

آنتروباکتریاسه های مولد آنزیم های β - لاکتاماز طیف گسترده (ESBL) و الگوی پلاسمیدی آنها در بخش مراقبت های ویژه در بیمارستان کودکان شهر تبریز

هائده مبین: دانشجوی دوره Ph.D. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران: نویسنده رابط

E-mail: haiedeh41@yahoo.com

دکتر محمد رضا نهائی: استاد میکروبیشناسی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر نور امیر مظفری: دانشیار میکروبیشناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران
جاوید صادقی: کارشناس ارشد میکروبیشناسی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی تبریز
مریم رسولی: کاردارن آزمایشگاه بیمارستان کودکان تبریز

دریافت: ۸۴/۸/۱۰، پذیرش: ۸۵/۲/۲۴

چکیده

زمینه و اهداف: باکتریهای تولید کننده آنزیم های β - لاکتاماز طیف گسترده (Extended - spectrum β -lactamases, ESBLs) به طور وسیعی در سراسر جهان انتشار یافته اند. تولید این آنزیم ها، سبب ایجاد مقاومت باکتریها نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها می گردد. عفونت ناشی از آنها، بخصوص در بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه (Intensive Care Unit, ICU)، زندگی بیماران را به مخاطره انداخته و سبب مرگ آنها می گردد. در این مطالعه، شیوع و الگوی پلاسمیدی آنتروباکتریاسه های مولد این آنزیم بررسی شد تا با شناخت بهتر باکتریهای جدا شده از ICU بتوان تدابیر درمانی بهتری را اتخاذ نمود.

روش بررسی: حساسیت باکتریهای جدا شده در مقابل آنتی بیوتیک ها با روش دیسک دیفیوژن آگار تعیین و سویه ها با روش مجاورت دودیسک (Double disk approximation test, DDT)، آزمایش دیسک ترکیبی (Combined test, CT) و حداقل غلظت مهارکننده (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) با نوارهای E-test از نظر تولید آنزیم های β - لاکتاماز مورد بررسی قرار گرفتند. جهت جداسازی پلاسمید از روش لیز قلیایی و جهت حذف پلاسمید از رشد باکتریها در دمای ۴۴ درجه سانتیگراد استفاده شد.

یافته ها: کلیه سویه های سودوموناس آئروجینوزا و آنتروباکتر کلوآکه و ۹۰/۹٪ از سویه های کلیسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه های جمع آوری شده از ICU بیمارستان کودکان تبریز، با روش E-test تولید کننده ESBL بودند. الگوی پلاسمیدی باکتریهای مطالعه شده، وجود پنج کلون مختلف باکتری را در این مطالعه روشن کرد.

نتیجه گیری: فشار انتخابی حاصل از مصرف آنتی بیوتیکها، منجر به شیوع بالای باکتریهای تولیدکننده آنزیم های ESBL می گردد که با توجه به مطالعه اخیر، احتمالاً این آنزیمها از گروه CTX-M و AmpC میباشند که جهت شناسایی دقیق تر احتیاج به مطالعات مولکولی وسیع تر می باشد.

کلید واژه ها: β - لاکتامازهای طیف گسترده، پلاسمید، آنتروباکتریاسه

مقدمه

عفونت های بیمارستانی یکی از مشکلات عمده در کل بیمارستانها بوده و این مشکل بیش از همه بخش مراقبت های ویژه (ICU) را درگیر میسازد (۱). فرض بر این است که بیماران بستری در بخش های ICU، بدلیل پیچیدگی های مراقبت در این بخش و فاکتورهای مربوط به بیماران و استفاده از وسایل پزشکی مختلف در معرض عفونت با ارگانیسم های مقاوم به چند دارو می باشند (۳ و ۲)، که علاوه بر افزایش موربیدیتی و مورتالیتی به افزایش هزینه نیز منجر میگردد. از طرف دیگر، مقاومت دارویی در عفونت های بیمارستانی یک مسئله مهم و بحرانی میباشد، زیرا در انواع زیادی از پاتوژن ها بخصوص عوامل ایجاد کننده عفونت بیمارستانی، به طور فزاینده ای مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی دیده شده است (۱). از معمول ترین پاتوژن های جدا شده از عفونت های بیمارستانی، آنتروباکتریاسه ها را می توان نام برد که غالباً جهت کنترل این عفونتها، آنتی بیوتیکهای β - لاکتام، بکار برده می شود که با ظهور فزاینده آنزیم های β - لاکتاماز، کارایی این داروها کاهش می یابد (۴). β - لاکتامازها، مطابق نظر Ambler به چهار دسته مولکولی متمایز از نظر تکاملی A، B، C و D تقسیم بندی شده اند (۵). در سال ۱۹۹۵، آخرین طبقه بندی برای این آنزیمها توسط Bush - Jacoby - Medeiros صورت گرفته که براساس این طبقه بندی، این آنزیمها به چهار گروه ۱ تا ۴ و زیرگروه های a-f تقسیم بندی شدند (۶). β - لاکتامازهای طیف گسترده (ESBLs) گروهی از آنزیم های ناشی از پلاسمید هستند

