

مقاله پژوهشی

بررسی فنوتیپی و مولکولی بتالاکتامازهای وسیع الطیف PER در ایزوولهای ادراری انتروباکتریاسه در مشهد

سحر نادری فر^۱، محبوبه نخعی مقدم^{۲*}

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروب شناسی، قم، ایران

^۲ استادیار میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست شناسی، مشهد، ایران

نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست شناسی، مشهد

پست الکترونیک: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

وصول: ۱۳۹۰/۸/۴ اصلاح: ۱۳۹۰/۱۱/۹ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط باکتری‌ها به ویژه نوع *Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL)* یکی از مشکلات بهداشتی و درمانی در سطح دنیاست. شیوع این آنزیم‌ها در نواحی جغرافیایی مختلف و با زمان تغییر می‌کند. هدف از انجام این تحقیق، تعیین شیوع باکتری‌های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در میان ایزوولهای ادراری انتروباکتریاسه و ردیابی ژن *bla_{PER}* در دو بیمارستان منتخب مشهد بوده است.

مواد و روش کار: در این مطالعه‌ی توصیفی، تعداد ۱۰۰ ایزووله انتروباکتریاسه از نمونه‌های ادراری بیماران بستری و سرپاپی بیمارستان‌های قائم و ۱۷ شهریور مشهد از تاریخ ۱۳۸۹/۱۰/۱۵ تا ۱۳۸۹/۱۰/۱۵ جمع‌آوری و با آزمایشات بیوپسیمایانی-افراقی شناسایی شدند. ایزووله‌ها از نظر حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها آزمایش شدند. سپس از نظر تولید *ESBL* به وسیله‌ی آزمایش دیسک دوتایی و آزمایش تأییدی مطابق دستورالعمل *CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute)* مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی مولکولی ژن *bla_{PER}* با استفاده از پرایمر اختصاصی و تکنیک واکنش زنجیره پلیمراز انجام شد.

یافته‌ها: از ۱۰۰ باکتری جدا شده، تعداد ۲۷ ایزووله (۲۷٪) مولد بتالاکتاماز بودند که همگی فاقد ژن *bla_{PER}* روی پلاسمید بودند. مقاومت باکتری‌های مولد بتالاکتاماز نسبت به آمپیسیلین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفالوتین بیشتر از انواع فاقد بتالاکتاماز بود ($P < 0.05$). درصد بیشتری از این باکتری‌ها در مقایسه با انواع فاقد بتالاکتاماز مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتالاکتام جنتامایسین، کوتزیموکسازول و نیتروفورانتسوین بودند که اختلاف برای جنتامایسین و کوتزیموکسازول معنی دار بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که تولید بتالاکتاماز در باکتری‌های جدا شده در جامعه‌ی مورد بررسی شیوع نسبتاً بالایی دارد. ژن *bla_{PER}* در میان باکتری‌های جدا شده یافت نشد، بنابراین تولید بتالاکتاماز در میان این ایزووله‌ها مربوط به سایر انواع بتالاکتاماز است.

واژه‌های کلیدی: انتروباکتریاسه، بتالاکتام، بتالاکتاماز وسیع الطیف تیپ *PER*

همراه نباشد و حتی با ظهور و شیوع ایزووله‌های جدید به دامنه‌ی این بیماری‌ها افزوده شود [۲]. به طوری که با وجود اقداماتی که تاکنون برای تولید مواد ضدمیکروبی وسیع الطیف انجام شده است، کماکان موضوع بروز و شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به خصوص، مقاومت باکتری‌های گرم منفی یکی از موانع اساسی برای درمان قطعی بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود. باکتری‌های

مقدمه به محض توسعه و گسترش داروهای ضد باکتریایی، باکتری‌ها نیز روش‌های مختلف مقاومت را بروز دادند [۱]. با وجود تلاش‌های بسیاری که برای ریشه‌کنی بیماری‌های عفونی صورت گرفته است، اما تغییر رفتار میکروارگانیسم‌ها از جنبه‌های مختلف موجب شده که ریشه‌کنی بسیاری از این عوامل میکروبی با موفقیت کافی

