مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۰ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۷ صفحات ۸۶- ۷۹

مقاومت آنزیمی بتالاکتاماز با محدوده اثر وسیع درگونه های کلبسیلا پنمونیه و اشریشیا کلی در بیماران بستری و سرپائی

محمدرضا صادقی: کارشناس ارشد میکروبشناسی دانشکده پزشکی، پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر محمدرضا نهائی: استاد میکروبشناسی دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
E-mail: nahaeim@yahoo.com
دکتر محمد مهدی سلطان دلال: استاد میکروبشناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران

دریافت: ۸۶/۳/۲۱، **پذیرش**: ۸۶/۱۱/۱

چکیده

زمینه و اهداف: مقاومت آنزیمی بتالاکتاماز بویژه نوع (Extended- Spectrum Beta-lactamase, ESBL) یکی از انواع شایع مقاومت آنزیمی بتالاکتاماز در باکتریهای عامل عفونتهای بیمارستانی است. تشخیص این نوع مقاومت در شرایط آزمایشگاهی مشکل بوده و از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا تعدادی از سویه های مقاوم علی رغم نشان دادن فنوتیپ حساس در شرایط آزمایشگاهی، تحت شرایط *in vivo* از خود مقاومت نشان می دهند. این مسئله سبب عدم تشخیص مقاومت و درمان نامناسب و در نتیجه افزایش مرگ و میر در بیماران می گردد، لذا این بررسی جهت ارزیابی جنبه های اپیدمیولوژی و میکروبیولوژی شیوع ESBL در دو جنس عامل عفونتهای بیمارستانی یعنی کلبسیلا و اشریشیا کلی صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه در فاصله زمانی مهر یکسال تعداد ۲۲۱ سویه کلبسیلا و ۲۵۵ سویه اشریشیا کلی از بیماران بستری و سرپائی مراکز درمانی شهرهای تبریز و تهران جمع آوری و تعیین هویت شدند. برای تمامی سویه ها تست حساسیت آنتی بیوتیکی انجام و سپس سویه های مقاوم مشکوک به وجود بتالاکتاماز بوسیله تستهای (Double Disk Synergy Test, DDST)، (Three- Dimensional Test, TDT) و ESBL E-test مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج این مطالعه نشان دهنده بالا بودن شیوع مقاومت آنزیمی بتا لاکاماز با محدوده اثر وسیع (ESBL) در بین سویه های کلبسیلا و اشریشیا مورد بررسی در شهر تهران نسبت به تبریز می باشد. درصد شیوع این مقاومت در گونه های کلبسیلا در بیماران بستری و سرپائی شهر تهران به ترتیب ۳۱/۴٪ و ۱۲/۲٪ و در اشریشیا کلی به ترتیب ۶/۱٪ و ۱/۷٪ بدست آمد. این ارقام برای شهر تبریز برای گونه های کلبسیلا به ترتیب ۲۱/۴٪ و ۹/۱٪ و برای اشریشیا کلی ۴/۶٪ و ۱/۱٪ به ثبت رسید. از طرف دیگر در شهرهای مورد مطالعه، الگوی حساسیت نسبت به داروهای بتالاکتام در دو گروه بیماران بستری و سرپائی متفاوت بوده و در گروه بیماران بستری سطوح بالائی از مقاومت مشاهده می شود.

نتیجه گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده شیوع بالای مقاومت آنزیمی ESBL در باکتریهای جداشده از شهرهای تهران و تبریز می باشد. بنابراین غربالگری نمونه های بالینی از لحاظ مقاومت ESBL از اهمیت زیادی برخوردار است.

کلید واژه ها: بتالاکتاماز، بتالاکتاماز با محدوده اثر وسیع، کلبسیلا پنمونیه، اشریشیا کلی

مقدمه

از زمان شناخته شدن موجوداتی تحت عنوان باکتریها بشر همواره در چالش برای یافتن داروئی موثر برعلیه عفونتهای ناشی از آن بوده است. با این وجود باکتریها نیز به مکانیسمهائی موثر جهت از بین بردن خاصیت ضد میکروبی آنتی بیوتیکها مسلح شده اند. داروهای گروه پنی سیلین و سفالوسپورین ازآنتی بیوتیکهائی می باشند که بطور وسیع مورد استفاده قرار گرفته و در جلوگیری از سنتز دیواره سلولی باکتریها موثر هستند. این داروها تحت عنوان داروهای بتالاکتام شناخته شده اند. برخی از باکتریها نظیر

استافیلوکوکوس اورئوس، هموفیلوس آنفلونزه، کلبسیلا پنمونیه، اشریشیا کلی و برخی از انتروباکتریاسه ها بخصوص سودوموناس دارای مکانیسم بالقوه ای جهت تخریب حلقه بتالاکتام این داروها می باشند. این مکانیسم شامل آنزیم بتالاکتاماز می باشد که به دو صورت کروموزومی (بسیاری از باکتریهای گرم منفی)و پلاسمیدی (استافیلوکوکوس اورئوس) تولید می شود. تمامی انواع بتالاکتاماز های پلاسمیدی بصورت مستمر و در مقادیر بالا تولید و تمایل زیادی به انتقال بین باکتریها دارند(۳-۱). انواع کروموزومی بتالاکتاماز به طریق القائی یا مستمر تولید می شوند. انواعی از آنزیم بتالاکتاماز در گونه های خاصی از باکتریهای گرم منفی بویژه کلبسیلا پنمونیه و اشریشیا کلی وجود دارند که تحت عنوان بتالاکتاماز با محدوده اثر وسیع خوانده می شوند که وجه تسمیه آن بعلت اعطاء توانائی فوق العاده به باکتری در هیدرولیز حلقه های بتالاکتام طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام بویژه سفالوسپورینهای نسل سوم ازجمله سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفتیزوکسیم وهمچنین آزترونام می باشد(۱).

