

بررسی فنوتیپی و مولکولی بتالاکتامازهای وسیع الطیف 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: ۱۳۹۰/۱۱/۱۷

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 شهرپور مشهد از تاریخ ۱۳۸۹/۸/۱۵ تا ۱۳۸۹/۱۰/۱۵ جمع‌آوری و با آزمایشات بیوشیمیایی-اقتراقی شناسایی شدند. ایزوله‌ها 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 پلیمرز انجام شد.

یافته‌ها: 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 آمپی‌سیلین، سفوتاکسیم، سفنازیدیم 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، کوتریموکسازول و نیتروفورانتوین بودند که اختلاف برای جنتامایسین و کوتریموکسازول 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 ایزوله‌ها مربوط به سایر انواع بتالاکتاماز است.

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

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

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 ضد میکروبی 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

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 انتروباکتریاسه از نمونه های اداری 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 اداری در نظر گرفته شدند که به تعداد 10^4 یا 10^5 باکتری در هر میلی لیتر ادرار جدا شدند. انواع انتروباکتریاسه با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی (آزمایش های اکسیداز، اندول، متیل رد، 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 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: سفنازیدیم ($30 \mu\text{g}$, CAZ)، سفالوتین ($30 \mu\text{g}$, CF)، آمپی سیلین ($10 \mu\text{g}$, AP)، سفوتاکسیم ($30 \mu\text{g}$, CTX)، آمیکاسین ($30 \mu\text{g}$, K)، نیتروفورانتوئین ($30 \mu\text{g}$, NI)، نالیدیکسیک اسید ($30 \mu\text{g}$, NA)، جنتامایسین ($10 \mu\text{g}$, G)، کوتریموکسازول ($25 \mu\text{g}$, SXT) و ایمپنم ($10 \mu\text{g}$, IMI). 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 37°C درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، گسترش هاله های مهار از ناحیه دیسک سفوتاکسیم ($30 \mu\text{g}$, CTX) به طرف آگمنتین ($30 \mu\text{g}$, AUG) $20/10 \mu\text{g}$ به عنوان باکتری مولد ESBL در نظر گرفته

تولیدکننده ی بتالاکتامازهای وسیع الطیف به واسطه ی هیدرولیز بسیاری از آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام مانند پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و آزترونام ها معضلات عدیده ای را در درمان عفونت های خطرناک ناشی از این باکتری ها به وجود آورده اند [۳]. ظهور مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام به سال های اولیه ی کشف مقاومت نسبت به اولین آنتی بیوتیک (پنی سیلین) بر می گردد و اولین بتالاکتاماز در باکتری اشريشيا کلي مشاهده شد [۲]. ظهور مقاومت باکتری ها اغلب مربوط به پلاسمید سویه های تولید کننده ی پنی سیلیناز است که به سرعت در بین ایزوله های کلینیکی انتشار می یابد [۴]. پلاسمیدهای ESBL^۱، 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 فعال متغیر 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 روزافزون 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 بتالاکتامی انتروباکتریاسه و نیز شیوع ایزوله های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف از نظر درمان عفونت با داروی مناسب، اهمیت دارد و می تواند از شکست درمان جلوگیری نماید.

بتالاکتامازهای نوع PER^۴ اولین بار از سودوموناس اثروجینوزا گزارش شدند و در تعداد کمی از جوامع از انتروباکتریاسه گزارش شده اند [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 انتروباکتریاسه های اداری 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.

- 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 سفنازیدیم ($30 \mu\text{g}$) و دیسک حاوی سفنازیدیم و کلاوولانیک اسید ($30/10 \mu\text{g}$) 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 سفنازیدیم حداقل ۵ میلی‌متر بیشتر از دیسک حاوی سفنازیدیم به تنهایی بود، آزمایش مثبت در نظر گرفته شد [۹، ۱۰].

بررسی وجود ژن پلاسمیدی *bla_{PER}*: بعد از کشت باکتری ها در محیط لوریابر تانی (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 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 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.

