مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هفدهم، شماره 10، مهر1394، صفحه 52-46

تشخیص سریع بتالاکتاماز TEM در ایزوله های کلبسیلا به روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR)

سارا بستان دوست نیکو (MSc)[1]، محمدحسن شاه حسینی (PhD)*[2]، محمدرضا ذوالفقاری (PhD)[3]، محمد رهبر (PhD)[4]

1-دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
2- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، تهران
3-گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
4-آزمایشگاه وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

دریافت: 93/11/25، اصلاح:94/2/16 ، پذیرش:94/5/7

خلاصه

سابقه و هدف: اطلاع از وجود ژن های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) در باکتری هایی چون کلبسیلا از نظر بیماری زایی و نیز میزان شیوع آنها در جوامع، در پیشگیری و درمان عفونت های ناشی از آنها کمک می نماید.هدف از این مطالعه شناسایی سریع ژن مولد bla_{TEM} در کلبسیلا با استفاده از تکنیک PCR می باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه مقطعی، از فروردین ماه لغایت مهرماه 1392 تعداد 70 ایزوله باکتری کلبسیلا از نمونه دهای بالینی شامل (زخم، ادرار، خلط و خون) بر اساس تست هاس بیوشیمیایی (وضعیت غیر تخمیری و تولید گاز در محیط (Triple Sugar Iron Agar=TSIA)، منفی بودن اندول، حرکت و MR، تست اوره آز و VP مثبت) مجزا گردیدند. سپس فراوانی سویه های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف، با Combined disk تعیین گردید. DNA با روش جوشانیدن استخراج شده و از نظروجود ژن TEM توسط روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع70 ایزوله کلبسیلا، در 11 نمونه فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع الطیف مشاهده شد که از این تعداد ، 10 نمونه دارای ژن مقاومت بتالاکتاماز TEM بودند. همچنین از 59 نمونه ESBL منفی در آنتی بیوگرام، 9 نمونه (26%) به وسیله تست PCR از جهت ژن bla_{TEM} مثبت تشخیص داده شد.

نتیجه گیری: با توجه به شیوع روزافزون سویه های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف و تشخیص ضعیف مقاومت آنتی بیوتیکی توسط روش سنتی آنتی بیوگرام، استفاده از تکنیک های دقیق تر از جمله PCR، قویا توصیه می شود.

واژه‌های کلیدی: ژن مقاومت blaTEM، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، واکنش زنجیره ای پلیمراز، آنتی بیوگرام.

مقدمه

کلبسیلا یکی از باکتری هایی است که قادر به تولید آنزیم های بتالاکتاماز با طیف وسیع و یکی از اعضای اصلی خانواده انتروباکتریاسه می باشد. همچنین این باکتری یکی از عوامل رایج عفونت های بیمارستانی می باشد(1). بتالاکتامازها از مهم رین آنزیم های مهارکننده داروهای بتالاکتام در باکتری هستند که با هیدرولیز حلقه بتالاکتام از اتصال آنتی بیوتیک به جایگاه هدف جلوگیری کرده و باعث ظهور مقاومت می گردند. تا امروز بیش از 340 آنزیم بتا لاکتاماز شناسایی شده است (3و2). بر طبق طبقه بندی مولکولار که بر اساس توالی نوکلئوتیدها و اسید آمینه در این آنزیم ها می باشد، امروزه چهار کلاس (A-D) شناخته شده است. کلاس A، D و C از طریق مکانیسم بر پایه سرین عمل می کنند. در حالی که کلاسB یا متالوبتالاکتاماز ها به فلز روی برای فعالیتشان نیاز دارند. اکثر ESBL. ها (Extended Spectrum B-Lactamases) به کلاس مولکولی A در طبقه بندی Ambler تعلق دارند. اولین بتالاکتاماز پلاسمیدی در باکتری های گرم منفی ژن مقاومت TEM بود که در دهه شصت شرح داده شد، این آنزیم اولین آنزیم بتالاکتامازی بود که از اشریشیا کلی جدا شده از کشت خونی بیمار یونانی به نام Temoniera در سال 1985 ایزوله شد و به همین دلیل به این نام، نامگذاری شد. طی مدت کمی پس از جداسازی این آنزیم ها در سراسر جهان به سرعت، TEMبتالاکتاماز انتشار یافتند به طوری که امروزه به عنوان شایع ترین مکانیسم مقاومت به داروهای بتالاکتام در باسیل های گرم منفی به حساب می آیند(4). در طول سال های اخیر مطالعات گسترده ای بر روی بتالاکتامازهای وسیع الطیف صورت گرفته؛ در سال Sharma 2009 و همکارانش تحقیقی را با عنوان "تشخیص ژن های مقاومت TEM و SHV در E.coli و کلبسیلا جدا شده از بخش مراقبت ویژه بیمارستان در هند" انجام دادند (5). مطالعات Kaftandzieva و همکارانش در سال 2011 بر روی شیوع و خصوصیات مولکولی ESBL های تولید شده توسط اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه انجام گرفت(6). در سال Ahmed 2013 و همکارانش در مقاله ای به بررسی شیوع ژن های SHV،TEM و CTX-M در اشریشیاکلی و گونه های