در پانزده سال اخیر اپیدمی های متعدد عفونت با ارگانیسمهای ESBL مثبت در سراسر دنیا گزارش شده است(۴). این شیوع تهدیدی جدی در روند درمان عفونتها محسوب می شود. تجربه نشان داده است که نتیجه رضایت بخشی از درمان عفونتهای ناشی از باکتریهای ESBL مثبت بدست نمی آید. میزان مرگ و میر در این گروه بطور قابل توجهی نسبت به عفونتهای ناشی از باکتریهای حساس به دارو بالا بوده و از ۴۲٪ تا ۱۰۰٪ متغیر می باشد(۶-۴). لذا این مطالعه جهت ارزیابی اپیدمیولوژی و میکروبیولوژی شیوع این نوع مقاومت در دو شهر تهران و تبریز انجام شد.

مواد و روش ها

این تحقیق بر روی دو گروه از بیماران بستری و سرپائی در دو شهر تهران و تبریز انجام شد. نمونه های مورد مطالعه را باکتریهای اشریشیا کلی و گونه های کلبسیلای جدا شده از عفونتهای بیماران بستری و سرپائی در بیمارستانهای شهید چمران، شهید لبافی نژاد و شهداء تهران و بیمارستانهای سینا و امام خمینی شهر تبریز تشکیل می داد. در این تحقیق مجموعاً ۲۲۱ ایزوله‌ی کلبسیلا و ۲۵۵ ایزوله‌ی اشریشیا کلی در فاصله زمانی مهر ۱۳۸۲ تا مهر ۱۳۸۳ جمع آوری و پس از تعیین هویت نهائی بصورت کشت ذخیره در محیط Skim Milk Broth در فریزر c ° ۷۰- جهت انجام مراحل بعدی نگهداری شدند. در مرحله بعد تست حساسیت نسبت به داروهای بتالاکتام برای تمامی سویه ها با استفاده از توصیه های CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006) و با روش Kirby-Bauer Disk Diffusion Method و با استفاده از دیسکهای شرکت پادتن طب انجام شد(۷). نهایتاً گونه های مقاوم جهت انجام تست بتالاکتاماز مورد آزمایش واقع و این مرحله با سه روش DDST،TDT و ESBL E-test صورت گرفت. در روش DDST باکتری مورد آزمایش بصورت متراکم بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و دو دیسک سفتازیدیم و سفتازیدیم-کلاولانیک اسید مربوط به شرکت پادتن طب به فاصله ۲ سانتی متر از هم بر روی آن قرار داده شد. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته ایجاد هاله عدم رشد بصورت سینرژی بین دو دیسک نشان دهنده مثبت بودن تست بتالاکتاماز می باشد. در روش TDT ابتدا باکتری حساس نسبت به تمامی داروهای بتالاکتام که بتالاکتاماز منفی نیز می باشد بصورت متراکم بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شده و یک دیسک سفتریاکسون در مرکز پلیت قرار داده می شود. چاهکی به فاصله ۲ میلی متری دیسک در پلیت ایجاد و ژلوز آن قسمت تخلیه می گردد. داخل چاهک توسط سوسپانسیونی از باکتری مورد آزمایش با کدورت ۵ مک فارلند پر شده و پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته نتایج آزمایش مشاهده می شود. در صورتی که باکتری مورد آزمایش بتالاکتاماز مثبت باشد، گسترش هاله عدم رشد باکتری حساس، به سمت دیسک مرکزی سفتریاکسون، در نواحی اطراف منطقه چاهک نشان دهنده تخریب دارو توسط این آنزیم و ایجاد امکان رشد برای باکتری حساس، در حضور دارو می باشد. در روش ESBL E-test از نوارهای آغشته به غلظتهای مختلف آنتی بیوتیک مربوط به شرکت AB BIODISK برای تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز و تعیین MIC مربوط به آن استفاده شد. این نوارها، مشابه روش تست حساسیت، بر روی کشت متراکم باکتری مورد آزمایش قرار داده می شوند. پس از انکوباسیون، اختلاف ۸ برابری MIC بین دو سمت نوار، نشان دهنده مثبت بودن بتالاکتاماز در باکتری مورد نظر خواهد بود. نهایتاً برای نمونه های ESBL مثبت، آنتی بیوگرام نسبت به داروهای مختلف شامل کلرامفنیکل، نالیدیکسیک اسید، استرپتومایسین، اریترومایسین، جنتامیسین، کوتریموکسازول، و آمیکاسین با استفاده از دیسکهای شرکت پادتن طب انجام شد(۸و۷).

یافته ها

اطلاعات اپیدمیولوژیک بدست آمده از جمع آوری نمونه ها پس از تعیین هویت تأییدی گونه های کلبسیلا و اشریشیا کلی به همراه اطلاعات مربوط به نوع عفونت در جدول ۱ درج شده است. تست حساسیت نسبت به تعدادی از داروهای بتالاکتام نیز جهت غربالگری سویه های مقاوم صورت گرفت که نتایج آن در جدول۲ آمده است. از آنجائی که مکانیسمهای مقاومت نسبت به داروهای بتالاکتام متعدد است، لذا تمامی سویه های مقاوم وحساس در مرحله بعدی با روشهایDDST ، TDTو ESBL E-test جهت تأیید حضور ESBL مورد مطالعه قرار گرفتند. جدول ۳ نتایج این مرحله از مطالعه را نشان می دهد. جهت ارائه یک الگوی حساسیت کلی نسبت به سایر داروهای رایج در درمان عفونتهای باکتریهای گرم منفی، تست حساسیت دیگری انجام شد که نتایج آن در جدول ٤ آمده است.