روش کار

جداسازی و شناسایی باکتری ها: در این مطالعه توصیفی مقطعی، باکتری ها از آبان تا دی ماه ۱۳۸۹ در دو بیمارستان دانشگاهی قائم و ۱۷ شهریور مشهد جمع آوری شدند و روش نمونه برداری متوالی بود. در مجموع ۱۰۰ باکتری از انواع خانواده انترباکتریاسه از نمونه های ادراری که با نظر پزشک به آزمایشگاه ارجاع داده شده بودند، جدا شد. نمونه ها مربوط به بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان ها و بیماران سرپایی مراجعه کننده به آزمایشگاه ها در مدت زمان انجام تحقیق بودند. باکتری هایی به عنوان عامل عفونت ادراری در نظر گرفته شدند که به تعداد 10^4 یا 10^5 باکتری در هر میلی لیتر ادرار جدا شدند. انواع انترباکتریاسه با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی (آزمایش های اکسیداز، اندول، متیل رد، و گس پروسکایر، سیترات، تولید گاز، تولید سولفید هیدروژن، تخمیر قند، لیزین دکربوکسیلاز و اوره) شناسایی شدند. جنس و گونه باکتری ها با استفاده از کیت میکروژن (Microgen GNA-ID System - کشور انگلستان) شناسایی و تأیید شد.

سنجه حساسیت آنتی بیوتیکی و شناسایی فنوتیپی تولید بتالاکتماژ: آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی با روش کربای بایر و مطابق با استانداردهای CLSI انجام گرفت [۸]. دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده از شرکت MAST Diagnostics (ساخت کشور انگلستان) تهیه شدند و عبارت بودند از: سفتازیدیم (μg CAZ, 30), سفالوتین (μg CF, 30), آمپی سیلین (μg AP, 10), سفوتاکسیم (μg CTX, 30), آمیکاسین (μg K, 30), نیتروفورانتوئین (μg NI, 30), نالیدیکسیکا سید (NA, μg), کوتريموکسازول (μg IMI, 10), جنتامايسین (μg G, 10), کوتريموکسازول (μg SXT, 25) و ایمی پنم (μg). برای شناسایی ایزوله های مولد بتالاکتماژ از آزمایش هم افزایی دیسک دوتایی (Double disk test) مطابق استانداردهای CLSI استفاده شد [۹]. بعد از گذاشتن پلیت در گرمانه ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، گسترش هاله های مهاری از ناحیه دیسک سفوتاکسیم (μg CTX, 30) به طرف آگمنتین (AUG, μg) به عنوان باکتری مولد ESBL در نظر گرفته

تولیدکننده ای بتالاکتماژهای وسیع الطیف به واسطه هیدرولیز بسیاری از آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتم مانند پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و آزترونام ها مضلات عدیده ای را در درمان عفونت های خطرناک ناشی از این باکتری ها به وجود آورده اند [۳]. ظهور مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتم به سال های اولیه کشف مقاومت نسبت به اولین آنتی بیوتیک (پنی سیلین) بر می گردد و اولین بتالاکتماز در باکتری اشريشیا کلی مشاهده شد [۲]. ظهور مقاومت باکتری ها اغلب مربوط به پلاسمید سویه های تولید کننده پنی سیلیناز است که به سرعت در بین ایزوله های کلینیکی انتشار می یابد [۴]. پلاسمیدهای^۱ ESBL، اجداد TEM-1، TEM-2 (اولین بار از بیماری به نام تمورینا^۲ جدا شد و TEM نامیده شد) [۵] و SHV-1 (به علت محل فعل مغایر سولفیدریل^۳ به این نام خوانده شده است) [۵] هستند که هم اکنون با ایجاد جهش های نقطه ای در این ژن ها انواع زیادی از آن ها حاصل شده اند [۶]. با توجه به مقاومت روزافرون باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها که به نظر می رسد در هر منطقه الگوی خاص خود را دارد، لزوم بررسی های جدید در رابطه با مقاومت های آنتی بیوتیکی مشهود است. شناسایی الگوی مقاومت بتالاکتمی انترباکتریاسه و نیز شیوع ایزوله های مولد بتالاکتماز وسیع الطیف از نظر درمان عفونت با داروی مناسب، اهمیت دارد و می تواند از شکست درمان جلوگیری نماید.

