مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
بهار ۱۳۹۱؛۴(۱): ۹۳-۸۷

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Spring 2012;4(1):87-93

مقاله پژوهشی

بررسی فنوتیپی و مولکولی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف PER در ایزوله‌های 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 به‌ویژه 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 ایزوله‌های ادراری انتروباکتریاسه و ردیابی ژن bla_{PER} در دو بیمارستان منتخب مشهد بوده است.*

مواد و روش کار: *در این مطالعه‌ی توصیفی مقطعی، تعداد ۱۰۰ ایزوله انتروباکتریاسه از نمونه‌های ادراری بیماران بستری و سرپایی بیمارستان‌های قائم و ۱۷ شهریور مشهد از تاریخ ۱۳۸۹/۸/۱۵ تا ۱۳۸۹/۱۰/۱۵ جمع‌آوری و با آزمایشات بیوشیمیائی- افتراقی شناسایی شدند. ایزوله‌ها از نظر حساسیت به آنتی‌بیوتیک ها 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.*

یافته ها: *از ۱۰۰ باکتری جدا شده، تعداد ۲۷ ایزوله (۲۷٪) مولد بتالاکتاماز بودند که همگی فاقد ژن bla_{PER} روی پلاسمید بودند. مقاومت باکتری‌های مولد بتالاکتاماز نسبت به آمپی سیلین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفالوتین بیشتر از انواع فاقد بتالاکتاماز بود ($p < ۰/۰۵$). درصد بیشتری از این باکتری ها در مقایسه با انواع فاقد بتالاکتاماز مقاوم به آنتی بیوتیک های غیر بتالاکتام جنتامایسین، کوتریموکسازول و نیتروفورانتوئین بودند که اختلاف برای جنتامایسین و کوتریموکسازول معنی دار بود ($p < ۰/۰۵$).*

نتیجه‌گیری: *نتایج نشان می دهد که تولید بتالاکتاماز در باکتری‌های جدا شده در جامعه‌ی مورد بررسی شیوع نسبتا" بالایی دارد. ژن bla_{PER} در میان باکتری های جدا شده یافت نشد، بنابراین تولید بتالاکتاماز در میان این ایزوله ها مربوط به سایر انواع بتالاکتاماز است.*

واژه های کلیدی: *انتروباکتریاسه، بتالاکتام، بتالاکتاماز وسیع الطیف تیپ PER*

مقدمه

به محض توسعه و گسترش داروهای ضد باکتریایی، باکتری ها نیز روش های 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 ریشه کنی بسیاری از این عوامل میکروبی با موفقیت کافی همراه نباشد و حتی با ظهور و شیوع ایزوله‌های جدید به دامنه‌ی این بیماری‌ها افزوده شود [۲]. به طوری که با وجود اقداماتی که تاکنون برای تولید مواد ضدمیکروبی وسیع‌الطیف انجام شده است، کماکان موضوع بروز و شیوع مقاومت‌های آنتی بیوتیکی به خصوص، مقاومت باکتری‌های گرم منفی یکی از موانع اساسی برای درمان قطعی بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود. باکتری‌های

تولیدکننده ی بتالاکتامازهای وسیع الطیف به واسطه‌ی هیدرولیز بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مانند پنی‌سیلین ها، سفالوسپورین‌ها و آزترونام‌ها معضلات عدیده‌ای را در درمان عفونت‌های خطرناک ناشی از این باکتری‌ها به وجود آورده‌اند [۳]. ظهور مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به سال‌های اولیه‌ی کشف مقاومت نسبت به اولین آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین) بر می‌گردد و اولین بتالاکتاماز در باکتری اشریشیا کلی مشاهده شد [۲]. ظهور مقاومت باکتری‌ها اغلب مربوط به پلاسمید سویه های تولید کننده‌ی پنی‌سیلیناز است که به سرعت در بین ایزوله‌های کلینیکی انتشار می‌یابد [۴]. پلاسمیدهای ESBL[1]، اجداد TEM-1، TEM-2 (اولین بار از بیماری به نام تمورینا[2] جدا شد و TEM نامیده شد) [۵] و SHV-1 (به علت محل فعال متغیر سولفیدریل[3] به این نام خوانده شده است) [۵] هستند که هم‌اکنون با ایجاد جهش های نقطه‌ای در این ژن ها انواع زیادی از آن ها حاصل شده اند [۶]. با توجه به مقاومت روزافزون باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها که به نظر می‌رسد در هر منطقه الگوی خاص خود را دارد، لزوم بررسی‌های جدید در رابطه با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مشهود است. شناسایی الگوی مقاومت بتالاکتامی انتروباکتریاسه و نیز شیوع ایزوله‌های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف از نظر درمان عفونت با داروی مناسب، اهمیت دارد و می‌تواند از شکست درمان جلوگیری نماید.

