جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجلهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۸ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۵ صفحات ۱۰۱-۹۵

آنتروباکتریاسه های مولد آنزیم های β – لاکتامازطیف 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 میکروبشناسی دانشکده پزشکی ومرکزتحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر نور امیر مظفری: دانشیارمیکروبشناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران
جاوید صادقی: کارشناس ارشد میکروبشناسی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی تبریز
مریم رسولی: کاردان 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 سرا سر جهان انتشار یافته اند. تولید این آنزیم ها، سبب ایجاد مقاومت باکتری‌ها نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها می‌گردد. عفونت ناشی از آنها ، بخصوص در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه (Intensive Care Unit, ICU)، زندگی بیمارن را به مخاطره انداخته و سبب مرگ آنها می‌گردد.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 آنزیم‌های β -لاکتاماز مورد بررسی قرار گرفتند. جهت جد ا سازی پلاسمید از روش لیز قلیایی و جهت حذف پلاسمید از رشد باکتریها در دمای ٤٤ درجه سانتیگراد استفاده شد.

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

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

کلید واژه‌ها: 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 پیچیدگی‌های مراقبت دراین بخش و فاکتورهای مربوط به بیماران و استفاده ازوسایل پزشکی مختلف در معرض عفونت با ارگانیسم های مقاوم به چند دارو می‌باشند (۲و۳)، که علاوه بر افزایش موربیدیتی و مورتا لیتی به افزایش هزینه نیز منجر میگردد. از طرف دیگر، مقاومت دارویی در عفونت‌های بیمارستانی یک مسئله مهم و بحرانی میباشد، زیرا در انواع زیادی از پاتوژن‌ها بخصوص عوامل ایجاد کننده عفونت بیمارستانی، به طور فزاینده‌ای مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی دیده شده است (۱). از معمول ترین پاتوژن‌های جدا شده از عفونت های بیمارستانی، آنتروباکتریا سه ها را می توان نام برد که غالبا" جهت کنترل این عفونتها، آنتی بیوتیکهای β – لاکتام، بکار برده می‌شود که با ظهور فزاینده آنزیم های β– لاکتاماز، کارآیی این داروها کاهش می یابد (٤). β – لاکتامازها، مطابق نظر Ambler به چهار دسته‌ی مولکولی متمایزاز نظر تکاملی A، B، C وD تقسیم‌بندی شده‌اند (۵). در سال ۱۹۹۵، آخرین طبقه‌بندی برای این آنزیم‌ها توسط Bush - Jacoby- Medeiros صورت گرفته که براساس این طبقه‌بندی، این آنزیم‌هابه چهار گروه ۱ تا ٤ و زیرگروه‌های a-f تقسیم‌بندی شدند (٦). β– لاکتامازهای طیف گسترده (ESBLs) گروهی از آنزیم های ناشی از پلاسمید هستند