عفونت های بیمارستانی یکی از مشکلات عمده در کل بیمارستانها بوده و این مشکل بیش از همه بخش مراقبت های ویژه (ICU) را درگیر میسازد (۱). فرض بر این است که بیماران بستری در بخش های ICU، بدلیل پیچیدگی های مراقبت در این بخش و فاکتورهای مربوط به بیماران و استفاده از وسایل پزشکی مختلف در معرض عفونت با ارگانیسم های مقاوم به چند دارو می باشند (۳ و ۲)، که علاوه بر افزایش موربیدیتی و مورتالیتی به افزایش هزینه نیز منجر میگردد. از طرف دیگر، مقاومت دارویی در عفونت های بیمارستانی یک مسئله مهم و بحرانی میباشد، زیرا در انواع زیادی از پاتوژن ها بخصوص عوامل ایجاد کننده عفونت بیمارستانی، به طور فزاینده ای مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی دیده شده است (۱). از معمول ترین پاتوژن های جدا شده از عفونت های بیمارستانی، آنتروباکتریاسه ها را می توان نام برد که غالباً جهت کنترل این عفونتها، آنتی بیوتیکهای β - لاکتام، بکار برده می شود که با ظهور فزاینده آنزیم های β - لاکتاماز، کارایی این داروها کاهش می یابد (۴). β - لاکتامازها، مطابق نظر Ambler به چهار دسته مولکولی متمایز از نظر تکاملی A، B، C و D تقسیم بندی شده اند (۵). در سال ۱۹۹۵، آخرین طبقه بندی برای این آنزیمها توسط Bush - Jacoby - Medeiros صورت گرفته که براساس این طبقه بندی، این آنزیمها به چهار گروه ۱ تا ۴ و زیرگروه های a-f تقسیم بندی شدند (۶). β - لاکتامازهای طیف گسترده (ESBLs) گروهی از آنزیم های ناشی از پلاسمید هستند

که توانایی هیدرولیز سفالوسپورینهای نسل سوم و منو باکتام ها را دارند. اغلب ارگانیزم های حاوی این آنزیم ها، نسبت به کاربا پنم ها حساس باقی مانده اند در حالیکه، فعالیت آنها نسبت به سیپروفلوکساسین و سفپیم و ترکیبات حاوی β -لاکتام و مهار کننده β - لاکتاماز متغیر می باشد (۴). ESBL ها از β - لاکتامازهای کلاس A/گروه 2be هستند. بیشتر این آنزیم ها از مشتقات TEM-1 (یک β -لاکتاماز وابسته به پلاسمید از *E. coli*) و یا SHV-1 (یک β -لاکتاماز کروموزومی از *Klebsiella pneumoniae*) می باشند (۶). این آنزیم ها با مهارکنندگان β - لاکتاماز، چون کلاولانیک اسید و سالباکتام و یا تازوباکتام مهار شود و معمولاً سفامایسین ها (برای مثال، سفوتیتان و سفوکستین) و یا ایمی پنم را هیدرولیز نمی کنند (۷). با توجه به اینکه، داشتن اطلاعات کافی از فاکتورهای اپیدمیولوژیک ارگانیزم های عامل عفونت والگوی مقاومت آنها جهت بهبود دستورات دارویی مناسب در مراحل خاص، ضروری می باشد (۸)، لذا این مطالعه جهت بررسی شیوع عفونتهای ناشی از باسیل های گرم منفی و توانایی تولید آنزیم بتا لاکتاماز با طیف گسترده انجام تا الگوی مقاومت دارویی سویه های جدا شده و نیز الگوی پلاسمیدی آنها شناسایی گردد.

