

# دانشور

## پژوهشی

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال هیجدهم - شماره ۹۶  
دی ۱۳۹۰

دریافت: ۱۳۹۰/۸/۲۷

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۰/۱۱/۵

پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۷

## الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی بتالاکتامازهای طیف وسیع تیپ CTX-M در

### جدایه‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه شهر مشهد

نویسندگان: محبوبه نخعی مقدم<sup>۱\*</sup>، سحر نادریفر<sup>۲</sup>، محمدرضا ذوالفقاری<sup>۳</sup>، سعید عامل جامه دار<sup>۴</sup>، مهرداد هاشمی<sup>۵</sup>

۱. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست‌شناسی، مشهد، ایران
  ۲. دانشجوی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبی‌شناسی، قم، ایران
  ۳. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبی‌شناسی، قم، ایران
  ۴. استادیار، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، گروه میکروبی‌شناسی و ویروس‌شناسی مشهد، ایران
  ۵. دانشجوی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات فارس، گروه بیوشیمی، شیراز، ایران
- \* نویسنده مسئول: دکتر محبوبه نخعی مقدم  
E-mail: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

### چکیده

**مقدمه و هدف:** بتالاکتامازهای طیف وسیع (ESBLs)، آنزیم‌هایی هستند که توانایی هیدرولیز اکسی-ایمینوسفالوسپورین‌ها را دارند. فشار انتخابی استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌های جدید، ظهور انواع جدید بتالاکتاماز را به همراه داشته‌است. هدف از انجام این تحقیق، شناسایی سویه‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتاماز طیف وسیع تیپ CTX-M و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آنها بود.

**مواد و روش‌ها:** باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه در سال ۱۳۸۹ از نمونه‌های ادراری ارسالی به آزمایشگاه‌های دو بیمارستان مشهد جدا و شناسایی شدند. بعد از انجام آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار در آگار، شناسایی فنوتیپی تولید بتالاکتاماز با آزمایش احتمالی دیسک دوتایی و آزمایش تأییدی CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام شد. برای شناسایی ژن bla<sub>CTX-M</sub> از پرایمر اختصاصی و روش واکنش زنجیره پلیمراز استفاده شد.

**نتایج:** از صد نمونه ادرار بررسی‌شده، نوزده باکتری کلبسیلا پنومونیه جدا شد که ۴۷/۴ درصد آنها مولد ESBL بودند و تمامی آنها از نظر ژن bla<sub>CTX-M</sub> مثبت بودند. درصد زیادی از جدایه‌های مولد ESBL در مقایسه با انواع غیرمولد ESBL، نسبت به کوتریموکسازول، جنتامیسین و نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند که اختلاف برای جنتامیسین معنی‌دار بود.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به شیوع به نسبت بالای باکتری‌های مولد ESBL در جامعه مورد بررسی، توجه به غربالگری عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها می‌تواند اهمیت بسزایی در درمان صحیح آنها داشته‌باشد.