بتالاکتماژهای نوع^۴ PER اولین بار از سودوموناس ائروجینوزا گزارش شدند و در تعداد کمی از جوامع از انترباکتریاسه گزارش شده اند [۷]. از آن جایی که مطالعه ای مبنی بر بررسی وجود بتالاکتماز نوع PER در میان انترباکتریاسه های شهر مشهد نیافتیم، هدف این تحقیق تعیین شیوع انترباکتریاسه های ادراری مولد ESBL در دو بیمارستان منتخب شهر مشهد، ردیابی ژن پلاسمیدی bla_{PER} در میان آن ها و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها بوده است.

1- Extended Spectrum β -Lactamase

2- Temoniera

3- Sulphydryl variable active site

4 - Pseudomonas extended resistance

(رضایت آگاهانه، رازداری و غیره) مربوط به تحقیقات بر روی نمونه‌های بالینی بیماران مدنظر قرار گرفت.

یافته‌ها

از ۱۰۰ نمونه ادراری جمع‌آوری شده، ۵۷ نمونه مربوط به بیماران سرپاچی و ۴۳ نمونه مربوط به بیماران بستری در بیمارستان بودند. گونه‌های باکتریایی شناسایی شده در میان ایزوله‌های انتروباکتریاسه عبارت بودند از: اشريشيا کلی (۶۵٪)، کلبسیلا پنومونیه (۱۹٪)، یرسینیا spp (۷٪)، انتروباکتر کلواکه^۱ (۵٪)، پروتئوس میرابیلیس (۲٪)، سیتروباکتر دایورسوس^۲ (۱٪)، سالمونولا گالیناروم^۳ (۱٪).

بین باکتری‌های جدasherde در مجموع ۲۷ ایزوله (۲۷٪) تولید کننده‌ی بتالاکتمامز و ۷۳ ایزوله (۷۳٪) فاقد بتالاکتمامز بودند که از ۲۷ ایزوله مولد بتالاکتمامز، ۱۲ ایزوله از بیماران بستری و ۱۵ ایزوله از بیماران سرپاچی جدا شدند. بدین ترتیب شیوع باکتری‌های مولد بتالاکتمامز در بین باکتری‌های جدا شده از بیماران بستری و سرپاچی به ترتیب ۲۷/۹٪ و ۲۶/۳٪ بود. به دنبال انجام واکنش زنجیره پلیمراز هیچکدام از ایزوله‌های انتروباکتریاسه ژن bla_{PER} را در پلاسمید نداشتند.

جدول ۲، ایزوله‌های ESBL مثبت و منفی را به تفکیک گونه‌ی باکتریایی نشان می‌دهد. همان طور که در جدول مشخص است، درصد بیشتری از باکتری‌های کلبسیلای

شد [۹]. سپس آزمایش تأییدی تولید بتالاکتمامز با استفاده از دیسک سفتازیدیم (30 µg) و دیسک حاوی سفتازیدیم و کلاوولانیک اسید (30/10 µg) بر روی محیط مولر هینتون آگار مطابق استانداردهای CLSI انجام شد. بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت اگر قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک حاوی کلاوولانات و سفتازیدیم حداقل ۵ میلی‌متر بیشتر از دیسک حاوی سفتازیدیم به تنها‌ی بود، آزمایش مثبت در نظر گرفته شد [۹,۱۰].

بررسی وجود ژن پلاسمیدی bla_{PER}: بعد از کشت باکتری‌ها در محیط لوریابرترانی (Biomark هندوستان) حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپیسیلین، DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت mini Kit-5 Prime (آمریکا) استخراج شد. برای تکثیر ژن bla_{PER} از پرایمر سفارش داده شده در شرکت متабیون آلمان و ترموسایکلر Kyratec (ساخت کشور کره) مطابق با شرایط نشان داده شده در جدول ۱ استفاده شد [۱۱]. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۲ درصد در کنار مارکر استاندارد با باندهای ۱۰۰ جفت بازی الکتروفورز و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. باندهای DNA با استفاده از اشعه ماورای بنسخ دستگاه ترانس لومیناتور مورد ارزیابی قرار گرفت. از سودوموناس دارای ژن bla_{PER} که از انتستیتو پاستور تهران دریافت شد، به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

