ میکروگرم و کوتریموکسازول ۲۵ میکروگرم بودند.

بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نتایج آنتی‌بیوگرام طبق دستور العمل CLSI ثبت شدند. سپس سویه-های کلبسیلا و اشریشیاکلی مقاوم به سفوتاکسیم و سفتازیدیم به روش CDT (دیسک ترکیبی) با قرار دادن دیسک‌های سفوتاکسیم و سفوتاکسیم + کلاولانیک اسید، سفتازیدیم و سفتازیدیم + کلاولانیک اسید جهت تأیید تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف غربال‌گری شدند و سویه‌هایی که قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های حاوی کلاولانیک اسید آن‌ها ۵ یا بیش‌تر از ۵ میلی‌متر از دیسک‌های بدون مهار کننده آن‌ها بود با در نظر گرفتن ضوابط CLSI، به‌عنوان بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در نظر گرفته شدند.

پس از آن به‌منظور تعیین حداقل غلظت آنتی‌بیوتیکی که مانع رشد باکتری‌ها می‌شود، تست MIC به‌روش رقیق‌سازی مایع بر روی سوش‌های مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف صورت گرفت. برای استخراج DNA و انجام PCR ابتدا از نمونه‌ها کشت شبانه تهیه شد سپس چندین کلونی از هر کشت شبانه باکتری‌ها به اپندورف‌های استریل که حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر آب مقطر بودند منتقل و DNA هر یک به-روش جوشاندن استخراج گردید. تست PCR برای شناسایی ژن-های بتالاکتامازی SHV (۹۷۳ bp)، TEM (۴۴۵ bp)و CTX-M (۵۹۳bp) با استفاده از پرایمرهای یونیورسال انجام شد.

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد یک سیکل ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (دناتوراسیون اولیه) سپس ۳۰ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و مرحله طویل شدن ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

از کلبسیلاپنومونیه ATCC700603 و اشریشیاکلی ATCC35218 به‌ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده

گردید (۳). سپس از ژل آگارز ۱ درصد برای الکتروفورز محصول-های PCR و از سایز مارکر 100bpLadder استفاده شد.

داده‌های جمع آوری شده با استفاده از آزمون فیشر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها

از ۳۴۶ انتروباکتریاسه جمع آوری و تأیید شده به‌وسیله تست‌های بیوشیمیایی افتراقی ۱۰ (۲/۸۹ درصد) ایزوله مربوط به نمونه‌های مدفوع، ۴ (۱/۱۵۶ درصد) ایزوله مربوط به ترشحات و خلط، ۲ (۰/۵۷۸ درصد) ایزوله مربوط به خون و ۳۳۰ (۹۵/۳۷ درصد) ایزوله مربوط به ادرار بود. بررسی میزان مقاومت ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه با استفاده از روش انتشار دیسک نشان داد که بیش‌ترین میزان مقاومت مربوط به نالیدیکسیک اسید (۵۰ درصد) و کم‌ترین میزان مقاومت مربوط به سفتازیدیم (۱۹/۹۴ درصد) بوده است. میزان مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز به شرح زیر مشاهده شد. کوتریموکسازول ۱۵۱ (۴۳/۶۴ درصد)، ایمی‌پنم ۱۰۸ (۳۱/۲۱ درصد)، سفوتاکسیم ۱۴۷ (۴۲/۴۸ درصد)، جنتامایسین ۹۰ (۲۶/۰۱)، سفکسیم ۱۶۷ (۴۸/۵۵ درصد) و سیپروفلوکساسین ۱۲۲ (۳۵/۲۶ درصد) (جدول ۱). همان‌طورکه در جداول ۲ و ۳ مشاهده می‌شود مقاومت کلبسیلا و اشریشیاکلی های جدا شده به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی بررسی شده است. بر اساس نتایج حاصل از آزمون تأییدی فنوتیپی CDT، ۴۲/۲۶ درصد از سوش‌های باکتریایی کلبسیلا و اشریشیاکلی تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بودند که از این تعداد ۲۶/۸۲ درصد مربوط به کلبسیلا و ۷۳/۱۷ درصد مربوط به اشریشیاکلی بود. حداقل غلظت باز دارندگی (MIC) با استفاده از روش رقیق سازی مایع در سویه‌های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بررسی شد (جداول ۵ و۴). جهت تعیین ژن‌های CTX-M، SHV و TEM از روش PCR استفاده شد. ۱۹ ایزوله (۲۳/۱۷ درصد) دارای ژن CTX-M به‌تنهایی که از این تعداد ۱۲ تا (۲۰ درصد) مربوط به اشریشیاکلی و ۷ تا (۳۱/۸۱ درصد) مربوط به کلبسیلا و ۲۵ (۳۰/۴۸ درصد) از ایزوله‌ها دارای ژن TEM به‌تنهایی که از این تعداد ۲۰ تا (۳۳/۳۳ درصد) مربوط به اشریشیاکلی و ۵ تا (۲۲/۷۲ درصد) مربوط به کلبسیلا بودند. هم-چنین ۷ ایزوله (۲/۳۵ درصد) دارای ژن‌های TEM و CTX-M بودند اما در هیچ‌کدام از ایزوله‌ها ژن SHV مشاهده نشد (تصویر ۲ و ۱).