جدول ۱: باکتریهای مورد مطالعه و منبع جداسازی آنها در دو شهر تهران و تبریز

باکتری(تعداد)	تهران												تبریز									
	بستری				سرپائی				بستری				سرپائی									
	عفونت ادراری	عفونت خون	عفونت CSF	عفونت زخم	عفونت ریوی	عفونت زخم	عفونت ادراری	عفونت خون	عفونت CSF	عفونت ریوی	عفونت زخم	عفونت ادراری	عفونت خون	عفونت CSF	عفونت ریوی	عفونت زخم	عفونت ادراری	عفونت خون	عفونت CSF	عفونت ریوی	عفونت زخم	
کلبسیلا پنمونیه	۴۱	۲	۱	۸	—	۵۰	۵	—	۳	۴	۱۵	۲	—	۳	۴	۲۰	۱	—	۳	۲	۱	(۱۵۸)
کلبسیلا اکسیتوکا	۲	۱	—	—	—	۷	—	—	—	—	۲	—	—	—	—	۱	۱	—	—	—	—	(۱۴)
کلبسیلا اوزنه	۵	۱	—	۱	—	۷	—	—	—	—	۲	—	—	—	—	۳	—	—	—	—	—	(۲۰)
کلبسیلا رینواسکلروماتیس	۵	۱	—	—	—	۶	۲	—	—	۲	۳	۱	—	—	—	۱	—	—	—	—	—	(۲۸)
اشریشیا کلی	۴۶	۱	—	—	—	۵۳	۳	—	—	—	۶۱	۳	—	—	—	۷۸	۱	—	—	۱	۳	(۲۵۵)
جمع	۹۹	۶	۱	۹	۴	۱۲۳	۱۰	۰	۳	۵	۸۳	۶	۰	۳	۵	۱۰۳	۱	۰	۳	۳	۷	

CSF: Cerebrospinal fluid

جدول ۲: درصد مقاومت باکتریهای مطالعه شده نسبت به داروهای بتالاکتام آزمایش شده به روش Disk Agar Diffusion Method

شهر	بیمار	آنتی بیوتیک	کلبسیلا پنمونیه	کلبسیلا اوکسی توکا	کلبسیلا اوزنه	کلبسیلا رینواسکروماتیس	اشریشیا کلی
تبریز	سرپائی	آموکسی سیلین	۹۶	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۴/۱۷
		سفتازیدیم	۴۹/۹	۸۷/۱۷	۶۵/۵۲	۵۶/۶۶	۸۳/۰۴
		سفتریاکسون	۳۲/۶	۷۶/۰۲	۴۷/۲۴	۵۲/۱۵	۲۴/۴۱
		سفتی زوکسیم	۴۳/۴	۷۰/۷	۴۰/۱۱	۵۱/۱۴	۵۰/۲۱
		سفالکسین	۴۷/۶	۶۱/۳	۵۵	۷۰/۳۵	۷۵/۰۳
		سفیکسیم	۵۴/۳	۷۱/۹۶	۳۹/۱	۴۸/۷۷	۳۵/۹۸
	بستری	آموکسی سیلین	۹۷/۸	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۵/۶
		سفتازیدیم	۵۶/۷	۸۸/۷	۶۸/۷۱	۵۹/۹۵	۸۴/۳۸
		سفتریاکسون	۴۱/۵	۷۴/۴	۴۹	۵۴/۴۷	۲۸/۴
		سفتی زوکسیم	۵۱/۶	۷۶/۴۵	۴۴/۴۳	۵۷/۳۵	۵۷/۷۴
		سفالکسین	۵۲/۰۱	۶۴/۰۷	۶۱/۲۹	۷۱/۴۹	۷۶/۱۹
		سفیکسیم	۵۵/۴۱	۷۴/۲۱	۴۳/۳	۵۲	۴۱/۷
تهران	سرپائی	آموکسی سیلین	۹۸	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۲/۴۵
		سفتازیدیم	۴۰/۰۶	۸۶/۵	۶۴/۱۲	۶۰/۰۲	۸۵/۳۷
		سفتریاکسون	۴۸/۰۴	۷۲/۲	۵۱/۱۴	۵۴/۳	۲۵/۵۵
		سفتی زوکسیم	۴۸/۱۵	۷۹/۹	۲۵/۵	۵۳/۲	۵۹/۹۱
		سفالکسین	۴۷/۹۱	۷۶/۳	۵۹/۹۱	۷۰/۱۷	۷۴/۳۱
		سفیکسیم	۴۳/۷۲	۷۸/۹	۴۳/۱	۵۳/۳۲	۴۲/۲۲
	بستری	آموکسی سیلین	۹۸/۳	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۳/۲
		سفتازیدیم	۵۴/۲	۹۰	۷۰	۶۱/۳	۸۷/۷
		سفتریاکسون	۵۵/۶۵	۸۱	۵۲/۱۱	۵۷/۹	۳۰/۱
		سفتی زوکسیم	۵۷/۳۹	۸۲/۳	۵۳/۳	۵۷/۶	۶۱/۷
		سفالکسین	۵۶/۵۲	۸۰/۰۵	۶۴/۷۱	۷۳/۵۴	۸۰/۸
		سفیکسیم	۵۶/۵۲	۸۳/۴	۵۰	۵۷/۴	۴۵/۲