**واژگان کلیدی:** کلبسیلا پنومونیه، حساسیت آنتی‌بیوتیکی، بتالاکتامازهای طیف وسیع، تیپ CTX-M

## مقدمه و هدف

بتالاکتام‌های طیف وسیع (ESBLs)، آنزیم‌هایی هستند که توانایی هیدرولیز اکسی‌ایمینوسفالوسپورین‌ها را دارند و با بازدارنده‌های بتالاکتاماز مهارمی‌شوند (۱). مقاومت غیرمنتظره نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام حتی قبل از کشف اولین آنتی‌بیوتیک، یعنی پنی‌سیلین ظاهر شد و اولین بتالاکتاماز در باکتری اش‌ریشیا کلی، پیش از کاربرد پنی‌سیلین در پزشکی شناسایی شد (۲). طی بیست سال گذشته، بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام جدید، معرفی و طراحی شدند تا در برابر عملکرد هیدرولیزی بتالاکتامازها مقاوم باشند. اگرچه هر رده آنتی‌بیوتیکی که برای درمان بیماران استفاده شد، ظهور بتالاکتام‌هایی جدید مقاومت به آن دسته دارویی را باعث شدند و احتمال دارد فشار انتخابی استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌های جدید در درمان عفونت‌ها، ظهور انواع جدید بتالاکتاماز را به همراه داشته باشد؛ یکی از این آنتی‌بیوتیک‌ها اکسی‌ایمینوسفالوسپورین‌ها بودند که به‌طور وسیعی در درمان عفونت‌های حاد باکتری‌های گرم منفی در دهه ۱۹۸۰ مورد استفاده قرار گرفتند. تعجبی ندارد که مقاومت ناشی از بتالاکتامازها نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به‌سرعت ایجاد شد و توسعه یافت (۱ و ۳). امروزه بیش از ۱۵۰ نوع بتالاکتاماز طیف وسیع توصیف و در سراسر دنیا در بسیاری از جنس‌های انتروباکتریاسه و سودوموناس انروجینوزا شناسایی شده‌اند (۲)؛ اغلب این آنزیم‌ها از طریق پلاسمیدها کد می‌شوند که به‌راحتی میان باکتری‌ها انتشار می‌یابند و مقاومت چندگانه را هم به همراه دارند که درمان عفونت را مشکل‌تر می‌کند (۴). شیوع ESBL و انواع آن، بسته به ناحیه جغرافیایی متفاوت است و گزارش‌ها از گسترش آنها در بعضی از جوامع حکایت دارند. باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتام‌های طیف وسیع تیپ CTX-M از سراسر دنیا گزارش شده‌اند و به‌نظر می‌رسد شیوع آنها رو به گسترش است (۱). به دنبال جستجوی انجام‌شده در مقالات، شیوع این باکتری‌ها در بعضی از مناطق ایران، مانند تهران (۵)، تبریز (۶)، خرم‌آباد (۷) و

شهرکرد (۸) گزارش شده‌است. از آنجاکه اطلاعات کافی درباره شیوع بتالاکتام‌های طیف وسیع تیپ CTX-M در میان جدایه‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه در مشهد وجود نداشت و شناسایی سویه‌های مولد ESBL در آزمایشگاه‌ها مرسوم نیست، هدف تحقیق حاضر، تعیین شیوع بتالاکتام‌های طیف وسیع در جدایه‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه در دو بیمارستان دانشگاهی مشهد و تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آنها بود و در ادامه، میزان شیوع ژن bla<sub>CTX-M</sub> در میان جدایه‌های مولد ESBL مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری باکتری‌ها

در این تحقیق، باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه از تاریخ مهر ۱۳۸۹ تا بهمن ۱۳۸۹ از نمونه‌های ادراری ارسالی (نمونه‌گیری تصادفی) به آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های آموزشی قائم و ۱۷ شهریور مشهد جدا شدند. نمونه‌ها مربوط به بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها یا بیماران سرپایی مراجعه‌کننده به آزمایشگاه بیمارستان‌ها بودند و نمونه‌های تکراری حذف شدند. باکتری‌هایی به‌عنوان عامل عفونت ادراری در نظر گرفته شدند که به تعداد  $10^4$  یا  $10^5$  باکتری در هر میلی‌لیتر ادرار جدا شدند. باکتری‌ها با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی افتراقی، شامل آزمایش‌های اکسیداز، اندول، متیل‌رد، وگس پروسکایر، حرکت، تولید سولفید هیدروژن، سترات، اوره و لیزین دکربوکسیلاز شناسایی شدند (۹).

### آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده با استفاده از آزمایش انتشار در آگار و استانداردهای مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی<sup>۱</sup> (CLSI) تعیین شد (۱۰)؛ برای این منظور از کلنی خالص باکتری، سوسپانسیون میکروبی معادل غلظت  $10^5$  مک فارلند تهیه

1. Clinical and Laboratory Standards Institute

### شناسایی تأییدی جدایه‌ها با کیت میکروژن

تمامی سویه‌های مولد ESBL با کیت شناسایی میکروژن<sup>۲</sup> (شماره محصول MG MID-64 - ساخت کشور انگلستان) از نظر جنس و گونه که کلبسیلا پنومونیه هستند، مورد تأیید قرار گرفتند (شکل ۱). آزمایش‌ها مطابق دستور کار کیت انجام و سپس نتایج با کمک نرم‌افزار محصول خوانده شدند.

