مقاومت چند دارویی و تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف سویه‌های اشریشیا کلی اسهال‌زا در کودکان زیر ۵ سال

صادق قربانی دالینی*[۱]، محمد کارگر[۲]، عباس دوستی[۳]، مهدی گلشن[۴]، میثم سرشار[۱]

۱. کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان
۲. دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی
۳. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی
۴. کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

* نشانی برای مکاتبه: مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) ghorbanidalini@jia.ac.ir، تلفن: ۰۹۱۷۳۱۳۱۵۳۶
دریافت مقاله: مهر نود پذیرش برای چاپ: آذر نود

چکیده

سابقه و هدف: *یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی، گسترش سویه‌های اشریشیا کلی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف و مقاوم به چند دارو می‌باشد. بتالاکتامازهای وسیع الطیف سفالوسپورینازهای مقاوم به طیف گسترده‌ای از اکسی‌ایمونوسفالوسپورین‌ها هستند که مشکلات جدی را در درمان ایجاد می‌کنند. هدف از این پژوهش، تعیین شیوع ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{CTX-M} در سویه‌های اشریشیا کلی مولد اسهال در کودکان زیر ۵ سال می باشد.*

روش کار: *این پژوهش به صورت مقطعی - توصیفی بر روی ۷۷ سویه‌ی اشریشیا کلی جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال در شیراز انجام شد. در ابتدا با استفاده از آزمون‌های متداول بیوشیمیایی، ایزوله های اشریشیا کلی شناسایی گردید. به منظور ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی از روش انتشار دیسک و برای شناسایی سویه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف از آزمون DDS (double disk synergy) مطابق دستورالعمل CLSI استفاده شد. در نهایت با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شیوع ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{CTX-M} مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های گروه پنی‌سیلین و ماکرولیدها و کمترین آن مربوط به کارباپنم بود. همچنین در ۶۴ سویه (۸۳/۱۱٪) مقاومت چندگانه شناسایی گردید. از مجموع ایزوله های مورد بررسی، در ۷۲ سویه (۹۳/۵۰٪) ژن‌های مرتبط با بتالاکتامازهای وسیع الطیف شناسایی گردید. ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{CTX-M} به ترتیب در ۴۰، ۳ و ۱ سویه به صورت منفرد و در ۲۸ سویه به صورت هم‌زمان وجود داشت.*

نتیجه گیری: *نتایج ما در این پژوهش نشان داد که برخلاف سایر نقاط دنیا که ژن bla_{TEM} بیشترین شیوع را در منطقه مورد بررسی ما دارد. همچنین شیوع بالای سویه‌های مقاوم به چند دارو، ضرورت توجه بیشتر به تجویز آنتی‌بیوتیک مناسب را نشان می‌دهد.*

واژگان کلیدی: ***مقاومت چند دارویی، اشریشیا کلی اسهال زا، کودکان، bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M}***

مقدمه

بتالاکتامازها، آنزیم‌های تجزیه کننده آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتا لاکتام هستند. پنی سیلیناز اولین بتالاکتاماز شناخته شده است که اولین بار در سال ۱۹۴۰ از اشریشیا کلی جداسازی گردید. با شناسایی ساختار حلقوی بتالاکتام واژه ی پنی‌سیلیناز به بتالاکتاماز تغییر یافت(۱). طی ۲۰ سال گذشته، آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بسیاری تهیه شدند که در برابر فعالیت هیدرولیزی بتالاکتامازها مقاوم بودند. اما با به کارگیری هر گروه جدید جهت درمان بیماران، بتالاکتامازهای جدیدی به وجود آمدند که نسبت با آن گروه جدید داروها مقاومت نشان می‌دادند. احتمالا مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌های جدید جهت درمان بیماران و فشار انتخابی بر باکتری، باعث تولید بتالاکتامازهای جدید توسط باکتری‌ها شده است. یکی از این گروه‌های جدید اکسی‌ایمینوسفالوسپورین‌ها می‌باشد که برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی در اوایل سال‌های ۱۹۸۰ مورد استفاده قرار گرفتند(۲). افزایش طیف فعالیت بتالاکتامازها، به‌ویژه به اکسی‌ایمینوسفالوسپورین‌ها، به دلیل جهش در ژنهای کد کننده آن‌ها، سبب ایجاد مقاومت گسترده باکتری‌ها نسبت به آنتیبیوتیک‌های پنی‌سیلین، سفالوسپورین‌های وسیع الطیف (مانند سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفتری‌آکسون) و آزترونام شده است.