جدول ۱: پرایمرها و شرایط مورد استفاده برای ردیابی ژن bla_{PER}

پرایمر	اندازه قطعه (bp)	واسرخت	اتصال	طول شدن	تعداد چرخه‌ها
PER-F PER-R	۹۲۴	AATTGGGCTTAGGGCAGAA ATGAATGTCATTATAAAAGC	۳۰ ثانیه در ۹۴°C	۳۰ ثانیه در ۴۸°C	۳۰ ثانیه در ۷۲°C

جدا شده در مقایسه با اشريشيا کلی دارای بتالاکتمامز وسیع الطیف هستند. تمامی گونه‌های یرسینیا و پروتئوس دارای بتالاکتمامز بودند، اما برای تعیین واقعی شیوع

1- *Enterobacter cloacae*

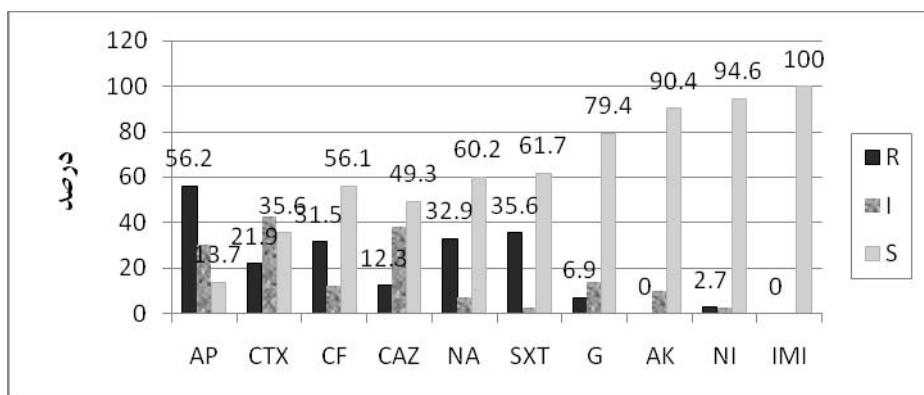
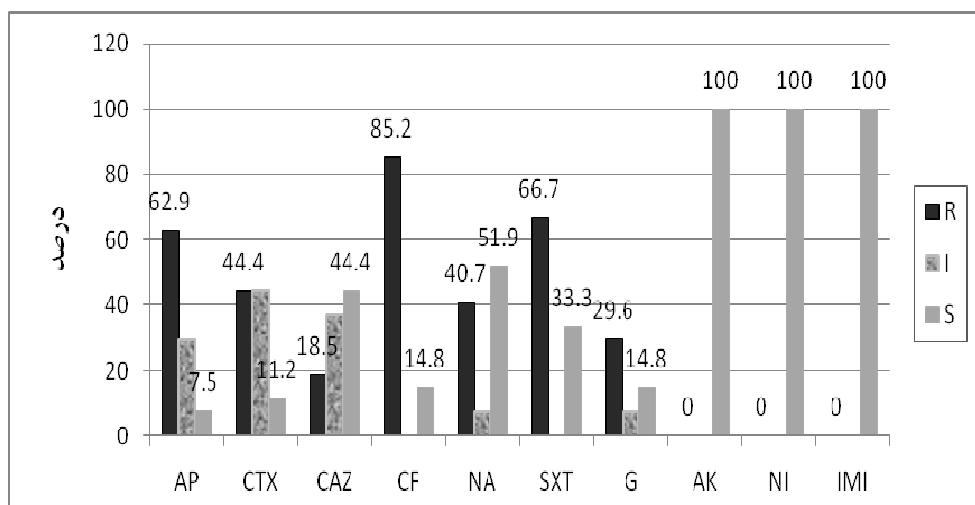
2- *Citrobacter diversus*

3- *Salmonella gallinarum*

نهایتاً تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS16 انجام شد و برای آنالیز آماری الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها بین ایزوله‌های ESBL⁺ و ESBL⁻ از آزمون کای دو استفاده شد. نتایج با $p < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین ملاحظات اخلاقی