### شناسایی ژن bla<sub>CTX-M</sub> با روش واکنش زنجیره پلیمرز

برای ردیابی ژن پلاسمیدی bla<sub>CTX-M</sub> در میان جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به استخراج پلاسمید از جدایه‌ها نیاز بود؛ بنابراین کلنی تازه و خالص باکتری‌ها از روی محیط ائوزین متیلن بلو آگار به محیط لوریابر تانی<sup>۳</sup> (Biomark-B699 - هندوستان) حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپی‌سیلین تلقیح شد. لوله‌ها در انکوباتور شیکردار ۳۷°C به مدت ۱۶ ساعت قرارداد شدند. سپس DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت<sup>۴</sup> mini Kit-5 Prime (شماره سریال ۲۳۰۰۱۰۰ - آمریکا) مطابق دستور استخراج شد؛ برای ارزیابی مراحل استخراج صحیح پلاسمید، DNA روی ژل آگاروز ۲ درصد به مدت ۲۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز گردید. از پرایمرهای CTX-MU1 (5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGT-3') و CTX-MU2 (5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGA-3') (ساخت شرکت Metabion - آلمان) برای تکثیر یک قطعه ۵۹۳ جفت بازی ژن bla<sub>CTX-M</sub> استفاده شد (۱۳). DNA با کمک دستگاه ترموسایکلر (Kyratec - ساخت کشور کره) با شرایط نشان داده شده در جدول ۱ تکثیر شد (۱۳). از اشریشیا کلی حاوی bla<sub>CTX-M</sub> که از انستیتو پاستور تهران تهیه شده بود، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

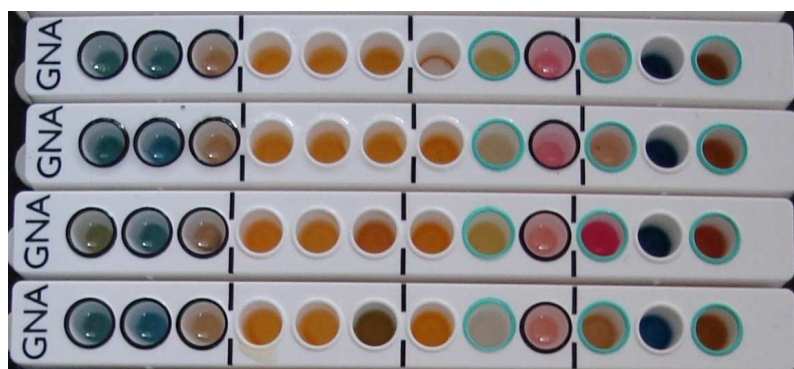
و به‌طور یکنواخت به محیط مولر هیتون آگار (شماره محصول ۱۰۵۴۳۷۰۵۰۰ - Merck - آلمان) تلقیح شد. پس از قراردادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با فاصله استاندارد، روی سطح محیط، پلیت در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت قرارداد شد. آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر در نظر گرفته شدند. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده عبارت بودند از: جنتامیسین (۱۰ μg)، کوتریموکسازول (۲۵ μg)، نیتروفورانئوئین (۳۰ μg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ μg)، سفوتاکسیم (۳۰ μg)، سفنازیدیم (۳۰ μg)، آمیکاسین (۳۰ μg) و ایمی‌پنم (۱۰ μg). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از کارخانه MAST انگلستان تهیه شدند.

### آزمایش‌های فنوتیپی تولید ESBL

در ابتدا آزمایش احتمالی دیسک دوتایی<sup>۱</sup> (DDT) روی محیط مولر هیتون آگار انجام شد؛ برای این منظور، بعد از کشت یکنواخت غلظت استاندارد باکتری، دیسک سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) با فاصله ۱۵ میلی‌متری از دیسک آگمتین (۱۰/۲۰ میکروگرم) قرار گرفت. بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت قراردادن در انکوباتور، اگر هاله‌های به سمت دیسک حاوی کلاوولانات گسترش یافته بود، آزمایش مثبت در نظر گرفته می‌شد (۱۱)؛ سپس برای باکتری‌ها آزمایش تأییدی تولید ESBL بر اساس استانداردهای CLSI گذاشته شد؛ برای این آزمایش، دیسک سفنازیدیم با فاصله ۱۵ میلی‌متری از دیسک حاوی سفنازیدیم و کلاوولانات (۱۰/۳۰ میکروگرم) روی محیط مولر هیتون آگار تلقیح شده با باکتری خالص قرارداد شد؛ اگر بعد از رشد ۱۸ تا ۲۴ ساعته باکتری، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک حاوی کلاوولانات و سفنازیدیم حداقل ۵ میلی‌متر بیشتر از دیسک حاوی سفنازیدیم به تنهایی بود، آزمایش مثبت در نظر گرفته می‌شد (۱۲).