مواد و روش ها

از آبان ماه سال ۱۳۸۳ الی شهریور ماه سال ۱۳۸۴ از بیماران مشکوک به عفونت بستری در بخش ICU بیمارستان کودکان شهر تبریز نمونه برداری شد. نمونه های مورد مطالعه شامل خون، ترشحات لوله ی تراشه، مایع پلور و ترشحات چشم بیماران بودند و در صورتی که از یک بیمار بیش از یکبار یک گونه باکتریایی جدا شده بود تنها یک نمونه از هر گونه باکتریایی در مطالعه دخالت داده شد. سویه های جدا شده از بیماران، به روش روتین مورد شنا سایی قرار گرفته و جهت تایید تشخیص آنها از کیت ساخت Hi25 *Enterobacteriaceae* Identification kit (strip 1,2) شرکت Kirby & Bauer (۹) مورد آزمایش حساسیت در برابر عوامل ضد میکروبی قرار گرفتند. آنتی بیوتیکهای مورد استفاده شامل سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین (شرکت BBL)، سفوروکسیم، سفوکستین، سفنازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، کوتریموکسازول، تتراسایکلین، افلوکساسین، آمیکاسین، توبراماسین، پی پراسیلین، کاربنی سیلین و تیکارسیلین (شرکت MAST) و آموکسی کلاو (شرکت ایران دارو) بودند.

طبق راهنمایی های NCCLS¹، قطر هاله مهار رشد کمتر از ۲۲ میلی متر برای سفنازیدیم $30\mu\text{g}$ ، قطر هاله مهار رشد کمتر از ۲۲ میلی متر برای سفتریاکسون و سفوتاکسیم $30\mu\text{g}$ برای غربالگری سویه های تولید کننده ESBL بکار گرفته شد (۱۰). سپس سویه های فوق با آزمایش مجاورت دو دیسک (DDT) روش پیشنهادی Jarlier و همکاران (۱۱) با اصلاحات پیشنهادی

Emery & Weymouth (۱۲)، با قراردادن دیسک آموکسی کلاو با فاصله ۲۰ میلی متر از دیسک های سفتریاکسون، سفنازیدیم و سفوتاکسیم انجام و جهت تایید تولید آنزیم های ESBL آزمایش ترکیبی (CT)، روش پیشنهادی NCCLS با استفاده از دیسک سفنازیدیم $30\mu\text{g}$ در کنار دیسک سفنازیدیم/کلاولانیک اسید ($30\mu\text{g}$) و دیسک سفوتاکسیم $30\mu\text{g}$ در کنار دیسک سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید ($30\mu\text{g}$ / $10\mu\text{g}$) (ساخت شرکت MAST)، استفاده شد (۱۰). سویه هایی که تفاوت قطر هاله مهار رشد آنها بیشتر از ۵ میلی متر در یک آنتی بیوتیک در مقایسه با همان آنتی بیوتیک حاوی کلاولانیک اسید بود بعنوان تولید کننده آنزیم های ESBL در نظر گرفته شد و روش MIC با استفاده از نوارهای (E-test strip AB Biodisk, Selona, Sweden) انجام یافت (۱۳ و ۱۴). نوارهای E-test مورد استفاده در این مطالعه در سویه های کلبسیلا پنومونیه و آنتروباکتر کلوآکه شامل آترونام، ایمی پنم، سفوتاکسیم، سفنی زوکسیم، کوآموکسی کلاو و سفنازیدیم/سفنازیدیم + کلاولانیک اسید بودند. برای انجام این آزمایش، طبق راهنمایی های شرکت سازنده نوارهای E-test باکتری مورد مطالعه در سرم فیزیولوژی به حالت سوسپانسیون در آمده و کدورت آن با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم و روی سطح پلیت مولر هیتون آگار با قطر ۹۰mm با سوآب پنبه ای گسترش و در هر پلیت دو عدد از نوارهای E-test قرار داده شد. نوارهای مورد استفاده در مورد سویه های سودوموناس آتروجینوزا شامل سفنازیدیم، سفتریاکسون و آترونام بودند.

جهت بررسی دقیق تر اپیدمیولوژیک، الگوی پلاسمیدی سویه ها با استفاده از روش لیز قلیایی Sambrook (۱۵) و جهت حذف پلاسمید^۲ از قرار دادن سویه ها در دمای بالا (۴۴ درجه سانتیگراد) به مدت یک شبانه روز استفاده شد (۱۶).

سویه های کنترل مورد استفاده در روش دیسک دیفیوژن و E-test شامل: *E. coli* ATCC 25922 و سویه های کنترل مورد استفاده در تعیین الگوی پلاسمیدی *E. coli* V517 و *E. coli* 39R861 بودند.

یافته ها

از ۲۷۵ بیمار بستری در بخش ICU بیمارستان کودکان، در طول یک دوره ۱۰ ماهه، از آبان ماه سال ۱۳۸۳ تا شهریور ماه سال ۱۳۸۴، نمونه های مختلف به آزمایشگاه بیمارستان ارسال که از ۳۲ بیمار (۱۱/۶۳٪) باکتری جدا سازی شده و ۲۵ مورد (۹/۰۹٪) مربوط به باسیل های گرم منفی بوده؛ که به ترتیب کلبسیلا پنومونیه ۱۱ مورد (۴۴٪)، آنتروباکتر کلوآکه ۳ مورد (۱۲٪)، سودوموناس آتروجینوزا ۸ مورد (۳۲٪) و با سیل های گرم منفی غیر تخمیر کننده دیگر ۳ مورد (۱۲٪) را شامل می شد.

