پژوهنده (مجله پژوهشي دانشگاه علوم پزشكي شهيد بهشتي)
سال سيزدهم, شماره ۴ , پي در پي ۶۴ ، صفحات ۳۳۵ تا ۳۴۵
مهر و آبان ۱۳۸۷

تاريخ دريافت مقاله ۸۶/۱۲/۱۶
تاريخ پذيرش مقاله ۸۷/۳/۱۲

شناسايي ايزوله هاي باليني اشريشياكلي مولد بتالاكتامازهاي وسيع الطيف (ESBLs) بر پايه تعيين MIC سفتازيديم، سفترياكسون و سفپيم

محسن ميرزايي[۱]، دكتر محسن چيت ساز[۲]*، صادق منصوري[۳]

چكيده

سابقه و هدف: *بتالاكتامازهاي وسيع‌الطيف، آنزيم هاي وابسته به پلاسميدي هستند كه آنتي بيوتيک هاي بتالاكتام اكسي ايمينو مثل سفالوسپورين‌هاي وسيع‌الطيف نسل سوم از جمله سفتازيديم، سفتريا‌كسون و سفوتاكسيم را تجزيه مي‌كنند. اين آنزيم‌ها اغلب در اعضاي خانواده آنتروباكتريا‌سه خصوصاً كلبسيلا پنومونيه و اشريشياكلي يافت مي‌شوند. شناسايي توليد بتالاكتامازهاي وسيع‌الطيف راه حل مفيدي براي انتخاب آنتي‌بيوتيك مناسب در اختيار پزشكان قرار مي‌دهد. در مطالعه حاضر فراواني توليد بتالاكتامازهاي وسيع الطيف در ايزوله هاي باليني اشريشياكلي توسط روش MIC ارزيابي شده است. هم چنين مقايسه توزيع مقاومت ايزوله هاي اشريشياكلي بر اساس توزيع MIC هر يک از آنتي بيوتيک هاي سفتريا‌كسون، سفتازيديم و سفپيم در ايزوله هاي باليني اشريشياكلي مورد بررسي قرار گرفته است.*

مواد و روش ها: *تعداد ۱۶۰ ايزوله اشريشيا كلي از نمونه هاي بيماران از سه بيمارستان دانشگاهي شهر تهران در سال ۱۳۸۵ جمع آوري گرديد. شناسايي ESBLs بر پايه MIC و با روش تهيه رقت در آگار با استفاده از عوامل سفتريا‌كسون، سفتازيديم و سفپيم بر مبناي استاندارد CLSI انجام شد. هر ايزوله در صورتي كه MIC براي يكي از عوامل فوق بزرگ تر از $1\ ^{\mu m}/_{ml}$ بود به عنوان يك توليد كننده بالقوه ESBLs در نظر گرفته مي شد. براي تأييد توليد بتالاكتاماز وسيع الطيف هم چنين MIC تمام ايزوله هاي باليني عوامل فوق در تركيب با اسيدكلاووولانيک با غلظت ثابت ۴ µm/ml تعيين گرديد. هر ايزوله در صورت كاهش رقت MIC به اندازه ۳ مرتبه يا بيش تر در تركيب يكي از عوامل فوق با اسيدكلاووولانيک به عنوان توليدكننده قطعي ESBL مشخص شد.*

يافته ها: *تست‌هاي اوليه به طور كلي توليد ESBLs در ۵۶/۶۸ درصد (n=۸۹) از ارگانيسم‌هاي مورد بررسي را نشان داد. آزمايش‌هاي تأييدي با استفاده از مهار كننده اسيد كلاووولانيك، توليد بتالاكتامازهاي وسيع‌الطيف از نوع ESBLs را تنها در ۹۶/۷۰ درصد (n=۸۶) از سويه هاي داراي فنوتيپ اوليه مثبت را تأييد نمود در حالي كه در ۳/۳ درصد (n=۳) از ايزوله هاي با فنوتيپ اوليه مثبت، افزايش ۳ رقت يا بيش تر در ميزان MIC در آزمايش تأييدي مشاهده نشد. هم چنين نتايج تست هاي MIC براي سفتريا‌كسون، سفتازيديم و سفپيم به ترتيب نشان داد كه به طور كلي ۲۵ درصد ارگانيسم هاي مورد مطالعه نسبت به سفتريا‌كسون، ۲۲ درصد نسبت به سفتازيديم و ۲۱/۵۲ درصد نسبت به سفپيم كاهش حساسيت پيدا كرده ولي MIC هاي كم تر از مرزهاي مقاومت كه براي آنتي بيوتيک فوق در تست هاي معمول آنتي بيوگرام در نظر گرفته مي شود داشتند. اين ارگانيسم ها از آن جهت مهم هستند كه در بيمارستان هايي كه شناسايي ESBLs انجام نمي دهند، استفاده از سفالوسپورين هاي نسل سوم و مونوباكتام ها براي درمان آن ها غير مجاز در نظر گرفته نمي شود.*

---

۱. كارشناس ارشد ميكروبيولوژي
۲ *. نويسنده مسؤول: استاديار ،گروه ميكروبيولوژي ، دانشكده پزشكي ، دانشگاه شاهد . پست الكترونيک: chitsaz@shahed.ac.ir
۳. كارشناس ارشد ، گروه ميكروبيولوژي ، دانشكده پزشكي ، دانشگاه شاهد

نتيجه گيري: يافته هاي تحقيق حاكي از آن است كه نسبت قابل توجهي از ايزوله هاي باليني اشريشيا كلي در بيمارستان هاي دانشگاهي شهر تهران مولد ESBLs هستند. اين ارگانيسم ها مي بايد به تمام بتالاكتام ها و مونوباكتام ها مقاوم گـزارش شـوند. اين امر لزوم اجراي روزمره تست هاي شناسايي ESBLs و انتخاب گزينه‌هاي درماني مناسب را مورد تأكيد قرار مي‌دهد.

