

تعیین سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در اشرشیاکلی و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها به روش دیسک آگار دیفیوژن (DAD)

چکیده

اکبر میرصالحیان
فرشته جیل‌عاملی*
سیدمحمد میرافشار
فرزانه باذرجانی
عالیه گرجی‌پور
حمیدرضا گلی

گروه میکروشناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نویسنده مسئول: گروه میکروشناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تلفن: ۸۸۹۵۵۸۱۰
email: jabalamelir@yahoo.com

کلمات کلیدی: اشرشیاکلی و بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

علی‌رغم این که بیماری‌های عفونی و درمان آنها در طول تاریخ بشر همواره مورد توجه قرار داشته و در این راستا تلاش‌های بسیار فراوانی برای ریشه‌کنی عوامل مؤثر در ایجاد این بیماری‌ها صورت گرفته است لکن تغییر رفتار میکروارگانیسم‌ها از جنبه‌های مختلف، موجب شده است که ریشه‌کنی بسیاری از این عوامل میکروبی با موفقیت کاملی همراه نباشد و حتی با ظهور و شیوع سویه‌های جدید بر دامنه این بیماری‌ها در اشکال جدید افزوده شود. یکی از جنبه‌های مهم در این امر، ظهور سویه‌های مقاوم میکروبی است، به طوری که علی‌رغم اقداماتی که تاکنون در جهت تولید مواد ضد میکروبی

زمینه و هدف: ظهور سویه‌های مقاوم میکروبی یکی از موانع اساسی در درمان قطعی بیماری‌های عفونی می‌باشد که در این بین باکتری‌های گرم منفی تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) معضلات عدیده‌ای را در درمان این گونه عفونت‌ها بروز داده‌اند. در حال حاضر اشرشیاکلی به عنوان یکی از عوامل اصلی ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی و عفونت دستگاه ادراری محسوب می‌گردد که در این مطالعه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز در اشرشیاکلی نسبت به ۱۷ آنتی‌بیوتیک رایج مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت. روش بررسی: در این مطالعه با روش Disk Agar Difusion (DAD)، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۳۹۲ سویه اشرشیاکلی جدا شده از بیماران مختلف نسبت به ۱۷ آنتی‌بیوتیک تعیین گردید و سپس طبق دستورالعمل NCCLS با روش Combind Disk، باکتری‌های تولیدکننده ESBLs در بین آنها مورد شناسایی قرار گرفت. یافته‌ها: با تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها نسبت به ۱۷ آنتی‌بیوتیک مشخص گردید که بیشترین درصد مقاومت نسبت به کربنی‌سیلین (۷۸/۰۶٪) و کمترین مقاومت نسبت ایمپنم (۰/۷۶٪) می‌باشد. مقاومت نسبت به سه آنتی‌بیوتیک کربنی‌سیلین (۷۸/۰۶٪)، کوتریموکسازول (۶۳/۲۱٪) و پیپراسیلین (۶۱/۹۸٪) بالاتر از ۵۰٪ می‌باشد. در این مطالعه از بین ۳۹۲ اشرشیاکلی ۲۵/۲۵٪ تولیدکننده ESBL بودند که بررسی مقاومت در این باکتری‌ها، نشان‌دهنده، مقاومت بالای آنها نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت چندگانه در آنها می‌باشد. نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه حاکی از مقاومت بالای اشرشیاکلی به ویژه سویه‌های تولیدکننده ESBL، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌باشد. با توجه به شیوع نسبتاً بالای باکتری‌های تولیدکننده ESBL و مقاومت آنها نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها، باید از راهکارهای مهم کنترل عفونت مانند محدود نمودن مصرف از سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف، استفاده نمود.