جدول ۲: ایزولههای ادراری انتروباکتریاسه⁺ و ESBL⁻ بر اساس گونه باکتریایی

تعداد (درصد) باکتری های ESBL ⁺ بین باکتری های همان گونه	گونه باکتریایی
ESBL ⁻ (۹۰/۵) ۵۷	اشریشیا کلی
(۵۲/۶) ۱۰	کلبسیلا پنومونیه
-	برسینیا spp
-	پروتئوس میرابیلیس
-	سالمونلا گالیناروم
(۱۰۰) ۵	انتروباکتر کلوآکه
(۱۰۰) ۱	سیتروباکتر دایورسوس

نمودار ۱: توزیع فراوانی حساسیت و مقاومت آنتیبیوتیکی باکتری های ESBL⁺ (n=27)نمودار ۲: توزیع فراوانی حساسیت و مقاومت آنتیبیوتیکی باکتری های ESBL⁻ (n=73)

بودند [۱۳]. در این تحقیق مشابه تحقیق حاضر شیوع باکتری های مولد ESBL بین ایزوله های کلبسیلا پنومونیه بیشتر از اشريشیا کلی بود. در تحقیق دیگری از مجموع ۲۵۰ ایزوله ادراری در یک بیمارستان در دهلي (شامل ۱۸۸ اشريشیا کلی و ۶۲ باکتری کلبسیلا پنومونیه) تولید بتالاكتاماز وسیع الطیف به میزان ۵۶٪ در بین باکتری های اشريشیا کلی و ۵۲٪ در بین باکتری های کلبسیلا پنومونیه گزارش شده است [۱۴]. شیوع ESBL در باکتری های خانواده انتروباکتریاسه در فرانسه کمتر از ۱٪ گزارش شده است [۱۵]. درصد تولید ESBL در کلبسیلا پنومونیه در برخی کشورهای آسیایی از جمله کره ۴/۸٪، تایوان ۸/۵٪ و هنگ کنگ ۱۲٪ گزارش شده است [۱۶]. در ژاپن درصد مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاكتام در اثر تولید بتالاكتاماز بسیار پائین و در بررسی انجام شده در ۱۹۶ مرکز درمانی واقع در این کشور مشخص گردید که کمتر از ۰/۱٪ باکتری های کلبسیلا پنومونیه آنژیم بتالاكتاماز تولید می کنند [۱۷]. در اروپا شیوع تولید بتالاكتاماز های وسیع الطیف در میان ایزوله های انتروباکتریاسه از کشوری به کشوری دیگر فرق می کند [۱۸، ۱۹]. در یک گزارش [۱۹] از ۱۷ کشور مختلف در سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۲، تولید بتالاكتاماز بین ایزوله های اشريشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و گونه های انتروباکتر به ترتیب ۵/۴، ۱۸/۲ و ۸/۸ درصد و میزان تولید این آنژیم در میان انواع انتروباکتریاسه ۱۰/۵٪ و بیشترین شیوع در مصر ۳۸/۵٪ و یونان ۲۷/۴٪ و کمترین شیوع در هلند ۰/۲٪ و آلمان ۰/۲٪ ذکر شده است [۱۹]. همانطوری که مشخص است، تولید بتالاكتاماز در بسیاری از کشورهای توسعه یافته کمتر از جامعه مورد مطالعه است. در مطالعه حاضر، مقاومت به سفالوتین، سفوتاکسیم و سفتازیدیم در میان کل ایزوله های انتروباکتریاسه به ترتیب ۴۶، ۲۸ و ۱۴ درصد و در میان سویه های مولد بتالاكتاماز ۴۴/۴، ۸۵/۲ و ۱۸/۵ درصد به دست آمد. بدین ترتیب مقاومت به سفالوتین بیشتر از بقیه آنتی بیوتیک های بتالاكتام بود. تمامی ایزوله ها در تحقیق حاضر حساس به ایمی پنم بودند. کیفر و همکاران در سال ۲۰۰۵

بتالاكتاماز بین این باکتری ها نیاز به جداسازی تعداد بیشتری از آن هاست. بر اساس نتایج به دست آمده باکتری های مولد بتالاكتاماز به طور معنی داری مقاومت بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاكتام نشان دادند ($p < 0.05$). در میان آنتی بیوتیک های بتالاكتام مورد آزمایش بیشترین مقاومت نسبت به سفالوتین (۰/۸۵٪) و کمترین مقاومت نسبت به سفتازیدیم (۰/۱۸٪) بود.