از این رو این آنزیم‌ها را بتالاکتامازهای وسیع الطیف نامیده‌اند(۳). ژن bla_{TEM} اولین بتالاکتامازی بود که در باکتری‌های گرم منفی شناسایی گردید. تنها پس از گذشت چند سال از زمان مشاهده اولین ایزوله، وجود بتالاکتاماز TEM در سرتاسر جهان گزارش گردید و امروزه آن را در بسیاری از گونه‌های خانواده انتروباکتریاسه می‌توان یافت(۲). سویه‌های واجد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف برای میکروبیولوژیست‌های بالینی، کلینیسین‌ها، متخصصین حرفه‌ای کنترل عفونت و تولید کنندگان داروهای ضدباکتریال مشکلات زیادی را ایجاد نموده‌اند(۴).مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک مساله مهم در پزشکی می‌باشد. به طور قابل ملاحظه ای بسیاری از مطالعات بر روی ارگانیسم‌های بیماری‌زایی مانند سالمونلا، کمپیلوباکتر و اشریشیا کلی متمرکز شده‌اند. درحالی که عناصر ژنتیکی قابل انتقال کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های کومنسال قابل ذکر است، انتقال ژن‌های مقاومت از ارگانیسم‌های غیرپاتوژن به پاتوژن‌ها در مجرای گوارشی در گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی بسیار مهم می‌باشد. اشریشیا کلی روش‌های متنوعی از اکتساب و گسترش شاخص‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را دارد که می‌توانند به عنوان مخزن قابل انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشد. مطالعه شاخص‌های مقاومت در سویه‌های رایج اشریشیا کلی، اهمیت باکتری‌های کومنسال در توسعه و انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی را افزایش می‌دهد(۵).گسترش عوامل ژنتیکی به ویژه پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها یا کاست‌های ژنی، مسئول گسترش سریع ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه و تبادل ژن‌های مقاومت بین پاتوژن‌ها و غیر پاتوژن‌ها و بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد(۶). تجمع ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در یک قطعه متحرک ژنتیکی، می‌تواند موجب مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها و فلزات سنگین گردد. به همین دلیل امکان انتخاب طبیعی سویه‌های دارای ژن‌های چندگانه مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بیشتر وجود دارد. از این رو ارزیابی اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های مقاوم به چند دارو می‌تواند موجب دقت در تجویز داروهای مناسب و جلوگیری از شیوع سویه‌های مقاوم گردد(۶).هدف از این پژوهش، تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شیوع ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{CTX-M} در بین سویه‌های اشریشیا کلی اسهال زا در کودکان می‌باشد.

روش کار

این پژوهش به صورت مقطعی - توصیفی از فروردین ماه ۱۳۸۹ تا آذر ۱۳۸۹ بر روی ۴۸۰ نمونه اسهال انجام شد. نمونه ها از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های نمازی، شهید فقیهی و مطهری شیراز، از بین کودکان مشکوک به اسهال با عامل اشریشیا کلی، جمع آوری شد. در این راستا موافقت کتبی و اخذ مجوز از کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه و رضایت نامه کتبی از بیماران در پرسشنامه تنظیمی کسب گردید.

محاسبه حجم نمونه با توجه به شیوع متوسط ۲۵ درصدی اشریشیا کلی مولد اسهال، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد و سطح خطای ۰/۰۴ انجام گرفت. که تعداد نمونه برابر ۴۵۰ محاسبه شد و برای اطمینان بیشتر ۴۸۰ نمونه بررسی گردید. جداسازی اولیه سویه‌های اشریشیا کلی با استفاده از محیط های ائوزین متیلن بلو (EMB) و VRBA (Violet Red Bile Agar) و تایید آن با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی TSI، سیمون سیترات، اوره‌آز، MR، LD، OD و SIM (تمامی محیطهای فوق ساخت شرکت مرک آلمان) انجام گردید. افراد مورد پژوهش به ۳ گروه سنی کمتر از ۱ سال، ۱ تا ۲ سال و ۳ تا ۵ سال تقسیم بندی شدند.تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های جداسازی شده با استفاده از ۱۱ گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها (سفالوسپورین، پنی‌سیلین، کارباپنم، فلوروکینولون، کینولون، فنیکول، تتراسیکلین، ممانعت کننده‌های فولات، آمینوگلیکوزید، نیتروفورانتوئین و ماکرولید) انجام شد. به این منظور با استفاده از روش انتشار دیسک بر اساس دستورالعمل CLSI (۷) حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفتری آکسون (۳۰µg)، سفکسیم (۵µg)، آمپی‌سیلین (۱۰µg)، پنی‌سیلین (۱۰U)، ایمی‌پنم (۱۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، لووفلوکساسین (۵µg)، نالیدیکسیک‌اسید (۳۰µg)، کلرامفنیکل (۳۰µg)، تتراسیکلین (۳۰µg)، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول (۲۳/۷۵µg و ۱/۲۵)، استرپتومایسین (۱۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، نیتروفورانتوین (۳۰۰µg)، آزیترومایسین (۱۵µg)، کلاریترومایسین (۱۵µg) و اریترومایسین (۱۵µg) (پادتن طب، ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین معیار انتخاب سویه‌های مقاوم به چند دارو (Multi-Drug Resistance) مقاومت به حداقل ۴ گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها بود(۷).به منظور شناسایی سویههای مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف از آزمون DDS استفاده گردید. در این روش باکتریها بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند و دو دیسک سفتری‌آکسون و سفوتاکسیم به فاصله ۲ سانتی متری از دیسک کلاولانیک اسید بر روی آن قرار داده شدند. در صورت مشاهده هرگونه تشدید هاله عدم رشد در حدفاصل دیسک‌ها، سویه به عنوان مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف درنظر گرفته شد.