وسیع‌الطیف صورت گرفته است. کماکان موضوع بروز و شیوع مقاومت‌های میکروبی به خصوص مقاومت باکتری‌های گرم منفی یکی از موانع اساسی بر سر راه درمان قطعی بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود در بین این باکتری‌ها، باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به واسطه هیدرولیز بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مانند پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و آزترونام، معضلات عدیده‌ای را در درمان عفونت‌های خطرناک ناشی از این باکتری‌ها به وجود آورده‌اند.^۱ علاوه بر این که پدیده مقاومت‌های میکروبی چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها (multidrug resistance) بین ایزوله‌های ایجادکننده بتالاکتاماز با طیف بسیار وسیع

جدول ۱- معیارهای غربالگری شناسایی ارگانیسیم‌های مولد ESBL براساس

DAD* (mm)	آنتی‌بیوتیک
≤۲۲	سفتازیدیم
≤۲۷	سفتواکسیم
≤۲۵	سفتریاکسون
≤۱۷	سفیو دوکسیم
≤۲۷	آزترونام

*DAD: Disk Agar Diffusion

جدول زیر باشد، تست‌های تأییدی برای باکتری باید انجام شود. در آزمون تأییدی از سری دیسک‌های سفتازیدیم ۳۰ μg و سفتازیدیم-کلاولانیک اسید ۳۰ / ۱۰ μg و سفتواکسیم ۳۰ μg، سفتواکسیم-کلاولانیک اسید ۳۰ / ۱۰ μg با روش دیسک آگار دیفیوژن استفاده شد. افزایش ۵ ≤ mm قطر هاله دیسک‌های ترکیبی یا کلاولانیک اسید نسبت به دیسک‌های فاقد این آنتی‌بیوتیک نشان‌دهنده این است که باکتری از گروه باکتری‌های تولیدکننده ESBL می‌باشد. در این آزمایش به عنوان شاهد از سوش‌های کنترل اشرشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲ و کلبسیلا پنومونیه ATCC ۷۰۰۶۰۳ (دارای آنزیم ESBL) استفاده گردید. پس از جمع‌آوری اطلاعات آنالیز آماری با استفاده از SPSS ویراست ۱۱/۵ صورت گرفت اختلاف مشاهده در میزان فراوانی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی بین تعداد کل باکتری‌های اشرشیا کلی و سویه‌های اشرشیا کلی تولیدکننده ESBL با استفاده از تست χ^2 محاسبه شد. $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۳۹۲ سویه اشرشیا کلی جدا شده از بیماران بستری بیمارستان‌های ذکر شده نسبت به ۱۷ آنتی‌بیوتیک با روش DAD تعیین گردید. همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود کمترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک ای‌می‌پنم می‌باشد (۰/۷۶٪) و بالاترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک کربنی‌سیلین (۷۸/۰۶٪) است و مقاومت نسبت به سه آنتی‌بیوتیک کربنی‌سیلین، کوتریموکسازول و پپراسیلین بالاتر از ۵۰٪ می‌باشد. در مورد شناسایی باکتری‌های تولیدکننده ESBL، در این تحقیق در آزمون غربالگری از میان ۳۹۲ باکتری ۲۰۱ باکتری وارد مطالعه شدند و در آزمون نهایی، ۹۹ سویه اشرشیا کلی (۲۵/۲۵٪) به عنوان باکتری‌های تولیدکننده ESBL مشاهده گردید که در این باکتری‌ها درصد مقاومت

(ESBL) Extended Spectrum β -Lactamase گزارش شده است. بنابراین تأثیرپذیری داروها بر روی این باکتری‌ها رو به کاهش گذاشته است.^۲ از آنجائی که اشرشیاکلی از گونه‌های شایع در تولید آنزیم‌های ESBL بوده و عامل اصلی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه عفونت‌های ادراری عفونت‌های مجاری تنفسی تحتانی، احشایی، آبسه‌های کبدی کلانژیت و کوله‌سیستیت و آبسه‌های پانکراس می‌باشد. لذا با توجه به افزایش روبه‌رشد این سویه‌ها در عفونت‌های بیمارستانی و مراکز درمانی تعیین الگوی مقاومت گونه‌های اشرشیا کلی جدا شده از منابع بیمارستانی و شناسائی سویه‌های تولیدکننده ESBLs در نمونه‌های بالینی از اهداف این تحقیق می‌باشد.