کلیه سویه های کلبسیلا پنومونیه، آنتروباکتر کلوآکه و سودوموناس آتروجینوزا در مقابل سیپروفلوکساسین ۱۰۰٪ حساس و در برابر کاربنی سیلین ۱۰۰٪ مقاوم بودند در حالی که در مقابل

کوتریموکسازول به ترتیب ۸۱/۸۱٪، ۳۶/۳۶٪، ۲۷/۲۷٪، ۲۷/۲۷٪، ۱۸/۱۸٪، ۱۸/۱۸٪، ۹/۰۹٪، ۹/۰۹٪ و ۹/۰۹٪ بود. کلیه سویه‌های آنتروباکتر کلوآکه در مقابل تمام آنتی‌بیوتیک‌های فوق‌الذکر ۱۰۰٪ مقاوم بودند به جزء آمیکاسین که ۶۶/۲۶٪ از سویه‌ها نسبت به این آنتی‌بیوتیک حساس بودند.

نورفلوکساسین به ترتیب ۹۰/۹٪، ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ و در مقابل افلوکساسین به ترتیب ۱۰۰٪، ۱۰۰٪ و ۶۲/۵٪ حساس بودند. حساسیت سویه‌های کلبسیلا پنومونیه در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین، آمیکاسین، توبراماسین، پی‌پراسیلین، تتراسایکلین، سفوتاکسیم، تیکارسیلین، سفمتازیدیم، سفوروکسیم و

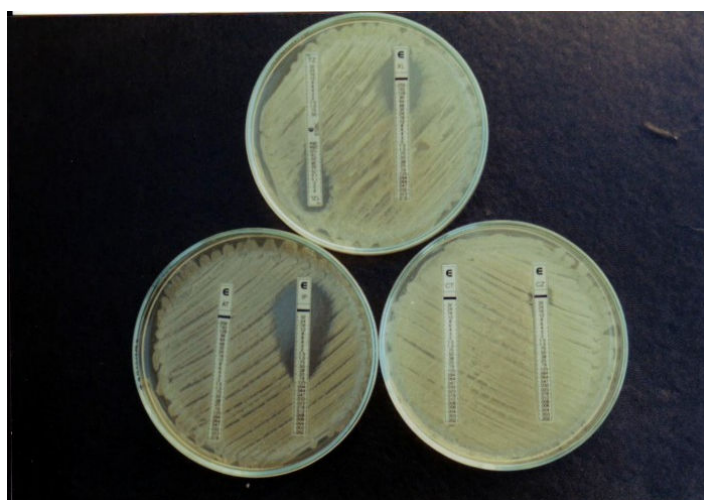
جدول ۱: نتایج حداقل غلظت مهارکننده (MIC) سویه‌های مورد مطالعه در بیمارستان کودکان

شماره سویه‌ها	جنس و گونه باکتری	آنتی‌بیوتیک‌ها							
		TX	XL	TZL	TZ	CT	CZ		
۱	K.p	-	۲	۰/۰۶۴	< ۰/۵۰	۰/۰۴۷	۰/۰۱۶	۳۲	۰/۲۵
۲	P.a	> ۲۵۶	-	-	۱۶	-	-	۸	-
۳	K.p	-	۳۲	۰/۲۵	> ۳۲	> ۳۲	> ۳۲	> ۲۵۶	۰/۱۹
۴	K.p	-	۸	۰/۱۲۵	> ۳۲	> ۳۲	> ۳۲	> ۲۵۶	۰/۲۵
۵	K.P	-	۱۶	۰/۱۲۵	> ۳۲	> ۳۲	> ۳۲	> ۲۵۶	۰/۱۲۵
۶	P.a	۶	-	-	۰/۷۵	-	-	۱/۵	-
۷	E.c	-	۲۴	> ۴	> ۳۲	> ۳۲	> ۳۲	۳۲	۰/۲۵
۹	K.p	-	۱۶	۰/۱۹	> ۳۲	> ۳۲	> ۳۲	> ۲۵۶	۰/۱۹
۱۰	K.p	-	۸	۰/۰۹۴	> ۳۲	> ۳۲	> ۳۲	> ۲۵۶	۰/۰۶۴
۱۳	P.a	۸	-	-	۰/۳۸	-	-	۲	-
۱۵	E.c	-	۱۶	۰/۲۵	۴	۲	۱	۸	۰/۱۹
۱۶	K.p	-	۱۶	۰/۱۹	> ۳۲	> ۳۲	۶	> ۲۵۶	۰/۱۲۵
۱۷	K.p	-	۱۶	۰/۱۹	> ۳۲	> ۳۲	۸	> ۲۵۶	۰/۱۲۵
۱۸	P.a	۲۴	-	-	۱/۵	-	-	۲	-
۱۹	E.c	-	۲۴	> ۴	> ۳۲	> ۳۲	> ۳۲	۳۲	۰/۱۹
۲۰	K.p	-	۱۶	۰/۳۸	> ۳۲	> ۳۲	۶	> ۲۵۶	۰/۱۲۵
۲۲	P.a	۱۲	-	-	۰/۷۵	-	-	۲	-
۲۳	K.p	-	۱۶	۰/۲۵	> ۳۲	> ۳۲	> ۳۲	> ۲۵۶	۰/۱۹
۲۴	P.a	۱۶	-	-	۱۶	-	-	۲	-
۲۷	K.p	-	۱۶	۰/۱۹	> ۳۲	> ۳۲	> ۳۲	> ۲۵۶	۰/۱۹
۲۸	P.a	۳۲	-	-	۱/۵	-	-	۱/۵	-