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

که توانایی هیدرولیز سفالوسپورینهای نسل سوم و منو باکتام ها را دارند. اغلب ارگانیسم های حاوی این آنزیم ها، نسبت به کاربا پنم ها حساس باقی مانده‌اند در حالیکه، فعالیت آنها نسبت به سیپروفلوکساسین و سفپیم و ترکیبات حاوی β- لاکتام و مهار کننده β – لاکتاماز متغییر می‌باشد (۴). ESBL ها از β – لاکتامازهای کلاس A/گروه2be 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*) می‌باشند (۶). این آنزیم ها با مهارکنندگان β – لاکتاماز، چون کلاولانیک اسید و سالباکتام و یا تازوباکتام مهار شود و معمولا سفامایسین ها (برای مثال، سفوتیتان وسفوکسیتین) و یا ایمی‌پنم را هیدرولیز نمی‌کنند(۷). با توجه به اینکه، داشتن اطلاعات کافی از فاکتورهای اپیدمیولوژیک ارگانیسم های عامل عفونت والگوی مقاومت آنها جهت بهبود دستورات دارویی مناسب در مراحل خاص، ضروری می‌باشد (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. نمونه‌های مورد مطالعه شامل خون، ترشحات لوله‌ی تراشه، مایع پلور و ترشحات چشم بیماران بودند و در صورتی‌که از یک بیمار بیش از یکبار یک گونه باکتریایی جداشده بود تنها یک نمونه از هر گونه باکتریایی در مطالعه دخالت داده شد. سویه های جداشده از بیماران، به روش روتین مورد شنا سایی قرار گرفته و جهت تایید تشخیص آنها ازکیت Hi25*Enterobacteriaceae* Identification kit (strip1,2) ساخت شرکت Hi media استفاده شد. تمامی سویه‌های گرم منفی با روش Kirby & Bauer (۹) مورد آزمایش حساسیت در برابر عوامل ضد میکروبی قرار گرفتند. آنتی‌بیوتیکهای مورد استفاده شامل سیپروفلوکساسین ونورفلوکساسین (شرکت BBL)، سفوروکسیم، سفوکسیتین، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، کوتریموکسازول، تتراسایکلین، افلوکساسین، آمیکاسین، توبرامایسین، پی‌پراسیلین، کاربنی‌سیلین‌وتیکارسیلین (شرکت MAST) و آموکسی کلاو (شرکت ایران دارو) بودند.

طبق راهنمایی‌های NCCLS[1] ، قطر هاله مهار رشد کمتر از ۲۲ میلی متر برای سفتازیدیم ۳۰µg، قطر هاله مهار رشد کمتر از ۲۲ میلی متر برای سفتریاکسون و سفوتاکسیم ۳۰µg برای غربالگری سویه‌های 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 ۲۰میلی‌متر از دیسک‌های‌سفتریاکسون، سفتازیدیم و سفوتاکسیم انجام و جهت تایید تولید آنزیم‌های ESBL آزمایش ترکیبی (CT) ، روش پیشنهادی NCCLS با استفاده از دیسک سفتازیدیم۳۰µg در کنار دیسک سفتازیدیم/کلاولانیک اسید (۳۰µg / ۱۰µg) ودیسک سفوتاکسیم ۳۰µg درکناردیسک سفوتاکسیم /کلاولانیک اسید(۳۰µg / ۱۰µg) (ساخت شرکتMAST)، 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 بااستفاده‌ازنوارهای E-test (strip AB Biodisk, Selona, Sweden) انجام‌یافت(۱۳و۱٤). نوارهایE-test مورد استفاده در این مطالعه درسویه‌های کلبسیلاپنومونیه و آنتروباکترکلوآکه شامل آزترونام، ایمی‌پنم، سفوتاکسیم، سفتی زوکسیم، کوآموکسی کلاو و سفتازیدیم/سفتازیدیم + کلاولانیک اسید بودند. برای انجام این آزمایش، طبق راهنمایی‌های شرکت سازنده نوارهای E-test باکتری مورد مطالعه در سرم فیزیولوژی به حالت سوسپانسیون در آمده و کدورت آن بااستاندارد نیم مک فارلند تنظیم و روی سطح پلیت مولر هینتون آگاربا قطر ۹۰mm با سوآب پنبه‌ای گسترش و در هر پلیت دو عدد از نوارهای E-test قرار داده شد. نوارهای مورد استفاده در موردسویه‌های سودوموناس آئروجینوزا شامل سفتازیدیم، سفتریاکسون و آزترونام بودند.

جهت بررسی دقیق تر اپیدمیولوژیک، الگوی پلاسمیدی سویه ها با استفاده از روش لیز قلیایی Sambrook (۱۵) و جهت حذف پلاسمید[2] از قرار دادن سویه ها در دمای بالا (٤٤ درجه سانتیگراد) به مدت یک شبانه روز استفاده شد(۱٦).