جدول ۳: درصد سویه های بتالاکتاماز مثبت در سه روش تشخیصی DDST، TDT و E-test

باکتری	شهر											
	تهران						تبریز					
	بستری			سرپائی			بستری			سرپائی		
	نوع تست بتالاکتاماز			نوع تست بتالاکتاماز			نوع تست بتالاکتاماز			نوع تست بتالاکتاماز		
	E-test	TDT	DDST	E-test	TDT	DDST	E-test	TDT	DDST	E-test	TDT	DDST
کلبسیلا پنمونیه	۲۵/۱	۲۷/۱	۲۰/۸	۱۲/۷	۱۳/۹	۱۰/۷	۱۴/۱	۱۵/۱	۱۳/۳	۳/۵۵	۴/۳۵	۲/۷۵
کلبسیلا اکسی توکا	۳۰	۲۹/۵	۲۵	۲۵	۲۳/۵	۲۱	۱۸	۱۷/۲	۱۶/۵	۱۰/۴	۹/۲۱	۸
کلبسیلا اوزنه	۱۴/۳	۱۴/۳	۱۳/۸	۸/۴	۸/۳	۷/۶	۱۰/۵	۱۰/۴	۹	۷/۱	۶	۴/۵
کلبسیلا رینواسکلروماتیس	۲۲/۷	۲۱/۶	۲۲	۱۶/۷	۱۵/۶	۱۲/۹	۱۵/۳	۱۵/۳	۱۴/۹	۱۲/۵	۱۲/۴	۱۲/۵
اشریشیا کلی	۴/۱	۴/۱	۳/۸	۳/۵۲	۳/۵۲	۳/۲	۲/۴	۲/۴	۲/۴	۱/۷	۱/۸	۱/۵

DDST: Double Disk Synergy Test TDT: Three Dimensional Test

جدول ٤: الگوی حساسیت سویه های بتالاکتاماز مثبت (بر حسب تعداد سویه های حساس از کل موارد بتالاکتاماز مثبت)

شهر	بیمار	باکتری	An	SXT	Gm	E	S	NA	C	موارد مثبت ESBL
تهران	ریوی	کلبسیلا پنمونیه	٤	٤	۲	۰	۳	۳	۲	۱۵
		کلبسیلا اوکسی توکا	۲	۱	۱	۰	۱	۱	۰	۲
		کلبسیلا اوزنه	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۱
		کلبسیلا رینواسکلرو ماتیس	۱	۲	۰	۰	۲	۲	۰	٤
		اشریشیا کلی	۳	۲	۰	۰	۱	۰	۱	۳
	بستری	کلبسیلا پنمونیه	۳	۳	۱	۰	۳	۲	۱	۸
		کلبسیلا اوکسی توکا	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۰	۱
		کلبسیلا اوزنه	—	—	—	—	—	—	—	–
		کلبسیلا رینواسکلرو ماتیس	۰	۱	۰	۰	۱	۲	۰	۲
		اشریشیا کلی	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۱
تبریز	بستری	کلبسیلا پنمونیه	۳	۳	۱	۰	۰	۳	۳	۳
		کلبسیلا اوکسی توکا	۲	۲	۱	۰	۰	۲	۱	۲
		کلبسیلا اوزنه	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۰	۱
		کلبسیلا رینواسکلرو ماتیس	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
		اشریشیا کلی	۳	۱	۰	۰	۱	۲	۰	۳
	ریوی	کلبسیلا پنمونیه	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱
		کلبسیلا اوکسی توکا	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰
		کلبسیلا اوزنه	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱
		کلبسیلا رینواسکلرو ماتیس	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۱
		اشریشیا کلی	۰	۱	۰	۰	۰	۱	۰	۱
جمع کل موارد ESBL										۵۰

C :کلرامفنیکل، NA : نالیدیکسیک اسید، S : استرپتومایسین ، E : اریترومایسین،
Gm : جنتامیسین، SXT : کوتریموکسازول، An :آمیکاسین

بحث

کلبسیلا و اشریشیا کلی از عوامل برجسته عفونت های بیمارستانی می باشند(۱۳-۹). شیوع سویه های فوق العاده مقاوم کلبسیلا پنمونیه تولید کننده بتالاکتاماز برای اولین بار در بیماران بخش ICU مشاهده شد(۱۴). از پانزده سال پیش اپیدمی های متعددی از عفونت با ارگانیسمهای تولید کننده بتالاکتاماز در سراسر دنیا مشاهده شده است. این پدیده تهدید بزرگی در استفاده از سفالوسپورینها محسوب می شود. همچنین بخوبی مشخص شده است که درمان رضایت بخشی از معالجه اینگونه عفونتهای مقاوم به سفالوسپورین عاید نمی شود. میزان مرگ و میر ناشی از باکتریهای مولد آنزیم ESBL بطور قابل توجهی بالا می باشد. مسئله دیگر اینست که آیا درمان با سفالوسپورینها برای ارگانیسمهای ESBL مثبتی که MIC آنها در محدوده حساس می باشد مناسب است یا خیر؟ در تحقیقی که در این زمینه صورت گرفته از ۱٤۱ سویه کلبسیلا پنمونیه ESBL مثبت در آمریکا ۲۳٪ آنها به سفوتاکسیم مقاوم بودند. در مطالعه ای در اروپا از ۹۱ سویه کلبسیلا پنمونیه ESBL مثبت ۳٦٪ به سفوتاکسیم مقاوم بودند(٤). بررسی ما بر روی کلبسیلا و اشریشیا کلی نشان داد که از ۲۳ مورد کلبسیلا پنمونیهESBL مثبت در تهران فقط یک مورد (۳/٤٪) نسبت به سفالکسین، سفتریاکسون، سفتازیدیم، سفتی زوکسیم و سفیکسیم حساس و بقیه موارد نسبت به تمامی آنتی بیوتیکها مقاوم بودند. این نتایج با یافته های بدست آمده از تحقیقات فوق در آمریکا و اروپا از نظر وجود سویه هایESBL مثبت حساس به سفالوسپورینهای نسل سوم در شرایط آزمایشگاهی تطابق دارد. از ۲۳ مورد سویه کلبسیلا پنمونیه واجد بتالاکتاماز در تهران، ۱۵ مورد مربوط به بیماران بستری و ۸ مورد مربوط به بیماران سرپائی می باشد که از ۱۵ مورد فوق ۱۱ مورد مربوط به عفونت ادراری، ۲مورد مربوط به عفونت ریوی ، ۱مورد را عفونت خون و۱ مورد را عفونت زخم و از ۸ مورد بیمار سرپائی در تهران ۵ مورد عفونت ادراری،۲ مورد عفونت ریوی و یک مورد عفونت خون را تشکیل می داد. وجود یک مورد فنوتیپ حساس از ۲۳ مورد عفونت کلبسیلا پنمونیه واجد بتالاکتاماز در مقایسه با تحقیق انجام شده توسط David L.Paterson و همکاران(٤) نشان می دهد که در شهرتهران موارد عفونت با کلبسیلا پنمونیه واجد بتالاکتاماز با فنوتیپ حساس در شرایط آزمایشگاهی در حد پائین تری می باشد. از ۴ مورد عفونت کلبسیلا پنمونیه بتالاکتاماز مثبت در شهر تبریز، فقط ۱ مورد با فنوتیپ حساس نسبت به سفتازیدیم مشاهده شد و در مورد سایرگونه های کلبسیلا و اشریشیا کلی فنوتیپ حساسی مشاهده نشد. در شهر تبریز از ۴ مورد سویه