برای بررسی مولکولی ESBLs ایزوله های خالص شده باکتری‌های مورد نظر، بر روی محیط لوریا-برتانی آگار (Merck) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. از کلنی های رشد یافته بر روی محیط کشت برای استخراج DNA استفاده شد. به این منظور یک کلنی باکتریایی در ۲۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی حل گردید و به صورت محلول یکنواخت در آمد. سپس DNA ی باکتری‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن ایران، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، تخلیص شد.از جفت پرایمرهای TEM-F/R و SHV-F/R به ترتیب برای شناسایی ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} استفاده شد. پرایمر های مذکور به ترتیب از روی شماره‌های ثبت J01749 و AF148850 موجود در بانک ژن، طراحی شدند(جدول ۱). همچنین برای تکثیر ژن bla_{CTX-M}، از جفت پرایمر CTX-M-F/R استفاده شد(۸).تکثیر قطعه هدف در تمامی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه مسترسایکلر ساخت شرکت اپندورف آلمان در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر DNA الگو، $MgCl_2$ با غلظت ۱/۵ میلی مولار، ۰/۲ میکرومول dNTPs، ۰/۲ میلی مول از هرکدام از پرایمرها و ۱ واحد DNA پلیمراز Smar Taq (تمامی واکنشگرهای یاد شده ساخت شرکت سیناژن، ایران) انجام گردید. شرایط دمایی PCR شامل ۵ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵°C و در ادامه ۳۰ چرخه دمایی شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴°C، اتصال در دمای ۵۸°C و گسترش در دمای ۷۲°C هرکدام به مدت ۱ دقیقه و نهایتا ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C جهت گسترش نهایی انجام گردید. سپس قطعه تکثیر یافته با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، به کمک نور ماورای بنفش مشاهده گردید.نتایج به دست آمده با استفاده از نسخه نوزدهم نرم افزار SPSS (IBM SPSS Statistics) و آزمون‌های آماری مربع کای آنالیز گردید. مرز معنی داری روی $p<۰/۰۵$ قرار داده شد.

جدول ۱: توالی الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در شناسایی ژن‌های مولد ESBLs.

نام پرایمر	توالی الیگونوکلئوتیدی (´۳→´۵)	اندازه محصول	منبع
TEM-F	TCCGCTCATGAGACAATAACC	۲۹۶ bp	این مطالعه
TEM-R	ATAATACCGCACCACATAGCAG		
SHV-F	TACCATGAGCGATAACAGCG	۴۵۰ bp	این مطالعه
SHC-R	GATTTGCTGATTTCGCTCGG		
CTX-M-F	TCTTCCAGAATAAGGAATCCC	۹۰۹ bp	۷
CTX-M-R	CCGTTTCCGCTATTACAAAC		

یافته‌ها

از بین ۴۸۰ نمونه ی مورد بررسی، ۷۷ (۱۶/۰۴) مورد اشریشیا کلی اسهال زا شناسایی گردید. از سویه‌های یاد شده، ۴۹ مورد (۶۳/۶۴٪) مربوط به جنس مذکر با میانگین سنی ۱۴±۱۶ ماه و ۲۸ مورد (۳۶/۳۶٪) مربوط به جنس مونث با میانگین سنی ۱۳±۱۴ ماه بودند. همچنین بیشترین فراوانی جداسازی سویه‌ها به ترتیب مربوط به فصول بهار، تابستان و پاییز با فراوانی ۳۸/۹۶، ۴۰/۲۶ و ۲۰/۷۸ درصد بود.

