Extended-Spectrum β-lactamase (ESBLs) درسویه‌های کلبسیلا پنومونیه جداشده از نمونه های کلینیکی بیمارستانهای تهران

فرشته شاه چراغی[*1] هاله معزی[2]

۱. میکروبیولوژیست، استادیار انستیتوپاستور ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران ، خیابان پاستور، انسیتو پاستور ایران، بخش میکروب شناسی، تلفن ۶۶۴۰۵۵۳۵ ، Fresh100@yahoo.com
دریافت مقاله: آذر هشتاد و پنج پذیرش برای چاپ: اردیبهشت هشتاد و شش

چکیده

سابقه و هدف : *مقاومت باکتری های گرم منفی نسبت به آنتی بیوتیکها موجب افزایش میزان مرگ و میر در سراسر دنیا شده است. سالانه هزینه های زیادی صرف درمان این عفونت ها در سراسر دنیا از جمله ایران می شود. از باکتری گرم منفی که سویه مقاوم آن رو به افزایش است می توان از کلبسیلا پنومونیه نام برد. این باکتری عامل عفونت بیمارستانی است که از طریق دست کارکنان بیمارستان منتقل می شود. بنابراین شناخت الگوی مقاومت و حساسیت آن نسبت به آنتی بیوتیک های β- لاکتام Extendet –Spectrum β- lactamase(ESBS) در درمان و کنترل عفونت نقش به سزایی دارد. بدین لحاظ تعیین مقاومت کلبسیلا پنومونیه مولد نسبت به آنتی بیوتیک های بتا لاکتام موضوع این بررسی قرار گرفته است.*

روش کار: *برای انجام این تحقیق ۱۵۰ سویه کلبسیلا از نمونه های مختلف شامل ادرار، خلط، زخم و مایع مغزی نخاعی از ۵ بیمارستان تهران ایزوله و جمع آوری شد. برای تعیین مقاومت نمونه ها تست آنتی بیوگرام با روش Disk diffusion صورت گرفت. سپس MIC سوش های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک سفتازیدیم به روش Microdilution تعیین شد. برای بررسی وجود ESBLs در سویه های ایزوله شده از روش Disk diffusion استفاده گردید.*

یافته ها : *میزان مقاومت کلبسیلا پنومونیه به کربنی سیلین (۹۴٪)، پیپراسیلین (۵۵٪)، سفوتاکسیم (۳۲٪) و سفتازیدیم (۳۱٪) بود. هیچ سوش مقاوم به ایمی پنم دیده نشد.*

نتیجه گیری : *با توجه به درصد بالای مقاومت به سفتازیدیم و میزان بالای تولید ESBLs باید در مصرف این آنتی بیوتیک دقت نمود.*

واژگان کلیدی: ***کلبسیلا، مقاومت، بتا لاکتاماز***

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یکی از باکتری های گرم منفی روده ای است که جزیی از میکروفلور طبیعی بدن انسان را تشکیل می دهد و حدود یک سوم افراد ناقل روده ای این میکروب هستند. میزان استقرار این باکتری در بیماران بستری شده در بیمارستان بیشتر از بیماران سرپایی است. طیف بیماری زایی کلبسیلا معمولاً وسیع بوده شامل باکتریمی، پنومونی، عفونت مجاری ادراری می باشد. در بیمارستان همه گیری شدید بین نوزادان و عفونت های آندمیک در بخش بیماران کلیوی رخ می دهد. پنومونی کلبسیلایی بخش کوچک از موارد پنومونی را تشکیل می دهد ولی میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا و حدود ۹۰٪ است. این میکروب بیش از پنوموکک تمایل به ایجاد نکروز دارد. گرچه مراحل اولیه شبیه پنومونی پنوموککی است ولی پیشرفت عفونت کلبسیلا موجب متلاشی شدن آلوئل های ششی و نکروز پارانشیم ششی می شود (۱).

متأسفانه مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها در دهه های اخیر باعث افزایش ظهور سویه های مقاوم با مقاومت چند گانه در کلبسیلا پنومونیه شده است. یکی از مکانیسم های مقاومت باکتری های گرم منفی به خصوص در کلبسیلا پنومونیه تولید آنزیم بتالاکتاماز با طیف وسیع (ESBLs) است. ژن های کدکننده ESBLs معمولاً به روی پلاسمید یافت می شود و توانایی انتقال به سویه های گرم منفی دیگر را دارند. در دو دهه اخیر، انواع زیادی از ESBLs شناسایی شده اند، تاکنون ۴۰۰ تیپ گوناگون β لاکتامازها از نمونه های کلینیکی جداشده است(۲). این مطالعه به منظور بررسی مقاومت و حساسیت سوش های کلبسیلا پنومونیه و میزان تولید ESBLs در باکتریهای ایزوله شده مقاوم صورت گرفت.

