مقاله پژوهشی

بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی وتشخیص فنوتیپی آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جداشده از نمونه‌های کلینیکی وتعیین حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک های ایمی پنم و سفتازیدیم

دکتر رسول یوسفی مشعوف *، پگاه علیجانی **، دکتر مسعود سعیدی جم ***، دکتر محمدیوسف علیخانی **** حسین رشیدی *****

دریافت : ٩٢/٣/٢٨ ، پذیرش : ٩٢/٨/٧

چکیده:

مقدمه و هدف: ازجمله مکانیسمهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های گرم منفی به خصوص سویه کلبسیلا پنومونیه، تولید آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (Extended –Spectrum β lactamase ;ESBLs) است. ژن‌های کدکننده ESBLs معمولاً روی پلاسمید قرار گرفته اند و قابلیت انتقال به سویه‌های گرم منفی دیگر را نیز دارند. به دلیل اهمیت موارد فوق، شناخت الگوی مقاومت و حساسیت آن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های β- لاکتام هدف این مطالعه قرار گرفت.

روش کار: برای انجام این مطالعه توصیفی - تحلیلی، نمونه‌های مختلف کلینیکی بیمارستانهای بروجرد و همدان در طی مدت ۶ ماه جمع‌آوری و با تستهای بیوشیمیایی و کیت انتروسیستم تعیین هویت شدند. جهت تایید سویه ها از ژن Ure D به عنوان ژن داخلی سویه کلبسیلا پنومونیه به روش PCR استفاده شد. بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن انجام شد. برای بررسی وجود ESBLs از روشPCT (Phenotypic Confirmatory Test) استفاده گردید و حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimal inhibitor concentration; MIC) آنتی‌بیوتیکهای سفتازیدیم و ایمی‌پنم به روش E- test انجام شد.

نتایج: بیشترین میزان مقاومت سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مربوط به آنتی‌بیوتیکهای سفکسیم ٤٦/٧٪، سفتریاکسون ٤٣/٣٪، آزترونام ٤٣/٣٪، سفوتاکسیم ٤١/٧٪، کوتریماکسازول ٤٠/٨٪، سفتازیدیم ٣٦/٧٪ و کمترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیکهای ایمی‌پنم ٠٪، سپیروفلوکساسین١٦/٧٪ ، سفپیم ٢٥٪ و جنتامیسین ٢٦/٧٪ بود. بشترین تعداد سویه‌های کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده از نمونه ادرار ٧٢سویه (٦٠٪) و کمترین تعداد از ترشحات چشم ١ مورد (٠/٨٪) جداسازی شدند. ٥٦ سویه ٤٦/٧٪ به‌عنوان سویه ESBLs مثبت شناخته شدند. با استفاده از نوار E- test برای آنتی بیوتیک سفتازیدیم ٦٦ سویه مقاوم ١٠ سویه نیمه حساس و ٤٤ سویه حساس شدند و با روش E- test برای آنتی بیوتیک ایمی پنم١٢٠ سویه حساس شدند.

نتیجه نهایی: شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تولید ESBLs درمناطق مورد مطالعه، نشان دهنده نیاز به غربالگری نمونه‌های کلینیکی از نظر ESBLs توسط آزمایشگاه و استفاده از آنتی‌بیوتیکهای مناسب با قدرت ممانعت‌کنندگی بتالاکتامازی و آنتی بیوتیک ها به صورت ترکیب با کلاولانیک توسط پزشکان می‌باشد.

کلید واژه ها: بتا لاکتامازها / حداقل غلطت مهار کنندگی / کلبسیلا پنومونی / مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه :

گونه‌های کلبسیلا جزء باکتریهای گرم منفی هستند که در طبیعت انتشار وسیعی دارند. آنها را در اطراف آب‌های سطحی، خاک، فاضلاب‌ها و بر روی گیاهان می‌توان یافت. با این وجود، اغلب به‌عنوان یکی از فلورهای طبیعی دستگاه تنفس و گوارش در انسان و حیوانات مطرح می‌گردند. کلبسیلا پنومونیه به‌عنوان یک میکروارگانیسم ساپروفیت در نازوفارنکس و روده انسان وجود دارد. در

* استاد گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
** کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی همدان (pegah_57@yahoo.com)
*** دانشیار گروه بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
**** دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
***** کارشناسی ارشد ایمونولوژی دانشگاه شاهد

حدود ۳۸- ۵٪ افراد جامعه ناقل این باکتری در مدفوع و ۶-۱٪ ناقل باکتری در نازوفارنکس هستند. این باکتری متداول‌ترین گونه از این جنس در ارتباط با بیماری‌های انسانی می‌باشد(۳-۱).

کلبسیلا پنومونیه و کلبسیلا اکسی توکا تقریباً عامل تمام موارد عفونت‌های مرتبط با انسان در جنس کلبسیلا هستند. هرچند که تعداد عفونت‌های ایجادشده توسط کلبسیلا پنومونیه بسیار بیشتر از کلبسیلا اکسی توکا می‌باشد. در مراکز بهداشتی شیوع عفونت‌های کلبسیلایی بیشتر از جامعه می‌باشد. پرسنل بیمارستان به میزان زیادی حامل کلبسیلا می‌باشند. طبق مطالعاتی که در سال ۱۹۷۱ صورت گرفته است، میزان حاملین کلبسیلا در بیماران بستری در حدود ۷۷٪ در مدفوع، ۱۹٪ در نازوفارنکس و ۴۲٪ بر روی دست‌های این بیماران مشاهده شد که ارتباط مستقیمی با مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها داشته به طوری که درمان قبلی با آنتی‌بیوتیک، به میزان قابل‌توجهی در اکتساب کلبسیلا توسط بیماران تأثیر گزار بوده است(۴).