متداول‌ترین علائم بالینی شناسایی شده در افراد مورد پژوهش شامل اسهال خونی، تب و تهوع به ترتیب با فراوانی ۲۰/۷۸٪، ۶۴/۹۳٪ و ۶۷/۵۳٪ بود. نتایج نشان داد که بیشترین شیوع اشریشیا کلی اسهال زا در گروه‌های سنی کمتر از ۱ سال (۴۵/۴۵٪) و ۱ تا ۲ سال (۴۱/۵۶٪) و کمترین شیوع آن در گروه سنی ۳ تا ۵ سال (۱۲/۹۹٪) بود. بین فصل پاییز و شیوع اشریشیا کلی اسهال زا در گروه سنی ۱ تا ۲ سال ($p<۰/۰۲۱$) و همچنین بین فصل تابستان و تب ($p<۰/۰۱۶$) ارتباط معنی داری وجود داشت(جدول ۲). با استفاده از روش استاندارد انتشار دیسک مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم ۴۶/۸٪، سفتری‌آکسون ۴۳/۵٪، سفکسیم ۶۱/۳٪، آمپی سیلین ۶۹/۳٪، پنی‌سیلین ۱۰۰٪، ایمی‌پنم ۶/۵٪، سیپروفلوکساسین ۹/۷٪، لووفلوکساسین ۴/۸٪، نالیدیکسیک اسید ۳۷/۱٪، کلرامفنیکل ۸/۱٪، تتراسیکلین ۵۱/۶٪، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول ۵۸/۱٪، استرپتومایسین ۵۶/۵٪، جنتامیسین ۱۷/۷٪، آمیکاسین ۳/۲٪، نیتروفورانتوئین ۳/۲٪، آزیترومایسین ۴۰/۳٪، کلاریترومایسین ۱۰۰٪ و اریترومایسین ۱۰۰٪ مشاهده گردید. همچنین در ۸۳/۱۱٪ سویه‌ها مقاومت چند دارویی مشاهده گردید به گونه‌ای که حداقل مقاومت به ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ گروه آنتی‌بیوتیک مختلف به ترتیب در ۳۲/۳٪، ۱۷/۷٪، ۱۲/۹٪، ۱۱/۳٪، ۴/۸٪ و ۴/۸٪ مشاهده گردید. با استفاده از آزمون DDS مشخص گردید که ۱۳٪ از نمونه‌ها واجد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌باشند.

با استفاده از روش PCR، در ۶۵ نمونه قطعه ۲۹۶ جفت بازی مورد انتظار ژن bla_{TEM}، در ۲۰ نمونه قطعه ۴۵۰ جفت بازی مورد انتظار ژن bla_{SHV} و در ۲۶ نمونه قطعه ۹۰۹ جفت بازی مورد انتظار ژن bla_{CTX-M} مشاهده شد (تصویر ۱). همچنین در ۵ نمونه هیچکدام از ژن‌های فوق یافت نگردید. از ۷۲ نمونه واجد ژن‌های بتالاکتاماز، ۳ نمونه دارای ژنوتیپ $bla_{TEM+SHV}$، ۱۱ نمونه $bla_{TEM+CTX-M}$، ۳ نمونه $bla_{SHV+CTX-M}$ و ۱۱ نمونه $bla_{TEM+SHV+CTX-M}$ بود. همچنین در ۴۰ نمونه bla_{TEM}، ۳ نمونه bla_{SHV} و ۱ نمونه ژن bla_{CTX-M} به صورت منفرد وجود داشت. بین فصل پاییز و شیوع ژن bla_{SHV} ($p<۰/۰۰۴$) و ژن bla_{CTX-M} ($p<۰/۰۴۲$) ارتباط معنی داری وجود داشت(جدول ۲).

جدول ۲: بررسی ارتباط بین فصول مختلف سال با ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، گروه‌های سنی و علائم بالینی.