روش کار

نمونه برداری از ۵ بیمارستان تهران شامل بیمارستان شریعتی، مرکز طبی کودکان، آسیا، مهر، طرفه و آزمایشگاه دانش صورت گرفت. کلیه نمونه ها شامل ادرار، خلط، خون، مدفوع، اسپرم، زخم و ضایعات پوستی، مایعات دیالیز، آبسه، مایع مغزی نخاعیcentral venous line و ترشحات گلو بودند. این نمونه ها از بخش های عمومی ICU، زنان و زایمان، ریه، اورولوژی، نفرولوژی و جراحی مغز و اعصاب جمع آوری شدند. در آزمایشگاه کلیه سوش ها بعد از شناسایی دقیق و انجام تستهای بیوشیمیایی در $-80^{\circ}c$ نگهداری شدند (۳). تعیین حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی به وسیله دیسک دیفیوژن (Baur-Kirby) صورت گرفت. دیسک های مورد استفاده از شرکت BBL تهیه شد و شامل کربنی سیلین (۱۰۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفتی زوکسیم (۳۰µg)، پیپراسیلین (۱۰۰µg)، پیپراسیلن تازوباکتام (۱۱۰µg)، جنتامیسین (۱۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، سفتازیدیم (۳۰µg)، امی پنم (۱۰µg)، سپیروفلوکساسین (۵µg) و سفتریاکسون (۳۰µg) بود. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه نتایج آنتی بیوگرام با استفاده از جداول مخصوص قرائت گردید. به منظور تعیین حداقل غلظت آنتی بیوتیک که مانع رشد باکتری شود تست MIC به روش Microdilution صورت گرفت. بر روی سوش های مقاوم و همچنین نیمه حساس کلبسیلا پنومونیه نسبت به سفتازیدیم، شامل ۵۶ سوش دارای MIC برابر یا بیش از ۴ میکروگرم در میلی لیتر Phenotypic Confirmatory Test به منظور جداسازی سوش های تولیدکننده ESBLs انجام گرفت. دیسک های مورد آزمایش سفتازیدیم کلاوونیک اسید (به ترتیب ۳۰ و ۱۰ میکروگرم) و سفتازیدیم به تنهایی، تهیه شده از شرکت Mast ، بود. بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه تولید ESBLs از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی متر یا بیشتر در اطراف دیسک سفتازیدیم- کلاوونیک اسید مشخص گشت (۴).

یافته ها

در این تحقیق ۱۵۰ نمونه کلبسیلا از ۵ بیمارستان تهران جمع آوری شد. از میان ۱۵۰ نمونه ۵ نمونه مربوط به کلبسیلا اکسی توکا (۳ نمونه از ادرار- ۱ نمونه از مدفوع و ۱ نمونه از مایع دیالیز) و بقیه مربو.ط به کلبسیلا پنومونیه بود. تمامی سوش های کلبسیلا اکسی توکا نسبت به سفتازیدیم و ایمی پنم حساس بودند. از میان ۱۵۰ نمونه ۳۱٪ به سفتازیدیم ۳۲٪ به سفوتاکسیم مقاومت داشتند. بیشترین مقاومت در برابر کربنی سیلین مشاهده شد. هیچ سوش مقاوم به ایمی پنم جدا نشد و تنها یک سوش نیمه حساس به ایمی پنم ۰ جدا شده از نمونه خلط) دیده شد(جدول ۱) .

جدول ۱. توزیع سویه های کلبسیلا بر اساس نتیجه آنتی بیوگرام آنها.(تمام اعداد به درصد است.)

مقاوم	نیمه حساس	حساس	انتی بیوتیک
۳۱	۴	۶۵	سفتازیدیم
۰	۱	۹۹	ایمی پنم
۹۴	۳	۳	کربنی سیلین
۱۷	۵	۷۵	جنتامیسین
۱۴	۸	۷۸	امیکاسین
۲۲	۱۳	۶۵	سفتی زوکسیم
۱۲	۳۳	۵۵	پیپراسیلین تازوباکتام
۵۵	۲۴	۲۱	پیپراسیلین
۳۳	۶	۶۰	سفوتاکسیم
۱۸	۱۲	۷۰	سیپروفلوکساسین
۲۷	۸	۶۵	سفتریاکسون