واژگان كليدي: ***ESBLs*** *، اشريشيا كلي ، سفتازيديم ، سفترياكسون ، سفوتاكسيم*

مقدمه

عفونت‌هاي ايجاد شده به وسيله باسـيل هـاي گـرم منفـي روده اي مقـاوم بـه چنـد دارو كـه آنـزيم‌هـاي بتالاكتامـاز وسيع‌الطيف (ESBL) توليد مي‌كنند، بـا افـزايش تعـداد در واحدهاي مراقبت ويـژه گـزارش شـده اسـت و در ارتبـاط بـا مرگ و مير و نـاتواني قابـل توجـه مـي‌باشـد (۱). ESBLs بتالاكتامازهايي هستند كه توانايي بـروز مقاومـت باكتريـايي به پني‌سيلين‌ها، سفالوسـپورين‌هـاي نـسل اول، دوم، سـوم و آزتروئونام (امـا نـه سفامايـسين يـا كاربـاپنم‌هـا) بـه وسـيله هيـدروليز ايـن آنتـي بيوتيـك‌هـا را دارنـد و بـه وسـيله مهـار كننـده‌هـاي بتالاكتامـاز ماننـد كلاوولانيـك اسـيد مهار مي‌شوند (۲).

ارگانيسم‌هاي توليد كننده بتالاكتاماز وسيع الطيف حاوي پلاسميدهاي چند مقاومتي هستند كه ممكن است به راحتي ميـان اعـضاي آنترواكترياسـه، حتـي در همـان بيمـار منتقل شود. در نتيجه ارگانيسم‌هاي توليـد كننـده ESBL، اغلب به كـلاس هـاي متنـوعي از آنتـي بيوتيـك هـا مقـاوم مي باشند (۳). ظهور بـاكتري هـاي مولـد ESBL اسـتفاده مـؤثر از سفالوسـپورين هـاي وسـيع الطيـف در درمـان عفونت هاي جدي ايجاد شده بـه وسـيله ايـن پـاتوژن هـا را محدود كرده است (۴).

وجود ارگانيسم‌هاي توليد كننده ESBLs در يک عفونت باليني مي تواند منجـر بـه شكـست درمـاني شـود، بنـابراين انتخاب عامل دارويي ضـد ميكروبـي بـسيار مهـم مـي‌باشـد. آزمايش هاي آنتي‌بيوگرام تمـامي مـوارد ايـن نـوع مكانيـسم مقاومت را شناسايي نمي‌كند. ضمن اين كه ممكن است يـک ارگانيسم توليد كننـده ESBLs بـه علـت سـطوح متفـاوت فعاليت بر ضد سفالوسپورين‌هاي مختلـف، در آزمـايش هـاي معمول به بعضي از آن ها حساس به نظر برسـد. لـذا CLSI پيـشنهاد كـرده اسـت كـه شناسـايي ESBLs در كنـار آزمايش هاي آنتي بيوگرام براي ارگانيسم‌هـاي جـدا شـده از نمونه بيماران صورت گيرد (۵). اين آزمايـشات انتخـاب‌هـاي درماني قابل اعتمادي در اختيـار پزشـک بـه منظـور درمـان موفقيـت آميـز و جلـوگيري از بـه كـار بـردن بـي رويـه آنتي بيوتيک‌هاي وسيع الطيف غير مؤثر كه شكست درمـاني و تحميل هزينه‌هاي سنگين بـه بيمـار و سيـستم بهداشـتي درماني را در پي دارد قرار مي‌دهد (۵).

شناسايي ESBLs در آزمايـشگاه هـاي ميكـروب شناسـي باليني در داخل كشور هنوز متداول نشده اسـت. ايـن تحقيـق به منظور تأكيد بر اهميت شيوع ارگانيـسم‌هـاي توليـد كننـده ESBLs و لزوم شناسايي آن ها، به طور ويـژه فراوانـي توليـد بتالاكتامازهاي وسيع الطيف در ايزوله هاي باليني اشريشياكلي توسط روش MIC را بررسي كرده است. هـم چنـين مقايـسه توزيع مقاومت ايزوله هاي اشريشياكلي بر اساس توزيـع MIC هر يـک از آنتـي بيوتيـک هـاي سفتريـاكـسون، سـفتازيديم و سفپيم در ايزوله هاي باليني اشريشياكلي در بيمارسـتان هـاي شهيد مصطفي خميني، مركز طبـي كودكـان و امـام خمينـي شهر تهران مورد بررسي قرار گرفت.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده در بيمارستان هاي امام خميني، شـهيد مصطفي خميني و مركـز طبـي كودكـان تهـران بـه صـورت يك مطالعـه مقطـعي در دوره زماني مهر تا اسفند ماه ۱۳۸۵

انجام شده است. در مجموع ۱۶۰ ايزوله باليني اشريشيا كلي بررسي گرديد. ايزوله‌هاي باليني بعد از انجام آزمايش هاي تعيين هويت در محلول هاي نگه دارنده در فريزر۷۰- درجه سانتي گراد نگه داري گرديدند.