این مقاله حاصل پایان نامه سارا بستان دوست دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر محمدحسن شاه حسینی
آدرس: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی. تلفن: 021-44844946
E-mail:shahhosseiny@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.7.2]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.46]

کلبسیلا جدا شده از عفونت های ادراری در سودان پرداختند(7). Masjedian در مطالعه ایی به بررسی مولکولی مقاومت به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف در اشریشیاکلی وکلبسیلا پنومونیه پرداختند (8). Yazdi و همکاران در سال 1389 در تحقیقی با عنوان شیوع ژن های مقاومت بتالاکتامازی SHV/CTX-M/TEM در اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری در شهر تهران تعداد 246 ایزوله اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های ادراری را مورد بررسی قرار دادند(9). توسط Shabani و همکارانش نیز با عنوان فراوانی ژن TEM-1 در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های کلینیکی در شهرستان دامغان در سال 90 را مورد بررسی قرار دادند (10). مقاومت باکتری های گرم منفی به آنتی بیوتیک های بتالاکتام وسیع الطیف در دو دهه گذشته به سرعت گسترش یافته و این مسئله یکی از بحران های موجود در درمان عفونت های ناشی از این باکتری ها می باشد. انتقال و انتشار سریع ارگانیسم هایی که قادر به تولید آنزیمهای مذکور هستند، باعث بالا رفتن میزان عفونت های بیمارستانی در سراسر دنیا شده است(11و3). با توجه به اهمیت این موضوع، هدف از این مطالعه، تشخیص سریع ژن بتالاکتاماز TEM در ایزوله های کلبسیلا به روش مولکولی PCR می باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی، از فروردین ماه لغایت مهرماه 1392 تعداد 70 ایزوله باکتری کلبسیلا از نمونه دهای بالینی شامل (زخم، ادرار، خلط و خون) بر اساس تست هاس بیوشیمیایی (وضعیت غیر تخمیری و تولید گاز در محیط TSI(Triple Sugar Iron Agar)، منفی بودن اندول ، حرکت و MR، تست اوره آز و VP مثبت) مجزا گردیدند. ایزوله های کلبسیلای جدا شده بر اساس روش Combined disk به جهت حضور بتالاکتامازهای وسیع الطیف مورد بررسی قرار گرفتند. در این روش از دیسک های مرکب استفاده گردید شامل : یک دیسک سفتازیدیم (30 میکروگرم) و یک دیسک مرکب (30 میکروگرم سفتازیدیم+10 میکروگرم کلاولانیک اسید)، محصول شرکت span، که این دیسک ها در فاصله 20 میلی متری از هم در محیط مولر هینتون آگار (مرک) قرار گرفتند. در صورتی که قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک حاوی کلاولانیک اسید پنج یا بیشتر از پنج میلیمتر از دیسک سفتازیدیم باشد تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت تلقی می شود (12).