بتالاکتامازهای نوع PER[4] اولین بار از سودوموناس ائروجینوزا گزارش شدند و در تعداد کمی از جوامع از انتروباکتریاسه گزارش شده‌اند [۷]. از آن جایی که مطالعه ای مبنی بر بررسی وجود بتالاکتاماز نوع PER در میان انتروباکتریاسه های شهر مشهد نیافتیم، هدف این تحقیق تعیین شیوع انتروباکتریاسه‌های ادراری مولد ESBL در دو بیمارستان منتخب شهر مشهد، ردیابی ژن پلاسمدی bla_{PER} در میان آن ها و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها بوده است.

روش کار

جداسازی و شناسایی باکتری ها: در این مطالعه توصیفی مقطعی، باکتری‌ها از آبان تا دی ماه ۱۳۸۹ در دو بیمارستان دانشگاهی قائم و ۱۷ شهریور مشهد جمع‌آوری شدند و روش نمونه برداری متوالی بود. در مجموع ۱۰۰ باکتری از انواع خانواده انتروباکتریاسه از نمونه‌های 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 میلی‌لیتر ادرار جدا شدند. انواع انتروباکتریاسه با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی (آزمایش‌های اکسیداز، اندول، متیل‌رد، وگس 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.

سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی و شناسایی فنوتیپی تولید بتالاکتاماز: آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش کربای باير و مطابق با استانداردهای CLSI انجام گرفت [۸]. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده از شرکت MAST Diagnostics (ساخت کشور انگلستان) تهیه شدند و عبارت بودند از: سفتازیدیم (CAZ, 30 µg)، سفالوتین (CF, 30 µg)، آمپی‌سیلین (AP, 10 µg)، سفوتاکسیم (CTX, 30 µg)، آمیکاسین (K, 30 µg، نیتروفورانتوئین (NI, 30 µg)، نالیدیکسیک‌اسید (NA, 30 µg)، جنتامایسین (G, 10 µg)، کوتریموکسازول (SXT, 25µg) و ایمی‌پنم (IMI, 10 µg). برای شناسایی ایزوله های مولد بتالاکتاماز از آزمایش هم افزایی دیسک دوتایی (Double disk test) مطابق استانداردهای CLSI استفاده شد [۹]. بعد از گذاشتن پلیت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، گسترش هاله‌ی مهاری از ناحیه‌ی دیسک سفوتاکسیم (CTX, 30 µg) به طرف آگمنتین (AUG, 20/10 µg) به عنوان باکتری مولد ESBL در نظر گرفته

1- Extended Spectrum β -Lactamase
2- Temoniera
3- Sulfhydryl variable active site
4 - *Pseudomonas* extended resistance

شد [۹]. سپس آزمایش تأییدی تولید بتالاکتاماز 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 تنهایی بود، آزمایش مثبت در نظر گرفته شد [۹،۱۰].

بررسی وجود ژن پلاسمیدی bla_{PER}: بعد از کشت باکتری ها در محیط لوریابرتانی (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 متابیون آلمان و ترموسایکلر Kyratec (ساخت کشور کره) مطابق با شرایط نشان داده شده در جدول۱ 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 بنفش دستگاه ترانس لومیناتور مورد ارزیابی قرار گرفت. از سودوموناس دارای ژن bla_{PER} که از انستیتو پاستور تهران دریافت شد، به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

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 $p<۰/۰۵$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین ملاحظات اخلاقی (رضایت آگاهانه، رازداری و غیره) مربوط به تحقیقات بر روی نمونه‌های بالینی بیماران مد نظر قرار گرفت.

یافته ها

از ۱۰۰ نمونه ادراری جمع‌آوری شده، ۵۷ نمونه مربوط به بیماران سرپایی و ۴۳ نمونه مربوط به بیماران بستری در بیمارستان بودند. گونه‌های باکتریایی شناسایی شده در میان ایزوله‌های انتروباکتریاسه عبارت بودند از: اشریشیا کلی (۶۵٪)۶۵، کلبسیلا پنومونیه (۱۹٪)۱۹، پرسینیا spp (۷٪)۷، انتروباکتر کلوآکه[1] (۵٪)۵، پروتئوس میرابیلیس (۲٪)۲، سیتروباکتر دایورسوس[2] (۱٪)۱، سالمونلا گالیناروم[3] (۱٪)۱.