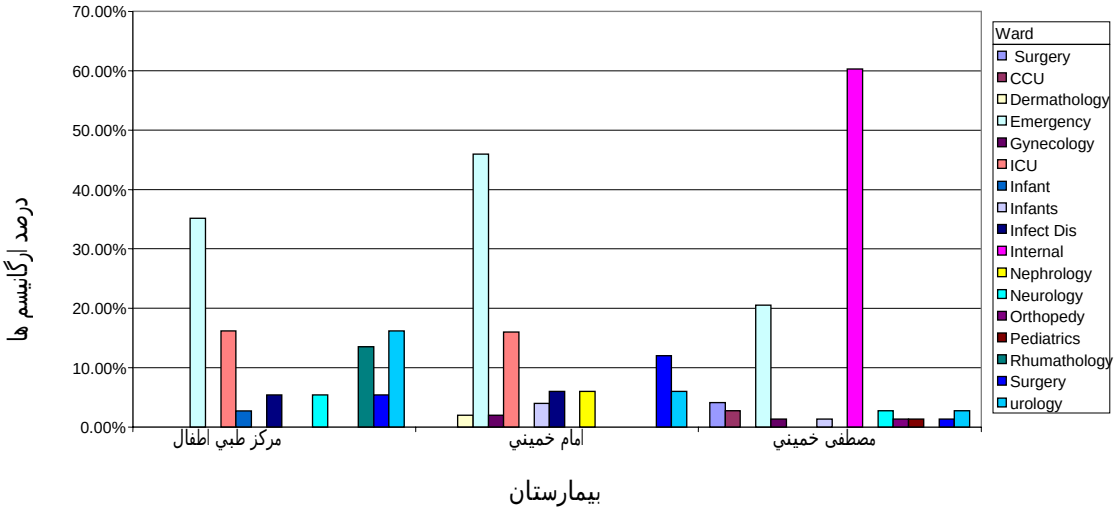
شناسايي بتالاكتامازهاي وسيع‌الطيف (ESBLs) در سويه‌هاي باليني اشريشياكلي در سطح فنوتيپي و بر مبناي روش‌هاي غربالگري و تأييدي توصيه شده توسط انستيتو استانداردهاي باليني و آزمايشگاهي (CLSI) انجام شد (۶). محلول استوك آنتي بيوتيک هاي (سفترياكسون، سفتازيديم و سفپيم) در آب مقطراستريل تهيه مي‌شد (پورد آنتي بيوتيک هاي مذكور از شركت داروسازي اكسير تهيه شده بود و مقدار ماده مؤثره آنتي‌بيوتيك در هر ميلي‌گرم پودر سفترياكسون معادل۰/۷۶۰ ميكروگرم، سفتازيديم ۰/۸۲۰ ميكروگرم و براي سفپيم ۰/۶۹۰ ميكروگرم بود). لوله‌هاي استوك آنتي‌بيوتيك هاي مذكور در شرايط انجماد ۷۰°C- تا زمان استفاده نگه‌دراي مي‌شدند. در هرسري آزمايش رقت‌هاي سريال استوک از اين آنتي بيوتيک ها تهيه مي شد. محلول آنتي بيوتيك به محيط مولرهينتون آگار استريل ذوب شده و خنك شده تا دماي حدود ۵۰°C- ۴۵°C افزوده مي شد. رقت هاي آنتي بيوتيك در هر سري پليت ۰/۰۰۸ ، ۰/۰۱۵ ، ۰/۰۳۱ ، ۰/۰۶۲ ، ۰/۱۲۵ ، ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱ ، ۲ ، ۴ ، ۸ ، ۱۶ ، ۳۲ ، ۶۴ و ۱۲۸میکروگرم در میلي ليتر بود و يك عدد پليت به عنوان كنترل رشد (فاقد آنتي‌بيوتيك) استفاده مي‌شد. پليت‌ها به صورت نقطه‌اي توسط لوپ كاليبره استريل يک ميكروليتري از سوسپانسيون تهيه شده از كشت ۲۴ ساعته ايزوله هاي مورد آزمايش در سرم فيزيولوژي استريل با كدورت معادل ۰/۵ استاندارد مك فارلند كه به نسبت ۱/۱۰ رقيق شده بود تلقيح شد. هم چنين در هر سري آزمايش از سوسپانسيون تهيه شده از كشت ۲۴ ساعته سويه هاي كنترل كيفي (ATCC 700603) *Klebsiella pneumonia* و (ATCC 25922) *E.coli* در كنار سويه هاي تست تلقيح مي شد. سپس سري پليت‌ها به گرم خانه ۳۵°C انتقال داده شده و ۲۴ ساعت كامل اجازه رشد داده مي‌شد. سري پليت‌ها بعد از ۲۴ ساعت براي رشد باكتري ها در نقاط تلقيح شده بررسي مي‌شدند. هرگونه رشد باكتري (به صورت انبوه يا كلني‌هاي معدود و منفرد) مقاومت نسبت به آن رقت تلقي مي‌شد. حداقل غلظتي كه باكتري هيچ گونه رشد قابل مشاهده در آن نداشت به عنوان MIC تعيين و در فرم‌هاي مربوطه با شماره مرجع ايزوله باكتري ثبت مي‌گرديد. هر ايزوله باليني اشريشياكلي در صورتي كه MIC آن براي يكي از عوامل فوق بزرگ تر از $^{\mu m}/_{ml}$ ۱بود به عنوان يك توليد كننده بالقوه ESBLs در نظر گرفته مي‌شد (۶و۷).

تأييد فنوتيپي ايزوله هاي باليني اشريشياكلي كه در مرحله قبل داراي توانايي بالقوه توليد ESBL شناخته شدند، با آزمايش رقت در آگار با استفاده ازسه عامل: فوق به همراه اسيد كلاوولانيك به عنوان مهار كننده آنزيم هاي بتالاكتاماز وسيع الطيف انجام گرديد. غلظت اسيد كلاوولانيك در تست هاي رقت سريال آنتي بيوتيک ثابت و۴µg/ml بود. در صورتي كه MIC لااقل يكي از آنتي بيوتيک ها در تركيب با اسيد كلاوولانيک سه مرتبه يا بيش تر از سه مرتبه از MIC آن آنتي بيوتيک به تنهايي كاهش نشان مي داد به عنوان يك ارگانيسم توليد كننده قطعي ESBL تأييد مي گرديد (۶و۷).