در آخر با استفاده از نرم‌افزار SPSS رابطه معنی‌دار بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده و ژن‌های به‌دست آمده در سطح ۰/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج در جداول ۶ و ۷ قابل مشاهده است.

جدول۱: درصد نتایج آنتی‌بیوگرام ایزوله‌های انتروباکتریاسه

آنتی‌بیوتیک	مقاوم	حدواسط	حساس
کوتریموکسازول	۴۳/۶۴	۶/۳۵	۵۰
ایمی‌پنم	۳۱/۲۱	۱۰/۶۹	۵۸/۰۹
سفوتاکسیم	۴۲/۴۸	۸/۹۵	۴۸/۵۵
جنتامایسین	۲۶/۰۱	۱۶/۴۷	۵۷/۵۱
سفکسیم	۴۸/۵۵	۷/۸۰	۴۳/۶۴
نالیدیکسیک اسید	۵۰	۱۰/۱۱	۳۹/۸۸
سیپروفلوکساسین	۳۵/۲۶	۸/۰۹	۵۶/۶۴
سفتازیدیم	۱۹/۹	۷/۵۱	۴۲/۵۴

جدول۲: مقاومت چند گانه E.coli های جدا شده به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی

Cephalosporins (CAZ,CTX,CFM)		Quinolones (CP,NA)		Aminoglycosid (GM)		Carbapenem (IPM)		Sulfonamid (SXT)	
تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۸۸	۱/۴۲	۹۷	۴۱/۴۶	۲۴	۵/۱۱	۳۵	۶/۱۶	۱۰۷	۲/۵۱

جدول۳: مقاومت چند گانه Klebsiellaهای جدا شده به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی

Cephalosporins (CAZ,CTX,CFM)		Quinolones (CP,NA)		Aminoglycosid (GM)		Carbapenem (IPM)		Sulfonamid (SXT)	
تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
٦١	٦٩/٣	٦٩	٧٣/٤	٦٣	٧١/٦	٧١	٨٠/٧	٢٣	٢٦

جدول۴ : بررسی تست MIC برای سویه‌های مقاوم به سفتازیدیم

	تعداد	لوله ١	لوله ٢	لوله ٣	لوله ٤	لوله ٥	لوله ٦	لوله ٧	لوله ٨	لوله ٩
		≤100 µg/ml	≤ 50 µg/ml	≤ 25 µg/ml	≤ 12.5 µg/ml	≤ 6.25 µg/ml	≤ 3.13 µg/ml	≤ 1.6 µg/ml	≤ 0.8 µg/ml	≤ 0.4 µg/ml
E.coli	٣٢	١	٤	٥	١٢	٧	٢	١	١	
Klebsiella	٢١	٢	١	٥	٧	٤	٢			