نمودار ۱ و ۲ نتایج آزمایشات حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های ESBL⁺ و ESBL⁻ را نشان می دهد. مقاومت آنتی بیوتیک های غیر بتالاكتام در میان باکتری های مولد بتالاكتاماز وسیع الطیف از صفر (ایمی پن، نیتروفورانتوین و آمیکاسین) تا ۴۴ درصد (کوتريموكسازول) بود. لازم به ذکر است که تمامی باکتری های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک ایمی پن حساس بود.

در بین آنتی بیوتیک های غیر بتالاكتام مورد آزمایش، درصد بیشتری از باکتری های مولد بتالاكتاماز مقاوم به کوتريموكسازول، نالیدیکسیک اسید و جنتامیسین بودند که اختلاف برای کوتريموكسازول و جنتامیسین معنی دار بود ($p < 0.05$).

بحث

در این مطالعه از ۱۰۰ نمونه ای ادرار مورد بررسی ۲۷ ایزوله انتروباکتریاسه مولد ESBL جدا شد و ۵/۹٪ از باکتری های اشريشیا کلی و ۴۷/۴٪ از کلبسیلا پنومونیه های جدا شده دارای آنژیم بتالاكتاماز بودند. شیوع باکتری های مولد بتالاكتاماز بین باکتری های کلبسیلای جدا شده بیشتر از اشريشیا کلی بود. در گزارش منتشر شده در سال ۱۳۸۹ توسط فیض آبادی و همکاران ۷/۶۹٪ جدایه های کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان لبافی نژاد تهران دارای ESBL بودند که در سال ۱۷/۶۱٪ آن ها مقاومت نسبت به سفتازیدیم را نشان دادند [۱۲]. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۵، داتری^۱ و همکاران در هند انجام دادند، از میان ۱۸۷ ایزوله اشريشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی، ۵۳٪ (۱/۲۹٪) ایزوله مولد بتالاكتاماز وسیع الطیف

در اغلب مطالعات به ویژه کشورهای توسعه یافته، درصد شیوع ESBL و نیز درصد مقاومت به این آنتیبیوتیک‌ها کمتر از ایران است و مقایسه‌ی آمار بدست آمده با کشورهای مختلف لزوم توجه و نظرارت بر عدم گسترش مقاومت دارویی در جامعه مورد نظر را خاطر نشان می‌سازد. غربالگری باکتری‌های مولد ESBL و درمان مناسب بیماران با داروهایی مثل ایمپنم می‌تواند از اهمیت بسیار زیادی برخوردار باشد و آزمایش معمول حساسیت آنتیبیوتیکی در بیمارستان‌ها روش مناسبی برای تشخیص این نوع مقاومت نیست.

از مهم‌ترین محدودیت‌های تحقیق محدودیت زمانی در انجام تحقیق و نیز مراجعته بعضی از افراد برای معاینه عمومی و تعیین سلامتی به آزمایشگاه بیمارستان‌ها بود که به عنوان بیمار سرپایی پذیرش می‌شدند.

نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان دهنده‌ی بالا بودن شیوع باکتری‌های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در بین بیماران جامعه‌ی مورد بررسی بود که درصد شیوع آن در بین بیماران بستری نسبت به بیماران سرپایی کمی بیشتر بود. هیچکدام از باکتری‌های جدا شده ژن *bla_{PER}* را نداشتند و تولید بتالاکتاماز می‌تواند مربوط به سایر تیپ‌های بتالاکتاماز باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای مهرداد هاشمی، دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی که در انجام آنتیبیوگرام و آزمایشات مولکولی همکاری نمودند، صمیمانه قدردانی می‌شود.

