

## فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف در بین ایزوله های اشریشیاکلی یوروپاتوزنیک بیمارستان ابن سینای شهرستان دلفان، استان لرستان

غلامرضا گودرزی<sup>۱</sup>، سمیه مومنی مفرد<sup>۲\*</sup>، پگاه شکیب<sup>۳</sup>

۱- استادیار، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی و گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۲- کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۳- کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

یافته / دوره شانزدهم / شماره ۲ / تابستان ۹۳ / مسلسل ۶۰

### چکیده

پذیرش مقاله: ۹۳/۵/۱۲

دریافت مقاله: ۹۳/۳/۲

**\* مقدمه:** شایع ترین علت مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام در اشریشیاکلی، تولید آنزیم های بتالاکتاماز می باشد. متأسفانه دسته ای از این آنزیم ها، به نام "بتالاکتامازهای وسیع الطیف" (ESBLs) قادرند سفالوسپورین های نسل سوم جدید و آنتی بیوتیک آزترونام را نیز غیر فعال کنند. مطالعات متعددی در ایران و سایر نقاط جهان، فراوانی ESBLs را گزارش کرده اند. لذا هدف از این مطالعه، تعیین حساسیت میکروبی و فراوانی ESBLs در بین ایزوله های اشریشیاکلی یوروپاتوزنیک شهرستان دلفان، لرستان در سال ۱۳۹۱ بود.

**\* مواد و روش ها:** در مطالعه حاضر، ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی یوروپاتوزنیک از بیماران بستری در بیمارستان ابن سینای شهرستان دلفان جمع آوری و تعیین هویت شد. حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها به روش انتشار از دیسک بر روی محیط مولر - هینتون آگار ارزیابی گردید. بررسی فنوتیپی تولید ESBLs در بین ایزوله های مورد آزمایش، با استفاده از از دیسک های سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفودوکسیم به تنهایی و در ترکیب با کللولونیک اسید (دیسک ترکیبی) انجام پذیرفت.

**\* یافته ها:** در بین ۱۰۰ ایزوله جمع آوری شده، بیشترین میزان مقاومت به آمپی سیلین (۸۵٪) و هیچ مقاومتی به ایمپ پنم دیده نشد. همچنین نتایج آزمون دیسک ترکیبی نشان داد که ۸۰٪ ایزوله ها ESBLs مثبت می باشند.

**\* بحث و نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان می دهد که فراوانی ESBLs در شهرستان دلفان بالاست. لذا شناسایی ایزوله های ESBLs مثبت توسط آزمایشگاه های میکروب شناسی به روش دیسک ترکیبی، و تا حد ممکن، پرهیز از درمان تجربی بیماران بستری می تواند کارایی آنتی بیوتیک های بتالاکتام را ارتقاء بخشد.

**\* واژه های کلیدی:** بتالاکتامازهای وسیع الطیف، اشریشیاکلی یوروپاتوزنیک، آنتی بیوتیک های بتالاکتام.

\* آدرس مکاتبه نویسنده مسئول: خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی.

پست الکترونیک: somayemomeni64@yahoo.com

## مقدمه

اشریشیاکلی یکی از شایع‌ترین عوامل باکتریایی است که از عفونت‌های انسانی جدا شده و باعث عفونت ادراری، گوارشی، مننژیت و غیره می‌شود. این باکتری یکی از پاتوژن‌های فرصت طلب بیمارستانی است که به علت کسب پلاسمیدهای مختلف، به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها (پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، مونوباکتام‌ها و کارباپنم‌ها) مقاومت نشان می‌دهد. مکانیسم اصلی مقاومت این باکتری به بتالاکتام‌ها، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشد که باعث هیدرولیز حلقه بتالاکتام این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌گردد.

بتالاکتام‌های وسیع الطیف (ESBLs)<sup>۱</sup> شامل تعدادی از آنزیم‌های بتالاکتاماز جهش یافته است که باعث هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مهمی چون سفالوسپورین‌های نسل سوم و مونوباکتام‌ها می‌شوند (۱،۲). از خصوصیات بارز ESBLs، مهار فعالیت آنها در حضور کلونولونیک اسید (مهارکننده بتالاکتامازی) می‌باشد؛ لذا از این خاصیت به عنوان تست تأییدی (فنوتیپی) در ردیابی آزمایشگاهی ESBLs استفاده می‌گردد. بطوریکه، ایزوله باکتریایی که مقاوم به یکی از سفالوسپورین‌های نسل سوم (سفتاکسیم، سفتریاکسون، سفیکسیم، سفتازیدیم و ...) باشد و تولید بتالاکتاماز آن در حضور کلونولونیک اسید مهار گردد به عنوان ایزوله تولیدکننده ESBLs تلقی می‌گردد. در دهه اخیر، تولید ESBLs در اشریشیاکلی و سایر اعضای خانواده انتروباکتریاسه در کشورهای مختلف از جمله ایران گسترش یافته است.

برخی از مطالعات، شیوع سویه‌های اشریشیاکلی و کلبسیلای مقاوم به سفالوسپورین‌های وسیع الطیف، با واسطه ESBLs را در ایران بین ۶۷-۱ درصد گزارش کرده‌اند (۳،۴). این در حالی است که بتالاکتام‌ها، درصد بالایی از آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در پزشکی را به خود اختصاص می‌دهند. متأسفانه

این آنزیم‌ها اغلب بوسیله پلاسمیدهایی حمل می‌شوند که همچنین حاوی ژن‌هایی برای مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، سولفونامیدها، فلوروکوئینولون‌ها و غیره نیز می‌باشند. با توجه به اهمیت موضوع و عدم وجود اطلاعات مستند در خصوص فراوانی بتالاکتام‌های وسیع الطیف در شهرهای مختلف استان لرستان، بررسی فراوانی ESBLs در ایزوله‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران بستری در شهرستان دلفان هدف از این مطالعه بوده است.

## مواد و روش‌ها

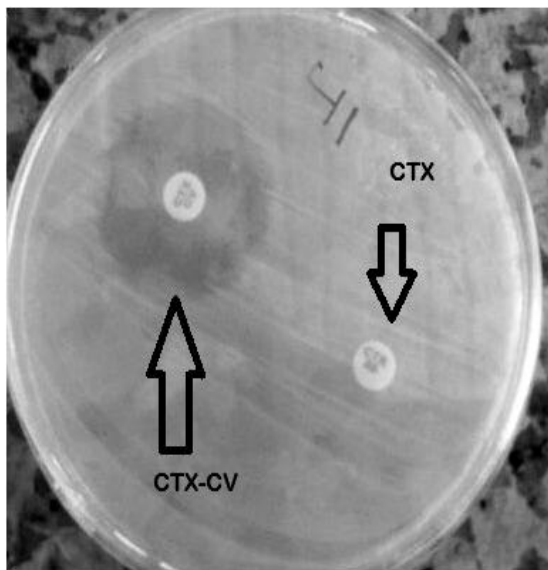
**جداسازی و تشخیص ایزوله‌ها:** در این مطالعه، ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک از مبتلایان به عفونت ادراری بستری شده در بیمارستان ابن سینا شهرستان دلفان لرستان در یک دوره ۸ ماهه در سال ۱۳۹۱ جداسازی شدند. کلیه ایزوله‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد بیوشیمیایی از جمله تست‌های چون سیمون سیترات، MR، VP، TSI و SIM تعیین هویت گردیدند (۵).

**تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی:** حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها، به روش انتشار از دیسک (کری-بائر) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) و بر اساس دستورالعمل‌های (CLSI)<sup>۲</sup> انجام پذیرفت. نتایج آنتی‌بیوگرام پس از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از جداول مؤسسه استاندارد فوق قرائت گردید (۶). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده در این مطالعه که شامل جنتامیسین (۱۰μg)، آمیکاسین (۳۰μg)، نیتروفوران-تئوین (۳۰۰μg)، آمپی‌سیلین (۱۰μg)، ایمی‌پنم (۱۰μg)، سفتازیدیم (۳۰μg)، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول (۱.۲۵/۲۳.۷۵μg)

1. Extended-Spectrum Beta-lactamase

2. Clinical and Laboratory Standards Institute

فراوانی ایزوله‌های  $ESBLs^+$  از ۱۰۰ ایزوله اشریشیا کلی یوروپاتوزنیک مورد آزمایش، ۸۰ ایزوله (۸۰٪) فنوتیپ  $ESBLs^+$  و ۲۰ ایزوله (۲۰٪) فنوتیپ  $ESBL^-$  داشتند (شکل ۱). فراوانی ایزوله‌های  $ESBLs^+$  به تفکیک آنتی بیوتیک‌های مورد آزمایش در جدول خلاصه شده است.



شکل ۱. تست تأییدی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف ( $ESBLs$ ).  
 $CTX =$  سفوتاکسیم؛  $CTX-CV =$  سفوتاکسیم / کلاولونیک اسید (دیسک ترکیبی)

### بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده از تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی مطالعه ما در شهرستان دلفان، بیشترین مقاومت را به آمپی‌سیلین (۸۵٪)، تری متوپریم - سولفامتوکسازول (۷۲٪) و سیپروفلوکساسین (۵۵٪) و همچنین بیشترین حساسیت را به ایمپنم (۱۰۰٪) و نیتروفورانتوئین (۹۷٪) نشان داد که با نتایج مطالعات قبلی همخوانی داشت (۸).

سیپروفلوکساسین (۵μg)، سفوتاکسیم (۳۰μg)، سفودوکسیم (۳۰μg)، سفتریاکسون (۳۰μg) و آزترونام (۳۰μg) بود از شرکت Mast انگلیس با واسطه شرکت تجاری میکروب شناسی راین تهیه گردید.

### غربالگری و تأیید ایزوله‌های تولید کننده

بتالاکتامازهای وسیع الطیف (فنوتیپ  $ESBLs^+$ ): ابتدا از سوسپانسیون باکتریایی (معادل نیم مک فارلند) ایزوله‌های مقاوم به یکی از سفالوسپورین‌های نسل سوم، بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس سه دیسک سفنازیدیم، سفوتاکسیم و سفودوکسیم و همچنین سه دیسک ترکیبی آنها با کلاولونیک اسید (سفنازیدیم/کلاولونیک اسید، سفوتاکسیم/کلاولونیک اسید و سفودوکسیم/کلاولونیک اسید) با فاصله مناسب بر روی محیط کشت مذکور قرار گرفت. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد. چنانچه اختلاف قطر هاله مهار رشد اطراف یکی از دیسک‌های ترکیبی (حاوی کلاولونیک اسید) نسبت به دیسک تنها (فاقد کلاولونیک اسید)، بیشتر مساوی ۵ میلی‌متر بود، ایزوله مورد نظر به عنوان فنوتیپ  $ESBLs$  مثبت در نظر گرفته می‌شد (شکل ۱) (۶،۷).

### یافته‌ها

#### الگوی حساسیت میکروبی: در این بررسی، ۳۹٪، ۳٪، ۳٪،

۸۵٪، ۰٪، ۸۲٪، ۷۲٪، ۵۵٪، ۴۷٪، ۵۸٪، ۵۵٪ و ۶۰٪ از ایزوله‌ها به ترتیب نسبت به جنتامیسین، آمیکاسین، نیتروفورانتوئین، آمپی‌سیلین، ایمپنم، سفنازیدیم، تری متوپریم-سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم، سفودوکسیم، سفتریاکسون و آزترونام مقاومت نشان دادند.