جدول۵ : بررسی تست MIC برای سویه‌های مقاوم به سفوتاکسیم

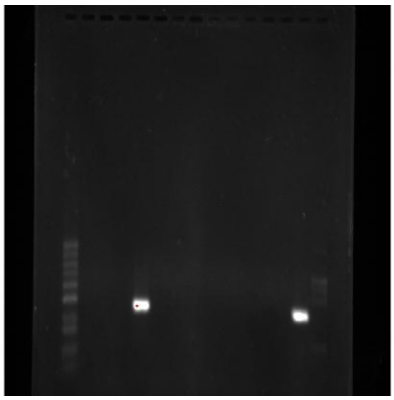
	تعداد	لوله ١	لوله ٢	لوله ٣	لوله ٤	لوله ٥	لوله ٦	لوله ٧	لوله ٨	لوله ٩
		≤100 µg/ml	≤ 50 µg/ml	≤ 25 µg/ml	≤ 12.5 µg/ml	≤ 6.25 µg/ml	≤ 3.13 µg/ml	≤ 1.6 µg/ml	≤ 0.8 µg/ml	≤ 0.4 µg/ml
E.coli	٥٣	١	٤	١٥	٢٥	٥	٢	١		
Klebsiella	١٤	٣	٢	٥	٤					

جدول ۶: پراکندگی ژن‌های مقاوم به بتالاکتام در باکتری اشریشیاکلی

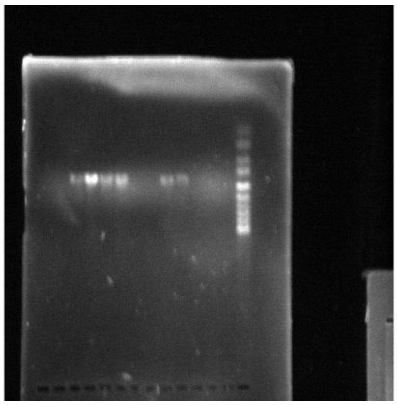
		سفتازیدیم	سفوتاکسیم	سفکسیم	سیپروفلوکساسین	نالیدیکسیک اسید	ایمی پنم	جنتامایسین	کوتریموکسازول
CTX-M ١٢	No.%	٥	١٢	١١	٩	١١	١٠	٣	١٠
	P	٠/٠٨٣	٠/٣٢۶	٠/۶٧١	٠/٠٢۶	٠/٠٨۶	٠/٠٠٩	٠/٧٢۴	٠/٧١٢
TEM ٢٠	No.%	١٣	١٧	١۶	١١	١۴	١١	١٣	١۵
	P	١/٠٠٠	٠/۶٧۶	٠/۴۶۴	٠/٢٨٨	١/٠٠٠	٠/٥٨۶	١/٠٠٠	١/٠٠٠
CTX-M/TEM ٥	No.%	٢	٥	۴	۴	۴	۴	٢	٥
	P	٠/٣٢٢	١/٠٠٠	٠/٥٧٠	٠/١۶۴	١/٠٠٠	٠/١٨٨	١/٠٠٠	٠/٣١٨

جدول۷ : پراکندگی ژن‌های مقاوم به بتالاکتام در باکتری کلبسیلا

		سفتازیدیم	سفوتاکسیم	سفکسیم	سیپروفلوکساسین	نالیدیکسیک اسید	ایمی پنم	جنتامایسین	کوتریموکسازول
CTX-M ۷	No.%	۷	۵	۴	۰	۴	۱	۳	۴
	p	۱/۰۰۰	۰/۱۵۶۵	۰/۲۷۴	۰/۲۲۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۳۷۶	۱/۰۰۰
TEM ۵	No.%	۴	۲	۲	۲	۲	۱	۴	۳
	p	۰/۴۱۱	۰/۰۲۴	۰/۰۵۵	۱/۰۰۰	۰/۶۲۴	۱/۰۰۰	۰/۳۶۰	۱/۰۰۰
CTX-M/TEM ۲	No.%	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱
	p	۱/۰۰۰	۰/۳۳۸	۰/۰۴۳	۰/۵۱۵	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۴۹۴	۱/۰۰۰



تصویر۱: محصول PCR ژن TEM (445 bp)، نمونه ۱سایز مارکر ژنیbp ۱۰۰ و نمونه‌های ۲،۳دارای ژن TEM



تصویر۲ : محصول PCR ژن CTX-M(۵۹۳bp) ، نمونه ۱سایز مارکر ژنی bp ۱۰۰ و نمونه های۲،۳،۴،۵،۷ دارای ژن CTX-M