سویه های کنترل مورد استفا ده در روش دیسک دیفیوژن و-E testشامل: *Klebsiella pneumonia*e ATCC 700603 و *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 ۱۳۸٤، نمونه های مختلف به آزمایشگاه بیمارستان ارسال که از ۳۲ بیمار(۱۱/٦۳ ٪) باکتری جداسازی 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 آئروجینوزا ۸ مورد (۳۲٪) و با سیلهای گرم منفی غیر تخمیر کننده دیگر ۳ مورد (۱۲٪) را شامل می شد.

کلیه‌ی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه، آنتروباکتر کلوآکه و سودوموناس آئروجینوزا در مقابل سیپروفلوکساسین ۱۰۰٪ حساس و در برابر کاربنی سیلین ۱۰۰٪ مقاوم بودند در حالی‌که در مقابل

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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، توبرامایسین، پی پراسیلین ، تتراسایکلین، سفوتاکسیم، تیکارسیلین، سفتازیدیم ، سفوروکسیم و کوتریموکسازول به ترتیب ۸۱/۸۱٪ ، ۳۶/۳۶٪، ۳۶/۳۶٪ ، ۲۷/۲۷٪، ۲۷/۲۷٪ ، ۱۸/۱۸٪ ، ۱۸/۱۸٪ ، ۹/۰۹٪ ، ۹/۰۹٪ و ۹/۰۹٪ بود.
کلیه‌ی 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.

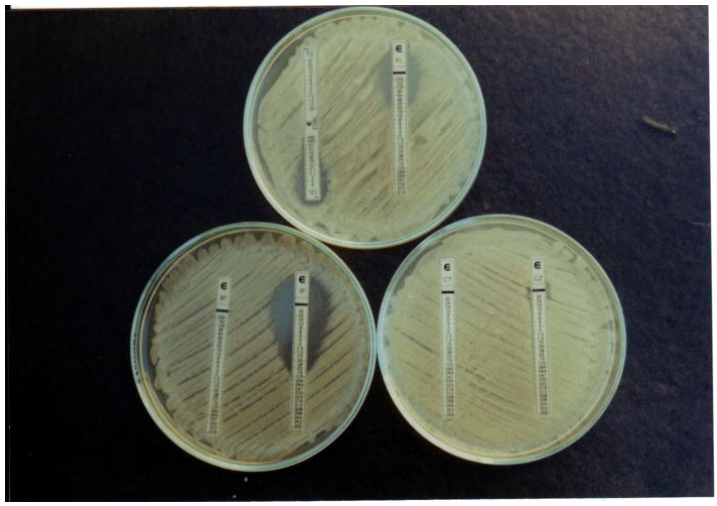
جدول ۱: نتایج حداقل غلظت مهارکننده(MIC) سویه های مورد مطالعه در بیمارستان **کودکان**