از نظر بالینی، سویه کلبسیلا پنومونیه بطور وسیعی در بیماران بستری در بیمارستانها، کلونیزه می‌گردد و در افرادی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند مانند افراد دیابتی و یا بیماران با نقص ایمنی اکتسابی و افراد مسن و کودکان، بیشتر مشاهده می‌گردد(۵،۶). اپیدمیهای شدید کلبسیلایی معمولا در نوزادان و عفونتهای اندمیک بیشتر در بخش بیماران کلیوی رخ می‌دهد. با اینکه پنومونی کلبسیلایی بخش کوچکی از موارد پنومونی را تشکیل می‌دهد ولی میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا و حدود ۹۰٪ است(۷-۵). طبق گزارشات، عفونت دستگاه ادراری شایع‌ترین نوع عفونت بیمارستانی بوده، ۴۳-۲۳٪ کل عفونتهای بیمارستانی را شامل می‌شود و در بین باکتریهای گرم منفی دومین عامل عفونتهای ادراری پس از اشریشیاکلی، کلبسیلا می‌باشد. از طرفی آنتی بیوتیکهای β- لاکتام برای درمان این عفونتها از عوامل ضد میکروبی انتخابی هستند(۶،۷). تولید آنتی بیوتیکهای جدید و استفاده بی رویه از آنها در درمان بیماریهای باکتریایی باعث ایجاد مقاومتهای آنتی بیوتیکی با مکانیسمهای متفاوت گردیده‌است. از جمله این مکانیسمها تولید آنزیمهای بتالاکتامازی در باکتری هاست که از طریق هیدرولیز هسته مرکزی آنتی بیوتیک های بتالاکتام باعث غیرفعال شدن آنها می گردند. بتالاکتامازهای وسیع الطیف (Extended –Spectrum β Lactamase ; ESBLs) که جزء بتالاکتامازهای گروه A می‌باشند، باعث هیدرولیز سفالوسپورینهای وسیع الطیف و در نتیجه بروز مقاومت باکتریایی به پنی سیلین و سفالوسپورینهای نسل اول و دوم و سوم می‌شوند و توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازی مانند کلاولانیک اسید مهار می‌گردند(۸) همچنین یکی از مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های گرم منفی به خصوص کلبسیلا پنومونیه، تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف است. ژن های کدکننده ESBLs معمولاً روی پلاسمید وجود داشته و قابلیت انتقال به سویه های گرم منفی دیگر رانیز دارند. بنابراین، شناخت الگوی مقاومت و حساسیت آن نسبت به آنتی بیوتیک های بتا لاکتام در درمان و کنترل عفونتهای ناشی از این میکروارگانیسم نقش به سزایی دارد(۹). به همین علت، این مطالعه به منظور بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و حساسیت سوشهای کلبسیلا پنومونیه و میزان تولید ESBLs در باکتریهای ایزوله شده(کلبسیلا پنومونیه) در بیمارستانهای شهرستانهای بروجرد و همدان صورت گرفت.

روش کار:

جداسازی و تعیین هویت سویه‌ها: در این مطالعه توصیفی – تحلیلی حجم نمونه براساس بازه زمانی ۶ ماه محاسبه و حدود ۱۲۰ سویه کلبسیلا پنومونیه جدا شد. نمونه برداری از بیمارستانهای بروجرد و همدان صورت گرفت. نمونه‌های مختلف کلینکی شامل ادرار، خلط، خون، ، زخم ، ترشحات ریوی، مدفوع ، ترشحات چشم و مایع پلورال از بخش های عمومی، ICU، CCU، قلب، داخلی، بیماران سرپایی (OPD)، ارولوژی ، نفرولوژی و اطفال جمع آوری شدند. نمونه‌ها ابتدا بر روی محیطهای کشت بلاد آگار و ائوزین متیلن بلو(Merck ، آلمان) کشت داده شدند و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون با تستهای بیوشیمیایی استاندارد و کیت انتروسیستم(Liofilchem ، ایتالیا) تعیین هویت انجام شد. در این مطالعه ژن Ure D جهت تایید گونه کلبسیلا پنومونیه به عنوان ژن داخلی مورد استفاده قرار گرفت، این ژن مسؤل کد کردن آنزیم اوره‌آز می‌باشد که جهت هیدرولیز اوره توسط گونه کلبسیلا پنومونیه مورد استفاده قرار می‌گیرد. سپس سویه‌ها در محیط TSB Broth + Glycerin و فریزر ۷۰° C- برای مراحل بعدی نگهداری شدند.