بحث

در دهه اخیر باکتری‌های مولد آنزیم‌های بتا لاکتاماز وسیع‌الطیف به‌خصوص گونه‌های مختلف انتروباکتریاسه حاوی این آنزیم‌ها رو به افزایش است که این مسئله مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را افزایش داده است. این امر باعث به‌وجود آمدن مشکلاتی در درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری‌ها شده است (۱۹). مطالعه‌ها و گزارش‌های متعددی در رابطه با افزایش و شیوع رو به رشد ارگانیسم‌های مولد ESBLs از مناطق مختلف در کشور وجود دارد (۳،۲۱،۲۷) به‌طوری‌که افزایش شیوع این ارگانیسم‌ها باعث ایجاد نگرانی شده است. باکتری‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف کمابیش به چندین گروه آنتی‌بیوتیک مقاوم بوده و در نتیجه منجر به شکست درمانی و مشکلات جدی می‌شوند. این باکتری‌ها یک تهدید کلینیکی به‌حساب می‌آیند و موجب نگرانی پزشکان در درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری‌ها شده اند (۴).

هدف از این مطالعه تعیین شیوع و فراوانی انتروباکتریاسه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و تشخیص مولکولی ژن-های بتا لاکتاماز SHV,TEM,CTX-M آن‌ها است. تست

حساسیت ضد میکروبی در سویه‌های مورد مطالعه نشان داده است که بیش‌ترین میزان مقاومت آن‌ها نسبت به نالیدیکسیک اسید (۵۰درصد) و کم‌ترین میزان مقاومت نسبت به سفتازیدیم (۱۹/۹۴) درصد بوده است. از مقایسه مطالعه مهاجری و همکاران در کرمانشاه (۱۴) با این مطالعه مشاهده شد که درصد مقاومت نمونه‌ها به سفتازیدیم از درصد مقاومت این مطالعه بیش‌تر و درصد مقاومت سیپروفلوکساسین، کوتریموکسازول، جنتامایسین و سفوتاکسیم از این بررسی کم‌تر است. با انجام آزمون تأییدی بر روی ارگانیسم‌های غربالی تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به‌روش CDT، ۴۲/۲۶ درصد از نمونه‌های کلبسیلا و اشریشیاکلی تولید کننده نهایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بودند. این در حالی‌است‌که در مطالعه میر صالحیان و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی ایزوله‌های انتروباکتریاسه در تهران از ۱۵۰ ایزوله ۸۹ (۵۹/۳ درصد) به‌عنوان تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف گزارش شدند که از این مطالعه بیش‌تر است. در مطالعه تاسلی و همکاران در ترکیه تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در سویه‌های اشریشیاکلی معادل ۱۷ درصد (۲۴) و در مطالعه ویلگاس در کلمبیا ۴/۷ -۳/۳ درصد (۲۶) گزارش شده است که نسبت به این مطالعه کم‌تر است. نتایج منتشر شده در تحقیقات علمی مختلف مربوط به ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف نشان می‌دهند که بالاترین درصد سویه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در کلبسیلا در کشورهای آمریکای لاتین ۵۴/۴ درصد، اروپا ۲۲/۶ درصد و حوزه غربی اقیانوس آرام ۲۶/۶ درصد می باشد (۵). مقایسه این نتایج و مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میزان بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سوش های جدا شده از کشورهای مختلف و هم‌چنین در یک کشور از یک بیمارستان با بیمارستان دیگر متفاوت است که این مسئله بستگی به سیستم کنترل عفونت و چگونگی درمان بیماران دارد. فاکتورهای مختلفی در افزایش میزان باکتری‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع-الطیف دخیل‌اند که مصرف بیش از حد و خودسرانه آنتی‌بیوتیک-ها، طولانی بودن مدت زمان بستری در بیمارستان، استفاده از کاتترهای عروقی و ادراری، سابقه جراحی و... از جمله این موارد می‌باشند (۲۱).

میزان مقاومت کلی سوش‌های انتروباکتریاسه مورد بررسی بسیار بالا بود. مقاومت به نالیدیکسیک‌اسید ۵۰ درصد، سفکسیم ۴۸/۵۵ درصد، سفوتاکسیم ۴۲/۴۸ درصد، کوتریموکسازول ۴۳/۶۴ درصد مشاهده شد که این میزان بالای مقاومت دارویی اهمیت انجام یک بررسی دقیق در سطح کشور را جهت بررسی میزان شیوع مقاومت در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه گوشزد می‌کند.

بر اساس یافته‌های آزمایشگاهی حاضر ایمی‌پنم، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین به‌ترتیب از مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها علیه کلبسیلا و اشریشیاکلی تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بودند.