2. Microgen GNA-ID System  
3. Luria Bertani Broth  
4. PerfectPrep™ Spin Mini Kit

1. Double Disk Approximation Test



شکل شماره ۱. کیت میکروژن GNA-ID برای شناسایی تأییدی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه

جدول شماره ۱. چرخه‌های تکثیری و زمان و دمای هر چرخه برای تکثیر ژن bla<sub>CTX-M</sub>

مرحله	درجه حرارت (°C)	زمان	تعداد چرخه
شروع	۹۴	۵ دقیقه	۱
واسرشت	۹۴	۳۰ ثانیه	
اتصال	۵۰	۳۰ ثانیه	۳۰
طویل شدن	۷۲	۳۰ ثانیه	
طویل شدن نهایی	۷۲	۳ دقیقه	۱

در جدول ۳ نشان داده شده است؛ همان‌طور که در جدول نشان داده شده، میزان حساسیت جدایه‌های مولد ESBL نسبت به ایمی پنم، نیتروفورانتوئین و آمیکاسین ۱۰۰ درصد بود. کمترین میزان حساسیت جدایه‌های ESBL<sup>+</sup> نسبت به آنتی بیوتیک کوتریموکسازول بود. تمامی باکتری‌های مولد ESBL نسبت به سفوناکسیم مقاوم بودند؛ در حالی که ۳۳/۳ درصد این جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی به سفنازیدیم حساسیت نشان دادند.

نمودارهای ۱ و ۲، مقایسه جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL و فاقد ESBL را از نظر میزان حساسیت یا مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های غیربتالاکتام نشان می‌دهد؛ همان‌طور که در نمودار مشخص است، درصد بیشتری از جدایه‌های مولد بتالاکتاماز طیف وسیع نسبت به سه آنتی بیوتیک غیر-بتالاکتام، جنتامیسین، کوتریموکسازول و نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند که اختلاف برای جنتامیسین معنی دار بود ( $p < 0/05$ ). هیچ یک از جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه نسبت به ایمی پنم و نیتروفورانتوئین مقاوم نبودند و از این نظر، میان دو گروه ESBL<sup>+</sup> و ESBL<sup>-</sup> اختلافی نبود.

## محاسبات آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. درصد حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی بر اساس میانگین قطر هاله عدم رشد پس از سه بار تکرار مشخص شد. برای آنالیز آماری مقاومت نسبت به آنتی-بیوتیک‌های غیر بتالاکتام بین دو گروه باکتری‌های ESBL<sup>+</sup> و ESBL<sup>-</sup> از آزمون کای اسکور<sup>۱</sup> استفاده شد و نتایج با p value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی دار<sup>۲</sup> در نظر گرفته شد.

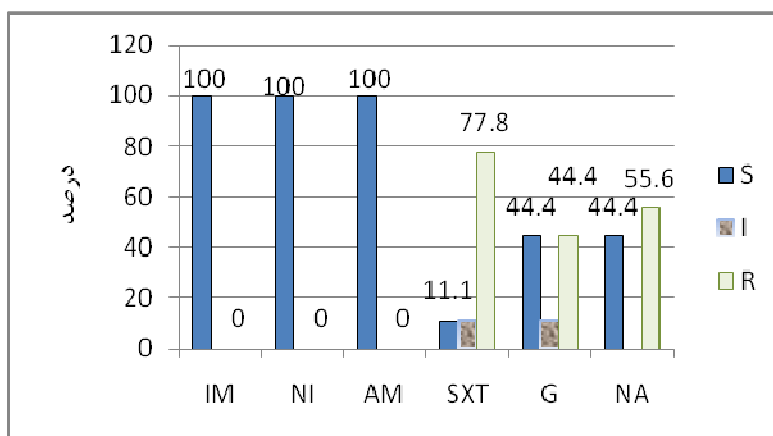
## نتایج

از صد نمونه ادراری، نوزده باکتری کلبسیلا پنومونیه جدا شد. تولید بتالاکتاماز طیف وسیع با روش‌های فنوتیپی در ۴/۷۷ درصد (۹ از ۱۹) باکتری‌ها شناسایی شد که پنج جدایه از نمونه ادرار بیماران بستری و چهار جدایه از بیماران سرپایی بود. حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌های مولد ESBL و جدایه‌های غیرمولد بتالاکتاماز

