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

غلامرضا گودرزی[1]، سمیه مومنی مفرد*[2]، پگاه شکیب[3]

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

دریافت مقاله: ۹۳/۳/۷ پذیرش مقاله: ۹۳/۵/۱۲

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 "بتالاکتاماز های 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 یوروپاتوژنیک شهرستان دلفان، لرستان در سال۱۳۹۱ بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک 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 سفپودوکسیم به تنهایی و در ترکیب با کلاولونیک اسید (دیسک ترکیبی) انجام پذیرفت.

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

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهدکه فراوانی ESBLs در شهرستان دلفان بالاست. لذا شناسایی ایزوله‌های ESBLs مثبت توسط آزمایشگاه‌های 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.

واژه‌های کلیدی: بتالاکتامازهای وسیع الطیف، اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک، آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام.

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

پست الکترونیک: somayemomeni64@yahoo.com

مقدمه

اشریشیاکلی یکی از شایع ترین عوامل باکتریایی است که از عفونت های انسانی جدا شده و باعث عفونت ادراری، گوارشی، مننژیت و غیره می شود. این باکتری یکی از پاتوژن های فرصت طلب بیمارستانی است که به علت کسب پلاسمیدهای مختلف، به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها از جمله بتالاکتام ها (پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها، مونوباکتام ها و کارباپنم ها) مقاومت نشان می دهد. مکانیسم اصلی مقاومت این باکتری به بتالاکتام ها، تولید آنزیم های بتالاکتاماز می باشدکه باعث هیدرولیز حلقه بتالاکتام این آنتی بیوتیک ها می گردد.

بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) [1] شامل تعدادی از آنزیم های بتالاکتاماز جهش یافته است که باعث هیدرولیز آنتی بیوتیک های بتالاکتام مهمی چون سفالوسپورین های نسل سوم و مونوباکتام ها می شوند (۱،۲). از خصوصیات بارز ESBLs، مهار فعالیت آنها در حضور کلاولونیک اسید (مهارکننده بتالاکتامازی) می باشد؛ لذا از این خاصیت به عنوان تست تأییدی (فنوتیپی) در ردیابی آزمایشگاهی ESBLs استفاده می گردد. بطوریکه، ایزوله باکتریایی که مقاوم به یکی از سفالوسپورین های نسل سوم (سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفیکسیم، سفتازیدیم و ...) باشد و تولید بتالاکتاماز آن در حضور کلاولونیک اسید مهار گردد به عنوان ایزوله تولید کننده ESBLs تلقی می گردد. 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 سویه های اشریشیاکلی و کلبسیلای مقاوم به سفالوسپورین های وسیع الطیف، با واسطه ESBLs را در ایران بین ۶۷-۱ درصد گزارش کرده اند (۳،۴). این در حالی است که بتالاکتام ها، درصد بالایی از آنتی‌بیوتیک-های مصرفی در پزشکی را به خود اختصاص می دهند. متأسفانه این آنزیم ها اغلب بوسیله پلاسمیدهایی حمل می‌شوند که همچنین حاوی ژن هایی برای مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، سولفونامیدها، فلوروکوئینولون ها و غیره نیز می باشند. با توجه به اهمیت موضوع و عدم وجود اطلاعات مستند در خصوص فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف در شهرهای مختلف استان لرستان، بررسی فراوانی ESBLs درایزوله های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران بستری در شهرستان دلفان هدف از این مطالعه بوده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی وتشخیص ایزوله ها: 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 ایزوله ها با استفاده از روش های استاندارد بیوشیمیایی از جمله تست های چون سیمون سیترات، MR، VP،TSI و SIM تعیین هویت گردیدند (۵).

تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی: حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله ها، به روش انتشار از دیسک (کربی- بائر) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) و بر اساس دستورالعمل‌های (CLSI) [2] انجام پذیرفت. نتایج آنتی بیوگرام پس از ۲۴-۱۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از جداول مؤسسه استاندار فوق قرائت گردید (۶). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده در این مطالعه که شامل جنتامیسین (10µg)، آمیکاسین (30µg)، نیتروفورانتوئین (300µg)، آمپی‌سیلین (10µg)، ایمی پنم (10µg)، سفتازیدیم (30µg)، تریمتوپریم- سولفامتوکسازول (1.25/23.75µg)،