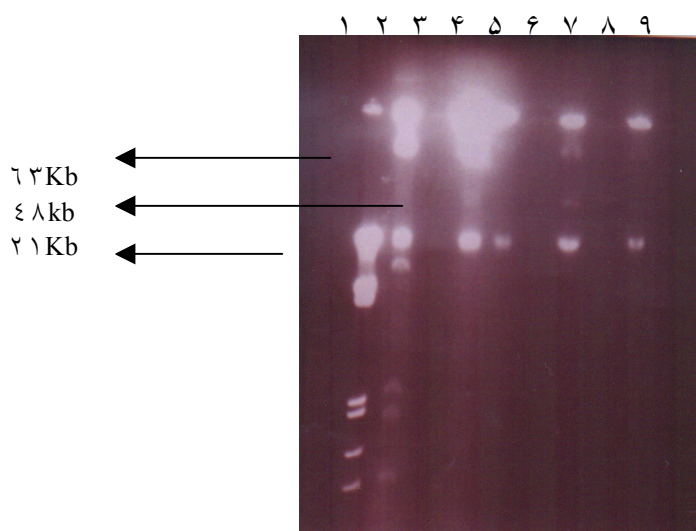
IP = ایمی پنم AT؛ AZ = آزترونام؛ CZ = سفتری‌زوکسیم؛ CT = سفوتاکسیم؛ TZ = سفمتازیدیم؛ TZL = سفمتازیدیم / کلاولانیک اسید؛ XL = آموکسی کلاو؛ TX = سفتری‌اکسون؛ K.p = کلبسیلا پنومونیه؛ E.c = آنتروباکتر کلوآکه و P.a = سودوموناس آئروجینوزا،

جدول ۲: الگوی پلاسمیدی سویه‌های تولید کننده ESBL در بیمارستان کودکان شهر تبریز

سویه‌های مورد آزمایش	قبل از حذف پلاسمید		بعد از حذف پلاسمید	
	تعداد	اندازه (kb)	تعداد	اندازه (kb)
۱	۳	> ۶۳، ۶۳ و ۲۱	-	-
۳	۴	> ۶۳، ۶۳، ۴۸ و ۲۱	-	-
۴	۳	۶۳، ۴۸ و ۲۱	۱	۴۸
۵	۳	> ۶۳، ۶۳ و ۲۱	-	-
۸	۲	۶۳ و ۴۸	۱	۴۸
۹	۳	> ۶۳، ۶۳ و ۴۸	-	-
۱۰	۳	> ۶۳، ۶۳ و ۴۸	۱	۴۸
۱۴	۴	> ۶۳، ۶۳، ۴۸ و ۲۱	۳	> ۶۳، ۴۸ و ۲۱



تصویر ۱، MIC کلبسیلا پنومونیه (سویه شماره ۴) به روش E-test



تصویر ۲، الگوی پلاسمیدی سویه‌های مورد آزمایش
Ladder - ۱، E.coli 39R861 - ۲، E.coli V517 - ۳،

۴، ۶ و ۸ = سویه‌های شماره ۱، ۳ و ۵ و ۷ و ۹ = سویه‌های شماره ۱، ۳ و ۵ بعد از حذف پلاسمید

قلیه ی سویه های سودوموناس آئروچینوزای جدا شده نسبت به سفوکسیتین، سفوروکسیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، کوتریموکسازول و تتراسایکلین ۱۰۰٪ مقاوم بودند؛ در حالی که حساسیت آنها نسبت به آمیکاسین، تورامایسین، سفنازیدیم، افلوکساسین، پی‌پراسیلین و تیکارسیلین به ترتیب ۸۷/۵٪، ۷۵٪، ۶۲/۵٪، ۵۰٪ و ۲۵٪ بود.