شماره سویه ها	جنس وگونه باکتری	آنتی بیوتیک‌ها IP	AT	CZ	CT	TZ	TZL	XL	TX
۱	K.p	۰/۲۵	۳۲	۰/۰۱۶	۰/۰۴۷	< ۰/۵۰	۰/۰۶۴	۲	–
۲	P.a	–	۸	–	–	۱۶	–	–	> ۲۵۶
۳	K.p	۰/۱۹	> ۲۵۶	> ۳۲	>۳۲	>۳۲	۰/۲۵	۳۲	–
٤	K.p	۰/۲۵	> ۲۵۶	> ۳۲	> ۳۲	>۳۲	۰/۱۲۵	۸	–
۵	K.P	۰/۱۲۵	> ۲۵۶	> ۳۲	> ۳۲	> ۳۲	۰/۱۲۵	۱۶	–
٦	P.a	–	۱/۵	–	–	۰/۷۵	–	–	٦
۷	E.c	۰/۲۵	۳۲	> ۳۲	> ۳۲	> ۳۲	> ٤	۲٤	–
۹	K.p	۰/۱۹	>۲۵٦	>۳۲	>۳۲	>۳۲	۰/۱۹	۱٦	–
۱۰	K.p	۰/۰۶۴	>۲۵٦	>۳۲	>۳۲	>۳۲	۰/۰۹۴	۸	–
۱۳	P.a	–	۲	–	–	۰/۳۸	–	–	۸
۱۵	E.c	۰/۱۹	۸	۱	۲	۴	۰/۲۵	۱٦	–
۱۶	K.p	۰/۱۲۵	> ۲۵٦	۶	> ۳۲	> ۳۲	۰/۱۹	۱٦	–
۱۷	K.p	۰/۱۲۵	> ۲۵٦	۸	> ۳۲	> ۳۲	۰/۱۹	۱٦	–
۱۸	P.a	–	۲	–	–	۱/۵	–	–	۲٤
۱۹	E.c	۰/۱۹	۳۲	> ۳۲	> ۳۲	> ۳۲	> ۴	۲٤	–
۲۰	K.p	۰/۱۲۵	> ۲۵٦	۶	> ۳۲	> ۳۲	۰/۳۸	۱٦	–
۲۲	P.a	–	۲	–	–	۰/۷۵	–	–	۱۲
۲۳	K.p	۰/۱۹	> ۲۵۶	> ۳۲	> ۳۲	> ۳۲	۰/۲۵	۱۶	–
۲۴	P.a	–	۲	–	–	۱٦	–	–	۱٦
۲۷	K.p	۰/۱۹	> ۲۵٦	> ۳۲	> ۳۲	> ۳۲	۰/۱۹	۱٦	–
۲۸	P.a	–	۱/۵	–	–	۱/۵	–	–	۳۲

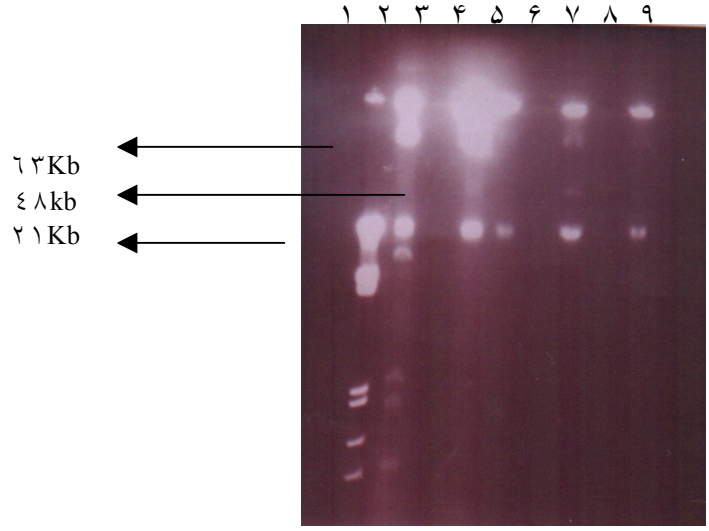
IP= ایمی پنم AT؛ =آزترونام؛CZ = سفتی‌زوکسیم ؛ CT= سفوتاکسیم ؛ TZ = سفتازیدیم؛ TZL = سفتازیدیم / کلاولانیک اسید؛ XL = آموکسی کلاو ؛ **TX** = سفتریاکسون ؛ K.p = کلبسیلا پنومونیه ؛E.c = آنتروباکتر کلوآکه و P.a = سودوموناس آئروجینوزا ،

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

سویه های مورد آزمایش	قبل از حذف پلاسمید: تعداد	قبل از حذف پلاسمید: اندازه(kb)	بعد از حذف پلاسمید: تعداد	بعد از حذف پلاسمید: اندازه(kb)
۱	۳	>٦۳ ، ٦۳ و ۲۱	–	–
۳	٤	>٦۳ ، ٦۳، ٤۸ و ۲۱	–	–
٤	۳	٦۳ ، ٤۸ و ۲۱	۱	٤۸
۵	۳	٦۳ >، ٦۳ و ۲۱	–	–
۸	۲	٦۳ > و ٤۸	۱	٤۸
۹	۳	٦۳ >، ٦۳ و ٤۸	–	–
۱۰	۳	٦۳ >، ٦۳ و ٤۸	۱	٤۸
۱٤	٤	٦۳ >، ٦۳ ، ۴۸ و ۲۱	۳	>٦۳ ، ٤۸ و ۲۱