کلبسیلا پنمونیه بتالاکتاماز مثبت ۳ مورد در بیماران بستری و ۱ مورد در بیماران سرپائی که از ۴ مورد فوق ۳ مورد از عفونت ادراری و یک مورد از عفونت زخم ایزوله شد. این نتایج نشان دهنده این مطلب است که مشاهده فنوتیپ حساس در آنتی بیوگرام دلیل قطعی بر مقاوم نبودن و منفی بودن سویه مورد نظر از لحاظ تولید ESBL نبوده و تشخیص قطعی وابسته به انجام تستهای پیشرفته می باشد. بر اساس این نتایج انجام غربالگری برای تمامی سویه ها از نظر بتالاکتاماز الزامی بوده و بر طبق توصیه های محققین در صورت مشاهده سویه هایESBL مثبت با فنوتیپ حساس نسبت به حداقل یکی از داروهای بتالاکتام، استفاده از ترکیب مناسبی از داروهای بتالاکتام به همراه مهار کننده های بتالاکتاماز الزامی است(۲۱-۱۵،٤). علاوه بر این، نتایج این بخش از مطالعه نشان می دهد که شیوع بتالاکتاماز در بیماران بستری بیش از بیماران سرپائی است. ژن آنزیمهایESBL بطور شایع بر روی عناصر خارج کروموزومی (پلاسمیدی) و بطور نادر بر روی کروموزوم قرار داشته و این مقاومت را توسط مکانیسمهای ترانسفورمیشن و ترنسپوزیشن به سایر باکتریها منتقل می کند. شیوع این مقاومت ابتدا از آلمان و سپس در سراسر اروپا گزارش شد و در حال حاضر در تمامی نقاط دنیا بطور گسترده شیوع پیدا کرده است. باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه ESBL مثبت، بویژه کلبسیلا و اشریشیا کلی سهم مهمی در این اپیدمی ها بخود اختصاص داده اند (۲۶-۲۲). نتایج بدست آمده از تحقیق Vercauteren و همکاران(۸) مبنی بر تشخیص ۳۱ مورد از ۳۲ سویه شاهد ESBL مثبت توسط تکنیک DDST و ۳۰ مورد از ۳۲ سویه شاهد توسط تکنیک TDT و ۲٦ مورد از ۳۲ سویه شاهد توسط تکنیک E-test ESBL نشان دهنده این مطلب است که تشخیص آزمایشگاهی ESBL کار دشواری بوده و علت این امر حساس بودن اکثر این سویه های بتالاکتاماز مثبت در شرایط آزمایشگاهی و عدم وجود روش روتین تشخیص انواع متنوع این مقاومت آنزیمی می باشد(۳۸). با وجود این، تحقیق انجام یافته توسط این محققین، دو روش DDSTو TDT را بعنوان روش های ساده و کم هزینه جهت تشخیص این نوع مقاومت معرفی می کند. به همین دلیل ما در مطالعه خود از هر سه روش فوق جهت به حداکثر رساندن کیفیت و کمیت تشخیص استفاده نمودیم. همانگونه که در جدول ۳ ملاحظه می شود نتایج حاصل از روش های مختلف متفاوت بوده و این مربوط به نوع تست و نوع داروی مورد استفاده در آن می باشد. با توجه به این نتایج و مقایسه آن با نتایج حاصل از تحقیق Eddy و همکاران(۸) این مطلب استنباط می شود که با استفاده از هر سه روش فوق، ۹۹٪ سویه های بتالاکتاماز مثبت تشخیص داده شده و در این میان روش TDT مناسبترین روش قابل توصیه به آزمایشگاههای تشخیص طبی به لحاظ کم هزینه و ساده بودن آن می باشد. نتایج بدست آمده از اپیدمیولوژی عفونتهای بالینی در بیماران بستری و سرپائی نشان می دهد که اکثر موارد عفونتها در مورد دو باکتری مورد نظر را به ترتیب عفونتهای ادراری، خون، ریوی و در نهایت عفونتهای نادری مثل CSF تشکیل می دهد. در بعضی مطالعات شیوع عفونتهای ریوی بیش از عفونت خون می باشد(۲۷). مطالعات مشابهی که توسط سایر محققین صورت گرفته معمولاً بر روی یک نمونه بالینی اعم از ترشحات تراشه، ترشحات زخم، خون و ادرار انجام شده و یا اینکه نمونه بالینی معینی برای مطالعه مد نظر نبوده است(۷،۸،۱۰،۲۸). ما در این تحقیق علاوه بر بررسی جنبه های اپیدمیولوژی و میکروبیولوژی کلبسیلا پنمونیه، اپیدمیولوژی سه زیر گونه از این باکتری را در دو دسته بیماران سرپائی و بستری در دو شهر تهران و تبریز که شامل کلبسیلا اوکسی توکا، کلبسیلا اوزنه و کلبسیلا رینواسکلروماتیس می باشد، مورد مطالعه قرار دادیم. این باکتریها از عواملی با شیوع کم در عفونتهای بیمارستانی نسبت به کلبسیلا پنمونیه و اشریشیا کلی بوده و از عوامل ایجاد کننده عفونتهای بافت نرم هستند(۱). بر اساس نتایج بدست آمده از آنتی بیوگرام الگوی مقاومت در دو گروه بیماران بستری و سرپائی متفاوت بوده و سطوح نسبی مقاومت نسبت به تمامی سفالوسپورینهای آزمایش شده، در گروه بیماران بستری بالاتر از بیماران سرپائی می باشد. نتایج بدست آمده از مطالعات متعدد نشان می دهد که روش دیسک دیفیوژن روش مناسبی جهت تشخیص قطعی مقاومت آنزیمی بتالاکتاماز نیست. بطوریکه گونه های ESBL مثبت با فنوتیپ حساس شایع می باشد(۴۸،۲۸،۲۹). نتایج بدست آمده در این تحقیقات با نتایج حاصل از مطالعه ما از نظر وجود سویه های بتالاکتاماز مثبت با فنوتیپ حساس مطابقت دارد. با این تفاوت که این سویه ها در دو شهر تهران و تبریز نسبت به آمریکا و اروپا از شیوع کمتری برخوردار می باشند. برای پی بردن به علت این امر نیاز به تحقیقات بیشتر در زمینه های منشاء مقاومت در سطح مولکولی و منشاء فیلوژنی می باشد. از طرف دیگر تقریباً تمامی سویه های آنتی بیوگرام شده نسبت به آموکسی سیلین مقاوم بودند که از این نظر مشابه نتایج الگوی آنتی بیوگرام در تحقیق Chang و همکاران در مشاهده مقاومت تمامی سویه ها نسبت به آمپی سیلین می باشد(۳۰). این محققین در بررسی خود، مقاومت نسبت به سفتازیدیم و سفوتاکسیم را به ترتیب۵۱/۳٪ و ۵۰/۴٪ گزارش کردند که این نتایج در تحقیق ما برای سفتازیدیم شامل مقاومت ۵۴/۲٪برای بیماران بستری و ۴۰٪ برای بیماران سرپائی در شهر تهران و ۵۶/۷٪ برای بیماران بستری و ۴۹/۹٪ در گروه بیماران سرپائی در شهر تبریز می باشد.