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)، یرسینیا spp (۷/۷)، انتروباکتر کلوآکه^۱ (۵/۵)، پروتئوس میرابیلیس (۲/۲)، سیتروباکتر دایورسوس^۲ (۱/۱)، سالمونلا گالیناروم^۳ (۱/۱).

بین باکتری‌های جدا شده در مجموع ۲۷ ایزوله (۲۷٪) تولید کننده 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 پلیمرز هیچکدام از ایزوله های 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

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

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

جدا شده در مقایسه با اشریشیا کلی دارای بتالاکتاماز وسیع الطیف هستند. تمامی گونه های یرسینیا و پروتئوس دارای بتالاکتاماز بودند، اما برای تعیین واقعی شیوع

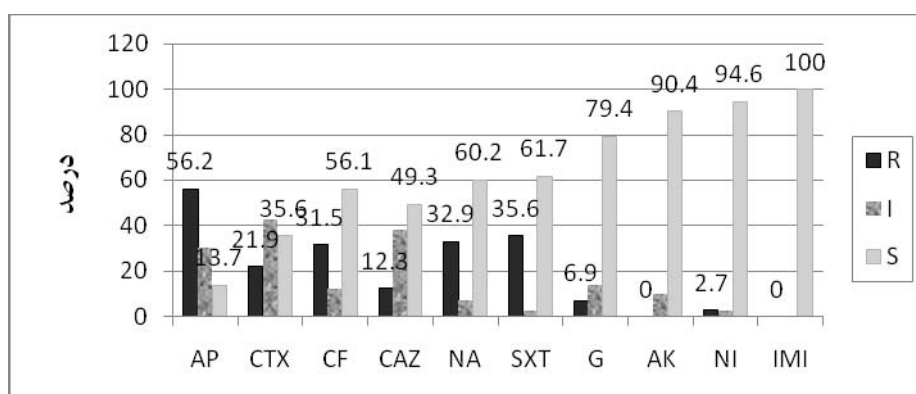
نهایتاً تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS16 انجام شد و برای آنالیز آماری الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها بین ایزوله‌های *ESBL⁺* و *ESBL⁻* از آزمون کای دو استفاده شد. نتایج با $p < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین ملاحظات اخلاقی

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

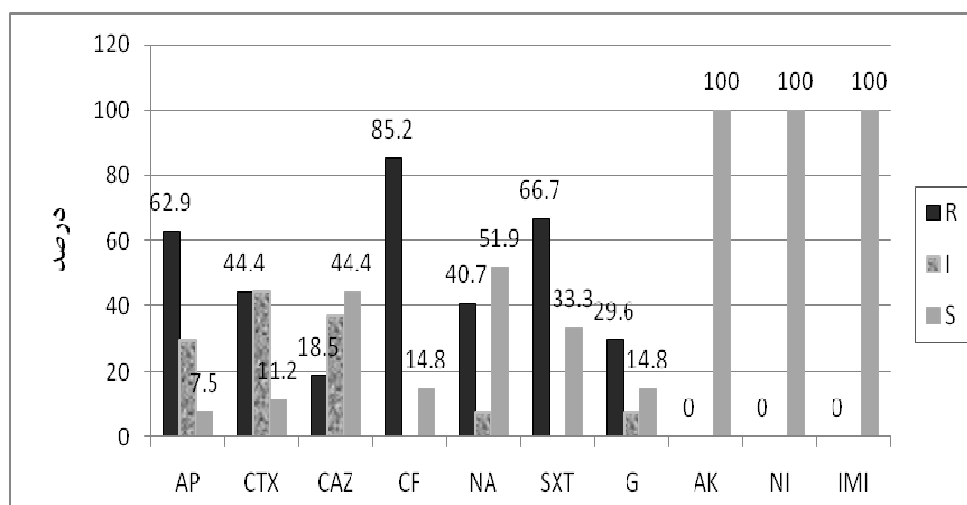
جدول ۲: ایزوله‌های ادراری انتروباکتریاسه $ESBL^+$ و $ESBL^-$ بر اساس گونه باکتریایی

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

نمودار ۱: توزیع فراوانی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های $ESBL^+$ (n=27)



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



بتالاكتاماز بين اين باكتري ها نياز به جداسازی تعداد بيشتري از آن هاست.