			بهار		تابستان		پاییز	
			مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی
ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف	bla_{TEM}	+	۲۵	۴۰	۲۴	۴۱	۱۶	۴۹
		−	۵	۷	۷	۵	۰	۱۲
	bla_{SHV}	+	۶	۱۴	۵	۱۵	۹*	۱۱
		−	۲۴	۳۳	۲۶	۳۱	۷	۵۰
	bla_{CTX-M}	+	۷	۱۹	۱۰	۱۶	۹*	۱۷
		−	۲۳	۲۸	۲۱	۳۰	۷	۴۴
گروه‌های سنی	<۱	+	۱۶	۱۹	۱۵	۲۰	۴	۳۱
		−	۱۴	۲۸	۱۶	۲۶	۱۲	۳۰
	۱-۲	+	۱۱	۲۱	۱۰	۲۲	۱۱*	۲۱
		−	۱۹	۲۶	۲۱	۲۴	۵	۴۰
	>۲	+	۳	۷	۶	۴	۱	۹
		−	۲۷	۴۰	۲۵	۴۲	۱۵	۵۲
علائم بالینی	تب	+	۲۳	۲۷	۱۵*	۳۵	۱۲	۳۸
		−	۷	۲۰	۱۶	۱۱	۴	۲۳
	اسهال خونی	+	۵	۱۱	۸	۸	۳	۱۳
		−	۲۵	۳۶	۲۳	۳۸	۱۳	۴۸
	تهوع	+	۲۲	۳۱	۲۲	۳۱	۹	۴۴
		−	۸	۱۶	۹	۱۵	۷	۱۷

*ارتباط معنی‌دار

بحث

دلیل نامگذاری بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، تاثیرشان بر سوبستراهای بتالاکتامازی است. اما اخیرا از این واژه تنها درمورد بتالاکتامازهایی استفاده می شود که بر طیف گسترده‌ای از بتالاکتام‌ها موثر بوده و نیز توسط کلاولانیک اسید مهار می‌شوند (۱ و ۹).در پانزده سال اخیر اپیدمی‌های متعدد عفونت با ارگانیسم‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در سراسر دنیا گزارش شده است. این شیوع تهدیدی جدی در روند درمان عفونت‌ها محسوب می‌شود. تجربه نشان داده است که نتیجه رضایت بخشی از درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف حاصل نمی‌شود. میزان مرگ و میر در این گروه به‌طور قابل توجهی نسبت به عفونت‌های ناشی از باکتری‌های فاقد آن بالا بوده و از ۴۲٪ تا ۱۰۰٪ متغیر می‌باشد (۱۰).باکتری‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف با هیدرولیز بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مانند پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و آزترونام، معضلات عدیده‌ای را در درمان عفونت‌های خطرناک ناشی از این باکتری‌ها به وجود آورده‌اند. به علاوه پدیده مقاومت‌های چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها (Multi-Drug Resistance) بین ایزوله‌های ایجاد کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف گزارش شده، بنابراین تاثیرپذیری داروها روی این باکتری‌ها رو به کاهش گذاشته است (۱۱).

باکتری‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف الگوی مقاومت دارویی بسیار گسترده‌ای از خود نشان می‌دهند و باعث افزایش مرگ و میر بیماران بستری در بیمارستان می‌شوند. شیوع این باکتری‌ها در نمونه‌های کلینیکی در نواحی جغرافیایی مختلف متفاوت است. دانش ما درمورد الگوی حساسیت این باکتری‌ها در یک ناحیه جغرافیایی به مصرف صحیح و معقول آنتی‌بیوتیک‌ها کمک خواهد کرد (۱۲).

امروزه شیوع ارگانیسم‌هایی مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در حال افزایش است و این مساله به عنوان یکی از بحران‌های موجود در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها مطرح است. انتقال و انتشار سریع ارگانیسم‌هایی که قادر به تولید آنزیم‌های مذکور هستند باعث بالا رفتن میزان عفونت‌های بیمارستانی مربوط به آن‌ها در سراسر دنیا شده است. ژن تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف روی پلاسمید واقع شده و مقاومت متقاطع نسبت به کلاس‌های دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها را هم ممکن می‌سازد که این امر موجب محدودیت در انتخاب درمان آنتی‌بیوتیکی می‌شود (۱۲).

Ochoa و همکاران از پرو (۱۳)، Garcia و همکاران از برزیل (۱۴)، Akinjagunia و همکاران از نیجریه (۱۵)، Nguyen و همکاران از ویتنام (۱۶)، Aslani و همکاران از تهران (۱۷) و کارگر و همکاران از شیراز (۱۸) در سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۰ به بررسی شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های اشریشیا کلی مولد اسهال در کودکان پرداختند. نتایج این بررسی‌ها نشان داد که بیشترین میزان مقاومت در آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، مهارکننده‌های فولات و تتراسیکلین وجود دارد. همچنین نتایج این بررسی‌ها نشان داد که آمینوگلیکوزیدها و کارباپنم ها موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بر علیه سویه‌های اشریشیا کلی اسهال زا در کودکان می‌باشد. با توجه به اینکه در این پژوهش گروه‌های آنتی‌بیوتیکی بیشتری مورد ارزیابی قرار گرفت، نتایج نشان داد که بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، ماکرولید، مهارکننده‌های فولات و تتراسیکلین می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که آمینوگلیکوزیدها، نیتروفورانتوئین‌ها، فلوروکینولون‌ها و کارباپنم‌ها موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بر علیه سویه‌های یاد شده می‌باشد.