تصویر ۱، MIC کلبسیلا پنومونیه (سویه شماره ٤) به روشE-test



تصویر۲، الگوی پلاسمیدی سویه‌های مورد آزمایش
۱- Ladder ، ۲- E.coli 39R861 ، ۳- E.coli V517،
٤، ٦ و ۸ = سویه‌های شماره ۱، ۳ و ۵ و ۵، ۷ و ۹ = سویه‌های شماره ۱، ۳ و ۵ بعد از حذف پلاسمید

کلیه ی سویه های سودوموناس آئروجینوزای جدا شده نسبت بـه سفوکسـیتین، سفوروکسـیم، سفوتاکسـیم، سفتریاکسـون، کوتریموکسـازول و تتراسـایکلین ۱۰۰٪ مقـاوم بودند؛ در حالی‌که حساسـیت آنهـا نسـبت بـه آمیکاسـین، توبرامایسـین، سفتازیدیم، افلوکساسـین، پـی‌پراسیلین و تیکارسیلین به ترتیب ۸۷/۵ ٪، ۷۵٪، ۷۵٪، ۶۲/۵٪، ۵۰٪ و ۲۵٪ بود.

در غربالگـری سـویه هـای تولـید کننده ESBL بـر اسـاس راهنمایـی‌هایـی NCCLS در کلـیه‌ی سویه های کلبسیلا پنومونیه، آنتروباکتـر کلو آکه و سودوموناس آئروجینوزا قطر هاله های مهار رشـد ایـن باکتـری هـا در مقابل سه آنتی بیوتیک سفتازیدیم، سفو تاکسـیم و سفتریاکسـون مورد مطالعه واقع شد که تمامی نمونه ها قطر کمتر از ۲۲ میلی متر نسبت به سفتازیدیم و یا کمتر از ۲۷ میلی متـر نسبت به سفوتاکسیم و سفتریاکسون را نشان دادند. لذا، تمامی سویه‌ها در مراحل بعدی مورد آزمایش واقع شدند.

در آزمـایش مجـاورت دو دیسـک (DDT)، بـا اسـتفاده از دیسک‌های سفتازیدیم، سفو تاکسیم، سفتریاکسون وآموکسی کلاو، در هیچیک از سویه ها ایجاد سینرژی بین دو دیسک مشاهده نشد، لـذا جهـت تایـید این نتایج آزمایش نمونه‌های فوق مورد آزمایش ترکیب دو دیسک (CT) واقع شدند.

درآزمـایش ترکیبی (CT) کلیه سویه های کلبسیلا پنومونیه و آنتـر وباکتـر کلوآکه(۱۰۰٪) و سویه های سودوموناس آئروجینوزا ٦٢/۵٪ مولد آنزیم های β– لاکتاماز طیف گسترده (ESBLs) بودند.

نتایج MIC برای سویه های کلبسیلا پنومونیه، آنتروباکتر کلوآکه وسودوموناس آئروجینوزا با نوار E-test درجدول وتصویر شماره ۱، نشان داده شده است. نوار E-test ESBL نوارهای دوطرفه هستند که حاوی گرادیان غلظتی از سفتازیدیم در یک طرف نوار و سفتازیدیم به اضافه کلاولانیک اسید در طرف دیگر آن می‌باشد. یک آزمایش مثبت برای ESBL کاهش رشد بیش از ۵ رقت در MIC سفتازیدیم در حضور کلاولانیک اسید می باشد (۱۷). سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و آنتروباکتر کلوآکه مورد مطالعه در این مرکز با توجه به نتایج این آزمایش ۱۰۰٪ تولید کننده انزیم‌های ESBL می‌باشند. علاوه بر این، براساس سند NCCLS M100-S8 حداقل غلظت مهارکننده (MIC) در مورد آنتی‌بیوتیک‌های آزترونام، سفتازیدیم و سفتریاکسون۳۰µg برا بر با ۲ یا بیش از آن ، دلیلی بر احتمال تولید آنزیم‌های ESBL می‌باشد (۱۰). با توجه به نتایج MIC در برابر این سه آنتی بیوتیک، کلیه سویه‌های آنتروباکتر کلوآکه ۱۰۰٪ تولید کننده ESBL بوده و ۹/ ۹۰ ٪ از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و ۱۰۰٪ از سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا به عنوان تولید کننده ESBL ثبت شدند.