استخراج DNA: جهت استخراج DNA و انجام تست PCR، DNA کنترل مثبت و کل نمونه ها به روش جوشاندن (Boiling) استخراج گردید. ابتدا 3 تا 5 کلنی از هر نمونه را داخل ویال اپندورف حاوی 100 میکرولیتر آب مقطر استریل حل نموده و سپس مخلوط کرده، به مدت 15-10 دقیقه در داخل بن ماری جوش (100 درجه سانتیگراد) قرار داده شدند. نهایتا ویال ها را به مدت 10 دقیقه در دور 12000 سانتریفوژ کرده و محلول رویی که حاوی DNA می باشد جهت آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت.

بهینه نمودن تست PCR جهت تشخیص ژن blaTEM: تست PCR جهت شناسایی ژن blaTEM با استفاده از پرایمرهای استخراج شده از روش Sharma و همکاران صورت گرفت(5). توالی پرایمرهای کد کننده ژن blaTEM با اندازه 1080bp به شرح زیر می باشد:

TEMF: 5'-AAA ATT CTT GAA GAC G-3'

TEMR: 5'- TTA CCA ATG CTT AAT CA-3'

همچنین برنامه حرارتی مورد استفاده جهت ژن blaTEM به صورت زیر تنظیم گردید:

الف) دناتوراسیون اولیه: 94°Cبه مدت 3 دقیقه

ب) سیکل اصلی واکنش زنجیره ای پلیمراز با 35 بار تکرار شامل: مرحله دناتوراسیون؛ 94°C به مدت 30 ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها؛ 50°C به مدت 30 ثانیه و مرحله تکثیر؛ 72°C به مدت 2 دقیقه

ج) تکثیر نهایی؛ 72 °C به مدت 10 دقیقه

ترکیب مخلوط واکنش PCR در یک تست، در این مطالعه به قرار زیر است: بافر 10X: 2/5 ماکرولیتر. MgC12: 0/75 ماکرولیتر. dNTP: 0/5 ماکرولیتر. پرایمر Forward: 0/5 ماکرولیتر. پرایمر Reverse: 0/5 ماکرولیتر. آب دوبار تقطیر شده: 15 ماکرولیتر. در این مطالعه از سوش کنترل مثبت کلبسیلا پنومونیه (ATCC700603) تهیه شده از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی تهران و سوش کنترل منفی اشریشیاکلی (ATCC35218) انیستیتو پاستور استفاده گردید.

تعیین حد تشخیص (LOD) تست PCR بهینه شده: به منظور تعیین حد تشخیص(LOD) آزمون PCR بهینه شده، رقتهایی از DNA با تعداد باکتری مشخص تهیه و با انجام واکنش PCR بر روی آن‌ها، حداقل تعداد باکتری مورد نیاز برای انجام واکنش تعیین گردید.

تعیین اختصاصیت آزمون PCR: برای تعیین اختصاصیت آزمون PCR بهینه شده از دو روش آنلاین و آفلاین استفاده شد. روش آنلاین بدین صورت که در سایت NCBI قسمت N-blast سکانس پرایمر مورد نظر را وارد تا همولوژی پرایمر با سایر میکروارگانیسم ها بررسی گردد، در روش آفلاین، DNA باکتری‌های شایع دیگر نظیر اشریشیاکلی TEM منفی، سالمونلا، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوپلاسما پنومونیه،کاندیدا آلبیکنس، بروسلا و کلبسیلایTEM منفی را استخراج کرده و آزمون PCR بهینه شده را برای آن‌ها به همراه نـمونه کنتـرل مثبت و منفی مورد ارزیابی قرار گرفت.