در آزمایش مجاورت دو دیسک (DDT)، با استفاده از دیسک‌های سفنازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و آموکسی کلاو، در هیچیک از سویه ها ایجاد سینرژی بین دو دیسک مشاهده نشد، لذا جهت تایید این نتایج آزمایش نمونه‌های فوق مورد آزمایش ترکیب دو دیسک (CT) واقع شدند.

درآزمایش ترکیبی (CT) کلیه سویه های کلبسیلا پنومونیه و آنتر و باکتر کلوآکه (۱۰۰٪) و سویه های سودوموناس آئروچینوزا ۶۲/۵٪ مولد آنزیم های β -لاکتاماز طیف گسترده (ESBLs) بودند.

در غربالگری سویه های تولید کننده ESBL بر اساس راهنمایی‌هایی NCCLS در کلیه ی سویه های کلبسیلا پنومونیه، آنتر و باکتر کلو آکه و سودوموناس آئروچینوزا قطر هاله های مهار رشد این باکتری ها در مقابل سه آنتی بیوتیک سفنازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون مورد مطالعه واقع شد که تمامی نمونه ها

کلیه ی سویه های سودوموناس آئروچینوزای جدا شده نسبت به سفوکسیتین، سفوروکسیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، کوتریموکسازول و تتراسایکلین ۱۰۰٪ مقاوم بودند؛ در حالی که حساسیت آنها نسبت به آمیکاسین، تورامایسین، سفنازیدیم، افلوکساسین، پی‌پراسیلین و تیکارسیلین به ترتیب ۸۷/۵٪، ۷۵٪، ۶۲/۵٪، ۵۰٪ و ۲۵٪ بود.

آزمایشگاهی، درمان عفونت ناشی از آن با داروهای β - لاکتام را با شکست مواجه می سازند (۱۸). شیوع باکتریهای تولید کننده ESBL در کلبسیلا پنومونیه و آنتروباکتر کلوآکه در مقایسه با گزارشهای ارایه شده از سایر کشورها بسیار بالاتر می باشد، مثلاً ترکیه تولید آنزیم در سویه های *E.coli* معادل ۱۷٪ و در سویه های کلبسیلا پنومونیه ۵۷/۱۰٪ (۱۹)، در آمریکای شمالی ۴/۴-۴/۲٪ از *E.coli* ها و ۴/۷-۳/۳٪ از کلبسیلاها (۲۰ و ۲۱)، در آمریکای جنوبی ۴۷-۴۰٪ از کلبسیلاها و ۲۵/۵-۶/۷٪ از *E.coli* ها (۶ و ۱۹) گزارش شده در حالیکه ۱۰۰٪-۹۰٪ سویه های جدا شده از بیمارستان مورد مطالعه ما، تولید کننده ESBL بودند. ریسک فاکتورهای مختلفی در انتخاب و پخش سویه های تولید کننده ESBL دخالت دارند از جمله توقف طولانی مدت در بیمارستان و یا در بخش ICU، مصرف قبلی آنتی بیوتیک ها (از جمله سفالوسپورین های نسل سوم)، شدت بیماری، استفاده از کاتترهای عروقی و ادراری و سابقه جراحی (۱۷). در بررسی پرونده های بیماران غالب بیماران مورد مطالعه سابقه جراحی و بستری شدن در بیمارستان های دیگر را داشتند.