جدول ۱. فراوانی ایزوله‌های اشریشیاکلی  $ESBLs^+$  به تفکیک مقاومت به آنتی بیوتیکی های مورد آزمایش

$ESBL^+$ (%)	(تعداد) سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک
۸۲	$(n=82)$ سفنازیدیم
۴۷	$(n=47)$ سفوتاکسیم
۵۳	$(n=53)$ سفتریاکسون
۵۸	$(n=58)$ سفودوکسیم
۵۲	$(n=52)$ آزوترونام
۳۶	$(n=36)$ جنتامایسین
۱	$(n=1)$ آمیکاسین
۳	$(n=3)$ نیتروفورانتوین
۴۶	$(n=46)$ آمپی سیلین
۰	$(n=0)$ ایمپی پنم
۶۷	$(n=67)$ تری متوبریم-سولفامتوکسازول
۴۹	$(n=49)$ سیپروفلوکساسین

از زمانی که آنتی بیوتیک های بتالاکتام در بالین مورد استفاده قرار گرفتند، بتالاکتامازها به همراه آنها تکامل یافته و نقش اساسی را در شکست های درمانی ایفا کرده اند. بتالاکتامازهای وسیع الطیف، دسته‌ای از آنزیم های بتالاکتاماز هستند که اهمیت ویژه ای در درمان ضد میکروبی دارند. فراوانی تولید  $ESBLs$  در میان اعضای خانواده انتروباکتریاسه در سراسر جهان متفاوت می باشد (۹۰،۱۰). تولید این آنزیم ها یکی از خطرات جدی در درمان عفونت های با مقاومت چندگانه می باشد، که از زمان کشف آنها در سال ۱۹۸۰، به سرعت در سطح جهان گسترش یافته و به عنوان یکی از معضلات بهداشت عمومی محسوب می گردند. از مهم ترین دلایل گسترش آنها، مصرف گسترده آنتی بیوتیک های بتالاکتام باشد (۱۱). ارائه گزارش های متفاوت از نواحی مختلف جغرافیایی، بر نقش مطالعات اپیدمیولوژیک منطقه ای دلالت دارد؛ لذا بررسی نمونه های میکروبی بیمارستان ابن سینای شهرستان دلفان و تعیین فراوانی ایزوله های

تولیدکننده  $ESBLs$  از اولویت های این تحقیق بود. بررسی ما نشان می دهد که از ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی مورد مطالعه، ۸۰ نمونه مولد  $ESBLs$  بودند که نشان دهنده شیوع بالای این آنزیم ها و ایجاد مقاومت علیه بتالاکتام ها در منطقه می باشد. در ایران نیز مطالعات پراکنده ای در این زمینه صورت گرفته است. مسجدیان و همکاران در اصفهان (۱۳۸۶)، ۱۴۸ ایزوله اشریشیاکلی را بررسی کرده و نشان دادند که ۵۱٪ از ایزوله ها مولد  $ESBLs$  می باشند (۱۲). صادقی و همکاران نیز ۲۲۵ ایزوله اشریشیاکلی را از شهرهای تهران و تبریز مورد مطالعه قرار داده و در صد فراوانی  $ESBLs$  را در ایزوله های اشریشیاکلی در بیماران بستری و سرپایی شهر تهران به ترتیب ۶۱٪ و ۱۷٪ و در شهر تبریز ۴۶٪ و ۱۱٪ گزارش کردند (۳). مطالعات متعددی دیگری نیز در سایر کشورها در تعیین فراوانی  $ESBLs$  صورت گرفته که دارای نتایجی مشابه و یا متفاوت با نتایج بدست آمده از تحقیق ما می باشند (۱۸-۱۳). مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه و سایر مطالعات انجام شده نشان می دهد که فراوانی  $ESBLs$  در ایران و همچنین شهرستان دلفان بالاست؛ که متأسفانه این موضوع، در آینده ای نزدیک استفاده از آنتی بیوتیک های مفید و ارزان بتالاکتام ها را متأثر خواهد کرد. همچنین و با توجه به این موضوع که ژن های کد کننده این آنزیم ها، عمدتاً بر روی عناصر ژنتیکی متحرکی چون پلاسمیدها و ترانسپوزون ها قرار دارند می توان چنین پیش بینی کرد که مقاومت ها، نه تنها به سایر باسیل های گرم منفی بیمارستانی منتقل خواهند شد بلکه به سایر باکتری های جدا شده از عفونت های اکتسابی از جامعه نیز گسترش خواهند یافت. لذا شناسایی و تعیین فنوتیپ  $ESBLs$  توسط آزمایشگاه های میکروب شناسی به روش دیسک ترکیبی، محدود کردن استفاده از آنتی بیوتیک های بتالاکتام، استفاده از مهار کننده های بتالاکتامازی