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

جدول۲، ایزوله‌های ESBL مثبت و منفی را به تفکیک گونه‌ی باکتریایی نشان می‌دهد. همان طور که در جدول مشخص است، درصد بیشتری از باکتری‌های کلبسیلای جدا شده در مقایسه با اشریشیا کلی دارای بتالاکتاماز وسیع الطیف هستند. تمامی گونه های پرسینیا و پروتئوس دارای بتالاکتاماز بودند، اما برای تعیین واقعی شیوع

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

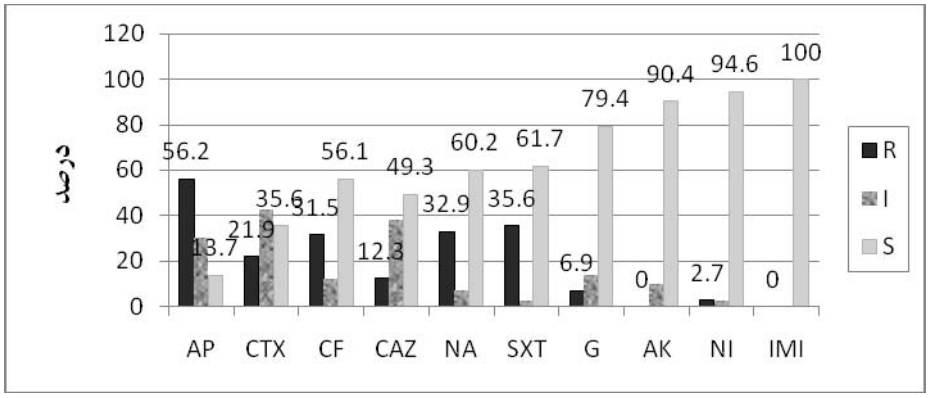
پرایمر	۳′- توالی- ۵′	اندازه قطعه (bp)	واسرشت	اتصال	طویل شدن	تعداد چرخه ها
PER-F	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA	۹۲۴	۳۰ ثانیه در ۹۴°C	۳۰ ثانیه در ۴۸°C	۶۰ ثانیه در ۷۲°C	۳۰
PER-R	ATGAATGTCATTATAAAAGC					

1- *Enterobacter cloacae*
2- *Citrobacter diversus*
3- *Salmonella gallinarum*

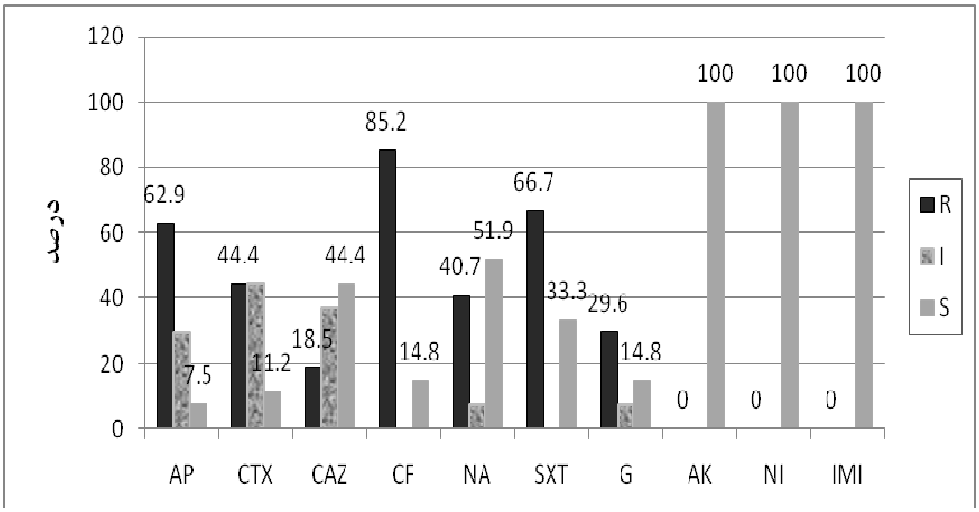
جدول۲: ایزوله‌های ادراری انتروباکتریاسه $ESBL^+$ و $ESBL^-$ بر اساس گونه باکتریایی