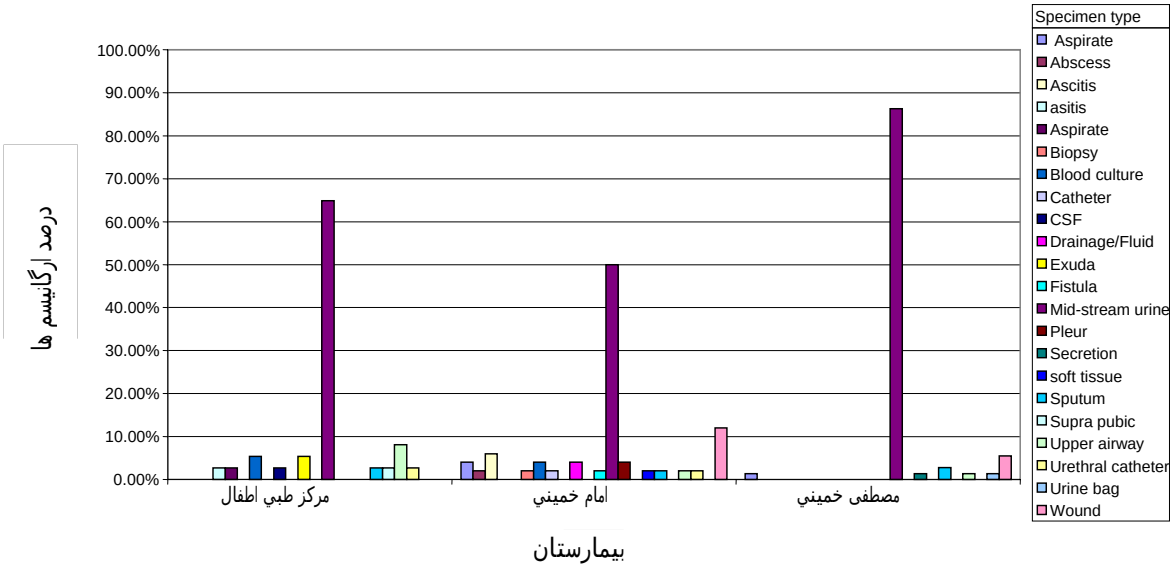
يافته ها

مجموعاً ۱۶۰ ايزوله باليني اشريشيا كلي از سه بيمارستان شهر تهران (بيمارستان امام خميني (ره)، مركز طبي كودكان و بيمارستان شهيد مصطفي خميني) از مهر تا اسفند ماه ۱۳۸۵ بررسي گرديد. در ميان ايزوله‌هاي جدا شده بيش ترين فراواني مربوط به بخش اورژانس با ۵۱ ايزوله اشريشياكلي بود. در مرتبه بعدي بخش داخلي با ۴۴ ايزوله قرار داشت. پس از آن بخش ICU با ۱۴ ايزوله و سپس

بخش اورولوژي ، جراحي و ساير بخش ها قرار داشتند. نمودار ۱ توزيع فراواني ارگانيسم‌هاي جدا شده برحسب بخش‌هاي بيمارستان هاي امام خميني، شهيد مصطفي خميني و مركز طبي كودكان شهر تهران را نشان مي دهد. بيش ترين فراواني ارگانيسم‌هاي جدا شده مربوط به ادرار (n=۱۱۲) با فراواني ۷۰ درصد بود و بعد از آن به ترتيب نمونه‌هاي زخم، مجاري هوايي فوقاني، خلط، كشت خون، آسپيراسيون، آسيت، بيوپسي، كاتتر، پلور و ساير نمونه ها قرار داشتند نمودار ۲ توزيع فراواني نسبي ارگانيسم‌هاي جدا شده بر حسب نوع نمونه باليني را نشان مي دهد.



نمودار ۱- توزيع فراواني ايزوله هاي باليني اشريشياكلي برحسب بخشهاي بيمارستان هاي امام خميني، شهيد مصطفي خميني و مركز طبي كودكان شهر تهران (مهر تا اسفند ۱۳۸۵)

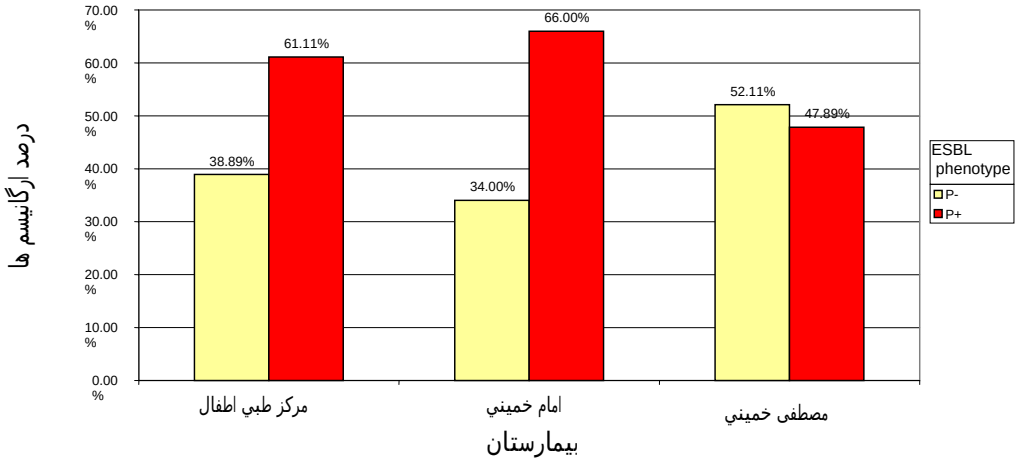


نمودار ۲- توزيع فراواني ايزوله هاي باليني اشريشياكلي بر حسب نوع نمونه باليني در بيمارستانهاي امام خميني، شهيد مصطفي خميني و مركز طبي كودكان شهر تهران (مهر تا اسفند ۱۳۸۵)

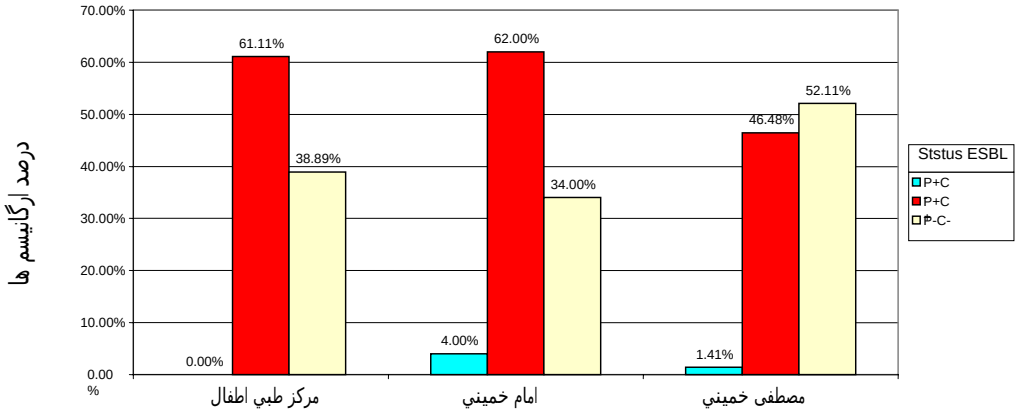
آزمايش هاي غربالگري فنوتيپي اوليه به طور كلي توليد بتالاكتاماز وسيع الطيف در ۵۶/۸۷ درصد از ايزوله‌هاي اشريشياكلي (n=۸۹) را نشان دارد كه داراي فنوتيپ اوليه مثبت براي ESBL بودند. نمودار۳، درصد فراواني فنوتيپ اوليه مثبت و منفي ESBL را در ايزوله هاي *E.coli* را نشان مي دهد.