نتایج بدست آمده از سه روش تشخیصی بتالاکتاماز بر اساس جدول ۳ و مقایسه آن با نتایج حاصل از تحقیق Paterson و همکاران نشان می دهد که درصد شیوع گونه های کلبسیلا پنمونیه ESBL مثبت در بیماران بستری از ۱۲ بیمارستان در آمریکا، تایوان، استرالیا، آفریقای جنوبی، ترکیه، بلژیک و آرژانتین برابر۱۸/۷٪ می باشد (٤) که این رقم برای شهر تهران ۲۸/۸٪ و برای شهر تبریز ۱۵٪ می باشد.

در اکثر تحقیقات انجام شده برروی بتالاکتاماز، نمونه های بیماران بستری مد نظر قرار گرفته و اهمیت این مطلب در عفونتهای سرپائی چندان موشکافانه مورد بررسی قرار نگرفته است. ما در این بررسی علاوه بر بیماران بستری عفونتهای بیماران سرپائی را نیز مورد بررسی قرار داده و درصد شیوع کلبسیلا پنمونیه ESBL مثبت برای این گروه در شهر تهران ۱۲/۹٪ و برای شهر تبریز ۴/۱٪ بدست آمد. در برخی آمارها درصد بالائی از بتالاکتاماز در حد ۸۷٪ وجود دارد که اکثراً مربوط به عفونت بیماران بستری بخشهای پیوند اعضا بوده که این امر بعلت استفاده از تجهیزات و دستکاری های پزشکی در این بخشها و مستعد بودن فرد از نظر سیستم ایمنی در اکتساب این عفونتها می باشد(۱۴). در تحقیق انجام شده توسط Coudron و همکاران درصد شیوع بتالاکتاماز در تمامی نمونه ها که فقط نمونه های مربوط به بیماران بستری را مورد آزمایش قرار داده بودند، شامل اشریشیا کلی، ۱/٦٪ و کلبسیلا پنمونیه، ۱/۱٪بوده است. این نوع بتالاکتاماز از نوع ESBL متفاوت بوده و از نوع AmpC می باشد. درصد پائین شیوع آن نسبت بهESBL به همین علت می باشد(۷).

در تحقیق انجام شده توسط Vercauteren و همکاران از ۸٦ نمونه خون ٦ سویه ESBL مثبت تشخیص داده شد که از این تعداد ۲ سویه اشریشیا کلی، ۳ سویه کلبسیلا پنمونیه و یک سویه کلبسیلا اوکسی توکا بودند که شیوع هر یک از آنها به ترتیب ۲/۳٪، ۳/٤٪ و ۱/۱٪ می باشد(۸). ارقام فوق از لحاظ اینکه در نمونه های خون انجام شده است با نتایج بدست آمده در تحقیق ما قابل مقایسه نمی باشد. اما این مطلب قابل ذکر است که شیوع این نوع مقاومت به ترتیب در نمونه های زخم، خون، ریه و ادرار دیده می شود (۸،۲۷).