از میان ۴۷ نمونه مقاوم به سفتازیدم (۶۱٪) ۲۶ مربوط به نمونه ادراری، ۲٪ CSF ، ۲٪ خون، ۶٪ زخم و ضایعات پوستی بود که از بخش های جراحی ایزوله شدند. (۶٪) ۹ نمونه از بخش پیوند کلیه جمع آوری شد که ایزوله های جداشده از بخش پیوند کلیه همگی مولد ESBLs بودند. از میان ۱۶ نمونه جمع آوری شده از خلط و ترشحات تنفسی (۷۵٪) ۱۲ نمونه به سفتازیدیم مقاوم بودند. ۸۷٪ نمونه های خلط از افراد پیر بالای ۶۰ سال گرفته شده بود. از میان ۵۶ نمونه مقاوم و نیمه حساس به سفتازیدیم ۸۶٪ نمونه ها دارای MIC برابر یا بیش از ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر نسبت به سفتازیدیم بودند. ۵۶ نمونه از نظر تولید ESBLs به وسیله روش Disk Diffusion مورد آزمایش قرار گرفت که از میان آنها (۸۹٪) ۵۰ نمونه ESBLs مثبت بودند. در نمونه های مربوط به گلو، مایع دیالیز، اسپرم، ترشح واژن، مدفوع وcentral venous line سوش دارایESBLs مثبت دیده نشد. MIC برای سفتازیدیم در مورد سوش های تولیدکننده ESBLs از ۴ تا ۵۱۲ میکروگرم در میلی لیتر متغیر بود (جدول ۲).

جدول ۲. توزیع کلبسیلا جدا شده بر اساس نمونه های کلینیکی و نوع مقاومت انها

نمونه	کل	ESBLs	درصد مقاومت به سفتازیدیم
ادرار	۱۱۲	۳۲	۲۵
خلط	۱۶	۱۲	۷۵
زخم	۷	۴	۴۳
خون	۴	۱	۲۵
ابسه	۱	۱	۱۰۰

در این مطالعه ۷۰٪ نمونه ها از بیماران بستری و ۳۰٪ از بیماران سرپایی جمع آوری شد. که در میان ۴۶ بیمار سرپایی (۴٪) ۲ بیمارمقاوم به سفتازیدیم بودند. اکثر نمونه های مورد مطالعه به ترتیب از بخش های نفرولوژی، اورولوژی، ریه جمع آوری شدند. در بیمارستان کودکان ۳۵٪ (۱۰ مورد از ۲۸) مقاوم به سفتازیدیم گزارش شد. ۹۳٪ نمونه ها از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری جمع آوری گشت. از ۵۰ سوش تولیدکننده ESBLs، ۱۶ مورد علاوه بر سفتازیدیم- مقاوم به سپیروفلوکساسین بودند.

بحث

تولید ESBLs به عنوان یک تهدید بزرگ برای مصرف سفالسپورین های با طیف وسیع به شمار می رود (۵ و ۶). در این مطالعه ۸۹٪ سوش های ایزوله شده تولیدکننده ESBLs بودند در حالی که تحقیق Chanel در سال ۱۹۹۰ نشان داد که ۷۰٪ سوش های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده ESBLs هستند (۷). ۵۲٪ نمونه های جداشده اداری تولیدکننده ESBLs بودند که این مطلب توسط Aamer Ali Shah در سال ۲۰۰۳ نیز گزارش شده است (۸). ۸٪ سوشهای جداشده از زخم و ۲٪ سوش های ایزوله شده از خون مولد ESBLs بودند. Jarlier درسال ۱۹۸۸ میزان ۱۸٪ سوش های جداشده از خون را مولد ESBLs گزارش کرد (۹). ESBLs به ندرت در بیماران سرپایی دیده می شود (۱۰). در این تحقیق تنها ۱ سوش تولید کننده ESBLs از بیمار سرپایی جدا شد.

۶٪ سوش های جداشده از بیماران پیوند کلیه ایزوله شد که بیشترین میزان آن در زنان مشاهده گشت. مدت زیاد بستری شدن، مصرف زیاد آنتی بیوتیک (خصوصاً سفتازیدیم)، بستری شدن در بخش ICU و استفاده از سوندهای ادراری جزء فاکتورهای تولیدکننده ESBLs هستند (۱۱).

سوش های تولیدکننده ESBLs, معمولاً سوش هایی با مقاومت چندگانه هستند. کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده ESBLs مقاومت بیشتر به کوینولون ها دارد (۱۲ و ۱۳). در مطالعه ما از ۵۰ نمونه تولیدکننده ESBLs ۱۶ نمونه (۳۲٪) علاوه بر سفتازیدیم به سپیروفلوکساسین نیز مقاومت داشتند. در حالی که در مطالعه Lautenbach ۱۵ نمونه از ۲۵ نمونه ESBLs مثبت یعنی ۶۰٪ به فلوروکوینیولون ها نیز مقاوم بودند (۱۲). نتایج ما نشان داد که : ۵۵٪ سوشهای کلبسیلا پنومونیه نسبت به پیپراسیلین مقاوم بودند. اما تنها ۱۲٪ به پیپراسیلین تازوباکتام مقاومت نشان دادند. این مطلب توسط Boyd نیز در سال ۲۰۰۴ گزارش شده است (۱۴).