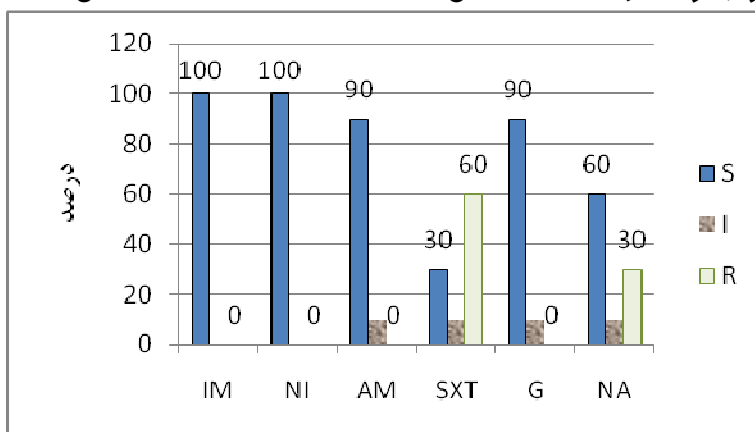
1. Chi square  
2. Significant

جدول شماره ۲. حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL و فاقد ESBL نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتالاکتام

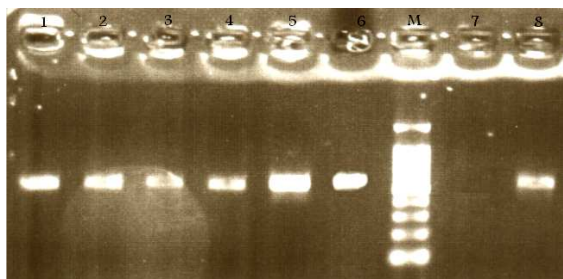
آنتی‌بیوتیک	ESBL <sup>+</sup> (درصد)	ESBL <sup>-</sup> (درصد)
ایمی‌پنم	۱۰۰	۱۰۰
نالیدیکسیک اسید	۴۴/۴	۶۰
آمیکاسین	۱۰۰	۹۰
کوتریموکسازول	۱۱/۱	۳۰
جتنامیسین	۴۴/۴	۹۰
نیتروفورانتوئین	۱۰۰	۱۰۰



نمودار شماره ۱. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مولد ESBL (IM=ایمی‌پنم، NI=نیتروفورانتوئین، AM=آمیکاسین، SXT=کوتریموکسازول، G=جتنامیسین، NA=نالیدیکسیک اسید، S=حساس، I=بینابینی، R=مقاوم)



نمودار شماره ۲. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های فاقد ESBL (IM=ایمی‌پنم، NI=نیتروفورانتوئین، AM=آمیکاسین، SXT=کوتریموکسازول، G=جتنامیسین، NA=نالیدیکسیک اسید، S=حساس، I=بینابینی، R=مقاوم) تمامی باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتاماز طیف وسیع که با روش فنوتیپی ردیابی شده بودند، ژن bla<sub>CTX-M</sub> را داشتند (شکل ۱).



شکل شماره ۱. محصولات PCR ژن  $bla_{CTX-M}$  روی ژل آگارز (M= مارکر استاندارد ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۷ کنترل منفی، شماره ۸ کنترل مثبت، شماره‌های ۱-۶ شش مورد از نمونه‌ها)

کلسیلا در بیماران بستری و سرپایی تهران به ترتیب ۶/۱ درصد و ۱/۷ درصد و برای شهر تبریز این ارقام به ترتیب ۲۱/۴ درصد و ۹/۱ درصد به دست آمد (۶)؛ در تحقیقی دیگر از بیمارستان شهدای عشایر شهر خرم‌آباد که = روی باکتری‌های گرم منفی در سال ۱۳۸۵-۱۳۸۶ انجام شد، شیوع جدایه‌های کلسیلا پنومونیه مولد ESBL ۸/۹ درصد گزارش شده است (۷). در گزارش منتشر شده در سال ۱۳۸۹ توسط فیض آبادی و همکاران، ۶۹/۷ درصد جدایه‌های کلسیلا پنومونیه از بیمارستان لبافی‌نژاد تهران دارای ESBL بودند که ۶۱/۷ درصد آنها مقاومت نسبت به سفنازیدیم را نشان دادند (۲۲). همان‌طور که از نتایج تحقیقات مختلف مشخص می‌شود به نظر می‌رسد که شیوع جدایه‌های کلسیلا پنومونیه مولد ESBL بسته به ناحیه، زمان و روش شناسایی می‌تواند متفاوت باشد.