مطالعات فوق، ایمی‌پنم را از داروهای موفق برعلیه سویه‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف معرفی کرده‌اند. به دلیل اینکه ایمی‌پنم در کشور ما یک آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در بیمارستانی بوده و بدون تجویز پزشک مصرف نمی‌شود، لذا مقاومت به این دارو خوشبختانه در ایران پایین است (۱۹). از طرفی ایمی‌پنم به خاطر وزن مولکولی کوچک می‌تواند از طریق پورین‌ها نیز وارد سلول گردد و این امر باعث تاثیر پذیری بیشتر آن می‌شود (۲۰). همچنین مقاومت در سویه‌های جدا شده از کودکان با توجه به سن کم آن‌ها و در نتیجه مصرف کمتر آنتی‌بیوتیک در آن‌ها کمتر است. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که آمپی سیلین کمترین اثر ضدباکتریایی را دارد. آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین اغلب به صورت خوراکی برای عفونت‌های ادراری باکتری‌های گرم منفی استفاده می‌شود و از آنجا که عفونت‌های ادراری غالبا به صورت تجربی و بدون توجه به نتایج آزمون‌های حساسیت سنجی درمان می‌شوند، و تست‌های حساسیت سنجی زمانی درخواست می‌شوند که بیمار دوره‌های درمانی ناموفق را تجربه کرده است، شاهد افزایش مقاومت در این باکتری‌ها هستیم. از این‌رو میزان مقاومت بالا در این مطالعه و سایر مطالعات، محدود شدن استفاده از این آنتی‌بیوتیک را پیشنهاد می‌کند (۲۱).

Tofland و همکاران در نروژ (۲۲)، Farber و همکاران در آلمان (۲۳)، Kim و همکاران در کره جنوبی (۲۴)، Kiratisin و همکاران در تایلند (۲۵)، Zhanel و همکاران در کانادا (۲۶) و Jones و همکاران در یک پروژه جهانی (۲۷) در سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۸ به بررسی شیوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سویه‌های اشریشیا کلی اسهال‌زا پرداختند. نتایج این بررسی ها نشان داد که فنوتیپ بتالاکتامازهای وسیع الطیف دارای شیوع ۵ تا ۱۴ درصد در دنیا میباشد اما ژن‌های آن دارای شیوع ۸۵٪ در دنیا میباشد. همچنین نتایج این پژوهشها نشان داد که ژن bla_{CTX-M} بیشترین فراوانی (۷۰ تا ۹۹ درصد) و ژن bla_{SHV} کمترین فراوانی (کمتر از ۲۸ درصد) را درمیان ژنهای بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف دارد. اما نتایج پژوهشهای افضلیان و همکاران در سال ۱۳۸۹ در شیراز (۲۸)، میرصالحیان و همکاران در سال ۲۰۰۸ در تهران (۲۹)، و حسینی مازینانی در سال ۲۰۰۷ در تهران (۲۰) بر روی نمونههای اشریشیا کلی جدا شده از ادرار نشان داد که ژن bla_{TEM} بیشترین شیوع را در ایران دارد. نتایج این پژوهش نشان داد که ژن bla_{TEM} بیشترین فراوانی را در منطقه مورد بررسی ما دارد که این نتایج همسو با پژوهش‌های انجام شده در این ایران بر روی سایر نمونه‌ها می‌باشد.همچنین نتایج پژوهش‌های یاد شده نشان داد که سویه‌های مقاوم به چند دارو در تمامی (۱۰۰٪) سویه‌های دارای بتالاکتامازهای وسیع الطیف و در بیش از ۷۵٪ از کل نمونه‌های مورد بررسی وجود دارد. نتایج پژوهش‌های ما نیز نشان داد که مقاومت چند دارویی در تمامی سویه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف و در ۸۳/۱۱ درصد از کل نمونه‌های مورد بررسی وجود دارد. این نتایج نشان دهنده خطر سویه‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌باشد.

همچنین نتایج نشان می‌دهد که بتالاکتامازهای وسیع الطیف، مارکر مناسبی برای نشان دادن مقاومت چند گانه در سویه‌های اشریشیا کلی می‌باشد و بیماران دارای سویه‌های تولید کننده آن باید با تدابیر مناسب‌تری تحت درمان قرار گیرند. همچنین بررسی شیوع این سویه‌ها می‌تواند در بررسی‌های اکولوژیکی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مفید واقع گردد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که مقاومت چند دارویی در ۸۳/۱۱ درصد از کل نمونه‌ها (۷۷ نمونه) وجود دارد. یافته ها حکایت از آن داشت که برخلاف سایر نقاط دنیا که ژن bla_{CTX-M} بیشترین فراوانی را دارد، ژن bla_{TEM} بیشترین شیوع را در منطقه مورد بررسی ما دارد. سرانجام اینکه شیوع بالای ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نشان دهنده روند رو به گسترش این ژن‌ها در سویه‌های اشریشیا کلی اسهال‌زا می‌باشد. از اینرو با توجه به شیوع قابل توجه اشریشیا کلی اسهال‌زای مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف و مقاوم به چند دارو، ضرورت پایش ارزیابی مکانیسم‌های مولکولی مقاومت در سایر مناطق کشور وجود دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس طرح پژوهشی شماره ۸۹۸۸۱ باشگاه پژوهشگران جوان انجام گردیده است. نویسندگان این مقاله از باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل حمایت های مالی و نیز معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل حمایت های اجرایی اعلام می‌دارند.

REFERENCES

1. Jalalpoor S, Mobasherizadeh S. Frequence of ESBLs and Antibiotic Resistant Pattern in to E. coli and K. pneumonia Strains Isolated of Hospitalized and Out Patients Acquired Urinary Tract Infection. J. Microbial World. 2009; 2(2): 109-16 [In Persian].

2. Behzadian Nejad Q, Abdollahi A, Najar Peerayeh Sh, Forouhesh Tehrani H. Evaluation of bla-ctx-m-type Gene in Multi Drug Resistance Klebsiella pneumonia Species Isolated from Clinical Samples. J. Iran University of Medical Sciences. 2008; 15(60-61): 37-45 [In Persian].

3. Bush, K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob.Agents Chemother. 1995; 39: 1211–33.

4. Hosein zadegan H, Hasani A, Azadpour M, Soleimannejad S, Mohammadi F. Screening of Extended Spectrum Beta lactamase Producing Gram Negative Bacilli Isolated from Clinical Cases. Medical Laboratory Journal. 2007; 1 (2): 20-25 [In Persian].

5. Salyers AA, Gupta A, Wang Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. Trends Microbiol. 2004; 12: 412–6.

6. Gow SP, Waldner CL, Harel J, Boerlin P. Associations between Antimicrobial Resistance Genes in Fecal Generic Escherichia coli Isolates from Cow-Calf Herds in Western Canada. App. Environ. Microb. 2008; 47(12): 3658–66.

7. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne PA. Clinical and Laboratory Standard Methods. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. seventeenth informational supplement. 2007; p. M100-S17.

8. Sturenburg E, Kuhn A, Mack D, Laufs R. A novel extended-spectrum b-lactamase CTX-M-23 with a P167T substitution in the active-site omega loop associated with ceftazidime resistance. J. Antimicrob Chemothe. 2004; 54: 406–9.

9. Philippon, LN, Naas T, Bouthors AT, et al. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β-lactamase from Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob.Agents Chemother. 1997; 41: 2188–95.

10. Sadeghi MR, Nahaei MR, Soltan-Dallal MM. Extended Spectrum Beta lactamase resistance in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in hospitalized and outpatients. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences & Health Service. 2008; 30(20): 79-86 [In Persian].

11. Feizabadi MM, Etemadi G, Yadegarinia D, Rahmati M, Shabanpoor S, Bokaei S. Antibiotic-resistance patterns and frequency of extended-spectrum beta-lactamase-producing isolates of Klebsiella pneumoniae in Tehran. Med Sci Monit. 2006; 12(11): 362-365.

12. Fazeli H , Hoseini MM, Mohammadi Ghalaei P. Frequency and resistance pattern of extended spectrum beta lactamase producing Escherichia coli in clinical specimen of Alzahra hospital in Isfahan, Iran, 2007. J Shahrekord Univ Med Sci. 2009, 10(4): 58-64 [In Persian].

13. Ochoa TJ, Ruiz J, Molina M, Del Valle LJ, Vargas M, Gil AI, Ecker L, Barletta F, Hall E, Cleary TG, Lanata CF. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic Escherichia coli in infants in Peru. Am J Trop Med Hyg. 2009; 81(2): 296-301.