آزمايش‌هاي تأييدي با استفاده از اسيد كلاوولانيك، توليد بتالاكتامازهاي وسيع‌الطيف از نوع ESBL را تنها در ۹۶/۷۰ درصد (n=۸۶) از ايزوله‌هاي *E.coli* داراي فنوتيپ اوليه مثبت را تأييد نمود (فنوتيپ P^+C^+). در حالي كه در ۳/۳ درصد (n=۳) از ايزوله‌ها فنوتيپ اوليه مثبت، افزايش ۳ رقت يا بيش تر در ميزان MIC در آزمايش تأييدي مشاهده نشد (فنوتيپ P^+C^-). نمودار ۴ نتايج آزمايش هاي تأييدي ESBL را نشان مي دهد.

توزيع فراواني ارگانيسم‌هاي مولد ESBL بر اساس نوع سفالوسپورين‌هاي نسل سومي كه تجزيه مي‌كردند نشان داد كه اكثر ارگانيسم‌ها (۸۸/۲ درصد) قادرند هر سه نوع سوبستراهاي آنتي‌بيوتيكي را تجزيه كنند و نسبت اندكي از آن ها قدرت تجزيه كنندگي آنتي‌بيوتيك محدودي دارند.

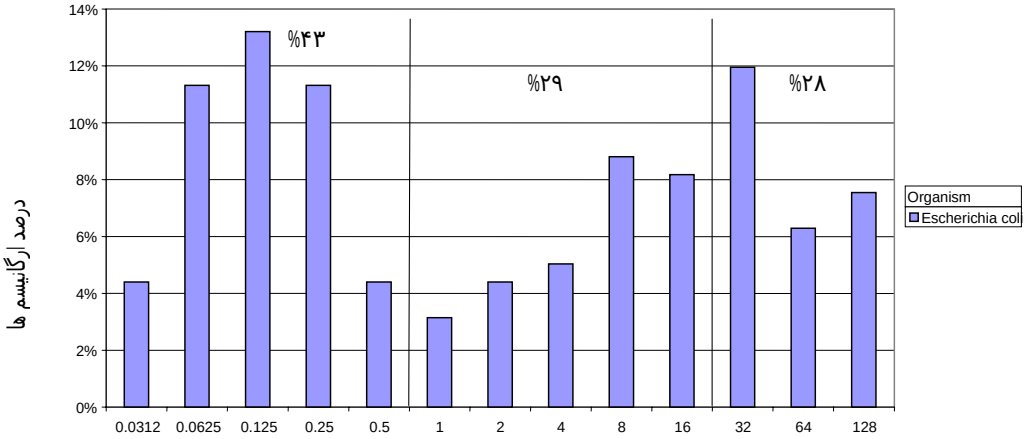


نمودار ۳- توزيع فراواني ايزوله هاي باليني اشريشياكلي بر حسب فنوتيپ اوليه ESBL در بيمارستان هاي امام خميني، شهيد مصطفي خميني و مركز طبي كودكان شهر تهران (مهر تا اسفند ۱۳۸۵)

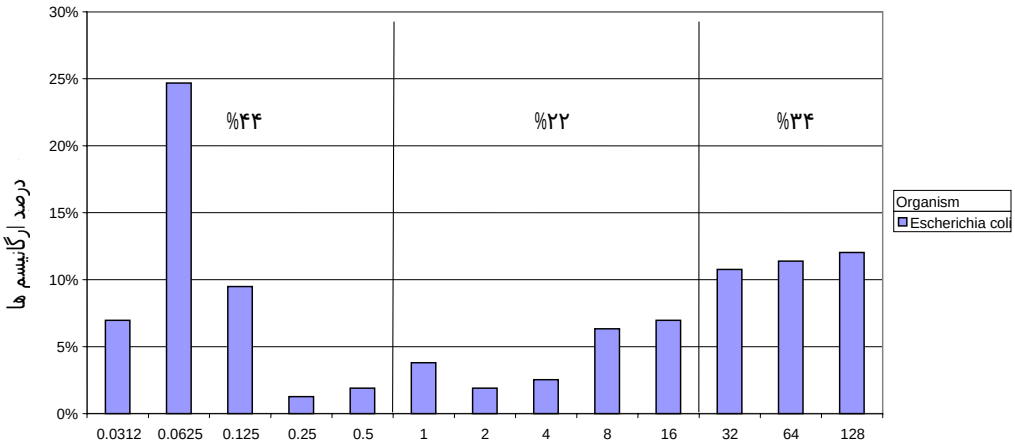


نمودار ۴- توزيع فراواني ايزوله هاي باليني اشريشيا كلي بر حسب فنوتيپ آزمايش هاي تأييدي ESBL در بيمارستان هاي امام خميني، شهيد مصطفي خميني و مركز طبي كودكان شهر تهران (مهر تا اسفند ۱۳۸۵)