در برزیل شیوع ESBL و مقاومت به سفووتاکسیم و سفتازیدیم را در میان کلبسیلا پنومونیه و اشريشیا کلی به ترتیب $14/6\%$ و $51/9\%$ گزارش کردند که تمامی باکتری‌های اشريشیا کلی و $99/2\%$ ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه ($80/8\%$ بینابینی) حساس به ایمی‌پنم بودند [۲۰]. در ویتنام در سال ۲۰۰۱ میلادی، در بین $130/9$ ایزوله بیمارستانی اشريشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس میرابیلیس، مقاومت به سفووتاکسیم، سفوپرازون و سفتازیدیم به ترتیب $30/3\%$ ، $15/9\%$ و $26/2\%$ گزارش شده است و $5/6\%$ ایزوله‌ها مقاوم به ایمی‌پنم بودند [۲۱].

طبق نتایج بدست آمده شیوع باکتری‌های مولد بتالاکتاماز در بین باکتری‌های جدا شده از بیماران بستری و سرپایی به ترتیب $27/9\%$ و $26/3\%$ بود. شیوع بین افراد بستری کمی بیشتر از افراد سرپایی بود، ولی اختلاف چندان بارز نبود. میزان شیوع باکتری‌های مولد ESBL بسته به ناحیه (حتی از بیمارستانی به بیمارستان دیگر) و زمان ممکن است متفاوت باشد [۵]. بخصوص هنگام وقوع همه گیری، شیوع در بین بیماران بستری در بیمارستان می‌تواند بطور ناگهانی افزایش یابد و از بیماران سرپایی به میزان قابل توجهی بیشتر باشد که شاید در زمان انجام تحقیق در مراکز مورد بررسی چنین رخدادی را نداشته ایم.

در تحقیق حاضر هیچ یک از ایزوله‌های مولد بتالاکتاماز طیف وسیع حامل ژن *bla_{PER}* در پلاسمید نبودند. در یک تحقیق در آرژانتین (سال ۲۰۰۳ میلادی) از 39 باکتری مولد ESBL، 9 ایزوله ($23/0.8\%$) حامل ژن *bla_{PER-2}* بودند که این ژن در باکتری‌های انتروباکتر کلوآکه، انتروباکتر اثروژنر و کلبسیلا پنومونیه یافت شد [۲۲]. شیوع ژن *bla_{PER}* در تحقیق شاهچراغی و همکاران (در سال ۲۰۱۰) در باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه در تهران $7/5\%$ گزارش شده است [۲۳]. هیچکدام از باکتری‌های اشريشیا کلی جدا شده از شش بیمارستان تهران در سال 1385 ژن *bla_{PER}* را نداشتند [۲۴] و در این تحقیق $48/0.8\%$ ایزوله‌های اشريشیا کلی بتالاکتاماز طیف وسیع تولید می‌کردند که $59/2\%$ به سفتازیدیم، $65/6\%$ به سفووتاکسیم و $40/74\%$ به جنتاماکسین مقاوم بودند [۲۴].