کلونینگ: پس از به دست آوردن محصول PCR، کلون کردن آن در یک حامل مناسب سبب می‌شود تا همواره منبع ماده‌ای از مقادیر زیاد DNA را بدون نیاز به تکثیر محصول از یک منبع اصلی در هر بار آزمون داشته باشیم. محصول PCRکلون شده درون وکتور مناسب می‌تواند برای اهداف مختلف از جمله استفاده به عنوان الگوی نمونه کنترل مثبت در آزمون PCR و یا برای تحقیقات بیشتر، مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین برای به دست آوردن کنترل مثبت قابل اطمینان در آزمون PCR، و همچنین داشتن ژن هدف برای تعیین سکانس نوکلئوتیدی، آمپلیکون مورد نظر را در وکتور مناسب کلون کردیم. بدین منظور از کیت T/A کلونینگ شرکت Thermocintific استفاده گردید.

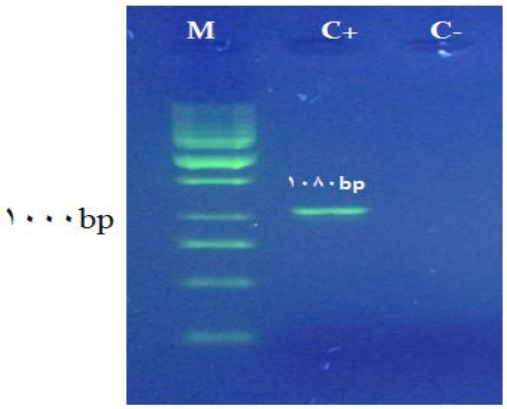
یافته ها

تست آنتی بیوگرام: از 70 ایزوله جدا شده کلبسیلا، 11 نمونه فنوتیپ ESBL را از خود نشان دادند و 59 نمونه ESBL منفی گزارش گردید.

بهینه نمودن تست PCR تشخیص ژن مقاومت blaTEM: تست PCR با استفاده از DNAهای استخراجی از نمونه کنترل مثبت، پرایمر های

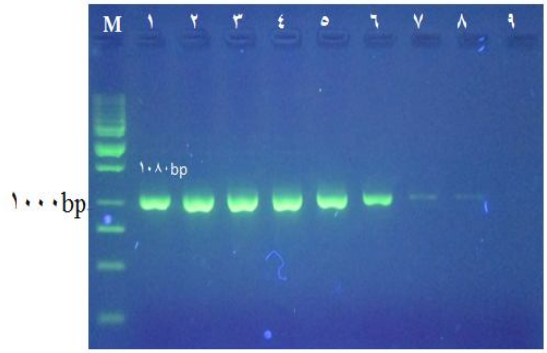
[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.7.2]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.46]

اختصاصی TEM-F و TEM-R و بر طبق دستورالعمل حرارتی مناسب، بهینه گردید. محصول PCR که الگوی آن DNA باکتری کلبسیلای TEM مثبت بود با اندازه 1080 جفت باز، همراه با نمونه کنترل منفی و در کنار سایز مارکر بر روی ژل آگارز 5/1٪ قابل مشاهده می باشد (شکل 1).



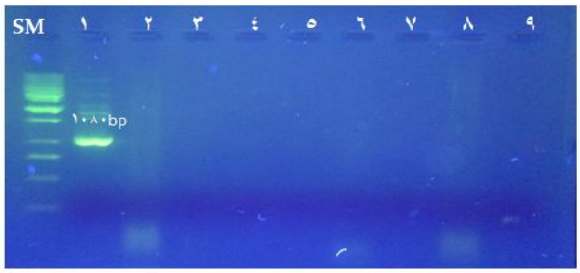
شکل 1. آزمون بهینه‌شده PCR تشخیص ژنblaTEM در باکتری کلبسیلا. M، سایز مارکر فرمنتاس 1kb DNA Ladder، 1. محصول PCR با DNA کلبسیلای TEM مثبت،2. کنترل منفی

تعیین حد تشخیص آزمون: حد تشخیص آزمون PCR (LOD) برای تشخیص ژن blaTEM در نمونه های کلبسیلایی تا 10 کپی از ژن مورد نظر بدست آمد. تعداد واحدهای سازنده کلونی (CFU) و همینطور تعداد DNA در هر کدام از رقت ها مشخص است که به همراه یک نمونه کنترل منفی و نمونه کنترل مثبت، بر روی ژل الکتروفورز مشخص شده است (شکل 2).