الگوی پلاسمیدی ۷ سویه کلبسیلا پنمونیه 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 سویه‌ها در شرایط کاملا یکسان مورد آزمایش حذف پلاسمید واقع و پلاسمید های استخراج شده در آگاروز ۰/۸٪ در بافر TBE درV ۱۵۰ وmA ۵۰ به مدت سه ساعت الکتروفورز شدند. تعداد و وزن مولکولی پلاسمیدهای استخراج شده در جدول ۲ و تصویر۲ نشان داده شده است.

سویه ها ی 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 بیوتیکها ی 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 مرکزآموزشی ودرمانی 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 می‌کنند، حتی در صورت حساسیت به داروهای β -لاکتام به صورت 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 می‌باشد، مثلاً ترکیه تولید آنزیم در سویه های *E.coli* معادل ۱۷٪ و در سویه های کلبسیلا پنمونیه۵۷/۱۰٪ (۱۹)، در آمریکای شمالی۴/۴–۴/۲ ٪ از *E.coli* ها و ۴/۷ –۳/۳٪ از کلبسیلاها (۲۰و۲۱)، در آمریکای جنوبی ۴۷– ۴۰ ٪از کلبسیلاها و ۲۵/۵٪ –۶/۷ ٪ از *E.coli* ها (٦و 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 سویه‌های تولید کننده ESBL دخالت دارندازجمله توقف طولانی مدت در بیمارستان و یا در بخش ICU ، مصرف قبلی آنتی بیوتیک‌ها (از جمله سفالوسپورین‌های نسل سوم) ، شدت بیماری، ا ستفاده از کاتترهای عروقی و ادراری و سابقه جراحی (۱۷). در بررسی پرونده‌های بیماران غالب بیماران مورد مطالعه سابقه جراحی و بستری شدن در بیمارستان‌های 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 یافته‌ها با نتایج حاصل از بیمارستانهای کلمبیا تطا بق دارد. حدوداً ۹۰٪ از سویه ها نسبت به فلوئوروکینولونها حساس باقی مانده بودند که در مقایسه با بیمارستان های کلمبیا (۴۰٪) (۲۱) بسیار بالاتر می‌باشد. حساسیت سویه‌های کلبسیلا و آنتروباکترنسبت به ایمی‌پنم، نیز تاییدی بر تولید آنزیم‌هایβ- لاکتامازتوسط این سویه‌ها می‌باشد. نتایج حساسیت درمقابل مواد ضد میکروبی سویه های مورد مطالعه یعنی مقاومت نسبت به سفتازیدیم ، سفو تاکسیم و آزترونام به خوبی روشن می سازد که آنزیم های β- لاکتاماز تولیدی توسط این باکتریها از دسته‌ی A زیر گروه 2be می‌باشند زیرا این گروه از آنزیم‌ها قادر به غیرفعال سازی سفالوسپورین‌های نسل سوم و منوباکتام‌ها بوده(۱۷) در حالی‌که نسبت به کارباپنم‌ها حساس باقی می‌مانند(۵) و با توجه با اینکه از آنزیم های ESBL ، گروه CTX-M، آنزیم های قادر به هیدرولیز سفوتاکسیم، می باشند(٦) بررسی مولکولی سویه های مورد آزمایش از نظر وجود ژن تولید این آنزیم، ضرورت می یا بد . 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 µ g ۳۰ ، کمتر از mm ۱۸ باشد وقوع تولید β- لاکتامازهای AmpC را مطرح میسازد(۲۲). نتایج حاصل از سویه های مورد مطالعه، با وجود حساسیت ۸۱/۸۱٪ سویه‌های کلبسیلاپنومونیه نسبت به سفوکسیتین قطر هاله مهار رشد آنها کمتر ازmm ۱۸بوده‌است که وجود این آنزیم را تایید می کندو نیز کلیه