References

1. Tenover FC, Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, Am J Med 2006; 119: S3–S10.
2. Davies J, Davies D, Origins and evolution of antibiotic resistance, Microbiol Mol Biol Rev 2010; 74: 417-33.
3. Yagi T, Wachino JI, Kurokawa H, “et al”, Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -Lactamase-Producing *K. pneumoniae* and *E. Coli*, J Clin Microbiol 2005; 43: 2551-58.
4. Betina, V, The chemistry and biology of antibiotics, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1983: 98-112.
5. Bradford PA, Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat, Clin Microbiol Rev 2001; 14: 933-51.
6. Paterson DL, Ko WC, Gottberg VA, “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.
7. Shahcheraghi F, Nikbin V, Shuraj F, Molecular detection of PER, TEM, SHV and VEB in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from specimens wounds in two hospitals from Tehran by PCR (in Persian), Iranian J Basic Med Sci 2007; 1: 21-7[Persian]
8. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI document M100-S20.
9. Umadevi S, Kandhakumari G, Joseph NM, ” et al”, Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of ESBL producing gram negative bacilli, J Clin Diagn Res 2011; 5: 236-9.
10. Jorgensen JH, McElmeel ML, Fulcher LC, Zimmer BL, Detection of CTX-M-Type extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs) by testing with MicroScan overnight and ESBL confirmation panels, J Clin Microbiol 2010; 48: 120-3.
11. Shahcheraghi F, Nasiri S, Noveiri H, The survey of genes encoding beta-lactamases, in *E. coli* resistant to beta-lactam antibiotics, Iranian J Basic Med Sci 2010; 13: 230-7[Persian]
12. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, “et al”, Distribution of *bla*(TEM), *bla*(SHV), *bla*(CTX-M) genes among clinical isolates of *K. pneumoniae* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran, Microb Drug Resist 2010; 16: 49-53[Persian]
13. Duttaroy B, Mehta S, Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in clinical isolates of *K. pneumoniae* and *E. coli*, Indian J Pathol Microbiol 2005; 48: 45-8.
14. Malhotra VL, Khandpur N, Dass A, Mehta G, Prevalence of extended spectrum beta-lactamases producing clinical isolates from patients of urinary tract infection in a tertiary care hospital in Dehli, J Commun Dis 2008; 40: 269-72.
15. Coque TM, Baquero F, Caton R, Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe, Eurosurveillance 2008; 13: 47.
16. 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.
17. Yagi T, Krukawa H, Shibata N, Shibayama K, Arkawa Y, A preliminary survey of extended spectrum beta-lactamases in clinical isolated of *K. pneumoniae* and *E. coli* in Japan, FEMS Microbiol 2000; 184: 53-6.
18. AL-Jasser AM, Extended spectrum beta-lactamases (ESBLs): a global problem, Kuwait Med J 2006; 38: 171-85.
19. Bouchillon SK, Johnson BM, Hoban DJ, “et al”, Determining incidence of extended spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 Centres from 17 countries: the PEARLS study 2001 -2002, INT J antimicrob Agents 2004; 24:119-24.
20. Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, “et al”, Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003, Braz J Infect Dis 2005; 9: 216-24.
21. Cao V, Lambert T, Nhu DQ, ” et al”, Distribution of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam, Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3739-43.
22. Quinteros M, Radice M, Gardella N, “et al”, Microbiology study group extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals, Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2864-7.
23. Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin V, Nematzadeh S, PER, CTX-M, TEM and SHV beta-lactamases in clinical isolates of *K. pneumoniae* isolated from Tehran, Iran, Iranian J Basic Med Sci 2010; 13: 111-18[Persian]

Original Article

Phenotypic and molecular detection of PER extended spectrum β -lactamases in urinary Enterobacteriaceae isolates in Mashhad

Naderifar S¹, Nakhaei Moghaddam M^{*}

¹M.Sc of Microbiology, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

²Assistant Professor of Microbiology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

***Corresponding Author:**
Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
E. mail:m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

Abstract

Background & Objectives: Production of β -lactamases especially extended spectrum β -lactamases (ESBLs) by bacteria is one of the emerging health problems in the world. The prevalence of these enzymes varies greatly within different geographical areas and is changing over time. The purpose of this study was to determine the prevalence of ESBL producing bacteria among the urinary Enterobacteriaceae isolates and detection of *bla_{PER}* gene from two selected hospitals in Mashhad.

Material & Methods: In this cross-sectional study, 100 Enterobacteriaceae isolates were collected from urine samples of inpatient and outpatient referred to 17-Shahrivar and Qaem hospitals from November 2010 to January 2011. Bacteria were identified by differential biochemical tests. Isolated bacteria were evaluated for antibiotic susceptibility. Double-disk approximation and phenotypic confirmation tests of ESBL production were performed according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) guidelines. Molecular detection of *bla_{PER}* gene was carried out by polymerase chain reaction using specific primers.

Results: Out of 100 bacterial isolates, 27 (27%) were ESBL producers without plasmid mediated *bla_{PER}* gene. Resistance to ampicillin, cefotaxime, ceftazidime and cephalothin among ESBL producing isolates was higher than non-producers ($p < 0.05$). ESBL producers in comparison with non-producers were resistant to gentamicin, co-trimoxazole, and nitrofurantoin and there was significant difference for resistance to gentamicin and co-trimoxazole ($p < 0.05$).

Conclusion: Results shows that ESBL production among Enterobacteriaceae isolates in the studied community is relatively high; *bla_{PER}* gene was not found among isolated strain; therefore, production of β -lactamase is related to other types of ESBLs among isolated Enterobacteriaceae.

Key words: Enterobacteriaceae, β -lactam, Extended spectrum β -lactamase type PER

Submitted: 2011 Oct 26

Revised: 2012 Jan 29

Accepted: 2012 Apr 5