1. Extended-Spectrum Beta-lactamase
2. Clinical and Laboratory Standards Institute

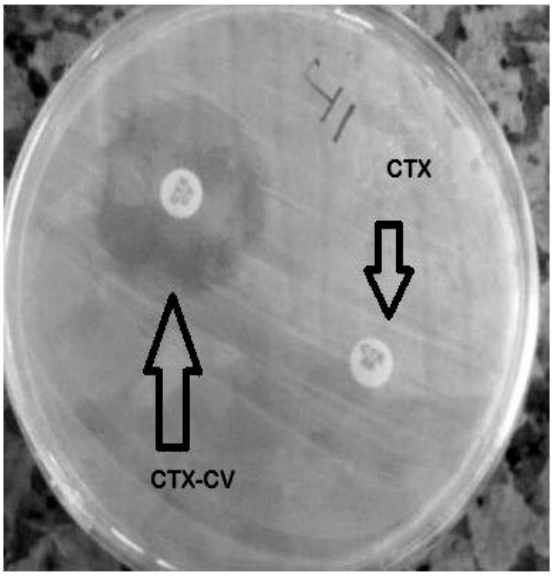
سیپروفلوکساسین (5µg)، سفوتاکسیم (30µg)، سفودوکسیم (30µg)، سفتریاکسون (30µg) و آزترونام (30µg) بود از شرکت Mast انگلیس با واسطه شرکت تجاری میکروب شناسی راین تهیه گردید.

غربالگری و تأیید ایزوله های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (فنوتیپ $ESBLs^+$): ابتدا از سوسپانسیون باکتریایی (معادل نیم مک فارلند) ایزوله های مقاوم به یکی از سفالوسپورین های نسل سوم، بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس سه دیسک سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفپودوکسیم و همچنین سه دیسک ترکیبی آنها با کلاولونیک اسید (سفتازیدیم/کلاولونیک اسید، سفوتاکسیم /کلاولونیک اسید و سفپودوکسیم/کلاولونیک اسید) با فاصله ناسب بر روی محیط کشت مذکور قرار گرفت. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته پلیت ها در ۳۷ درجه سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک ها اندازه گیری شد. چنانچه اختلاف قطر هاله مهار رشد اطراف یکی از دیسک های ترکیبی (حاوی کلاولونیک اسید) نسبت به دیسک تنها (فاقد کلاولونیک اسید)، بیشتر مساوی ۵ میلی متر بود، ایزوله مورد نظر به عنوان فنوتیپ ESBLs مثبت در نظر گرفته می شد (شکل۱) (۶،۷).

یافته‌ها

الگوی حساسیت میکروبی: در این بررسی، ۳۹٪ ، ۳٪ ، ۳٪ ، ۸۵٪ ، ۰٪ ، ۸۲٪ ، ۷۲٪ ، ۵۵٪ ، ۴۷٪ ، ۵۸٪ ، ۵۵٪ و ۶۰٪ از ایزوله ها به ترتیب نسبت به جنتامیسین ، آمیکاسین، نیتروفورانتوئین، آمپی‌سیلین، ایمی پنم، سفتازیدیم، تری متوپریم- سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم، سفودوکسیم، سفتریاکسون و آزترونام مقاومت نشان دادند.

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



شکل۱. تست تأییدی تولید آنزیم های 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 ایمی پنم (۱۰۰٪) و نیتروفورانتوئین (۹۷٪) نشان داد که با نتایج مطالعات قبلی همخوانی داشت (۸).

جدول۱. فراوانی ایزوله های اشریشیاکلی $ESBLs^+$ به تفکیک مقاومت به آنتی بیوتیکی های مورد آزمایش

$ESBL^+$ (%)	(تعداد) سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک
۸۲	سفتازیدیم (n=۸۲)
۴۷	سفوتاکسیم (n=۴۷)
۵۳	سفتریاکسون (n=۵۵)
۵۸	سفبودوکسیم (n=۵۸)
۵۲	آزوترونام (n=۶۰)
۳۶	جنتامایسین (n=۳۹)
۱	آمیکاسین (n-۱)
۳	نیتروفورانتوئین (n-۳)
۴۶	آمپی سیلین (n=۸۵)
۰	ایمی پنم (n=۰)
۶۷	تری متوبریم-سولفامتوکسازول (n=۷۲)
۴۹	سیپروفلوکساسین (n=۵۵)

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 (۹،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 می‌دهد که از ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی مورد مطالعه، ۸۰ نمونه مولد ESBLs بودند که نشان دهنده شیوع بالای این آنزیم‌ها و ایجاد مقاومت علیه بتالاکتام‌ها در منطقه می‌باشد. 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 ۶/۱٪ و ۱/۷٪ و در شهر تبریز ۴/۶٪ و ۱/۱٪ 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 آینده‌ای نزدیک استفاده از آنتی بیوتیک های مفید و ارزان بتالاکتام ها را متأثر خواهد کرد. همچنین و با توجه به این موضوع که ژن‌های کد کننده این آنزیم‌ها، عمدتاً بر روی عناصر ژنتیکی متحرکی چون پلاسمیدها و ترانسپوزون ها قرار دارند می‌توان چنین پیش بینی کرد که مقاومت ها، نه تنها به سایر باسیل‌های 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 بیوتیک‌های بتالاکتام، استفاده از مهار کننده های بتالاکتامازی

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

تشکر و قدردانی

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

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 β-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. Moulecular evaluation of resistance to espanded 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 β-lactamases in urinary isolates of E. coli and Klebsiella pneumonia-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 β-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 β- 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.