باکتریهای تولید کننده ESBL، به طور قابل توجهی، نسبت به سایر آنتی بیوتیکها مقاومت نشان دادند بطوری که سویه های کلبسیلا پنومونیه نسبت به تتراسایکلین ۷۲/۷٪ و نسبت به آمیکاسین ۵۰٪ مقاوم و در عین حال ۱۰۰٪ آنها نسبت به ایمی پنم حساس باقی مانده اند که این یافته ها با نتایج حاصل از بیمارستانهای کلمبیا تطابق دارد. حدوداً ۹۰٪ از سویه ها نسبت به فلونوروکینولونها حساس باقی مانده بودند که در مقایسه با بیمارستان های کلمبیا (۴۰٪) (۲۱) بسیار بالاتر می باشد. حساسیت سویه های کلبسیلا و آنتروباکتر نسبت به ایمی پنم، نیز تاییدی بر تولید آنزیم های β -لاکتاماز توسط این سویه ها می باشد. نتایج حساسیت در مقابل مواد ضد میکروبی سویه های مورد مطالعه یعنی مقاومت نسبت به سفنازیدیم، سفو تاکسیم و آزترونام به خوبی روشن می سازد که آنزیم های β -لاکتاماز تولیدی توسط این باکتریها از دسته ای A زیر گروه 2be می باشند زیرا این گروه از آنزیم ها قادر به غیرفعال سازی سفالوسپورین های نسل سوم و منوباکتام ها بوده (۱۷) در حالی که نسبت به کاربانم ها حساس باقی می ماند (۵) و با توجه با اینکه از آنزیم های ESBL، گروه CTX-M، آنزیم های قادر به هیدرولیز سفو تاکسیم، می باشند (۶) بررسی مولکولی سویه های مورد آزمایش از نظر وجود ژن تولید این آنزیم، ضرورت می یابد. حساسیت این سویه ها نسبت به ایمی پنم با مطالعات قبلی مطابقت دارد (۲۱).

از طرف دیگر، سویه هایی که قطر هاله مهار رشد آنها، در برابر دیسک سفوکسیتین $30 \mu g$ ، کمتر از ۱۸ mm باشد وقوع تولید β -لاکتامازهای AmpC را مطرح می سازد (۲۲). نتایج حاصل از سویه های مورد مطالعه، با وجود حساسیت ۸۱/۸۱٪ سویه های کلبسیلا پنومونیه نسبت به سفوکسیتین قطر هاله مهار رشد آنها کمتر از ۱۸ mm بوده است که وجود این آنزیم را تایید می کند و نیز کلیه

نتایج MIC برای سویه های کلبسیلا پنومونیه، آنتروباکتر کلوآکه و سودوموناس آتروجینوزا با نوار E-test در جدول و تصویر شماره ۱، نشان داده شده است. نوار E-test ESBL نوارهای دوطرفه هستند که حاوی گرادیان غلظتی از سفنازیدیم در یک طرف نوار و سفنازیدیم به اضافه کلوانیک اسید در طرف دیگر آن می باشد. یک آزمایش مثبت برای ESBL کاهش رشد بیش از ۵ رقت در MIC سفنازیدیم در حضور کلوانیک اسید می باشد (۱۷). سویه های کلبسیلا پنومونیه و آنتروباکتر کلوآکه مورد مطالعه در این مرکز با توجه به نتایج این آزمایش ۱۰۰٪ تولید کننده آنزیم های ESBL می باشند. علاوه بر این، براساس سند NCCLS M100-S8 حداقل غلظت مهار کننده (MIC) در مورد آنتی بیوتیک های آزترونام، سفنازیدیم و سفتریاکسون $30 \mu g$ بر با ۲ یا بیش از آن، دلیلی بر احتمال تولید آنزیم های ESBL می باشد (۱۰). با توجه به نتایج MIC در برابر این سه آنتی بیوتیک، کلیه سویه های آنتروباکتر کلوآکه ۱۰۰٪ تولید کننده ESBL بوده و ۹/۹۰٪ از سویه های کلبسیلا پنومونیه و ۱۰۰٪ از سویه های سودوموناس آتروجینوزا به عنوان تولید کننده ESBL ثبت شدند. الگوی پلاسمیدی ۷ سویه کلبسیلا پنومونیه و ۱ سویه آنتروباکتر کلوآکه همزمان با سویه های *E.coli* 39 R861 و *E.coli* V517 مورد مطالعه قرار گرفته و سپس همگی این سویه ها در شرایط کاملاً یکسان مورد آزمایش حذف پلاسمید واقع و پلاسمید های استخراج شده در آگاروز ۰/۸٪ در بافر TBE در ۱۵۰ mA و ۵۰ به مدت سه ساعت الکتروفورز شدند. تعداد و وزن مولکولی پلاسمیدهای استخراج شده در جدول ۲ و تصویر ۲ نشان داده شده است.

سویه های فوق پس از حذف پلاسمید مجدداً به روش دیسک دیفیوژن مورد آزمایش حساسیت در برابر عوامل ضد میکروبی واقع شدند. نتایج حساسیت سویه ها نسبت به تمامی آنتی بیوتیکهای مورد مطالعه بدون تغییر باقی مانده به غیر از سه سویه مقاوم به تتراسایکلین یعنی سویه های ۳، ۸ و ۹ که واکنش به حالت بینابینی تغییر یافته و سویه های مقاوم به آمیکاسین یعنی سویه های ۵، ۸ و ۹ که به ترتیب بصورت حساس، بینابینی و بینابینی تغییر یافتند.