گونه باکتریایی	تعداد (درصد) باکتری های $ESBL^+$ بین باکتری های همان گونه	
	$ESBL^+$	$ESBL^-$
اشریشیا کلی	۸ (۱۲/۳)	۵۷ (۹۰/۵)
کلبسیلا پنومونیه	۹ (۴۷/۴)	۱۰ (۵۲/۶)
یرسینیا spp	۷ (۱۰۰)	-
پروتئوس میرابیلیس	۲ (۱۰۰)	-
سالمونلا گالیناروم	۱ (۱۰۰)	-
انتروباکتر کلوآکه	-	۵ (۱۰۰)
سیتروباکتر دایورسوس	-	۱ (۱۰۰)

نمودار۱: توزیع فراوانی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های $ESBL^+$ (n=27)



نمودار ۲: توزیع فراوانی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های $ESBL^-$ (n=73)



بتالاکتاماز بین این باکتری ها نیاز به جداسازی تعداد بیشتری از آن هاست.

بر اساس نتایج به دست آمده باکتری‌های مولد بتالاکتاماز به طور معنی‌داری مقاومت بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام نشان دادند ($p <$ ۰/۰۵). در میان آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مورد آزمایش بیشترین مقاومت نسبت به سفالوتین (۸۵/۲٪) و کمترین مقاومت نسبت به سفتازیدیم (۱۸/۵٪) بود.

نمودار ۱ و ۲ نتایج آزمایشات حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های $ESBL^+$ و $ESBL^-$ را نشان می دهد. مقاومت به آنتی بیوتیک های غیر بتالاکتام در میان باکتری های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف از صفر (ایمی پنم، نیتروفورانتویین و آمیکاسین) تا ۴۴ درصد (کوتریموکسازول) بود. لازم به ذکر است که تمامی باکتری های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک ایمی پنم حساس بود.

در بین آنتی بیوتیک های غیر بتالاکتام مورد آزمایش، درصد بیشتری از باکتری های مولد بتالاکتاماز مقاوم به کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید و جنتامیسین بودند که اختلاف برای کوتریموکسازول و جنتامیسین معنی‌دار بود ($p <$ ۰/۰۵).

بحث

در این مطالعه از ۱۰۰ نمونه‌ی ادرار مورد بررسی ۲۷ ایزوله انتروباکتریاسه مولد ESBL جدا شد و ۹/۵٪ از باکتری های اشریشیا کلی و ۴۷/۴٪ از کلبسیلا پنومونیه های جدا شده دارای آنزیم بتالاکتاماز بودند. شیوع باکتری های مولد بتالاکتاماز بین باکتری‌های کلبسیلای جدا شده بیشتر از اشریشیا کلی بود. در گزارش منتشر شده در سال ۱۳۸۹ توسط فیض آبادی و همکاران ۶۹/۷٪ جدایه های کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان لبافی نژاد تهران دارای ESBL بودند که ۶۱/۷٪ آن ها مقاومت نسبت به سفتازیدیم را نشان دادند [۱۲]. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۵، داتری[1] و همکاران در هند انجام دادند، از میان ۱۸۷ ایزوله‌ی اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه‌ی مورد بررسی، ۵۳ (۲۹/۱٪) ایزوله مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند [۱۳]. در این تحقیق مشابه تحقیق حاضر شیوع باکتری های مولد ESBL بین ایزوله های کلبسیلا پنومونیه بیشتر از اشریشیا کلی بود. در تحقیق دیگری از مجموع ۲۵۰ ایزوله ادراری در یک بیمارستان در دهلی (شامل ۱۸۸ اشریشیا کلی و ۶۲ باکتری کلبسیلا پنومونیه) تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف به میزان ۵۶٪ در بین باکتری های اشریشیا 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 تولیدESBL 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 بیوتیک‌های بتالاکتام بر اثر تولید بتالاکتاماز بسیار پائین و در بررسی انجام شده در ۱۹۶ مرکز درمانی واقع در این کشور مشخص گردید که کمتر از ۰/۱٪ باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه آنزیم بتالاکتاماز تولید می کنند [۱۷]. در اروپا شیوع تولید بتالاکتامازهای 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 بتالاکتاماز بین ایزوله های اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و گونه های انتروباکتر به ترتیب ۵/۴، ۱۸/۲ و ۸/۸ درصد و میزان تولید این آنزیم در میان انواع انتروباکتریاسه ۱۰/۵٪ و بیشترین شیوع در مصر (۳۸/۵٪) و یونان (۲۷/۴٪) و کمترین شیوع در هلند (۲٪) و آلمان (۲/۶٪) ذکر شده است [۱۹]. همانطوری که مشخص است، تولید بتالاکتاماز در بسیاری از کشورهای توسعه یافته کمتر از جامعه مورد مطالعه است. در مطالعه‌ی 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 بتالاکتاماز ۸۵/۲، ۴۴/۴ و ۱۸/۵ درصد به دست آمد. بدین ترتیب مقاومت به سفالوتین بیشتر از بقیه آنتی بیوتیک های بتالاکتام بود. تمامی ایزوله ها در تحقیق حاضر حساس به ایمی پنم بودند. کیفر[2] و همکاران در سال ۲۰۰۵