Cao و همکاران در تحقیق خود با شیوع ٤/۳۸، ۲/۹٦ و۷/۰۹ درصدی شیوع ESBL به ترتیب در گونه های اشریشیا کلی، کلبسیلا پنمونیه، و پروتئوس میرابیلیس در ۷۳۰ نمونه بالینی از عفونتهای بیمارستانی مواجه شدند که این آمار از لحاظ درصد شیوع اشریشیا کلی تقریباً با نتایج بدست آمده در این تحقیق انطباق دارد(۲۱). در این مطالعه ٤ مورد اشریشیا کلی در تهران و ٦ مورد در تبریز از نمونه های بالینی خون بدست آمد که هیچ موردی از مقاومت بتالاکتاماز در آنها مشاهده نشد. در مورد کلبسیلا پنمونیه نیز در تهران کلاً ۷ مورد از نمونه های خون بدست آمد که مقاومتی در مورد آنها مشاهده نشد. در شهر تبریز سه مورد عفونت خون با کلبسیلا پنمونیه مشاهده شد که یک مورد واجد ESBL بود. نتایج مندرج در جدول ۳ نشان می دهد که علاوه بر اشریشیا کلی و کلبسیلا پنمونیه سایر زیر گونه های کلبسیلا شیوع قابل توجهی از نظر سویه های واجد ESBL بخصوص در گروه بیماران بستری دارند. در اکثر تحقیقات انجام شده سخنی از ارائه یک داروی موثر و یک درمان روتین برای گونه های بتالاکتاماز مثبت به میان نیامده است. در تحقیقی که ما انجام دادیم برای سویه های ESBL مثبت الگوی آنتی بیوگرام نسبت به ۷ نوع داروی ضد میکروبی تعیین شد. بر اساس نتایج جدول ٤ عدم وجود درمان روتین برای این گونه ها قابل توجیه می باشد و این نتایج با نتایج حاصل از تحقیق Villa و همکاران مبنی بر وجود پلاسمیدهای حامل مقاومت چندگانه نسبت به انواع آمینوگلیکوزیدها و تریمتوپریم انطباق دارد(۳۱). بر طبق این مطالعه آمیکاسین، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول و نالیدیکسیک اسید از داروهائی هستند که می توانند به شرط انجام دقیق آنتی بیوگرام برای این منظور بکار روند.

محققین اذعان می دارند که در صورت مشاهده این نوع مقاومت، استفاده از هیچکدام از داروهای بتالاکتام جهت درمان، حتی در صورت مشاهده حساسیت در تست حساسیت، مفید نیست(٤). اما امروزه تحقیقات گسترده ای، استفاده از داروهای بتالاکتام را به همراه مهار کننده های بتالاکتاماز مورد ارزیابی قرار داده و نتایج کاربردی آن در درمان این عفونتها بکار گرفته شده است(۲۰،۱۸،۱۷).

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان دهنده بالا بودن شیوع مقاومت آنزیمی بتالاکتاماز در بین بیماران بستری و سرپائی در شهرهای تهران و تبریز و بالا بودن شیوع آن در بین بیماران بستری نسبت به بیماران سرپائی می باشد. علاوه بر این، بر اساس یافته های این مطالعه غربالگری مقاومت آنزیمی ESBL از اهمیت بسیار زیادی برخوردار بوده و تست حساسیت روش مناسبی برای تشخیص این مقاومت نمی باشد.

تقدیر و تشکر

با تشکر ازمسئولین دپارتمانهای میکروبشناسی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مسئولین محترم بیمارستانهای شهید چمران، شهداء، لبافی نژاد، آزمایشگاه مرکزی تهران و بیمارستانهای سینا و امام خمینی شهر تبریز.

References

1. Brooks GF, Butel JS, More SA. *Medical Microbiology*. 22nd ed. United States of America, McGrew Hill, 2000; PP: 145.

2. Ishii Y, Kimura S, Alba J, Shiroto K, Otsuka M, Hashizume N, et al. Extended-Spectrum ß-Lactamase-Producing Shiga Toxin Gene (stx_1)-