شکل 2. آزمون تعیین حد تشخیص PCR بهینه‌شده ژن TEMدر باکتری کلبسیلا. SM: سایز مارکر فرمنتاس 1kb DNA Ladder، 1.کنترل مثبت، 2.رقت 10^{-1}، 3رقت 10^{-2} 4 .رقت 10^{-3}، 5. رقت 10^{-4} 6.رقت 10^{-5}، 7. رقت 10^{-6} 8.. رقت 10^{-7}، 9.کنترل منفی.

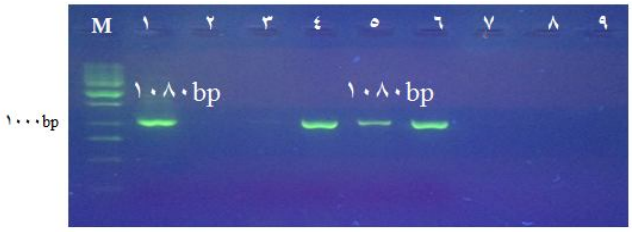
تعیین اختصاصیت آزمون PCR: نتایج حاصل از این بررسی که نشان دادهشده آزمون PCR به درستی قادر به شناسایی blaTEMدر کلبسیلا بوده و این در حالی است که DNA مربوط به سایر میکروارگانیسم ها توسط پرایمرهای این آزمون قابل تکثیر نبودند (شکل 3).



شکل 3. آزمون اختصاصیت PCRبهینه شده. SM. سایز مارکر شرکت فرمنتاس 1kb DNA Ladder، 1. نمونه کنترل مثبت (DNAکلبسیلای واجد ژن TEM)، 2. DNAکلبسیلای فاقد ژنTEM 3.DNA سالمونلا، 4. DNAمایکوباکتریوم توبرکلوزیس، 5. DNAمایکوپلاسما پنومونیه، 6. DNAکاندیدا آلبیکنس، 7.DNAبروسلا، 8. DNA اشریشیاکلی فاقد ژنTEM، 9. کنترل منفی

کلونینگ: محصول PCR با اندازه 1080 جفت باز با استفاده از پلاسمید pTz57R کلون و پلاسمید نوترکیب pSB3946 ساخته شد.

انجام تست PCRبر روی 70 نمونه کلبسیلا: آزمون PCR بهینه‌شده بر روی DNAهای استخراج‌شده از نمونه‌های کلبسیلا های جدا شده از بیمارستان میلاد، به همراهنمونه کنترل مثبت که الگوی آن DNA استخراج‌شده از کلبسیلای واجد ژنTEMبود و نمونه کنترل منفی انجام شد. از 70 نمونه کلبسیلای جدا شده از بیمارستان میلاد،11 نمونه به روش آنتی بیوگرام(Disk Diffusion) ESBL مثبت و 59 نمونه باقیمانده ESBL منفی گزارش شد. در آزمون PCR از 11 نمونه ESBL مثبت، 10 نمونه و از 59 نمونه ESBL منفی 9 نمونه به جهت حضور ژن TEM مثبت گردید(شکل 4).