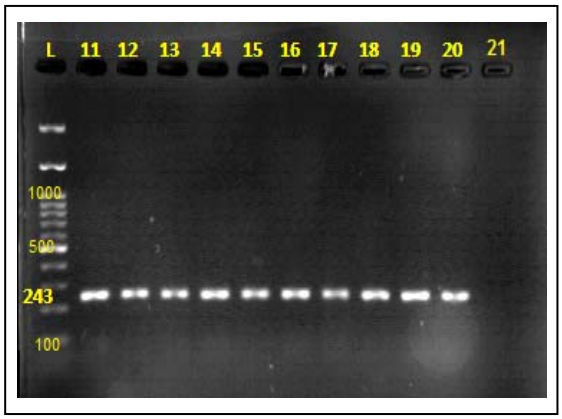
ژن Ure D بـا روش PCR در سـویه هـای کلبـسیلا پنومونیه شناسایی شـد. پرایمـر ژن مـورد نظـر از شـرکت Bioneer کره به صورت لیو فیلیزه خریداری شد که توالی آنها در زیر آورده شده است:

Ure –D F :5□-CCCGTTTTACCCGGAAGAAG - 3□

Ure –D R :5□ - GGAAAGAAGATGGCATCCTGC -3□

برای انجام واکنش PCR، مقادیر بهینـه شـده بـرای تهیـه Master Mix یـک واکـنش PCR در حجـم نهـایی ۲۵ میکرولیتـر محاسـبه شـد : بـافر PCR بـا غلظـت x۱ بـه میـزان ۲/۵میکرولیتـر، $MgCl_2$ ۲میلـی مـولار۱/۵ میکرولیتر،dNTp mix ۰/۲ میلی مولار ۰/۵ میکرولیتر، هر کـدام از پرایمرهـای F و R بـا غلظـت ۰/۵ پیکومـول بـر میکرولیتر به میـزان ۰/۵ میکرولیتـر، Taq polymeras ۵ واحدی در میکرولیتر به میزان ۰/۳ میکرولیتر و آب مقطر ۱۶/۲ میکرولیتر مورد استفاده قرار گرفت.

برنامه ریزی دستگاه ترموسـایکلر بـه شـرح زیـر بـود: دناتوراسیون اولیه در دمای C °۹۵ به مـدت ۱۸۰ ثانیـه ، دناتوراسیون ثانویه در دمای C °۹۵ بـه مـدت ۳۰ ثانیـه ، دمای آنلینگ C °۴۵ به مـدت ۴۵ ثانیـه و طویـل شـدن اولیه در دمایC °۷۲ به مدت ۶۰ ثانیه که این چرخـه هـا ۳۰ بار تکرار شد و طویل شدن ثانویه در دمای C °۷۲ بـه مدت ۶۰ ثانیه برای دستگاه ترموسایکلر تعریف شد . از ژل آگاروز ٪۲/۵ وسایز مارکر bp ۱۰۰ (Fermentas، آلمـان) و سایبرسیف (سیناژن، ایران) بـرای الکتروفـورز محـصولات PCR جهت شناسایی ژن *Ure D* با طول قطعـه bp ۲۴۳ استفاده شد (شـکل۱) . DNA کنتـرل مثبـت از انـستیتو پاستور خریداری گردید.



شکل۱: تصویر PCR ژن داخلی Ure D

طول محصول PCR (Ure D) bp 243 می باشد

L: DNA ladder 100bp ; 11: Positive control
12-20: sample ; 21: Negative control

تعیین حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی: بـه منظـور تعیـین حـساسیت آنتـی بیـوتیکی، از روش دیـسک دیفیـوژن (Kirby-Bauer Disk Diffusion Method) بر روی محیط مولرهنتـون آگـار اسـتفاده شـد. دیـسک هـای مورد استفاده از شرکت Mast و Rosco تهیه شد که شامل سـفتی زوکـسیم، سفکـسیم، سـفپیم، ایمـی پـنم، جنتامیـسین، آزترونـام، کوتریماکـسازول، سفوتاکـسیم، سفتازیدیم، سپیروفلوکساسین و سفتریاکسون بـود. نتـایج تعیـین حـساسیت پـس از انکوباسـیون در ۳۷ درجـه سـانتیگراد بـه مـدت ۲۴ سـاعت بـا اسـتفاده از جداول (Clinical and Laboratory Standard Institute) CLSI 2012 قرائت گردید.

تـشخیص تولیـد ESBL تـست تأییـد فنـوتیپی (Phenotypic Confirmatory Test): در ایـن روش براسـاس اسـتانداردهای CLSI، از دیـسک‌هـای سفوتاکـسیم ۳۰µg و سفتازیدیم µg ۳۰ در ترکیب با کلاولونیک اسید و بدون آن استفاده شد. چنانچه قطر هالـه عـدم رشـد در پیرامون دیسک‌های ترکیبی(سفوتاکـسیم/ کلاولونیـک یـا سفتازیدیم/ کلاولونیک) بیـشتر یـا مـساوی ۵ میلـی متـر نسبت به قطـر هالـه عـدم رشـد در اطـراف دیـسک‌هـای سفوتاکیـسم یـا سـفتازیدیم بـود، تـست فنـوتیپی مثبـت گـزارش مـی‌گردیـد. دیـسک هـای ترکیبـی و خـالص سفتازیدیم و سفوتاکسیم جهـت بررسـی تولیـد ESBL از شرکت Mast تهیه و بعد ازکشت سفره ای بر روی محـیط مولرهینتون آگارو انکوباسیون بـه مـدت۲۴ سـاعت در ۳۷ درجه سانتیگراد نتیجه قرائت شد.