سـویه‌هـای آنتروباکتـر کلوآکه وسودوموناس آئروجینوزا قطر هاله مهـار رشـد کمتـر از ۱۸ میلیمتـر رانسـبت بـه سفوکسـیتین، نشان مـی‌دادند.این نتایج بررسی مولکولی سویه‌هارا از نظر ژن وابسته به پلاسمید AmpC پیشنهاد می‌کند.

در بررسـی الگوی پلاسمیدی باکتریهای تولید کننده ESBL ، ۵ کلـون مـتفاوت را در بـین سـویه ها می‌توان مشاهده کرد که در بررسـی پـرونده بیماران، بیش از ۳۵٪ ازآن‌ها سابقه بستری در یک بیمارسـتان دیگـر را داشتند، که این امر می‌تواند توجیه مستندی از اسـتقرار کلـون‌هـای مخـتلف باکتریایی در بیمارستان مورد مطالعه باشـد. تمامـی سـویه هـای مـورد مطالعه بعد از مرحله‌ی حذف، پلاسـمیدی بـا وزن مولکولـی ۶۳ kb خـود را از دست داده بودند بدون اینکه الگوی فنوتیپیک حساسیت نسبت به آنتی بیوتیکها تغییر نمایـد، کـه میـتوان نتـیجه گیـری کـرد این پلاسمید حامل ژنهای تولیدکـنده آنزیم β – لاکتاماز نمی باشد . انکوباسیون به مدت ۲۴ سـاعت در دمـای ۴۴ درجـه سـانتیگراد قـادر بـه حـذف کامـل پلاسـمیدهـای سـویه‌های مورد مطالعه نبوده و جهت حذف کامل پلاسمیدها انکوباسیون طولانی مدت مورد نیاز می‌باشد.

نتیجه گیری

نـتایج ایـن مطالعـه پیشـنهادمی‌کـند کـه جهت شناسایی انواع آنزیم‌های بتالاکتام از طیف گسترده، سویه های تولید کننده ESBL هـا مـورد مطالعـه، بـا پرایمـرهای اختصاصی به روشPCR مورد مطالعه قرار گیرند.

تشکر و قدر دانی

از مسـئولین آزمایشـگاهای دانشـکده پزشـکی دانشـگاه آزاد اسـلامی تبریـز، مسـئولین مرکـز تحقـیقات کاربـردی- دارویـی، همکـاران بیمارسـتان کودکان و مسئولین آزمایشگاه میکروبشناسی وبیوشـیمی عمومـی مرکـز تحقـیقات کاربردی – دارویی دانشگاه علـوم پزشـکی تبریـز بدلـیل همکـاری‌هـای صـمیمانه قـدر دانی می شود.

References

1. Vincent JL. Nosocomial infections in the ICU. *Microbes and Infection*. 2004; **6**:1003
2. Dieckhaus KD, Cooper BW. Infection control concepts in critical care. *Crit Care Clin*. 1998; **14**: 55-70
3. Ambrose PG, Owens RC, Quintillani R. Antibiotic use in the critical care unit. *Crit Care Clin*. 1998; **14**: 283 -308
4. Livermore DM. β-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995; **8**: 557-84
5. 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
6. 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
7. Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended –spectrum β-lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol infect.* 2000**; 6**: 460-463
8. 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
9. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Baily & Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th ed. 2002; pp. 229-258. St.louis, Mosby, Inc.
10. 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.
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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. Avaiable 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 JInfect 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): 772-77