نتیجه گیری

کاهش در مصرف آنتی بیوتیک ها کنترل عفونت از طریق رعایت بهداشت می تواند سبب کاهش میزان گسترش ارگانیسم تولیدکننده ESBLs در محیط بیمارستان می شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از سرکار خانم شورج و خانم نیک بین که ما را در انجام این تحقیق یاری نموده اند تشکر می نماییم.

REFERENCES

۱ .ملک زاده فریدون.میکروب شناسی .فصل هشتم:باسیل های روده ای،کلبسیلا،انتروباکتر،سراشیا، پروویدنسیا ،مورگانلا،تهران: انتشارات و چاپ دانشگاه تهران چاپ سوم،۱۳۸۱(۲۸۸-۲۸۷)

2 .Ines Schneider Renate-Marek Gniadkowski: ceftazidime resistance Enterobacteriaceae Isolates from three polish Hospitals : Indentification of Three novel TEM and SHV-5 type Extended –Spectrum β-lactamase :journalAntimicrobial Agent and chemotherapy 1998(42)514-520

۳. نوروزی جمیله ،در ترجمه میکروبیولوژی جاوتز،ارنست جاوتز،ملنیک،آدلبرگ،(مولفین)چاپ دوم.تهران:انتشارات حیان ،۱۳۷۹صفحات۲۶۵-۲۶۴

4 .Steward, C. D., J. K. Rasheed, S. K. Hubert, J. W. Biddle, P. M. Raney, G. J. Anderson, P. P. Williams, K. L. Brittain, A. Oliver, J. E. McGowan, and F. C. Tenover. Characterization of clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum ß-lactamase detection methods. J. Clin. Microbiol.2001(39):2864-2872

5 .Kliebe ,C,B.A .Nies,J.F.Meyer,R.M.Tolxdorff –Neutzling and B.wiedemann ..Evolution of plasmid –coded resistance to broad spectrum cephalosporins Antimicrob.Agents Chemother 1985.(28):302-307

6. Knothe, H., P. Shah, V. Kremery, M. Antal, and S. Mitsuhashi. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. Infection 1983 (11):315-317

7. Bradford PA.Extended –spectrum β-lactamase in the 21st century ;characterization ,epidemiology .and detection of this importance resistance threat .Clin Microbial REV 2001:(14):933-951

8. Aamer Ali Shah ,Fariha Hassan ,Safia Ahmed :Prevalance of Extended –Spectrum β-lactamase in nosocomial and out patient.2003(19):187-191

9. Jarlier V,Nicolas MH,Fournier G & philippon A:Extended –spectum β-lactamase conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in Enterobacteriaceae :hospital prevalence and susceptibility patterns.Rev Infec Dis 1988(10);867-878

10. Machka K , Braveny I, Dabernat H,Dornsbusch K,Kayser FH& Klingern BV. Distribution and resistance pattern of haemophilus influenza :Epidemiology and risk factors for acquisition.Clin Infect Dis 1996(22):430-436

11.Lucet JC,Chevert S ,Vanjak D ,Decre D ,Macrez A & Wolff M :Out break of multiple resistance Enterobacteriaceae in an intensive care unit : Epidemiology and risk factor acquisition.Clin Infect Dis 1996(22):430-436

12. Lautenbach ,E, B.L. Strom ,W.B.Bilker,J.B.Patel ,P.H.Edelstein and N.O fishmen.. Epidemiological investigation of fluroquinolones resistance in infection due to extended –spectum β-lactamase –producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae .Clin. Infect .Dis.2001(33);1288-1294

13. Paterson ,D.L.,Mulazimoglu ,J.M.Casellas ,W.C.Ko ,H.Goossens ,A.Von Gottberg ,S.Mohapatra,G.M.Trenholme.2000.Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended –spectrum β-lactamase production in klebsiella pneumoniae isolates causing bacteremia.Clin. Infect .Dis. 2000:(30):473-478

14. Boyd DA,Olson AB ,Silverman M etal: Indentification of progenitor of CTX_M group of extended –spectrum β- lactamase from kluyvera spp isolated in Guyana.In:programs and Abstracts of the forty fourth interscience conference on Antimicrobial Agent and chemotherapy Washington ,DC,USA,2004 abstract C1-1661.American Society for microbiology ,Washington,DC,USA