روش بررسی

۳۹۲ سویه اشرشیاکلی از بیماران مراجعه‌کننده به بخش‌های مختلف در بیمارستان‌های تابعه دانشگاه از اوسط سال ۱۳۸۳ به مدت ۱۸ ماه ایزوله و به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی انتقال گردید و پس از انجام حداقل ۱۴ آزمایش بیوشیمیایی از جمله آزمایشات IMViC، دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه، اکسیداز، مصرف مالونات، اوره‌از، حرکت و مانند آن مجدداً تعیین هویت شدند. لازم به توضیح است که باکتری‌ها از نمونه‌های مختلف بیماران (ادرار، زخم و خون و غیره) جدا شده است. الگوی مقاومت این باکتری‌ها با روش Disk Agar Difusion مطابق دستورالعمل NCCLS تعیین گردید دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تهیه شده از شرکت Mast انگلستان مورد استفاده عبارت بودند از Ampicillin, Amikacin, Amoxicillin- Clavulanic Acid, Ceftriaxone, Cefotaxime, Ceftizoxime, Aztreonam, Cefixime, Carbenicillin, Ciprofloxacin, Cefpodoxime, Trimethoprim, Sulfamethoxazole, Piperacillin, Nalidixic acid, Gentamicin. در این روش از محیط کشت مولر هیتون آگار (Merk) و با شرایط گرماگذاری ۳۵ به مدت ۱۸-۲۴ ساعت استفاده گردید به منظور شناسائی باکتری‌های تولیدکننده ESBLs در ابتدا آزمون غربالگری طبق دستورالعمل NCLS با استفاده از دیسک آنتی‌بیوتیک‌های سفیدوکسیم، سفتواکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون و آزترونام انجام گردید. برای انجام این کار ابتدا برای تمام باکتری‌ها هاله عدم رشد مربوط به هر یک از این آنتی‌بیوتیک‌ها اندازه‌گیری شد، سپس اگر اندازه هاله عدم رشد هر یک از این آنتی‌بیوتیک‌ها برای باکتری مطابق

برابر انواع آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. همان طور که در نمودار ۲ آمده است در این تحقیق افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به تعداد کل قابل مشاهده می‌باشد که در سایر مطالعات نیز مشابه به دست آمد در مطالعه گسترده‌ای که بین سال‌های ۲۰۰۲-۱۹۹۸ در کشورهای مختلف صورت گرفت درصد مقاومت سویه‌های اشرشیاکلی تولیدکننده بتالاکتاماز به هفت آنتی‌بیوتیک به دست آمد که نتایج حاکی از مقاومت بالای این باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌باشد.^{۱۳} از مسائل مهم دیگر این باکتری‌ها، مقاومت چندگانه در بین این باکتری‌ها می‌باشد که در این تحقیق ۴/۸۵٪ از E. coli های تولیدکننده ESBL به ۱۶ آنتی‌بیوتیک، ۱۷/۴۸٪ از باکتری‌ها به ۱۵ آنتی‌بیوتیک، و ۱۳/۵۹٪ از آنها به ۱۴ آنتی‌بیوتیک از خود مقاومت نشان دادند. شیوع مقاومت چندگانه در این باکتری‌ها نشانگر اهمیت آنها در عفونت‌های مختلف می‌باشد. NCCLS توصیه کرده است که ارگانسیم‌های تولیدکننده ESBL باید نسبت به تمامی پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها و مونولاکتام‌ها مقاوم در نظر گرفته شوند. انتشار این باکتری‌ها به نظر می‌رسد ناشی از استفاده وسیع سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف در بخش‌های مختلف بیمارستان باشد به طوری که شاهد افزایش روزافزون میزان الگوی مقاومت‌های دارویی به ویژه ESBL‌ها در بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستان‌ها هستیم. همچنین مطالعات فراوانی ارتباط نزدیک بین استفاده قبلی و تجربی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با پیدایش و افزایش مکانسیم‌های تولیدکننده این آنزیم‌ها را نشان دادند. این باکتری‌ها شبیه سایر عفونت‌های بیمارستانی از طریق دست‌های آلوده پرسنل بیمارستان و تجهیزات آلوده پزشکی از جمله کاتترهای ادراری، عروقی و شریانی نیز انتقال می‌یابند. با توجه به مقاومت این باکتری‌ها نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها، امروزه به عنوان یک مشکل اساسی و رو به رشد در درمان و کنترل عفونت محسوب می‌شوند. بنابراین باید با استفاده از راهکارهای مختلف از جمله استفاده صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها و محدودسازی مصرف آنها می‌توان عفونت حاصل از این باکتری‌ها را کنترل نمود.