در تحقیق حاضر، میزان مقاومت جدایه‌های مولد ESBL در مقایسه با انواع ESBL نسبت به کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید و جنتامیسین بیشتر بود که احتمال دارد ژن‌های کدکننده مقاومت در برابر این آنتی‌بیوتیک‌ها همراه ژن‌های مولد بتالاکتاماز روی پلاسمید منتقل می‌شوند؛ در این حالت، درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مولد بتالاکتاماز مشکل‌تر خواهد بود. مشابه تحقیق حاضر، مقاومت جدایه‌های مولد بتالاکتاماز طیف وسیع در مقایسه با سویه‌های فاقد ESBL نسبت به جنتامیسین در تانزانیا (۲۳) و نسبت به سولفامتوکسازول در هند (۲۴) بیشتر گزارش شده است.

تمامی باکتری‌های کلسیلا پنومونیه مولد بتالاکتاماز طیف وسیع که با روش فنوتیپی ردیابی شده بودند، ژن  $bla_{CTX-M}$  را داشتند (شکل ۱).

#### بحث

بتالاکتامازها سیستم دفاعی اصلی باکتری‌های گرم منفی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام هستند. از زمانی که آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مورد استفاده قرار گرفتند، بتالاکتامازها به همراه آنها تکامل یافتند و نقش اصلی را در شکست درمانی ایفا کردند (۱۴). بیش از پانزده سال است که اپیدمی‌هایی متعدد از عفونت با باکتری‌های بتالاکتاماز در سراسر دنیا مشاهده شده است و این پدیده تهدیدی بزرگ در استفاده از سفالوسپورین‌ها محسوب می‌شود (۱۵)؛ در این تحقیق از میان صد نمونه ادراری مورد بررسی، نوزده باکتری کلسیلا پنومونیه جدا شد که نه جدایه (۴/۷ درصد) مولد بتالاکتاماز طیف وسیع بودند. در مقایسه با گزارش‌های ارائه شده از کشورهای تایوان (۵/۸ درصد)، اسپانیا (۲/۳ درصد)، آمریکا (۸ درصد)، کانادا (۵ درصد) و ژاپن (۴/۰ درصد) میزان شیوع جدایه‌های مولد بتالاکتاماز در جامعه مورد مطالعه بیشتر است (۱۶-۱۹). میزان شیوع در آمریکای لاتین، ۴۵ درصد و عربستان ۵۵ درصد گزارش شده است (۱۷ و ۲۰). بهروزی و همکاران، میزان شیوع جدایه‌های کلسیلا پنومونیه مولد ESBL را در بیمارستان میلاد تهران در سال ۱۳۸۸، ۱۲ درصد گزارش کردند (۲۱)؛ در تحقیق گزارش شده در سال ۱۳۸۷، ۱۳۸۷ درصد شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی ناشی از تولید بتالاکتاماز برای گونه‌های

مهم‌ترین محدودیت این تحقیق عبارت بود از بیمارانی که برای معاینه عمومی و تعیین سلامتی به‌عنوان بیمار سرپایی در بیمارستان‌ها پذیرش می‌شدند.

### نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهند که در جامعه مورد مطالعه شیوع جدایه‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL در مقایسه با جوامع پیشرفته بالاتر است و تمامی جدایه‌ها ژن CTX-M را داشتند. مقاومت باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL نسبت به آنتی بیوتیک‌های کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید و جنتامیسین بیشتر از جدایه‌های فاقد ESBL بود که اختلاف برای جنتامیسین معنی‌دار بود.

### تقدیر و تشکر

از سرکار خانم دکتر فرشته شاهچراغی که باکتری کنترل مثبت دارای ژن blaCTX-M را در اختیارمان قرار دادند، صمیمانه قدردانی می‌شود.

با توجه به حساسیت جدایه‌های مولد ESBL نسبت به آنتی بیوتیک‌های ایمپنم، نیتروفورانئوئین و آمیکاسین در تحقیق حاضر می‌توان از این آنتی بیوتیک در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها در جامعه مورد مطالعه استفاده کرد.