تعیـین MIC بـا اسـتفاده از نـوار E-test: نـوار E-test دو آنتـی بیوتیـک سـفتازیدیم و ایمـی پـنم جهـت تعیـین حـداقل غلظـت مهـار کننـدگی آنتـی بیوتیـک (Minimal inhibitor concentration; MIC) بـاکتری از شرکت Liofilchem ایتالیا تهیه شد. ایـن نـوار پلاسـتیکی بـا شـیب غلظتـی آنتـی بیوتیـک پوشـانده شـده اسـت. زمـانی کـه ایـن نـوار روی سـطح محـیط کـشت آگـار کـه بـاکتری بـه صـورت سـفره‌ای کـشت داده شـده قرار می‌گیرد مانند روش دیسک دیفیوژن آگـار، بلافاصـله آنتی بیوتیک براساس شیب غلظتی شروع بـه انتـشار روی پلیت کرده و پس از ۲۴-۱۶ ساعت هاله عـدم رشـد تخـم مرغی شکلی در طول نوار تـشکیل مـی‌شـود ، جـایی کـه ابتدای بیضی نوار را قطع می کند MIC محسوب می‌شود.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ و از آزمونهای فراوانی و مجذور کای استفاده شد.

نتایج:

در این مطالعه، ۱۲۰ سویه کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های کلینیکی جداسازی و مورد بررسی قرار گرفتند. از لحاظ جنسیت ۵۷ نمونه (۴۷/۵٪) از بیماران مذکر و ۶۳ نمونه (۵۲/۵٪) از بیماران مونث بودند. سایر نتایج به تفکیک نوع نمونه و محدوده سنی و بخش جدا شده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: فراوانی سویه های کلبسیلا پنومونیه بر اساس نمونه های بالینی ،محدوده سنی و بخشهای مختلف بیمارستان های مورد مطالعه

نوع نمونه	تعداد(درصد)	نام بخش	تعداد(درصد)	سن(سال)	تعداد(درصد)
ادرار	۷۲(۶۰)	آی سی یو	۱۹ (۱۵/۸)	۰-۱۰	۲۹ (۲۴/۲)
ترشحات چشم	۱ (۰/۸)	سی سی یو	۱۷ (۱۴/۲)	۱۱-۲۰	۳ (۲/۵)
زخم	۳ (۲/۵)	بیماران سرپائی	۴ (۳/۳)	۲۱-۳۰	۸ (۶/۷)
تراشه	۹ (۷/۵)	داخلی	۱۸ (۱۵)	۳۱-۴۰	۷ (۵/۸)
خون	۲۵ (۲۰/۸)	قلب	۱۴ (۱۱/۷)	۴۱-۵۰	۱۱ (۹/۲)
مایع پلورال	۴ (۳/۳)	اورولوژی	۱۳ (۱۰/۸)	۵۱-۶۰	۷ (۵/۸)
مدفوع	۶ (۵)	نفروروژی	۹ (۷/۵)	۶۱-۷۰	۱۲ (۱۰)
		اطفال	۲۶ (۲۱/۷)	۷۱-۸۰	۲۱ (۱۷/۵)
				۸۱-۹۰	۲۲ (۱۸/۳)
مجموع	۱۲۰(۱۰۰)		۱۲۰(۱۰۰)		۱۲۰(۱۰۰)

نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی نشان می‌دهد که تمامی سوش های کلبسیلا پنومونیه نسبت به ایمی پنم حساس می باشند و بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفکسیم (۴۶/۷٪) می باشد (جدول ۲).

جدول ۲ : الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی کل سویه‌های کلبسیلا پنومونیه

	حساس(٪)	نیمه حساس(٪)	مقاوم(٪)	مجموع(٪)
سفکسیم	۵۲/۵	۰/۸	۴۶/۷	۱۰۰
سفتریاکسون	۵۲/۵	۴/۲	۴۳/۳	۱۰۰
آزترونام	۵۵	۱/۷	۴۳/۳	۱۰۰
سفوتاکسیم	۵۴/۲	۴/۲	۴۱/۷	۱۰۰
کوتریماکسازول	۵۵/۸	۳/۳	۴۰/۸	۱۰۰
سفتازیدیم	۵۵	۸/۳	۳۶/۷	۱۰۰
سفتی زوکسیم	۵۸/۳	۱۴/۲	۲۷/۵	۱۰۰
جنتامایسین	۷۱/۷	۱/۷	۲۶/۷	۱۰۰
سفپیم	۶۵	۱۰	۲۵	۱۰۰
سیپروفلوکسازین	۷۴/۲	۹/۲	۱۶/۷	۱۰۰
ایمی پنم	۱۰۰	۰	۰	۱۰۰

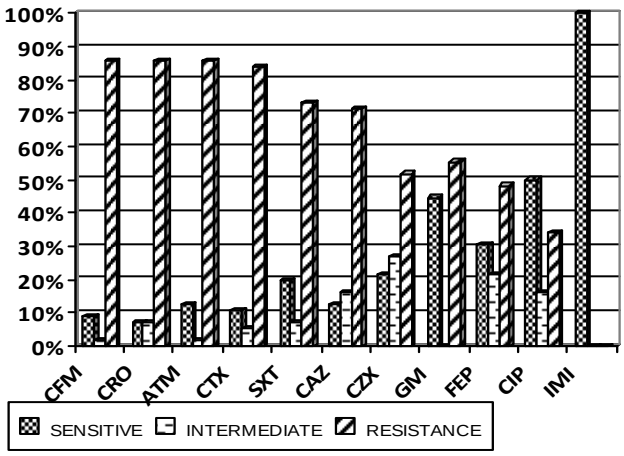
آزمون PCT با دیسکهای ترکیبی سفتازیدیم و سفوتاکسیم با کلاولانیک اسید نشان داد که ۵۶ سویه (۴۶/۷٪) تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف می‌باشند. از مجموع ۵۶ سویه تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز، ۵۰ سویه (۸۹/۲۸٪) بطور مشترک با هردو دیسک ترکیبی، ۲ سویه (۳/۵۷٪) از طریق دیسک ترکیبی سفتازیدیم و کلاولانیک اسید و ۴ سویه (۷/۱۴٪) از طریق دیسک ترکیبی سفوتاکسیم و کلاولانیک اسید بعنوان تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز مشخص شدند.