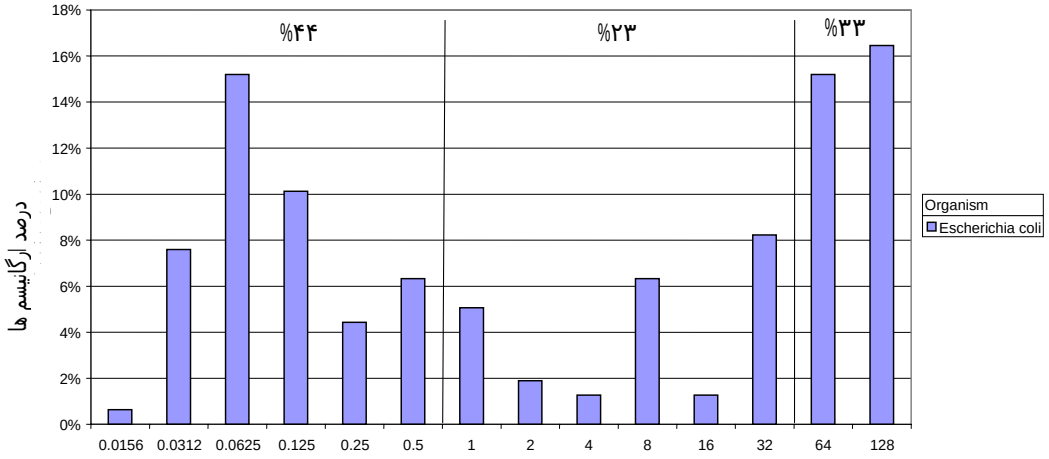
آزمايش هاي MIC آنتي بيوتيک سفتازيديم نـشان داد کـه به طور کلي ٢٩% از ارگانيسم هاي اشريـشياکلي مـورد مطالعـه داراي MIC هاي بالاتر از ١ و پـايين تـر از ٣٢ بودنـد، ۴٣% از ارگانيسم ها داراي MIC کم تر از ١ بوده و ٢٨% از ارگانيسم ها داراي MIC≥٣٢ مي باشند (نمودار ۵)، آزمـايش هـاي MIC براي سفپيم نشان داد که به طور کلـي ٢٢% از ارگانيـسم هـاي اشريشياکلي مورد مطالعه داراي MIC هاي بالاتر از ١ و پـايين تر از ٣٢ بودند، ۴۴% از ارگانيسم ها داراي MIC هاي کم تر از ١ بـوده و ٣۴% از ارگانيـسم هـا داراي MIC≥٣٢ مـي باشـند (نمودار ۶) و آزمايش هاي MIC براي سفترياکسون نـشان داد که به طور کلي ٢٣% از ارگانيسم هاي اشريشياکلي مورد مطالعه داراي MIC هاي بـالاتر از ١ و پـايين تـر از ۶۴ بـوده، ۴۴% از ارگانيـسم هـا داراي MIC هـاي کـم تـر از ١ بـوده و ٣٣% از ارگانيسم هـا داراي MIC≥٣٢ مـي باشـند(نمـودار ٧). توجـه به اين نکته داراي اهميت مي باشد که ارگانيسم هايي کـه بـين دو مرز در نظر گرفته شده براي هر آنتي بيوتيک قرار مي گيرند، ارگانيـسم هـايي هـستند کـه توسـط روش هـاي معمـول آنتي بيوگرام شناسايي نمي شوند حال آن که اين ارگانيسم هـا مولد ESBL مي باشند (اين منطقه توسط دو برش بـراي هـر آنتي بيوتيک بر روي نمودار آن مشخص گرديده است).



نمودار ۵- توزيع فراواني ايزوله هاي باليني اشريشيا کلي به دست آمده از بيمارستان هاي امام خميني، شهيد مصطفي خميني و مرکز طبي کودکان شهر تهران (مهر تا اسفند ١٣٨۵) برحسب مقادير MIC سفتازيديم



نمودار ۶- توزيع فراواني ايزوله هاي باليني اشريشياکلي به دست آمده از بيمارستانهاي امام خميني، شهيد مصطفي خميني و مرکز طبي کودکان شهر تهران (مهر تا اسفند ١٣٨۵) برحسب مقادير MIC سفپيم



نمودار ۸- توزيع فراواني ايزوله هاي باليني اشريشيا كلي به دست آمده از بيمارستان هاي امام خميني، شهيد مصطفي خميني و مركز طبي كودكان شهر تهران (مهر تا اسفند ۱۳۸۵) بر حسب مقادير MIC سفترياكسون

بحث

امروزه بتالاكتامازهاي وسيع الطيف (ESBLs) يک مشكل بيماران بستري شده در بيمارستان در سرتاسر جهان شناخته مي باشند. شيوع ESBL ها در بين گونه هاي باليني از يک كشور به كشور ديگر واز يک مؤسسه تا مؤسسه ديگر متفاوت است (۸). باكتري هاي مولد ESBL غالباً به چندين دسته آنتي بيوتيكي مقاوم بوده و سبب شكست درماني و راه هاي درماني محدود مي‌شوند (۹). باكتري هاي توليدكننده بتالاكتامازهاي وسيع الطيف (ESBLs) يک تهديد كلينيكي جدي مي باشند كه موجب نگراني پزشكان درمان كننده عفونت هاي ناشي از اين ارگانيسم ها گرديده است. سويه هاي توليد كننده اين آنزيم ها مسؤول عفونت هاي بيمارستاني طولاني مدت همراه با عواقب جدي هستند (۱۰).

تست هاي غربالگري فنوتيپي اوليه به طور كلي توليد ESBLs در ۵۶/۶۸ درصد (n=۸۹) از ارگانيسم‌هاي مورد بررسي را نشان داد. اين رقم در مقايسه با ساير كشورهاي جهان رقم بالايي است به طوريكه بر طبق مطالعات انجام شده در ايالات متحده توليد ESBL در آنتروباكتريا سه از صفر تا ۲۵ درصد بسته به محل با ميانگين ملي حدود ۳ درصد متفاوت است. در اروپا نيز شيوع توليد ESBL در بين گونه هاي آنتروباكتريا سه از كشوري تا كشور ديگر بسيار متنوع است. در هلند، بررسي ۱۱ آزمايشگاه بيمارستاني نشان داد كه كم تر از ۱ درصد از سويه هاي اشريشيا كلي داراي يک ESBL هستند (۱۱). در تحقيقي كه در ژاپن انجام شده در سرتاسر اين كشور كم تر از ۰/۱ درصد از اشريشيا كلي و حاوي يک ESBL بودند (۱۲). در جاهاي ديگر آسيا نيز درصد توليد ESBL در اشريشيا كلي و كلبسيلا پنومونيه از ۴/۸ درصد در كره تا ۸/۵ درصد در تايوان و تا۱۲ درصد در هنگ كنگ متفاوت است (۱۳). مقايسه آمارهاي موجود با نسبت هاي به دست آمده در اين مطالعه اهميت يافته هاي تحقيق ESBL را برجسته تر مي نمايد و از آن جا كه طبق مطالعات انجام شده، يک عامل مشترک در بين همه بيمارستان هايي كه به وسيله ارگانيسم هاي مولد ESBL مورد هجوم و آزار هستند حجم زياد استفاده از سفالوسپورين اي وسيع الطيف است (۱۴). بنابراين يک اقدام مؤثر مي تواند كاهش مصرف اين آنتي بيوتيک ها و استفاده به جاي آن ها باشد.