بر اساس نتايج به دست آمده باكتري هاي مولد بتالاكتاماز به طور معنی داری مقاومت بيشتري نسبت به آنتی بيوتیک های بتالاكتام نشان دادند ($p < 0.05$). در میان آنتی بيوتیک های بتالاكتام مورد آزمایش بيشتري مقاومت نسبت به سفالوتين ($0.85/2$) و کمترین مقاومت نسبت به سفنازيديم ($0.18/5$) بود.

نمودار ۱ و ۲ نتايج آزمایشات حساسيت آنتی بيوتيکی ايزوله های $ESBL^+$ و $ESBL^-$ را نشان می دهد. مقاومت به آنتی بيوتیک های غير بتالاكتام در میان باكتري هاي مولد بتالاكتاماز وسيع الطيف از صفر (ايمي پنم، نيتروفورانتوين و آميكاسين) تا ۴۴ درصد (کوتريموکسازول) بود. لازم به ذکر است که تمامی باكتري های جدا شده نسبت به آنتی بيوتیک ايمي پنم حساس بود.

در بين آنتی بيوتیک های غير بتالاكتام مورد آزمایش، درصد بيشتري از باكتري هاي مولد بتالاكتاماز مقاوم به کوتريموکسازول، ناليدیکسيک اسيد و جنتاميسين بودند که اختلاف برای کوتريموکسازول و جنتاميسين معنی دار بود ($p < 0.05$).

بحث

در اين مطالعه از ۱۰۰ نمونه ای ادرار مورد بررسی ۲۷ ايزوله انتروباکتریاسه مولد $ESBL$ جدا شد و $9/5\%$ از باكتري هاي اشريشيا کلي و $47/4\%$ از کلبسيلا پنومونيه های جدا شده دارای آنزيم بتالاكتاماز بودند. شيوع باكتري های مولد بتالاكتاماز بين باكتري هاي کلبسيلاي جدا شده بيشتري از اشريشيا کلي بود. در گزارش منتشر شده در سال ۱۳۸۹ توسط فيض آبادی و همکاران $69/7\%$ جدایه های کلبسيلا پنومونيه از بیمارستان لبافی نژاد تهران دارای $ESBL$ بودند که $61/7\%$ آن ها مقاومت نسبت به سفنازيديم را نشان دادند [۱۲]. در تحقيقاتی که در سال ۲۰۰۵، داتری^۱ و همکاران در هند انجام دادند، از میان ۱۸۷ ايزوله ای اشريشيا کلي و کلبسيلا پنومونيه ای مورد بررسی، ۵۳ ($29/1\%$) ايزوله مولد بتالاكتاماز وسيع الطيف