1-Duttarey

1- Kiffer

در برزیل شیوع ESBL و مقاومت به سفوتاکسیم و سفتازیدیم را در میان کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلی به ترتیب ۵۱/۹٪ و ۱۴/۶٪ گزارش کردند که تمامی باکتری های اشریشیا کلی و ۹۹/۲٪ ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه (۰/۸٪ بینابینی) حساس به ایمی پنم بودند [۲۰]. در ویتنام در سال ۲۰۰۱ میلادی، در بین ۱۳۰۹ ایزوله بیمارستانی اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس میرابیلیس، مقاومت به سفوتاکسیم، سفوپرازون و سفتازیدیم به ترتیب۳۰٪، ۱۵/۹٪ و ۲۶٪ گزارش شده است و ۵/۶٪ ایزوله ها 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 ۲۷/۹٪ و ۲۶/۳٪ بود. شیوع بین افراد بستری کمی بیشتر از افراد سرپایی بود، ولی اختلاف چندان بارز نبود. میزان شیوع باکتری های 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 می تواند 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 ۳۹ باکتری مولد ESBL، ۹ ایزوله (۲۳/۰۸٪) حامل ژن $bla_{\text{PER-2}}$ بودند که این ژن در باکتری های انتروباکتر کلوآکه، انتروباکتر ائروژنز و کلبسیلا پنومونیه یافت شد [۲۲]. شیوع ژن bla_{PER} در تحقیق شاهچراغی و همکاران (در سال ۲۰۱۰) در باکتری های کلبسیلا پنومونیه در تهران ۷/۵٪ گزارش شده است [۲۳]. هیچکدام از باکتری های اشریشیا کلی جدا شده از شش بیمارستان تهران در سال ۱۳۸۵ ژن bla_{PER} را نداشتند [۲۴] و در این تحقیق ۴۸/۰۸٪ ایزوله های اشریشیا کلی بتالاکتاماز طیف وسیع تولید می کردند که ۵۹/۲٪ به سفتازیدیم، ۶۵/۶٪ به سفوتاکسیم و ۴۰/۷۴٪ به جنتامایسین مقاوم بودند [۲۴].

در اغلب مطالعات به ویژه کشورهای توسعه یافته، درصد شیوع ESBL و نیز درصد مقاومت به این آنتی‌بیوتیک ها کمتر از ایران است و مقایسه‌ی آمار به‌دست آمده با کشورهای مختلف لزوم توجه و نظارت بر عدم گسترش مقاومت دارویی در جامعه مورد نظر را خاطر نشان می‌سازد. غربالگری باکتری های مولد ESBL و درمان مناسب بیماران با داروهایی مثل ایمی‌پنم می‌تواند از اهمیت بسیار زیادی برخوردار باشد و آزمایش معمول حساسیت آنتی بیوتیکی در بیمارستان ها روش مناسبی برای تشخیص این نوع مقاومت نیست.

از مهم ترین محدودیت های تحقیق محدودیت زمانی در انجام تحقیق و نیز مراجعه بعضی از افراد برای معاینه عمومی و تعیین سلامتی به آزمایشگاه بیمارستان ها بود که به عنوان بیمار سرپایی پذیرش می شدند.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان دهنده‌ی بالا بودن شیوع باکتری های 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 باکتری های جدا شده ژن پلاسمیدی bla_{PER} را نداشتند و تولید بتالاکتاماز می تواند 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.

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 ß-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 bea-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 S[1] **,** *Nakhaei Moghaddam M*[*2]

[1]M.Sc of Microbiology, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
[2] Assistant 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 Entrobacteriaceae.*

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

Submitted: *2011 Oct 26*
Revised: *2012 Jan 29*
Accepted: *2012 Apr 5*