همانطور که جدول ۳ نشان می دهد، بیشترسویه‌های تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز مربوط به نمونه‌های ادراری و از بخش های اطفال و ICU و در محدوده سنی ۱۰- ۰ و ۹۰- ۸۰ سال می باشند. و در ضمن از ۵۶ سویه ، ۲۸ سویه(۵۰٪) مربوط به بیماران مذکر و ۲۸ سویه(۵۰٪) مربوط به بیماران مونث بودند.

جدول ۳: فراوانی سویه های کلبسیلا پنومونیه بر اساس نمونه های بالینی ،محدوده سنی و بخشهای مختلف بیمارستان های مورد مطالعه در سویه های تولیدکننده ESBLs

نوع نمونه	تعداد(درصد)	نام بخش	تعداد(درصد)	سن(سال)	تعداد(درصد)
ادرار	۳۱ (۵۵/۴)	آی سی یو	۱۰ (۱۷/۹)	۰-۱۰	۱۳ (۲۳/۳)
زخم	۱ (۱/۸)	سرپائی	۲ (۳/۶)	۱۱-۲۰	۳ (۵/۴)
ترشحات ریوی	۳ (۵/۴)	سی سی یو	۶ (۱۰/۷)	۲۱-۳۰	۳ (۵/۴)
خون	۱۳ (۲۳/۲)	اطفال	۱۲ (۲۱/۴)	۳۱-۴۰	۳ (۵/۴)
مدفوع	۴ (۷/۱)	داخلی	۹ (۱۶/۱)	۴۱-۵۰	۶(۱۰/۸)
ترشحات چشم	۱ (۱/۸)	اورولوژی	۵ (۸/۹)	۵۱-۶۰	۳ (۵/۴)
مایع پلورال	۵ (۵/۴)	نفروروژی	۳ (۵/۴)	۶۱-۷۰	۷ (۱۲/۵)
		قلب	۹ (۱۶/۱)	۷۱-۸۰	۷ (۱۲/۵)
				۸۱-۹۰	۱۱ (۱۹/۶)
مجموع	۵۶(۱۰۰)		۵۶(۱۰۰)		۵۶(۱۰۰)

درشکل ۲ نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی در سویه های ESBLs مثبت نشان داده شده است.



شکل ۲: الگوی مقاومت سویه‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده ESBLs

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی سـویه هـای مقـاوم و نیمه مقاوم و حساس بـه سـفتازیدیم و ایمـی‌پـنم بطـور خلاصه در جدول ۴ آورده شـده اسـت نتـایج MIC نـشان می‌دهد این مقدار برای سویه‌های حساس بـه ایمـی‌پـنم و سفتازیدیم اکثرا ۰/۱۳ تا ۰/۲۵ و بـرای سـویه‌هـای نیمـه مقاوم به سفتازیدیم ۶ تا ۱۶ و برای سویه‌هـای مقـاوم بـه سفتازیدیم ۱۶ تا ۲۴ می باشد.

جدول۴: فراوانی حداقل غلظت مهارکنندگی سویه های کلبسیلا پنومونیه نسبت به دو آنتی بیوتیک سفتازیدیم و ایمی پنم

غلظت MIC (µg/ml)	ایمی پنم ۰/۰۰۲-۳۲			سفتازیدیم ۰/۰۱۶-۲۵۶		
وضعیت‌حساسیت MIC (µg/ml)	مقاوم ≥ ۱۶	نیمه حساس ۵ -۱۵	حساس ≤ ۴	مقاوم ≤ ۱۴	نیمه حساس ۱۴ -۱۷	حساس ≥ ۱۸
تعداد (درصد)	-	-	۱۲۰ (۱۰۰)	۴۰ (۳۳/۳)	۱۶ (۱۳/۳)	۶۴ (۵۳/۴)

بحث:

تولید ESBLs با ایجاد سویه‌های باکتریـایی مقـاوم بـه درمـان بـه عنـوان یـک تهدیـد بـزرگ بـرای مـصرف سفالوسپورین‌های وسیع الطیف و درمان این نوع عفونتهـا به شمار می رود(۱۰،۱۱).

در این مطالعه تعداد۵۶ سـویه (۴۶/۷٪) ایزولـه شـده تولیدکننده ESBLs بودند کـه از ایـن تعـداد ۲۸ سـویه از افراد مذکر(۵۰٪) و ۲۸ سویه از افـراد مونـث (۵۰٪) جـدا شده بودند. در حالی که تحقیق احمد خورشیدی در سـال ۱۳۸۸ نشان داد که ۳۲٪ سوش هـای کلبـسیلا پنومونیـه تولیدکننده ESBLs هستند و از این میان ۵۲/۵٪ بیماران مذکر و ۴۷/۵٪ مونث بودند(۱۲). که نشان دهنده آن است که در طـی ایـن چنـد سـال میـزان سـویه‌هـای کلبـسیلا پنومونیه تولیدکننده ESBLs رو به افرایش بوده و از لحاظ جنسیت تفاوت چندانی نکرده یا ندارد.