بودند [۱۳]. در اين تحقيق مشابه تحقيق حاضر شيوع باكتري هاي مولد $ESBL$ بين ايزوله های کلبسيلا پنومونيه بيشتري از اشريشيا کلي بود. در تحقيق ديگري از مجموع ۲۵۰ ايزوله ادراری در یک بیمارستان در دهلي (شامل ۱۸۸ اشريشيا کلي و ۶۲ باكتري کلبسيلا پنومونيه) توليد بتالاكتاماز وسيع الطيف به میزان 56% در بين باكتري هاي اشريشيا کلي و 52% در بين باكتري هاي کلبسيلا پنومونيه گزارش شده است [۱۴]. شيوع $ESBL$ در باكتري هاي خانواده انتروباکتریاسه در فرانسه کمتر از 1% گزارش شده است [۱۵]. درصد توليد $ESBL$ در کلبسيلا پنومونيه در برخی کشورهای آسیايی از جمله کره $4/8\%$ ، تايوان $8/5\%$ و هنگ کنگ 12% گزارش شده است [۱۶]. در ژاپن درصد مقاومت به آنتی بيوتیک های بتالاكتام بر اثر توليد بتالاكتاماز بسيار پائين و در بررسی انجام شده در ۱۹۶ مرکز درمانی واقع در اين کشور مشخص گرديد که کمتر از $0/1\%$ باكتري هاي کلبسيلا پنومونيه آنزيم بتالاكتاماز توليد می کنند [۱۷]. در اروپا شيوع توليد بتالاكتامازهای وسيع الطيف در میان ايزوله های انتروباکتریاسه از کشوری به کشوری ديگر فرق می کند [۱۹، ۱۸]. در یک گزارش [۱۹] از ۱۷ کشور مختلف در سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۲، توليد بتالاكتاماز بين ايزوله های اشريشياکلي، کلبسيلا پنومونيه و گونه های انتروباکتر به ترتيب $5/4\%$ ، $18/2\%$ و $8/8\%$ درصد و میزان توليد اين آنزيم در میان انواع انتروباکتریاسه $10/5\%$ و بيشتري شيوع در مصر ($38/5\%$) و يونان ($27/4\%$) و کمترین شيوع در هلند (2%) و آلمان ($2/6\%$) ذکر شده است [۱۹]. همانطوری که مشخص است، توليد بتالاكتاماز در بسياری از کشورهای توسعه یافته کمتر از جامعه مورد مطالعه است. در مطالعه ای حاضر، مقاومت به سفالوتين، سفوتاکسيم و سفنازيديم در میان کل ايزوله های انتروباکتریاسه به ترتيب ۴۶، ۲۸ و ۱۴ درصد و در میان سويه های مولد بتالاكتاماز $85/2\%$ ، $44/4\%$ و $18/5\%$ درصد به دست آمد. بدین ترتيب مقاومت به سفالوتين بيشتري از بقيه آنتی بيوتیک های بتالاكتام بود. تمامی ايزوله ها در تحقيق حاضر حساس به ايمي پنم بودند. کيفر^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۵

در برزیل شیوع ESBL و مقاومت به سفوتاکسیم و سفنازیدیم 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٪ ایزوله های 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 سفنازیدیم به ترتیب ۳۰٪، ۱۵/۹٪ و ۲۶٪ گزارش شده است و ۵/۶٪ ایزوله ها مقاوم به ایمی پنم بودند [۲۱].

طبق نتایج بدست آمده شیوع باکتری های مولد بتالاکتاماز در بین باکتری های 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 ایزوله های مولد بتالاکتاماز طیف وسیع حامل ژن *bla_{PER}* در پلاسמיד نبودند. در یک تحقیق در آرژانتین (سال ۲۰۰۳ میلادی) از ۳۹ باکتری مولد ESBL، ۹ ایزوله (۲۳/۰۸٪) حامل ژن *bla_{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 سفنازیدیم، 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 آنتی بیوتیک ها کمتر از ایران است و مقایسه ای آمار به دست آمده با کشورهای مختلف لزوم توجه و نظارت بر عدم گسترش مقاومت دارویی در جامعه مورد نظر را خاطر نشان می سازد. غربالگری باکتری های مولد ESBL و درمان مناسب بیماران با داروهایی مثل ایمی پنم می تواند 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.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان دهنده ی بالا بودن شیوع باکتری های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در بین بیماران جامعه ی 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 پلاسמידی *bla_{PER}* را نداشتند و تولید بتالاکتاماز می تواند مربوط به سایر تیپ های بتالاکتاماز باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای مهرداد هاشمی، دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی که در انجام آنتی بیوگرام و آزمایشات مولکولی همکاری نمودند، صمیمانه قدردانی می شود.

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 β -lactamases, in *E. coli* resistant to β -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^{*2}

¹M.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 Enterobacteriaceae.

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

Submitted: 2011 Oct 26

Revised: 2012 Jan 29

Accepted: 2012 Apr 5