References

1. Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, Queenan AM, Swenson JM, Biddle JW, et al. Characterization of the Extended-Spectrum beta-Lactamase Reference Strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), Which Produces the Novel Enzyme SHV-18. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2382-88.
2. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. *Res Microbiol* 2004; 155: 409-21.
3. Stratchounski LS, Kozlov RS, Rechedko GK, Stetsiouk OU, Chavrikova E. Antimicrobial resistance patterns among aerobic Gram-negative bacilli isolated from patients in intensive care units : results of a multicenter study in Russia. *Clinical Microbiology and Infection* 1998; 9: 497-507.

آنتی‌بیوتیک مقاومت داشتند. در کشورهای چین، تایوان، برزیل، آمریکای شمالی و روسیه نیز درصد مقاومت به این آنتی‌بیوتیک بسیار پایین می‌باشد. مقاومت نسبت به ایمی‌پنم در این مطالعه ۰/۷۶٪ به دست آمده در حالی که مقاومتی نسبت به این آنتی‌بیوتیک در اکثر کشورها گزارش نشده است. در ترکیه ۸٪ از سویه‌های اشرشیاکلی ایزوله شده از بخش‌های ICU نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاومت داشتند قابل ذکر است آمیکاسین، ایمی‌پنم از داروهای انتخابی مؤثر علیه باکتری‌های تولیدکننده ESBL می‌باشند. در مورد سویه‌های اشرشیاکلی درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی تقریباً بالا می‌باشد. اختلافات مشاهده شده این نتایج با سایر کشورها مربوط به تفاوت در الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک، منطقه جغرافیایی، تفاوت در الگوی مقاومت در مناطق مختلف و مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک در کشور ما می‌باشد. همچنین بالا بودن میزان مقاومت سویه‌های مقاوم به بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها نشان‌دهنده مصرف بی‌رویه آن آنتی‌بیوتیک در کشور است. از دیگر نتایج مهم این مطالعه، باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌باشند که در دو دهه اخیر افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته‌اند در این مطالعه ۲۵/۲۵ درصد از سویه‌های اشرشیاکلی از گروه باکتری‌های تولیدکننده ESBL شناسایی شدند. در مطالعه Ling و همکاران در چین فراوانی تولید ESBL در اشرشیاکلی ۱۶٪ گزارش شده است.^{۱۰} در مطالعه Duttaroy و همکاران در هند که بر روی ۱۸۷ کلبسیلا و اشرشیاکلی صورت گرفت ۵۳ ایزوله (۲۹/۱٪) تولیدکننده ESBL بودند.^{۱۱} در مطالعه‌ای که در Brooklyn صورت گرفت فراوانی تولید ESBL در بین E. coli ۴/۷ درصد بود.^{۱۱} در مطالعه‌ای که در فرانسه بر روی ۳۰۶۲ ایزوله انتروباکتریاسیه صورت گرفت، ۱۶/۲ درصد از اشرشیاکلی تولیدکننده ESBL بودند.^{۱۲} به طور کلی می‌توان گفت که درصد باکتری‌های تولیدکننده ESBL در ایزوله‌های بیمارستانی در ایران نسبتاً بالا می‌باشد که بررسی این مسئله اهمیت ویژه‌ای دارد. قابل ذکر است که تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف توسط باکتری‌های گرم منفی موجب ایجاد مقاومت در