بررسی مولکولی سویه‌های مورد آزمایش از نظر وجود ژن‌های بتالاکتاماز SHV، CTX-M و TEM نشان داد که ژن TEM بیش‌ترین ژن در سویه‌های مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بود. در این مطالعه با روش PCR، ۲۳/۷ درصد حاوی ژن CTX-M ، ۳۰/۴۸ درصد حاوی ژن TEM بودند و هیچ‌کدام از نمونه‌ها ژن SHV را نداشتند. مطالعه‌هایی که توسط مزیانی و همکاران در سال ۱۳۸۶ در تهران صورت گرفت ۶۰ درصد ایزوله‌ها حاوی ژن TEM بودند (۸)، در مطالعه مسجدیان ۸۶/۴ درصد نمونه‌ها ژن TEM را در برداشتند (۱۱) و در تحقیق میرصالحیان ۳۹/۴ درصد ایزوله‌ها حاوی ژن TEM بودند (۱۵). مقایسه نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر با مطالعه‌های مذکور نشان دهنده شیوع بالای تیپ آنزیمی TEM درکشور ماست. بنابراین ضروری است که برای شناسایی این نوع از مقاومت از روش‌های مولکولی در کنار روش-های فنوتیپی استفاده شود و باید تحقیقات مشابهی در نقاط مختلف کشور صورت گیرد تا ژنوتیپ‌های بتا لاکتامازی وسیع-الطیف در نواحی جغرافیایی مختلف به‌دست آید.

نتیجه گیری

در نهایت این مطالعه نشان داد که سویه‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف یک معضل جدی و رو به پیشرفت است. بنابراین ضرورت دارد تا با اتخاذ راه‌کارهای علمی مناسب در مورد درمان آنتی‌بیوتیکی، تجهیز آزمایشگاه‌ها به روش‌های تشخیصی فنوتیپی و در کنار آن تکنیک‌های مولکولی میزان شیوع سویه‌های مقاوم باکتری‌ها مورد بررسی قرار گیرد و تدابیر لازم جهت درمان بیماران و کنترل مقاومت در باکتری‌ها صورت گیرد.

سپاسگزاری

نویسنده این مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به‌دلیل حمایت اجرایی اعلام می‌دارد.

منابع

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

2- Roschanski N, Fischer J, Guerra B, Roesler U. Development of a Multiplex Real- Time PCR for the Rapid Detection of the Predominant Beta-Lactamase Genes CTX-M,SHV,TEM and CIT-Type AmpCs in Entrobacteriaceae. PloS one. 2014;9(7):e100956.

3-Archin T, Ghasemi Y, Kargar M, Mohkam M.A. 2013. simple multiplex PCR For assessing prevalence of extended-spectrum β-lactamases producing klebsiella pneumonia in Intensive care units of a referral Hospital in Shiraz, Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 703-708.

4-Aubert D, Girich D, Naas T, Nagarajan S, Nordmann P. 2004. Functional and Structural Characterization of the Genetic Environment of an Extended-Spectrum β –Lactamase blaVEB Gene from a Pseudomonas aeruginosa isolate Obtained in India. Antimicrobial agents and chemotherapy. 48(9):3284-90.

5-Behroozi A, Rahbar M, Yousefi J. 2010. Frequency of extended spectrum beta lactamase (ESBLs) Producing Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae isolated from Urine in an Iranian.

tertiary care hospital. African **J**. microbiology. 4(9): 881-4. bed 1000.

6-Bush K, Jacoby G.A, Medeiros A.A. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. 39(6):1211-33.

7-Chaudhary U, Aggarwal R. 2004. Extended spectrum beta Lactamases (ESBL)- An emerging threat to Clinical therapeuties. Indian J med Microbial. 22(2): 75-80.

8-Hosseini -Mazinani S.M, Eftekhar F, Milani M, Gandili. 2007. Characterization of B-lactamase from Urinary Isolated of Escherichia coli in Tehran. Iranian Biomedica l Jurnal. 11(2):95-99.

9-Li Q , Lee J.Y, Castillo R, Hixon M.S, Pujol C, Doppalapudi V.R . 2002. A novel antibacterial agent with broad-spectrum activity and enhanced potency against beta-lactamase-producing strains. Antimicrob Agents Chemother.46(5):1262-8.