شکل 4. آزمون بهینه‌شده PCR تشخیص ژنTEM در کلبسیلا. SM: سایز مارکرفرمنتاس 1Kb DNA Ladder، 1. کنترل مثبت با DNAکلبسیلای واجد ژنTEM(1080 bp)، ۲،۳،۷و8. نمونه‌های منفی، ۴،۵و6. نمونه‌های مثبت، 9. کنترل منفی

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاکی از پژوهش حاضر، شیوع همه جانبه ESBL ها و حضور ژن blaTEM را در ایزوله های مورد بررسی تایید می کند. در این بررسی 15/7 درصد سویه های ایزوله شده تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند. از طرفی میزان شناسایی فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع الطیف در سویه های کلبسیلا در سال 2008 توسط Leung Ho و همکاران، 50 درصد گزارش گردید(13). در سال 2009 در مطالعه انجام شده توسط Ehlers و همکاران، 58/4 درصد سویه های کلبسیلا فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع الطیف را نشان دادند(14). در مطالعه

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.7.2]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.46]

Kaftandzieva و همکاران در سال 2011، 31درصد بتالاکتاماز مثبت بودند(6)و همچنین در ایران در مطالعهpornour در سال 1389 ، 97/8 درصد سویه های کلبسیلا بتالاکتاماز وسیع الطیف گزارش گردیدند(15). با مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق و نتایج مطالعات قبل، آمار به دست آمده نشان دهنده آن است که درصد سویه های بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت رو به افزایش است و این افزایش می تواند در نتیجه مصرف بیش از حد و طولانی مدت سفالوسپورین های وسیع الطیف در درمان بیماران و کسب مقاومت در سویه های باکتریایی باشد .به طور کلی فاکتورهای خطر متعددی در افزایش باکتری های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف نقش دارند که شامل :مصرف بیش از حد و طولانی مدت سفالوسپورین های وسیع الطیف، طولانی بودن مدت زمان بستری در بیمارستان، استفاده از کاتترهای عروقی و ادراری می باشد (17و16). امروزه وجود بتالاکتامازهای وسیع الطیف در باکتری های جدا شده از بیماران بستری که مقاومت دارویی چندگانه را بیان می کنند، یک مساله مهم بهداشتی در اکثر کشورها محسوب می شود(19و18). روش های فنوتیپی تنها می توانند نشان دهند که یک بتالاکتاماز وسیع الطیف تولید شده است یا نه، ولی نمی توانند تیپ و ساب تیپ های یک بتالاکتاماز وسیع الطیف را نشان دهند. لذا انجام تکنیکهای مولکولی PCR جهت تشخیص انواع بتالاکتاماز وسیع الطیف TEM-1 ضروری به نظر می رسد. در مطالعه حاضر فراوانی ژن با استفاده از روش PCR 27/14 درصد بود. در مطالعات انجام شده در سال های گذشته فراوانی ژن TEM در کلبسیلا با توجه به اندازه جامعه آماری هر مطالعه زیاد بوده، به طوریکه در مطالعه Ehlers و همکاران در سال 2009 و در مطالعه Bali و همکاران در سال 2010 فراوانی ژن TEM به ترتیب 24 و 74/4 درصد گزارش گردید(20و14). همچنین در مطالعه Akpaka و همکاران، از 65 ایزوله کلبسیلابررسی شده توسط روش Multiplex PCR 84/3 درصد حاوی ژن TEM بودند(21). در ایران نیز در مطالعه ای توسط Pornour و همکاران انجام شد، 74/4 درصد ایزوله ها حامل ژن TEM بودند(15). که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد. این میزان فراوانی در باکتری های خانواده انتروباکتریاسه، در حالی است که این ژن در سایر باکتری ها کم یا بندرت دیده میشود و بنظر می رسد که این آنزیم از خانواده انتروباکتریاسه به سایر باکتری ها توسط عناصر متحرک انتقال یافته است.(22) با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، انجام تحقیقاتی مشابه در کشور ما جهت اطلاع از وضعیت سویه های مقاوم و همچنین ارائه راهکارها و تدابیر مناسب جهت جلوگیری از انتشار سویه های مقاوم ضروری می باشد. از طرفی با توجه به این که نتیجه تست فنوتیپی تاییدی 15/7 درصد و نتیجه تست ژنوتیپی 27/14 درصد می باشد، مشخص میشود که روش های فنوتیپی ضعف بالایی در شناسایی ESBL ها دارند و روش های ژنوتیپی مثل PCR روش مناسب، حساس و دقیقتری جهت شناسایی این آنزیم ها می باشند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از موسسه ایرانیان ژن فناور و پرسنل آن، که امکانات علمی و آزمایشگاهی این پروژه را فراهم نمودند، همچنین از آزمایشگاه بیمارستان میلاد و بخش میکروب شناسی به ویژه خانم اسلامی، که در جمع آوری نمونه همکاری نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.7.2]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.46]