14. Garcia PG, Silva VL, Diniz CG. Occurrence and Antimicrobial Drug Susceptibility Patterns of Commensal and Diarrheagenic Escherichia coli in Fecal Microbiota from Children With and Without Acute Diarrhea. The Journal of Microbiology. 2011. DOI 10.1007/s12275-010-0172-0.

15. Akinjogunla OJ, Eghafona NO, Ekoi OH. Diarrheagenic Escherichia coli (DEC): prevalence among in and ambulatory patients and susceptibility to antimicrobial chemotherapeutic agents. Journal of Bacteriology Research. 2009; 1(3): 34-38.

16. Nguyen TV, Le PV, Le CH, Weintraub A. Antibiotic resistance in diarrheagenic Escherichia coli and Shigella strains isolated from children in Hanoi, Vietnam. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(2): 816-9.

17. Aslani MM, Ahrabi SS, Alikhani YM, Jafari F, Zali RM, Mani M. Molecular detection and antimicrobial resistance of diarrheagenic Escherichia coli strains isolated from diarrheal cases. Saudi Med J. 2008; 29(3): 388-92.

18. Kargar M, Homayoon M. Survey of enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) and antibiotic resistance among children less than 5 years in Marvdasht. Medical Sciences Journal of Islamic Azad University,Tehran Medical Branch. 2009; 19(4): 268-273 [In Persian].

19. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Shurej F. Molecular assessment of PER, VEB, SHV and TEM betalactamases in P. aeroginusa strains isolated from wound specimens in two hospitals of Tehran by PCR. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2007; 1(4): 21-27 [In Persian].

20. Hosseini-Mazinani SM, Eftekhar F, Milani M, Ghandili S. Characterization of β-Lactamases from Urinary Isolates of Escherichia coli in Tehran. Iranian Biomedical Journal. 2007; 11 (2): 95-99.

21. Milani M, Nahaei MR, Lotfipour F, Yousefee S. Antibiotic sensitivity of prevalent Bacteria isolated from urinary tract infection during 1998-2005. Pharmaceutical Sciences. 2008; 13(4): 47-53 [In Persian].

22. Tofteland S, Haldorsen B, Dahl KH, Simonsen GS, Steinbakk M, Walsh TR, Sundsfjord A; Norwegian ESBL Study Group. Effects of Phenotype and Genotype on Methods for Detection of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Clinical Isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Norway. J Clin Microbiol. 2007; 45(1): 199–205.

23. Fa¨rber J, Moder KA, Layer F, Tammer I, Ko¨nig W, Ko¨nig B. Extended-Spectrum Beta-Lactamase Detection with Different Panels for Automated Susceptibility Testing and with a Chromogenic Medium. J Clin Microbiol. 2008; 46(11): 3721–3727.

24. Kim MH, Lee HJ, Park KS, Suh JT. Molecular Characteristics of Extended Spectrum β-Lactamases in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae and the Prevalence of qnr in Extended Spectrum β-Lactamase Isolates in a Tertiary Care Hospital in Korea. Yonsei Med J. 2010; 51(5): 768-74.

25. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular Characterization and Epidemiology of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae Isolates Causing Health Care-Associated Infection in Thailand, Where the CTX-M Family Is Endemic. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 58(2): 2818–24.

26. Zhanel GG, DeCorby M, Adam H, Mulvey MR, McCracken M, Lagacé-Wiens P, Nichol KA, Wierzbowski A, Baudry PJ, Tailor F, Karlowsky JA, Walkty A, Schweizer F, Johnson J; Canadian Antimicrobial Resistance Alliance, Hoban DJ. Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in Canadian hospitals: results of the Canadian Ward Surveillance Study (CANWARD 2008). Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(11):4684-93.

27. Jones CH, Tuckman M, Keeney D, Ruzin A, Bradford PA. Characterization and Sequence Analysis of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Encoding Genes from Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis Isolates Collected during Tigecycline Phase 3 Clinical Trials. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(2): 465–75.

28. Afzalian E. Evaluation of a multiplex PCR for detection of TEM, SHV and CTX-M β-lactamases producing clinical isolates of Escherichia coli collected from ICU patients in Namazi hospital, Shiraz. M.Sc thesis on Microbiology, Faculty of biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran, 2010 [In Persian].

29. Mirsalehian A, Akbari-Nakhjavani F, Peymani A, Kazemi B, Jabal Ameli F, Mirafshar SM. Prevalence of Extended Spectrum β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae by Phenotypic and Genotypic Methods in Intensive Care Units in Tehran, Iran. DARU. 2008; 16(3): 169-173.