از يافته هاي ديگر اين مطالعه توزيع فنوتيپي ارگانيسم ها براساس نوع سفالوسپورين نوع سوم يا منوباكتامي كه تجزيه

مي كنند بود كه نشان داد ۵۹/۵۴ درصد از ارگانيسم هاي مورد آزمايش قادرند هرسه نوع سوبستراي آنتي بيوتيكي را تجزيه كنند كه در واقع نشان دهنده محدوديت گزينه هاي آنتي بيوتيكي در مواجهه با عفونت هاي ناشي از ارگانيسم هاي مولد ESBL ودر نتيجه افزايش شكست درماني و نيز افزايش مرگ ومير در بيمارستان مي باشد.

يک يافته مهم ديگر درصد فراواني ارگانيسم هايي است كه در تست هاي فنوتيپي اوليه مثبت و در آزمايشات تأييدي منفي بودند (P^+C^-)، كه دراين مطالعه۳/۳ درصد (n=۳) از سويه هاي اشريشيا كلي با فنوتيپ اوليه مثبت را شامل مي شد اين دسته معمولاً ارگانيسم هايي هستند كه حامل بتالاكتامازهاي وسيع الطيف نوع AmpC مي باشند و بايد نسبت به پني سيلين ها، سفالوسپورين ها و منوباكتام ها مقاوم گزارش شوند (۱۵). بتالاكتامازهاي نوع AmpC از طريق موتاسيون يا توليد بيش از حد، ايجاد شده و سبب مقاومت نسبت به سفالوسپورين هاي اكسي ايمينو و نيز ۷- α - متوكسي سفالوسپورين ها (سفوكستين و سفوتتان) و منوباكتان ها مي گردند. مهار كننده هاي بتالاكتامازي مانند كلاوولانات، سولباكتام و تازوباكتام موجب تقويت عمل آنتي بيوتيک اي بتالاكتام بر اين ارگانيسم ها نمي شود (۱۶). نتيجه اين كه راه هاي درماني بيش از پيش محدودتر شده است و سبب پراهميت شدن راه هاي شناسايي و كنترل آن ها گرديده است. در بررسي كه در سال ۱۳۸۵ توسط فرشته شاهچراغي و سياوش نصيري بين ۱۹۶ سويه اشريشيا كلي جدا شده از بيمارستان هاي شهر تهران انجام گرفت شيوع ESBLs با روش هاي فنوتيپي ديسک ديفيوژن وتعيين MIC سفتازيديم با روش ميكروبراث دايلوشن مورد بررسي قرار گرفت، نشان دادند كه ۷۰/۶% سويه هاي مورد مطالعه ESBLs مثبت بودند و علاوه بر اين ۲۸% سويه ها MIC≥ ۳۲ براي سفتازيديم داشتند (۱۷). در مطالعه اي كه توسط محمد رضا نهائي و همكارانش در سال ۱۳۸۶ در تبريز انجام گرفت شيوع ESBLs بين ۷۸۶ ايزوله باليني به دست آمده از بخش هاي مراقبت هاي ويژه با استفاده از سه روش فنوتيپي DDT، E-Test و CT مورد بررسي قرار گرفت نشان دادند كه با استفاده از روش DDT ، ۱۱/۶% با روش CT، ۳۶/۵% و با استفاده از روش E-Test ۵۸/۱% ايزوله مولد ESBLs بودند و هم چنين ۷۳/۸% ايزوله ها نسبت به سفتريا كسون مقاوم بودند (۱۸).

بررسي ديگري كه در اين مطالعه انجام شد، تعيين الگوي توزيع MICs آنتي بيوتيک هاي سفتازيديم، سفتريا كسون و سفپيم در بين ايزوله هاي باليني اشرشيا كلي بود. همان طور كه در نمودار توزيع MIC آنتي بيوتيک سفتريا كسون ديده مي شود ۲۳% از ارگانيسم هاي اشريشياكلي مورد مطالعه داراي MIC بالاتر از ۱ mcg/ml و پايين تر از ۶۴ mcg/ml مي باشند. از سوي ديگر همان طور كه در نمودارهاي توزيع MIC آنتي بيوتيک سفتازيديم و سفپيم نيز ديده مي شود به ترتيب ۲۹% و ۲۲% ارگانيسم هاي اشريشياكلي مورد مطالعه داراي MIC بالاتر از ۱ mcg/ml و پايين تر از ۳۲ mcg/ml مي باشند. اينها ارگانيسم هايي هستند كه توسط روش هاي معمول آنتي بيوگرام به عنوان توليدكننده ESBL شناسايي نمي شوند حال آن كه اين ارگانيسم ها مولد ESBL مي باشند (اين منطقه توسط دو برش بر روي نمودار مشخص گرديده است). در حقيقت اين نكته توجه ما را به نقاط انقطاع (Breakpoint) متداول به كار رفته در آنتي بيوگرام روتين جلب مي نمايد. در واقع تشخيص ESBL از آن جا منشاء گرفت كه برخي از ارگانيسم هاي مولد ESBL با به كار بردن نقاط انقطاع متداول نسبت به سفالوسپورين ها حساس ظاهر مي شدند (۶). اين به علت اختلاف در MIC هايي مي باشد كه به عنوان مرزهاي تعيين كننده حساس و مقاوم در آنتي بيوگرام روتين نسبت به تست هاي شناسايي ESBL تعيين شده است. در آنتي بيوگرام روتين مرز MIC براي ارگانيسم هاي مقاوم به سفتريا كسون mcg/ml ۶۴ ≥، براي ارگانيسم هاي مقاوم به سفتازيديم و سفپيم mcg/ml ۳۲ ≥