Early Detection of blaTEM in Klebsiella Isolates by the Molecular Polymerase Chain Reaction Method

S. Bostandoost Nikoo (MSc)[1], M.H. Shahhosseini (PhD)*[2], M.R. Zolfaghari (PhD)[3], M. Rahbar (PhD)[4]

1.Azad Islamic University of Qom, Qom, I.R.Iran
2.Department of Microbiology, Azad Islamic University of Shar Qods, Tehran, I.R.Iran
3.Department of Microbiology, Azad Islamic University of Qom, Qom, I.R.Iran
4.Laboratory of the Ministry of Health and Medical Education, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 17(10);Oct 2015; PP:46-52
Received: Feb 14th 2015, Revised: May 6th 2015, Accepted: July 29th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Obtaining information regarding pathogenesis and prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing genes seems to be necessary, since it can promote prevention modalities and treatment of the infections caused by bacterias such as Klebsiella. The aim of this study was early identification of the blaTEM gene in Klebsiella, using polymerase chain reaction (PCR) technique.

METHODS: In this cross-sectional study, conducted form April to September 2013, 70 Klebsiella isolates were extracted from clinical samples (i.e., wound, urine, sputum and blood) using biochemical tests, including non-state fermentation and triple sugar iron, negative indole, motile and methyl red, as well as positive Voges–Proskauer and urease tests. Subsequently, the frequency of ESBL producing strains was determined by means of combined disk method. DNA was extracted by boiling and was investigated for the presence of TEM gene using the PCR approach.

FINDINGS: In the 70 Klebsiella isolates, 11 cases of ESBL phenotype were observed, of which 10 cases contained TEM beta-lactamase resistance gene. In addition, 9 out of 59 samples (26%) of negative ESBL in antibiogram, were determined positive in terms of blaTEM gene using PCR method.

CONCLUSION: Given the increasing prevalence of ESBL producing strains and poor diagnosis rate of antibiotic resistance through antibiogram method, applying more accurate techniques such as PCR is highly recommended.

KEY WORDS: *BlaTEM Resistance Gene, Extended Spectrum Beta-lactamases, Polymerase Chain Reaction, Antibiogram.*

Please cite this article as follows:

Bostandoost Nikoo S, Shahhosseini MH, Zolfaghari MR, Rahbar M. Early Detection of blaTEM in Klebsiella Isolates by the Molecular Polymerase Chain Reaction Method. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(10):46-52.

***Corresponding Author: M.H. Shahhosseini (PhD)**
Address: , Department of Microbiology, Azad Islamic University of Shar Qods, Tehran, I.R.Iran
Tel: +98 21 44844946
Email: shahhosseiny@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.7.2]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.46]

References

1.Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M. Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiellapneumoniaecarbapenemases. Lancet Infect Dis, 2013; 13(9):785-796.

2. Brooks G, Jawetz E, Butel J, Melnick J, Adelberg E. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. Prentice-Hall Int; 1995.p. 656.

3. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002. p.325-33.

4.Steward C, Rasheed J, Hubert S, Biddle J, Raney P, Anderson G, et al. Characterization of clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended spectrum beta-lactamase detection methods. J Clin Microbiol. 2001 Aug;39(8):2864-72.

5.Sharma J, Sharma M, Ray P. Detection of TEM & SHV genes in Escherichia coli&Klebsiellapneumoniae isolates in a tertiary care hospital from India. Indian J Med Res. 2010; 132:332-6.

6. Kaftandzieva A, Trajkovska-Dokic E, Panovski N. Prevalence and molecular characterization of extendedspectrum Beta-lactamase (ESBLs) producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Prilozi. 2011 Dec;32(2):129-41.