## تشکر و قدردانی

و تا حد ممکن عدم درمان تجربی عفونت‌ها در بیماران بستری، کارایی آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام را تا حد زیادی حفظ خواهد کرد.

بدین وسیله از زحمات کلیه همکاران معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

## References

1. Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995; 8(4): 557-584.
2. Patricia A. ESBL in 21st century: Characterization, Epidemiology and Detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001; 14(4): 933-951.
3. Sadeghi MR, Nahaei MR, Soltan Dallal MM. Resistance to Extended Spectrum  $\beta$ -Lactam antibiotics in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from hospital. Tabriz Uni Med J. 2008; 30(2):79-86. (In Persian)
4. Mohajeri P, Izadi B, Rezai M, Falahi B, Khademi H. Assessment of the frequency of Extended Spectrum Beta Lactamases Producing, *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections and its Antibiotic Resistance Pattern in Kermanshah. Ardebil Uni Med J. 2011; 11(1): 86-94. (In Persian)
5. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Woods GL. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Baltimore; Lippincott Williams & Wilkins. 2006; PP: 211-238.
6. Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M100-S20. CLSI Document. 2010; 30(1): 27-44.
7. Srisangkaew S, Vorachit M. The Optimum Agent for Screening and Confirmatory Tests for Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Ramathibodi Hospital, Thailand. J Infect Dis Antimicrob Agents. 2004; 21: 1-5.
8. Farsha S, Anvarinejad M, Mehrabi Tavana A, Ranjbar R, Japoni A, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* strains isolated from children with community acquired urinary tract infections. Afr J Microb Res. 2011; 5(26): 4476-4483.
9. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. Int J Antimicrob Agents. 2000; 14(2):137-142.
10. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum betalactamase-producing organisms. J Hosp Infect. 2009; 73(4): 345-354.
11. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect. 2008; 14 (Suppl 1):144-153.
12. Masjedian GF, Valehi F, Talebi, Rastegar Lari A. Molecular evaluation of resistance to expanded antibiotics in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Iran J Med Microbiol. 2007; 1(2):27-34. (In Persian)
13. Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases in urinary isolates of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae*-Prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. Indian J Med Microbiol. 2004; 22 (3): 172-174.
14. 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 doi: 10.1186/1471-2334-5-86.
15. Bercion R, Mossoro-Kpinde D, Manirakiza A, Le Faou A. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among enterobacteriaceae uropathogens in Bangui, Central African Republic. *J Infect Dev Ctries.* 2009; 30 (3): 187-190.
  16. Goyal A, Prasad KN, Prasad A, Gupta S, Ghoshal U, Ayagari A. Extended spectrum  $\beta$ - lactamases in *E. coli* and *Klebsiella pneumonia* and associated risk factors. *Indian J Med Res.* 2009; 129 (6): 695-700.
  17. 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): 428-432.
  18. Patzer JA, Dzierzanowska D, Pawinska A, Turner PJ. High activity of meropenem against gram negative bacteria from a pediatric intensive care unit, 2001-2005. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29(3): 285-288.