بحث

باتوجه به شیوع باکتریهای مولد ESBL در جوامع مختلف و اهمیت موضوع از نظر درمان عفونتهای باکتریایی وعدم وجود اطلاعات لازم در این مورد، این مطالعه روی نمونه های جدا شده از بیماران مرکز آموزشی و درمانی کودکان شهر تبریز، انجام و هدف آن از بررسی شیوع و الگوی پلاسمیدی آنتروباکتریاسه های تولید کننده ESBL در این مرکز بود.

لازم به ذکر است که باکتریهای ایجاد کننده عفونت، که ژن آنزیم β -لاکتاماز ESBL و یا AmpC را با خود حمل می کنند، حتی در صورت حساسیت به داروهای β -لاکتام به صورت

پلاسمیدهای سویه‌های مورد مطالعه نبوده و جهت حذف کامل پلاسمیدها انکوئاسیون طولانی مدت مورد نیاز می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که جهت شناسایی انواع آنزیم‌های بتالاکتاماز تیف گسترده، سویه‌های تولید کننده ESBL ها مورد مطالعه، با پرایمرهای اختصاصی به روش PCR مورد مطالعه قرار گیرند.

تشکر و قدر دانی

از مسئولین آزمایشگاه‌های دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، مسئولین مرکز تحقیقات کاربردی - دارویی، همکاران بیمارستان کودکان و مسئولین آزمایشگاه میکروبیشناسی و بیوشیمی عمومی مرکز تحقیقات کاربردی - دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز بدلیل همکاری‌های صمیمانه قدر دانی می‌شود.

References

- Vincent JL. Nosocomial infections in the ICU. *Microbes and Infection*. 2004; **6**:1003
- Dieckhaus KD, Cooper BW. Infection control concepts in critical care. *Crit Care Clin*. 1998; **14**: 55-70
- Ambrose PG, Owens RC, Quintillani R. Antibiotic use in the critical care unit. *Crit Care Clin*. 1998; **14**: 283-308
- Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995; **8**: 557-84
- Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implication for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *Journal of infection* 2003; **47**: 273-295
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents Chemother*. 1995; **39**: 1211-1233
- Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended -spectrum β -lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol infect*. 2000; **6**: 460-463
- Alvarez-Lerma F. Modification of empiric antibiotic treatment in patients with pneumonia acquired in the intensive care unit. *Intensive Care Med*. 1996; **22**: 387-94
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Baily & Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th ed. 2002; pp. 229-258. St.louis, Mosby, Inc.
- NCCLS. M100-S13. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Thirteenth Informational Supplement. NCCLS documents.2003.Wayne. Pennsylvania, USA, National Committee for Clinical Laboratory Standards.NCCLS documents.
- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis*. 1988; **10**: 867-78
- Emery CL, Weymouth L. Detection and clinical significance of extended spectrum β - lactamases in tertiary - care medical center. *J Clin Microbiol*. 1997; **35**: 2061-7
- M'Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Howkey PM. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: Comparison of the Mast DD test, the double disk and the Etest ESBL. *J Antimicrob Chemother*. 2000; **45**: 881-885
- Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Detection of extended -spectrum beta-lactamases (ESBL) - producing strains by the E-test ESBL screen. *J Clin Microbiol*. 1996; **34**: 1880-1884
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2001. **1**, 3rd ed. pp1.1-1.34 and 5.1-5.17. New York, CSHI Press
- Shahid M, Malik A, Sheeba. Multidrug- resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains harboring R-plasmids and AmpC β -lactamases isolated from hospitalized burn patients in a tertiary care hospital of North India. *FEMS Microbiology Letters*. 2003; **228**: 181-186

17. Shah AA, Hasan F, Ahmad S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Research in Microbiology*. 2004. Available online at www.sciencedirect.com
18. Schreckenberger PC. Conundrums in the laboratory detection of antimicrobial resistant Gram negative bacteria. *Reviews in Medical Microbiology*. 2004; **15** (2): 45-49
19. Tashi H, and Bahar IH. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Jpn J Infect dis*. 2005; **58**: 162-167
20. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variation in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta lactamases phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas and the western pacific region. *Clin infect dis* 2001; **32**(Suppl, 2): S94-103
21. Villegas MV, Correa A, Perez F, Mirand MC, Zuluaga T, Quinn JP. Prevalence and characterization of extended -spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2004; **49**: 217-222
22. Coudron PE, Hanson ND, and Climo MW. Occurrence of extended -spectrum and AmpC beta-lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC beta lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; **41** (2): 772-777