همچنین در طـی سـالهای گذشـته نیـز مطالعـاتی در سراسر دنیا و از جمله ایـران در ایـن زمینـه انجـام گرفتـه است که درصد و شیوع سویه‌هـای تولیـد کننـده ESBLs در سویه هـای کلبـسیلا پنومونیـه را ایـن چنـین گـزارش کرده‌اند: در ژاپن۴۰٪(۱۳) آمریکا ۴۴٪ (۱۴) فرانسه ۳۰ تا ۴۰٪ (۱۵) جنوب شرقی آسیا ۲۰ تا ۶۰٪ (۱۶) هلند ۴۰٪ و سوئد ۳٪ (۱۷) در اصفهان ۷۰٪ (۱۸) تهـران ۷۶٪ (۱۹) در سال ۱۳۸۷ در شهرکرد ۲۰/۲٪ (۲۰) و در سـال ۱۳۸۶ در تهران ۳۸٪ (۲۱). با توجه به این گزارشات به نظـــر می رسد که میزان شیوع سویه‌های تولید کننـده ESBLs در سویه های کلبسیلا پنومونیه در شهرستانهای بروجرد و همدان نیز تقریبا نزدیک بـه سـطح جهـانی بـوده ولـی از بعضی نقاط ایران کمتراست که احتمالا بدلیل مصرف آنتی بیوتیکها توسط بیماران تحت نظر پزشک و انجام تستهای آنتی بیوگرام خصوصا در مورد نمونـه‌هـای ادراری قبـل از مصرف آنتی بیوتیکها می باشد.

به نظرمی‌رسد این آمار متفاوت در شـیوع سـویه‌هـای تولیدکننـده ESBLs بـه ایـن دلیـل باشـد کـه شـیوع ارگانیسمهای مولد این آنزیم ها در مناطق مختلف بستگی به میزان شیوع آنها در حیوانات و ناقلین مـدفوعی انـسانی دارد که به عنوان مخازن این ارگانیسمها می‌باشـند و مـی توانند از طریق تماس با این مخازن و یا زنجیره های غذایی از طریق حیوانات به دیگر انسانها منتقـل شـوند. همچنـین می تواند بدلیل ظهور کلونیهای مقـاوم باکتریـایی و مولـد بتالاکتامازهای وسیع الطیف دریک منطقه و الگوی درمانی سفالوسپورینی بخصوص سفالوسپورین‌های وسـیع الطیـف در درمان بیماری‌های گوناگون عفونی در منـاطق مختلـف باشد که منجر به ایجاد و افزایش سویه‌های باکتریایی تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف می گردند (۲۲،۲۳).

۵۵/۴٪ سـوش هـای کلبـسیلا پنومونیـه جداشـده از نمونه‌های ادراری تولیدکننده ESBLs بودند. درحـالی کـه در مطالعه عامر و همکاران در سال۲۰۰۳ در حـدود ۵۲٪ گزارش شده است(۲۴).

همچنین۲۳/۲٪ سوش های ایزوله شده از خون مولـد ESBLs بودند که نـسبت بـه بررسـی جـارلیر و همکـاران درسال ۱۹۸۸ که ۱۸٪ سوش‌های جداشده از خون را مولد ESBLs گزارش کرده بودند(۲۵) نشان دهنده افـزایش آن در طی این دو دهه اخیر بوده است.

مـصرف زیـاد آنتـی بیوتیـک خـصوصاً سـفتازیدیم و سفوتاکسیم، بستری شدن به مـدت طـولانی در بخـشهای مختلـف از جملـه داخلـی و ICU و اسـتفاده از ابزارهـای پزشکی آلوده مانند کاتترهای وریدی و ادراری، تراشه‌هـای تنفسی، بنـت‌هـای ICUT، دسـتگاه دیـالیز و ... از عوامـل مـسبب بـروز سوشـهای ESBLs مثبـت هـستند(۲۶) و مطالعـه حاضـر نیـز نـشان مـی دهـد کـه ایـن فاکتورهـا می توانند ازعوامل بروزسویه هـای تولیـد کننـده ESBLs در سویه‌های کبسیلا پنومونیه محسوب گردند.

سوش‌های باکتریایی تولیدکننده ESBLs ، معمـــولاً

سوش هایی با مقاومت چندگانه آنتـی بیـوتیکی هـستند. کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده ESBLs بیشتر به کوینولونها مقاومت دارد(۲۷،۲۸) در مطالعـه اخیـر نیـز از ۵۶ نمونـه تولیدکننـده ESBLs ، ۱۹ نمونـه(۳۳/۹۲٪) عـلاوه بـر سفتازیدیم به سپیروفلوکساسین نیز مقاومـت داشـتند. در مطالعه لوتن باخ ۱۵ نمونه از ۲۵ نمونـه ESBLs مثبـت یعنی ۶۰٪ به فلوروکوینیولون ها نیز مقاوم بودنـد(۲۷) کـه این نشان می دهد سویه های تولید کننـده ESBLs اکثـرا سویه‌هایی با مقاومت چندگانه می‌باشند.