4. Daza R, Jose' Gutie' rrez, Gonzalo Pie'drola Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections International Journal of Antimicrobial Agents 2001; 18: 211-215.
5. Hsueh PR, Chen WH, Luh KT. Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991-2003 at a university hospital in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26: 463-72.
6. Ling TK, Xiong J, Yu Y, Lee CC, Ye H, Hawkey PM. Multicenter antimicrobial susceptibility survey of gram-negative bacteria isolated from patients with community-acquired infections in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 374-8.
7. Günsere F, Mamikoğlu L, Öztürk S, Yücesoy M, Biberöglü K, Yuluğ N, et al. A surveillance study of antimicrobial resistance of gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 373-8.
8. Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakagami E, Turner P, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis* 2005; 9: 216-24.
9. Streit JM, Jones RN, Sader HS, Fritsche TR. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001). *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 111-8.
10. Duttaroy B, Mehta S. Extended spectrum β lactamases (ESBL) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Indian J Pathol Microbiol* 2005; 48: 45-8.
11. Saurina G, Quale JM, Manikal VM, Oydna E, Landman D. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 895-8.
12. Lavigne JP, Bouziges N, Chanal C, Mahamat A, Michaux-Charachon S, Sotto A. Molecular epidemiology of Enterobacteriaceae isolates producing extended-spectrum β -lactamases in a French hospital. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3805-8.
13. Hirakata Y, Matsuda J, Miyazaki Y, Kamihira S, Kawakami S, Miyazawa Y, et al. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 323-9.

Determination of antimicrobial resistance patterns and extended spectrum β lactamases in clinical isolates of *E. coli*

Mirsalehian A.
Jabalameli F.*
Mirafshar S.M.
Bazarjani F.
Gorjipor A.
Goli H.R.

Department of Microbiology,
Tehran University of Medical
Science

Abstract

Background: Antimicrobial resistance is a growing threat among hospitalized patients. The mortality and morbidity due to antimicrobial-resistant bacteria are severe. Extended-spectrum betalactamase (ESBL) Enterobacteriaceae are especially alarming because they are capable of hydrolyzing third-generation cephalosporins and monobactams. Thus, antimicrobial treatment for infections due to these resistant pathogens will remain under critical scrutiny.

Methods: Gram-negative bacterial pathogens were collected from selected centers and were identified by biochemical methods. Of these, 392 *E. coli* isolates were tested for antimicrobial susceptibility to 17 antibiotics by the disk agar diffusion (DAD) method. The phenotypes of ESBLs were determined using the disk diffusion synergy test (DDST) as recommended by the interpretative guidelines of the NCCLS.

Results: Most of the bacterial resistance in this study was against carbenicillin (78.06%), trimethoprim- sulfamethoxazole (63.21%), and piperacillin (61.98%), with very low resistance to imipenem (0.76%). More than 50% of the isolates were simultaneously resistant to the three antibiotics, carbenicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole and piperacillin. In total, 99 *E. coli* isolates (25.25%) were ESBL positive.

Conclusions: Organisms expressing ESBLs in this study were widely distributed, often possessing the multidrug resistance phenotype. Limiting the use of broad-spectrum cephalosporins is recommended to control this high rate of ESBL expression.

Keywords: *E. coli*, extended- spectrum betalactamase, antimicrobial resistance.

* Corresponding author: Department of
Microbiology, Tehran University of
Medical Science
Tel: +98-21-88955810
email: jabalamelir@yahoo.com