7. Ahmed OB, Omar AO, Asghar AH, Elhassan MM. Prevalence of TEM, SHV and CTX-M genes in Escherichia coli and Klebsiella spp Urinary Isolates from Sudan with confirmed ESBL phenotype. Life Science Journal. 2013; 10(2).

8. Masjedian, Valehi F, Talebi A, Rastegar Lari A. Evaluation of wide broad spectrum antibiotic resistance of E. coliand Klebsiella pneumonia. Iran J Med Microbiol. 2007;1(2):27-34. [In Persian]

9.Yazdi M, Nazemi A, Mirinargasi M, Khataminejad MR, Sharifi Sh, Babai kochkaksaraei M. Prevalence of SHV/CTX-M/TEM (ESBL) Beta-lactamase Resistance Genes in Escherichia Coli Isolated from Urinary Tract Infections in Tehran, Iran. Med Lab J Golestan Univ Med Sci. 2010;4(1):48-54.[In Persian]

10. Shabani AA, Ebrahimi Varkiani M, Aghaei S, Nasr R. A Survey Frequency of TEM-1 Gene In E. coli Strains Isolated from Clinical specimens in Damqan City. Microb Biotechnol J Islamic Azad Univ. 2011;3(11):15-22.[In Persian]

11. Thirapanmethee K. Extended spectrum β-lactamases: critical tools of bacterial resistance. Mahidol Univ J Pharmac Sci. 2012;39(1):1-8.

12. Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother. 2001;48(Suppl 1):59-64.

13. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Yip K, Wong SS, Que TL. CTX-M type beta-lactamases among fecal Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates in non-hospitalized children and adults. J Microbiol Immunol Infect. 2008;41(5):428-32.

14. Ehlers MM, Veldsman C, Makgotlho EP, Dove MG, Hoosen AA, Kock MM. Detection of blaSHV,blaTEM and blaCTX-M antibiotic resistance genes inrandomly selected bacterial pathogens from the Steve Biko Academic Hospital. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009; 5: 191–196.

15. Pornour M, Reza Nahae M, Mobayen H, Mobasher A. Molecullar study of tem type extended- spectrum beta-lactamase genes in Escherichia coli and klebseilla pneumoniae isolates. Med J Tabriz Univ Med Sci. 2010;32(2):30-4. [In P ersian]

16. Nathisuwan S, Burgess D, Lewis JS. Extended-spectrum beta-lactamases: epidemiology, detection, and treatment. Pharmacotherapy. 2001;21(8):920-8.

17. Galas M, Decousser J, Breton N, Godard T, Allouch P, Pina P, et al. Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum-betalactamase- producing Enterobacteriaceae in France. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(2):786-9.

18. Yan JJ, Tsai S, Chuang CL, Wu JJ. OXA-type beta-lactamases among extended-spectrum cephalosporin-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates in a university hospital in southern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 2006;39(2):130-4.

19. Yu W, Chuang Y, Walther-Rasmussen J. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. J Microbiol Immunol Infect. 2006;39(4):264-77.

20.Bali EB, Acik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV,TEM, CTX-M and extendedspectrum-lactamase produced by Escherichia coli, Acinobacter baumannii and Klebsiella isolates in a Turkish hospital. Afr J Microbiol Res. 2010;4(8):650-4.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.7.2]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.46]

21. Akpaka PE, Legall B, Padman J. Molecular detection and epidemiology of extended- spectrum beta-lactamase genes prevalent in clinical isolates of klebsiella pneumoniae and escherichia coli from Trinidad and Tobago. West Indian Med J. 2010;59(6):591-6.
22. Dubois V, Arpin C, Noury P, Andre C, Coulange L, Quentin C. Prolonged outbreak of infection due to TEM-21-producing strains of Pseudomonas aeruginosa and enterobacteria in a nursing home. J Clin Microbiol. 2005;43(8):4129-38.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.7.2]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.46]