نتیجه نهایی:

شیوع بالای مقاومت آنتـی‌بیـوتیکی و تولیـد ESBLs درمناطق مورد مطالعه، نـشان دهنـده نیـاز بـه غربـالگری نمونه‌های کلینیکـی از نظـر ESBLs توسـط آزمایـشگاه و استفاده از آنتـی‌بیوتیکهـای مناسـب بـا قـدرت ممانعـت-کنندگی بتالاکتامازی و آنتی بیوتیک ها به صورت ترکیـب با کلاولانیک توسط پزشکان می‌باشد. طی سالهای اخیر با افزایش سویه های مقـاوم بـه آنتـی بیوتیـک هـا مواجـه هستیم که منجر به افـزایش مـشکلات درمـانی و هزینـه های درمانی میشود. آلودگی‌زدایی محیط و استریلیزاسیون صحیح محیط بیمارستانی، رعایت بهداشت توسط پرسـنل بهداشـتی – درمـانی، الگـوی صـحیح بـرای مـصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، عدم خوددرمانی و یا درمان‌های نـاقص بـا آنتی‌بیوتیک‌ها، محدود نمودن استفاده از سفالوسپورین‌های وسیع الطیـف، اسـتفاده از داروهـای ترکیبـی ماننـد یـک داروی بتالاکتام با یک آمینوگلیکوزید یا کینولون یا داروی مقاوم به بتالاکتاماز، آگاهی پزشکان در ارتبـاط بـا میـزان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، از جمله راهکارهایی هستند که مـی‌تواننـد بـرای کنتـرل و پیـشگیری از عفونـت‌هـای ناشی از ارگانیسم‌های تولیدکننـده $ESBL_s$ بـه‌کـار گرفتـه شوند.

سپاسگزاری:

ایـن مقالـه برگرفتـه از پایـان نامـه کارشناسـی ارشـد میکروبیولوژی مصوب دانشگاه علوم پزشکی همدان میباشد و بدین وسیله از آقای دکتر محمدرضا عربستانی و پرسـنل محتـرم آزمایـشگاه میکـروب شناسـی دانـشکده پزشـکی دانشگاه علوم پزشکی همـدان و بیمارسـتانهای شهرسـتان بروجرد و همدان بخصوص سرکار خانم روح انگیز افتخاری که مـا را در انجـام ایـن تحقیـق یـاری نمـوده انـد تـشکر می نماییم.

منابع :

1. Janda JM, Abbott SL. Theenterobacteria. New York: Lippincott- Raven, 1998:110-30.
2. Murray PR. Manual of clincal microbiology. 8th ed. Washington: ASM press, 2003.
3. Umeh O. Klebsiella infection.Availebel from: http://emedicinecom. 2006; 27: 240-60.
4. Selden R, Lee S. Nosocomial Klebsiella infection: Intestinal colonization as a reservoir. Ann Intern Med 1971;74:657-64.
5. Feizabadi MM, Mohammadi-Yeganeh S, Mirsalehian A, Azimi P, Mirafshar SM, Mahboobi M, et al. Genetic characterization of ESBL-producing strains of Klebsiella pneumoniae from Tehran hospitals. J Infect Dev Ctries2010; 4(10): 609-15.
6. Shahcheraghi F, Moezi H. [Broad-spectrum beta-lactamase enzymes in K. pneumoniae strains isolated from clinical samples in Tehran hospitals]. Q Infect Dis Trop Med Assoc 2007; 39(12):60-57. (Persian)
7. Babypadmini S, Appalaraju.B. Extended spectrum β-lactamases in urinary isolated of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae prevalence and susceptibility pattern in tertiary care hospital. Indian J Med Microbiol 2004; 22(3): 72-4.
8. Mesa RJ. Extended-spectrum β-lactamase producing Enterobacteriaceae in different vironments (humans, food, animal farms and sewage). J Antimicrob Chemother 2006; 58(1):211-5.
9. Gniadkowski M, Schneider I, Jungwirth R, Hryniewicz W, Bauernfeind A. Ceftazidime resistance Enterobacteriaceae isolates from three polish hospitals : Indentification of three novel TEM and SHV-5 type extended -spectrum β-lactamase. Antimicrob Agents Chemother1998; 42:514-20.
10. Kliebe C, Nies JF, Meyer RM, Neutzling T, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1985;28:302-7.
11. Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. Infection 1983; 11:315-7.
12. Khorshidi A, Moazen Z, Rohani M, Moniri R, Shajari Gh, Mousavi Gh. [Prevalence of TEM1 and SHV1 genes in Beta-Lactamase-producing Kelebsiella pneumoniae].J Military Med 2009; 11(3):149-53. (Persian)
13. Hawkey PM. Prevalence and locality of extended spectrum B-lactamases in Asia. Clin Microbiol Infect 2008;14(Supl1):159-65.
14. Patzer J, Dzierzanowska D, Pawinska A, Turner P. High activity of meropenem against gram-negative bacteria from a pediatric intensive care