در این تحقیق، تمامی جدایه‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه، ژن blaCTX-M را داشتند. در گزارش فیض‌آبادی و همکاران ۶۷/۵۱ درصد جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای ژن bla(CTX-M-I) و ۲۹ درصد آنها دارای ژن bla(CTX-M)-III بودند (۲۲). در گزارش باسری و همکاران از ۱۶۸ جدایه بالینی کلبسیلا پنومونیه، ۸۸ سویه (۷۵/۲ درصد) ژن blaCTX-M گروه ۱، یک سویه (۰/۸۵ درصد) ژن blaCTX-M گروه ۳ و دو سویه (۱/۷ درصد) ژن blaCTX-M گروه ۴ را کد می‌کردند (۲۵). در گزارش ارائه‌شده از تحقیقی در اسپانیا در سال ۲۰۰۷، ۳۰ درصد جدایه‌های کلبسیلا این ژن را داشتند که نمونه‌ها از خون، زخم و ادرار جدا شده بود (۱۸) و ۱۰۰ درصد جدایه‌های ادراری کلبسیلا در گزارشی از هند، ژن CTX-M-۱۵ (۲۶) و ۳۷/۵ درصد جدایه‌ها از کشور فرانسه ژن CTX-M (از نمونه‌های خون، ادرار و مجاری تنفسی) را حمل می‌کردند (۲۷). تا اواخر سال ۱۹۹۹ گزارش‌ها مربوط به این بود که اغلب باکتری‌های مولد بتالاکتاماز جدا شده از بیماران ژن blaSHV و blaTEM را دارند، اما در سال‌های اخیر، بتالاکتامازهای تیپ CTX-M، بتالاکتاماز غالب گزارش شده از بیماران است که می‌تواند نشان‌دهنده افزایش شیوع این ژن در میان باکتری‌های گرم منفی باشد؛ این ژن در سرتاسر جهان از اعضای خانواده اتروباکتریاسه جدا می‌شود (۲۸).

با توجه به اینکه میزان مرگ‌ومیر ناشی از باکتری‌های مولد ESBL رو به افزایش است و از طرفی، ظهور مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها، سالانه هزینه‌های گزافی به کشورها تحمیل می‌کند، توجه به غربالگری این باکتری‌ها و درمان صحیح عفونت‌های ناشی از آنها و نیز پرهیز از مصرف نابه‌جای آنتی بیوتیک‌ها در کشورمان اهمیت دارد.

### منابع

- AL- Jasser AM. Extended spectrum beta-lactamases (ESBLs): a global problem. *Kuwait Med J.* 2006; 38: 171-85.
- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 933-51.
- Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evaluation of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985; 28: 302-7.
- Bal S. Beta-lactamase mediated resistance in hospital-acquired urinary tract infections. *Hospital today.* 2000; 5: 96-101.
- Amirmozafari N, Tehrani HF, Tavaf Langeroodi Z, Abdullahi A, Survey of drug resistance due to extended spectrum  $\beta$ -lactamases in *K. pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients (Persian). *Pejouhesh.* 2007; 31:241-5.
- 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 (Persian). *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services.* 2008; 30: 79-86.
- Hosseinzadegan H, Ramezanzadeh R, Hasani A. Cross-sectional study of extended spectrum beta-lactamase producing gram-negative bacilli from clinical cases in Khorramabad, Iran. *Iranian J Microbiol.* 2009; 1: 16-9.
- Zamanzad B, Deyham B, Nafisi MR, Karimi ali, Farokhi E. The frequency of TEM-1 gene in extended spectrum beta-lactamases producing *E. coli*, *K. pneumoniae* and Enterobacter strains isolated from Shahrekord hospital clinical samples using PCR (Persian). *Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences and Health Services.* 2008; 14: 19-25.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey and Scott's diagnostic Microbiology*, 11th edition. USA: Mosby; 2002: p.37-40.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 12th informational supplement. M100-S12, National Committee for Clinical Laboratory standards. Wayne: Pa. 2002.
- Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum beta-lactamases in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*- Prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol.* 2004; 22 (3): 172-4.
- Linscott AJ, Brown WJ. Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 1081-5.
- Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, Romero E, Rossolini GM. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4264-9.
- Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *E. coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 707-12.
- Sanchez UM, Bello TH, Dominguez YM, Mella MS, Zemelman ZR, Gonzalez RG. Transference of extended-spectrum beta-lactamases from nosocomial strains of *K. pneumoniae* to other species of Enterobacteriaceae. *Rev Med Chil.* 2006; 134: 415-20.
- Yan J-J, Wu S-M, Tsai S-H, Wu J-J, Su I-J. Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *K. pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in southern Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 1438-42.
- Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: S94-S103.
- Valverde A. Complex molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in *K. pneumoniae*: a long-term perspective from a single institution in Madrid. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 61: 64 -72.
- Yagi T, Wachino JI, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y. Practical methods using boronic acid compounds for identification of Class C beta-lactamase-producing *K. pneumoniae* and *E. coli*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 2551-58.
- Al-Agamy MH, Shibl AM, Tawfik AF. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *K. pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. *Ann Saudi Med.* 2009; 29 (4): 253-7.
- Behroozzi A, Rahbar M, Vand Yousefi J, Frequency of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) (producing *E. coli* and *K. pneumoniae*) isolated from urine in an Iranian 1000-bed tertiary care hospital. *Afr J Microbiol Res.* 2010; 4 (9): 881-4.
- Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, Parvin M, Yadegarimia D. Distribution of bla(TEM), bla(SHV), bla(CTX-M) genes among clinical isolates of *K. pneumoniae* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. *Microb Drug Resist.* 2010;16: 49-53.
- Ndugulile F, Jureen R, Harthug S, Urassa W, Langeland N. Extended spectrum beta-lactamases among Gram-negative bacteria of nosocomial origin from an Intensive Care Unit of a tertiary health facility in Tanzania. *BMC Infect Dis.* 2005; 5: 86.
- Goyal A, Prasad KN, Prasad A, Gupta S, Ghoshal U, Ayyagari A. Extended spectrum beta-lactamases in *E. coli* & *K. pneumoniae* & associated risk factors. *Indian J Med Res.* 2009; 129 (6): 695-700.
- Bameri Z, Chitsaz M, Owlia P. Detection of CTX-M-beta-lactamases in isolated *K. pneumoniae*. *Iran J Pathol.* 2010; 5:137-42.
- Muzaheed, Yohei D, Adams-Haduch JM, Endimiani A, Sidjabat HE, Gaddad SM, Paterson DL. High prevalence of CTX-M-15-producing *K. pneumoniae* among inpatients and outpatients with urinary tract infection in Southern India. *J Antimicrob Chemother.* 2008. 61(6): 1393-4.
- Galas M, Decusser J, Breton N, Godard T, Allouch YP, Pina P. Nationwide Study of the Prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum-  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 52 (2): 786-9.
- Daoud Z, Moubareck C, Hakime N, Doucet-Populaire F. Extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in Lebanese ICU patients: epidemiology and patterns of resistance, *J Gen Appl Microbiol.* 2006; 52: 169-78.