مي باشد در حالي كه تست ESBL ، MIC هاي بالاتر از ۶۴ mcg/ml را در زمره ارگانيسم هايي كه مي بايد به عنوان مقاوم براي سفترياكسون و ساير بتالاكتام ها در نظر گرفته شوند، مشخص مي كند. دراين خصوص تفاوت هاي كشوري كاملاً قابل توجه هستند. براي مثال حساسيت نسبت به سفوتاكسيم ممكن است براي يک ارگانيسم با MIC در گستره بين ۱ mcg/ml ≥ تا ۸ mcg/ml ≥ بسته به كشورهاي مختلف، متفاوت گزارش شود. آزادانه ترين تفسيري كه براي حساسيت سفالوسپوريني به كار رفته، تفسيري است كه توسط موسسه استانداردهاي آزمايشگاهي و باليني (CLSI) ارائه مي شود كه حساسيت سفالوسپوريني با MIC ≤ ۸ mcg/ml را نشان مي دهد. زماني كه سفالوسپورين هاي به كار رفته در عفونت هاي ناشي از ارگانيسم هاي مولد ESBL، MIC هاي µg/ml ۸-۴ دارند ميزان شكست بالاي ۹۰% است و زماني كه MIC هاي سفالوسپورين درماني۱mcg/ml ≤ باشند ميزان شكست اساساً پائين‌تر است (۱۱). همان طور كه نتايج نشان مي دهد بين ۲۲% تا ۲۹% از ارگانيسم هاي مورد مطالعه داراي MIC هاي كم تر از مرزهاي مقاوم در نظر گرفته شده در آنتي بيوگرام معمول براي آنتي بيوتيک هاي سفتازيديم، سفترياكسون وسفپيم مي باشند، اين ارگانيسم ها پر خطر محسوب مي شوند و مي توانند شرايط مخاطره آميزي را براي بيماران و پزشكان به وجود بياورند، زيرا از طرفي آزمايشگاه آن ها را بر اساس آزمايش هاي معمول آنتي بيوگرام خود، حساس يا غير مقاوم به سفالوسپورين هاي نسل سوم گزارش مي كند، در حالي كه آن ها به طور واقعي آنزيم بتا لاكتاماز وسيع الطيف توليد مي كنند و مي توانسته اند همان طور كه در تفسيري كه توسط مؤسسه استانداردهاي آزمايشگاهي و باليني (CLSI) ارائه شد در صورت استفاده درماني از سفالوسپورين هاي نسل سوم، ساير بتالاكتام ها و مونوباكتام ها به نسبت بالايي منجر به شكست درماني شوند (۱۹). متأسفانه اطلاعاتي كه اين وضعيت را نشان دهد تهيه نشده است.

نتيجه گيري

يافته هاي تحقيق حاكي از آن است كه نسبت قابل توجهي از ايزوله هاي باليني اشريشيا كلي در بيمارستان هاي مورد مطالعه مولد ESBLs هستند. در نتيجه انجام روتين تست هاي شناسايي ESBLs در آزمايشگاه هاي ميكروب شناسي بيمارستان ها يك ضرورت فوري است. شناسايي و تعيين اوليه سويه هاي توليد كننده ESBLs ممكن است با اعمال محدوديت هاي آنتي بيوتيكي و كنترل عفونت از گسترش سويه هاي مقاوم به چند دارو جلوگيري نمايد. در غياب عوامل جديد براي درمان عفونت هاي ايجاد شده توسط باكتري هاي گرم منفي مقاوم به چند دارو، در آينده نزديک گسترش كنترل نشده توليد كننده هاي ESBLs ممكن است به شكست درمان و در نتيجه افزايش عفونت و مرگ و مير منتهي گردد. بنابراين لازم است باكتري هاي گرم منفي مقاوم يا غير حساس به سفالوسپورين هاي نسل سوم، به طور روزمره براي توليد بتالاكتامازهاي وسيع الطيف با استفاده از روش هاي موجود غربالگري شوند.

REFERENCES

1. Raul C. Extended-spectrum β-lactamases: a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. Am J Infect Control 2005; 33: 104-7.
2. Konthe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhasi S. Transferable resistance to Cefotoaxime, Cefoxitin, Cefamandole and Cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and

Cefuroxim in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcenscens*. Infection 1983; 11: 315-17.

3. Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended–spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1131-6.
4. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. Clin Infect Dis 2001; 32: 1162-71.
5. Blondeau JM. Extended-spectrum beta-lactamases. Semin Respir Infect 2001; 16: 169-76.
6. Clinical and laboratory standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing: Fifteenth Informational supplement 2005; 25(1): 100-15.
7. Queenan AM, Foleno B, Gownloy C. Effect of inoculom and β-lactamase activity in AmpC and Extended-spectrum β-lactamases(ESBLs)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by NCCLS ESBL methodology. J Clin Microbial 2004; 42(1): 269-75.
8. Pterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum ß -lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18 (4):657-86.
9. Stobberingh EE, Arends J, Hoogkamp-Korstanje JA, Goessens WH, Visser MR, Buiting AG, et al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Dutch hospitals. Infection 1999; 27: 348-54.
10. Branger C, Lesimple AL, Bruneu B, Berry, Lambert-Zechovsky N. Long-term investigation of the clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a university hospital. J Med Microbiol 1998; 47: 209-10.
11. Bradford PA. Extended-spectrum ß-lactamases in the 21st century: characterisation, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14 (4): 933-51.
12. Yagi T, Kruokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. A preliminary survey of extended-spectrum ß - lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. FEMS Microbiol Lett 2000; 184: 53-6.
13. European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report 2005, On-going surveillance of *S.pneumonuae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, EARSS, Bilthoven, The Netherlands, October 2006.
14. Shah AA, Hasan F, Ahmad S, Hameed A. Characteristic epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β-lactamases. Research in Microbiology 2004; 155: 409-21.
15. Philipon A, Arlet G, Jacoby AG. Plasmid-determined AmpC-Type ß-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(1): 1-11.
16. Bell JM, Chitsaz M, Turnidge JD, Barton M, Walters LJ, Jones RN. Prevalence and significance of a negative extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) confirmation test result after a positive ESBL screening test result for isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: results from the SENTRY Asia-Pacific Surveillance Program. J Clin Microbiol 2007; 45(5): 1478-82.

۱۷. شاهچراغي فرشته، نصيري سياوش، نويري جهان هانيه. شناسايي سويه هاي مولد ESBLs و تعيين MIC سفتازيديم در اشريشياكلي هاي جدا شده از نمونه هاي كلينيكي در بيمارستانهاي تهران. اولين كنگره ميكروب شناسي باليني ايران. ۱۳۸۶، صفحه ۱۱۵.

18. Mobaiyen H, Nahaei MR, Amirmizafari N, Moaddab SR, Hoseni F. First report of CTX-M type β-lactamases-production in clinical *Escherichia coli* isolates from intensive care units in Tabriz. 1St Iranian Congress of Clinical Microbiology. Shiraz 2007; P: 66.

19. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, 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: 2206-12.