unit, 2001-2005. Int J Antimicrob Agents 2007; 29(3):285-8.
15. Sirot D, Goldstein F, Soussy C. Resistance to cefotaxime and seven other beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: A 3-year survey in France. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36(8):1677-81.
16. Pitout J. Multiresistant Enterobacteriaceae: New threat of an old problem. Expert Rev Anti Infect Ther 2008; 6(5):657- 69.
17. Canton R, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F. Prevalence and spread of extended-spectrum b-lactamases producing Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect 2008; 14(1):144-53.
18. Jazi Msjdyan F, Valle F, Talebi A, Rstgarlary A. [Molecular evaluation of resistance to broad spectrum antibiotics in E.coli and Kelebsiella pneumoniae]. Iranian J Med Microbiol 2007; 1 (2):24-7. (Persian)
19. Myrsalyhan A, Akbari Nakhjavani F, Pymani A, Jebelameli F, Myrafshar S, Hamidian M.[Evaluation of frequency of broad-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in ICU]. J Med Tehran Univ Med Sci 2007; 65(1): 8 -33. (Persian)
20. Torshizi R, Zaman Zad B, Mokhtarian K, Karimi A. [Study frequency of prevalence of CTX-M genes in ESBL-producing intestinal bacteria by polymerase chain reaction method (PCR)]. J Shahrekord Univ Med Sci 2011; 13(3): 9-17. (Persian)
21. Nasehi L, Shahcheraghi F, Sadat Nikbin V, Nematzadeh S. PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae isolated from Tehran, Iran. Iranian J Basic Med Sci 2010; 13(3):111-18.
22. Riano I, Moreno M, Teshager T, Senz Y, Domnguez L, Torres C. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in Salmonella enterica strains of healthy food animals in Spain. J Antimicrob Chemother 2006; 58(4):844-7.
23. Valverde A, Coque T, Sgnchez-Moreno M, Rollgn A, Baquero F, Cantn R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. J Clin Microbiol 2004;42(10):4769-75.
24. Aamer A, Fariha H, Safia A. Prevalance of extended -spectrum β-lactamase in nosocomial and outpatient. Pakistan J Med Sci 2003; 9(3):187-91.
25. Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Philippon A. Extended-spectum β-lactamase conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in Enterobacteriaceae :hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988; 10: 867-78.
26. Lucet J, Chevert S, Vanjak D, Decre D, Macrez A, Wolff M. Outbreak of multiple resistance Enterobacteriaceae in an intensive care unit : Epidemiology and risk factor acquisition. Clin Infect Dis 1996; 22:430-6.
27. Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH, Fishmen NO. Epidemiological investigation of fluroquinolones resistance in infection due to extended -spectum β-lactamase -producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Clin Infect Dis 2001; 33:1288-94.
28. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H A, Von Gottberg A, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended -spectrum β-lactamase production in klebsiella pneumoniae isolates causing bacteremia 2000. Clin Infect Dis 2000; 30:473-8.

Original Article

Study of Antibiotic Resistance Pattern and Phenotypic Detection of ESBLs in Klebsiella Pneumoniae Strains Isolated from Clinical Samples and Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Imipenem and Ceftazidim Antibiotics

R. Yousefi Mashouf, Ph.D.[*]; P. Alijani, M.Sc.[**]; M. Saidijam, Ph.D.[***]
M.Y. Alikhani, Ph.D.[****]; H. Rashidi, M.Sc.[*****]

Received: 18.6.2013 Accepted: 29.10.2013

Abstract

Introduction & Objective: One of the mechanisms of antibiotic resistance in gram negative bacteria, particularly Klebsiella pneumonia strains, is the production of Extended-Spectrum β lactamase enzymes (ESBLs). Encoding genes of ESBLs are usually located on the plasmid and they are able to transfer to other gram-negative bacteria. Thus, due to the importance of resistance pattern recognition and its sensitivity to the β- lactam antibiotics, the above mentioned issue was examined in this study.

Materials & Methods: In this study different clinical samples of Boroujerd and Hamadan Hospitals during 6 months were collected and identified by biochemical tests and Enterosystem kit. To confirm the strains, the *Ure D* gene was used as the internal gene of *Klebsiella pneumoniae* by PCR method. Antibiotic resistance by Disk diffusion method was performed. Phenotypic confirmatory test was used to determine the presence of ESBLs. MIC antibiotics of Ceftazidime and imipenem by E test method were determined.

Results: The results showed that the highest rate of Klebsiella pneumoniae strains resistance was related to Cefexime antibiotics 46.7%, Ceftriaxone 43.3%, Azthrunam 43.3%, Cefotaxime 41.7%, Cotrimaksazol 40.8% , Ceftazidim 36.7% and the least resistance was related to antibiotics Imipenem 0% Sprofluksasin 16.7%, Cefepime 25% and Gentamicin 26.7%. 56 strains(46.7%) were identified as ESBL –positive strains. Using E-test strip for Ceftazidim antibiotic, 66 strains were resistant , 10 strains intermediate ,and 44 strains were sensitive to Ceftazidim and by E test method for Imipenem antibiotic ,120 strains were sensitive.

Conclusion: The high prevalence of antibiotic resistance and ESBLs production in the cities which were studied indicates the need for screening of ESBLs in clinical samples by laboratory and prescribing appropriate antibiotics with β-lactamase inhibitory power and antibiotics together with clavulanic by physicians.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2014; 20 (4):295-302)

Keywords: Antibiotic Resistance / beta-Lactamases / Klebsiella Pneumoniae
Minimal Inhibitor Concentration

---

* Professor, Department of Microbiology, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
** M.Sc. in Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran. (pegah_57@yahoo.com)
*** Associate Professor, Department of Biotechnology, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
**** Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
***** M.Sc. in Immunology, Shahed University, Tehran, Iran