**Daneshvar**

**Medicine**

*Scientific-Research  
Journal of Shahed  
University  
Seventeenth Year,  
No.96  
December, January  
2011-2012*

Received: 18/11/2011

Last revised: 25/1/2011

Accepted: 27/1/2012

## **Pattern of antibiotic susceptibility and detection of CTX-M-type extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) in urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Mashhad**

**Mahboobeh Nakhaee Moghadam<sup>1</sup>, Sahar Naderifar<sup>2</sup>, Mohammad Reza Zolfaghari<sup>2</sup>, Saeid Amel Jamehdar<sup>3</sup>, Mehrdad Hashemi<sup>4</sup>**

1. Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

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

3. Department of Microbiology and Virology, Emam Reza Hospital, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

4. Department of Biochemistry, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

**e-mail: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir**

### **Abstract**

**Background and Objective:** Extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) are defined as enzymes capable of hydrolyzing oxyimino-cephalosporins. Selective pressure of overuse of new antibiotics may be associated with emergence of new types of beta-lactamases. The aim of this study was to identify urinary isolates of CTX-M ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* and to detect their pattern of antibiotic susceptibility

**Materials and Methods:** Bacteria were isolated and identified from the urine samples sent to laboratories of two hospitals in Mashhad in 2010. Isolates were then tested for antimicrobial susceptibility by disc diffusion and examined for beta-lactamase production by double disk approximation test and CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) confirmatory test. The blaCTX-M genes were detected by polymerase chain reaction using specific primer.

**Results:** Out of 100 studied urinary specimens, 19 bacteria were *K. pneumoniae*, of which 47.4% were ESBL producer and all were positive for blaCTX-M gene. A large percentage of ESBL-producing isolates compared to ESBL-non producers were resistant to co-trimoxazole, gentamicin, and nalidixic acid and the difference for gentamicin was significant.

**Conclusion:** Due to relatively high prevalence of ESBL-producing bacteria in the studied population, screening of infections caused by these bacteria would be important for appropriate treatment.

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae*, Antibiotic sensitivity, Extended spectrum beta-lactamases, CTX-M type