Positive *Escherichia coli* O26:H11: a New Concern. *J Clin Micribiol* 2005; **43**(3): 1072-75.
3. Yagi T, Wachino JI, Kurokawa H, Suzuki S,Yamane K, Doi Y, et al. Practical Methods Using Boronic Acid Compounds for Identification of Class C ß-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(6): 2551-58.
4. Paterson DL, Ko WC, Gottberg VA, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP, et al. Outcome of Cephalosporin Treatment for Serious Infections Due to Apparently Susceptible Organisms Producing Extended – Spectrum Beta-lactamases: Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(6): 2206-12
5. Kim YK, Pai H, Park SE, Choi EH, Kim J H. Bloodstream Infections by Extended- Spectrum - Betalactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Children: Epidemiology and Clinical Outcome. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; **46**(5): 1481-91.
6. Blomberg B, Jureen R, Manji KP, Tamim BS, Mwakagile DSM, Urasa WK, et al. High Rate of Fatal Cases of Pediatric Septicemia Caused by Gram-Negative Bacteria with Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(2): 745-9.
7. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and Detection of AmpC Beta-Lactamases among *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* Isolates at a veterans Medical Center. *J Clin Microbiol* 2000; **38**(5): 1791-96.
8. Vercauteren Y, Descheemeaker P, Ieven M, Sanders CC, Gossens H. Comparison of Screening Methods for Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases and Their Prevalence among Blood Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumpniae* In a Belgian Teaching Hospital. *J Clin Microbiol* 1997; **35**(9): 2191-97.
9. Jeong SH, Bae I, Lee JH, Sohn SG, Kang GH, Jeon GJ, et al. Molecular Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Produced by Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean Nationwide Survey. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(7): 2902-06.
10. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ, Tsai SH and Chuang CL. Epidemiological Investigation of Bloodstream Infections by Extended Spectrum Cephalosporin - Resistant *Escherichia coli* in a Taiwanese Teaching Hospital. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(7): 3329-32
11. Cartelle M, Tomas MD, Pertega S, Beceiro A, Dominguez MA, Velasco D, et al. Risk Factors for Colonization and Infection in a Hospital Outbreak Caused by a Strain of *Klebsiella pneumoniae* with Reduced Susceptibility to Expanded- Spectrum Cephalosporins. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(9): 4242-49.
12. Yan JJ, Ko WC, Wu HM, Tsai SH, Chuang CL and Wu JJ. Complexity of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Resistant to Both Cephamycins and Extended-Spectrum Cephalosporins at a Teaching Hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(11): 5337-5340.
13. Pitout JD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and Molecular Detection of CTX-M-ß-Lactamases Produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(12): 5715-21.
14. Rebuck JA, Olsen KM, Fey PD, Langnas AN, Rupp ME. Characterization of an Outbreak Due to Extended-Spectum Beta-Lactamase -Producing *klebsiella pneumoniae* in a Pediatric Intensive Care Unite Transplant Population. *Clin Infect Dis* 2000; **31**: 1368-72.
15. Pena C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Linares J, et al. Epidemiology and Successful Control of a Large Outbreak Due to *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* 1998; **42**(1): 53-58.
16. Spano T, Luzzario F, Perilli M, Amicosante G, Toniolo A, Fadda G, et al. Occurrence of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Member of the Family Enterobactriaceae in Italy: Implications for Resistance to Betalactams and Other Antimicrobial Drugs. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; **46**(1): 196-202.
17. Leleu G, Kitzis MD, Vallois JM, Gutmann L, Decazes JM. Different Rations of the Pipracillin – Tazobactam Combination for Treatment of Experimental Meningitis Due to *Klebsiella pneumoniae* Producing the TEM-3 Extended-Spectrum Beta-Lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother* 1994; **38**(2): 195-9.
18. Payne DJ, Cramp R, Winstanley DJ, Knowles DJ. Comparative Activities of Clavolanic Acid Sulbactam and Tazobactam Against Clinically Important Beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* 1994; **38**(4): 767-72.
19. Rice LB, Carias LI, Shelaes DM. In vivo Efficacies of Beta-Lactamase Inhibitors Combination Against a TEM-26 –Producing Strain of *Klebsiella pneumonaie*. *Antimicrob. Agants Chemother* 1994; **38**(11): 2663-2664.
20. Thauvin EC, Tripodi MF, Moelleringjr RC, Eliopoulos GM. Efficacies of Pipracillin – Tazobactam and Cefepim in Rates with Experimental Intra-Abdominal Abscesses Due to Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997; **41**(5):1053-57.
21. Cao V, Lambert T, Nhu DQ, Loan HK, Hoang NK, Arlet G, et al. Distribution of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; **46**(12): 3739-43.

22. Schwaber MJ, Venezia SN, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwarts D, Carmeli Y. Utility of the VITEK 2 Advanced Expert System for Identification of Extended-Spectrum ß-Lactamase Production in *Enterobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2006; **44**(1): 241-3.
23. Yong D, Lim YS, Yum JH, Lee H, Lee K, Kim EC, et al. Nosocomial Outbreak of Pediatric Gastroenteritis Caused by CTX-M-14-Type Extended-Spectrum ß-Lactamase-Producing Strains of *Salmonella enterica* Serovar London. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(7): 3519-21.
24. Lavigne JP, Bouziges N, Chanal C, Mahamat A, Charachon SM, Sotto Albert. Molecular Epidemiology of Enterobacteriaceae Isolates Producing Extended-Spectrum ß-Lactamases in a French Hospital. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(8): 3805-08.
25. Venezia SN, Leavitt A, Ami RB, Aharoni Y, Schwaber M, Schwartz D, et al. Evaluation of an Accelerated Protocol for Detection of Extended-Spectrum ß-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(1): 439-41.
26. Li WC, Huang FY, Liu CP, Weng LC, Wang NY, Chiu NC, et al. Ceftriaxone Resistance of Nontyphoidal *Salmonella enterica* Isolates in Northern Taiwan Attributable to Production of CTX-M-14 and CMY-2 ß-Lactamases. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(7): 3237-43.
27. Gniadkowski M, Schnider I, Jungwirth R, Hryniewicz W, Bauernfeind A. Seftazidime-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from Three Polish Hospitals: Identification of Three Novel TEM and SHV-5-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* 1998; **42**(3): 514-20.
28. Gruteke P, Goessens W, Gils JV, Peerbooms P, Toom NLD, Santen-Verheuvel MV, et al. Patterns of Resistance Associated with Integron , the Extended Spectrum Beta-Lactamase SHV-5 Gene , and Multidrug Efflux Pump of *Klebsiella pneomoniae* Causing a Nosocomial Outbreak. *J Clin Microbiol* 2003; **41**(3): 1161-66.
29. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A Functional Classification Scheme for Betalactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrob. Agents Chemother* 1995;**39**(6):1211-23.
30. Chang FY, Fung LC, Huang MH, Ho M. Diversity of SHV and TEM Beta-Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* : Gene Evaluation in Northern Taiwan and Two Novel Betalactamases, SHV-25 and SHV-26. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001; **45**(9): 2407-13.
31. Villa L, Pezella C, Tosini F, Visca Petrucea A, Carattoli A.Multiple- Antibiotic Resistance Mediated by Structurally Related IncL/M Plasmid Carrying an Extended-Spectrum Beta-Lactamase Gene and a Class 1 Integron. *Antimicrob. Agents Chemother* 2000; **44**(10): 2911-14.