10-Mirzaee M,Owlia P, Mansouri S.Distribution of CTX-M Beta Lactamase genes among Escherichia coli strains isolated from patients in Iran.Lab Med. 2009;40(12):724-7.

11-Masjedian G.F, Valehi F, Talebi A , Rastegar L.A. 2006. Molecular evaluation of resistance to espanded ntibiotics in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae.Iran JMed Microbiol. 1(2):27–34.

12-Geyer CN,Hanson ND. Rapid PCR amplification protocols decrease the turn-around time for detection of antibiotic resistance genes in Gram-negative pathogens.Diagn Microbiol Infect Dis.2013;31;77(2):113-7.

13-Lina TT, Khajanchi BK,Azmi Ij, Islam MA, Mahmood B, Akter M, et al. phenotypic and Molecular Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase producing Escherichia coli in Bangladesh. PloS one.2014;9(10):e108735.

14-Mohajeri P, Izadi B, Rezai M, Falahi B, Khademi H, Ebrahimi R. 2011. Assessment of the frequency of Extended Spectrum Beta Lactamases Producing Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Resistance Pattern in Kermanshah. J Ardabil Univ Med Sci. 11(1): 86-94.

15-Mirsalehian A, Akbari-Nakhjavani F, Peymani A, Kazemi B, Jabal Ameli F.Mirafshar S.m. 2008. Prevalence of Extended spectrum B- Lactamase-production Enterobacteriacea by Phenotypic and Genotypic Methods in Intensive care Units in Tehran, Iran. 6:169-173.

16-National Committee for Clinical laboratory standards. 2005. erformance standard for antimicrobial susceptibility testing, 15In information supplement (M100- 315). National committee for Clinical laboratory standards, Wayne, pa.

17-Paterson D.L, Bonomo R.A. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 18(4): 657-86.

18-Prabha L, Arti K.B. 2007. Occurrence of TEM, SHV gene in extended Spectram β- Lactamases (ESBLs) Producing Klebsiella SP. isolated from atertiary care hospital. Indian J Med Res.125: 173-8.

19-Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez M.M, Costa N, Korbenfeld D.2003. Extended-spectrum B-Lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. Antimicrob agent chemother. 47(9): 286-7.

20-Samaha-Kfoury J.N, Araj G.F. 2003. Recent development in β -lactamase and extended spectrum β- lactamases. BMJ. 327: 1209-13.

21-Mansouri S, Neyestanaki DK, Shokoohi M, Halimi S, Beigverdi R, Rezagholezadeh F, et al. Characterization of AmpC,CTX-M and MBLs types of Beta Lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumonia and Escherichia coli producing Ex-tended Spectrum Beta Lactamases in Kerman, Iran.Jundishapur J Microbiol.2014;7(2): 12-16.

22-Sinha M, Srinivasa H, Macaden R. 2007. Antibiotic resistance profile and extended spectrum beta lactamas (ESBL) production in Acinetobactre species. Indian J Med Res. 126(1): 63- 7.

23-Soltan- Dallal M.M, Mobasseri G, Fallah-Mehrabadi J, Rastegar-Lari A, Molla- Aghamirzaei H, Sabbaghi A, Azarsa M. 2011.Detection Of CTX-M-1 beta lactamase gene in Esherichia coli isolated from clinical samples by polymerase Chain Reaction(PCR).Tehran University J.69(1):16-21.

24-Tasli H, Bahar I.H. 2005. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extendedspectrum beta-lactamases in hospital-based Enterobacteriaceae in Turkey. Jpn J Infect Dis . 58(3): 162-7.

25-Thomson K.S, Prevan A.M, Sanders C.C. 1996. Novel plasmidmediated beta-lactamases in Enterobacteriaceae: Emerging problems for new beta-lactam antibiotics. Curr Cline Top Infect Dis. 16:151-63.

26-Villegas M.V, Correa A, Perez F, Miranda M.C, Zuluaga T, Quinn JP. 2004. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta- lactamases in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli isolates from Colombian hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis . 49(3): 217-22.

27-Moghaddam MN, Beidokhti MH, Jamehdar SA, Ghahraman M. Genetic properties of blaCTX-M and bla-PER Beta Lactamase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae by polymerase chain reaction. Iran J Basic Med Sci.2014;17(5):378.