Minimum Inhibitory Concentration of Cefotaxime by E-test Method on *Klebsiella* in Gorgan

Mahmoudjanlou, H.(MSc)
MSc of Microbiology,Golestan University of Medical Sciences

Ghazisaeedi, k.(PhD)
Professor of Microbiology , Microbiology Department, Golestan University of Medical Sciences

Moradi, A. (PhD)
Professor of Virology, Microbiology Department, Golestan University of Medical Sciences

Shakeri, F.(Msc)
MSc of of Microbiology,Golestan University of Medical Science

Babaii Koochaksarii, M. (MSc)
MSc of Microbiology, Tonekabon Islamic Azad University

Mansoor Samae, N.(PhD)
Assistant Professor of Human Genetic, Golestan University of Medical Science

Corresponding author: Mahmoudjanlou, H.
E- mail: janloo_h@yahoo.com

Received: 1/May/2012
Revised: 6/Oct/2012
Accepted: 8/Oct/2012

Abstract

Background and objectives: the increasing use of antibiotics, especially the third generation cephalosporins, is an important factor in the spread of antibiotic resistance in bacteria. The main reason for the development of resistance phenotype such as Extended Spectrum Beta Lactamas (ESBL) is the extensive use of broad-spectrum cephalosporins. In phenotypic survey, the Phenotyping confirmatory test and the minimum inhibitory concentration (MIC) are used. In this study, the prevalence of the isolates resistant to third generation cephalosporin (cefotaxime) was determined based on MIC.

Material and Methods: form September 2010 to September 2011, 75 isolates *of Klebsiella pneumoniae* were collected from the infections of inpatients and outpatients, referred to state and private laboratories of Gorgan. For all of the *Klebsiella pneumoniae* strains, MIC determination using E-test (company Liofilcheme-Italy) was performed.

Results: According to the MIC results, 26 samples (34.6%) are resistant to cefotaxime; 22 isolates are completely resistant to concentration of 256µg.

Conclusion: Because of the importance of risk of becoming ESBL, further studies are needed to clarify the ESBL in the region.

Keywords: ESBL, MIC, *Klebsiella pneumoniae*, Cephalosporin

دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی

حداقل غلظت مهار کننده رشد سفوتاکسیم به روش E-test بر *کلبسیلا* های شهر گرگان

حدیثه محمودجانلو
کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

کیومرث قاضی سعیدی
استاد باکتری شناسی ، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

عبدالوهاب مرادی
استاد ویروس شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

فاطمه شاکری
کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

مایا بابایی کوچکسرایی
کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن، تنکابن، ایران

نادر منصور سمائی
استادیـار ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

نویسنده مسئول : حدیثه محمود جانلو

تلفن: 09363526477

پست الکترونیک:
janloo_h@yahoo.com

آدرس: گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پیراپزشکی، گروه میکروبیلوژی

وصول مقاله: 91/2/13
اصلاح نهایی: 91/7/15
پذیرش مقاله: 91/7/17

چکیده

زمینه و هدف: *استفاده روز افزون از آنتی بیوتیک ها به خصوص سفالوسپورین های نسل سوم فاکتور مهمی در انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری هاست. دلیل اصلی گسترش و پیشرفت فنوتیپ مقاومت های همچون ESBL(Extended Spectrum Beta Lactamas) مصرف بی رویه سفالوسپورین های وسیع الطیف می باشد. در بررسی فنوتیپی تست تایید فنوتیپی و تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد(MIC: Minimum Inhibition Concentration) مورد استفاده قرار می گیرد . در این بررسی فراوانی ایزوله های مقاوم به سفالوسپورین نسل سوم (سفوتاکسیم) بر مبنای MIC تعیین شده است.*

روش بررسی: *طی مهر 1389 تا مهر 1390 تعداد 75 ایزوله کلبسیلا پنومونیه از عفونت های بیماران بستری و سرپایی مراجعه کننده به مراکز آموزشی درمانی دولتی و آزمایشگاه های خصوصی سطح شهر گرگان تهیه شد. برای تمامی نمونه ها، تعیین MIC با روش E-test(شرکت Liofilcheme-ایتالیا) انجام شد.*

یافته ها: *26 نمونه (34.6%) با توجه به نتایج MIC مقاوم به سفوتاکسیم بودند. 22 مورد کاملا به غلظت 256µg مقاوم بوده و هیچ گونه هاله ای در اطراف نوار E-test مشاهده نشد.*

نتیجه گیری: *با توجه به اهمیت خطر ESBL شدن ایزوله ها و جهت داشتن چشم اندازی از ESBL شدن در منطقه لازم است مطالعات بیشتری صورت پذیرد.*

واژه های کلیدی: *ESBL، کلبسیلا پنومونیه، سفالوسپورین، MIC*

آدرس مقاله:
محمودجانلو ح ، قاضی سعیدی ک ، مراد ی ع ، شاکری ف ، بابایی کوچکسرایی م " منصور سمائی ن. حداقل غلظت مهار کننده رشد سفوتاکسیم به روش E-test بر کلبسیلا های شهر گرگان". مجله علوم آزمایشگاهی پاییز و زمستان، 1391 دوره ششم (شماره 2):19-15

مقدمه

آنتی بیوتیک های بتالاکتام به ویژه سفالوسپورین های نسل سوم از گزینه های اصلی در درمان عفونت های ناشی از باکتری های روده ای به خصوص *کلبسیلا پنومونیه* می باشد، استفاده روز افزون از این آنتی بیوتیک ها فاکتور مهمی در انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری هاست . در طی 15 سال اخیر، پیدایش و گسترش مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام درسویه های بیمارستانی *کلبسیلا پنومونیه* و سایرباکتری های روده ای به خصوص مقاومت به سفالوسپورین ها ی نسل سوم و چهارم بعنوان یک مشکل جهانی مطرح شده و مورد توجه قرار گرفته است. مکانیسم عمومی مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک های بتالاکتام، تولید آنزیم های بتالاکتاماز است. این آنزیم داروهایی نظیر سفالوسپورین ها و پنی سیلین ها را غیرفعال می کند، از جمله این آنزیم ها-ESBL(Extended Spectrum Beta (Lactamaseها هستند که اولین بار در سال 1982 در یک سویه *کلبسیلا پنومونیه* ایزوله شده از بیماری در آلمان غربی مشاهده شد (1). دلیل اصلی گسترش و پیشرفت فنوتیپ ESBLمصرف بی رویه سفالوسپورین های وسیع الطیف می باشد. ژن مسئول مقاومت به سفالوسپورین های وسیع الطیف (سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفپیم) به طور عمده در پلاسمید قرار دارد و به همین دلیل با سرعت بیشتری قابلیت انتشار در بین باکتری ها را دارند، با توجه به قابلیت انتقال ژن این آنزیم ها توسط پلاسمید بین سویه های مختلف و نیز قابلیت بالای آنها در وقوع جهش هایی که منجر به مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها می گردد، داروهای مناسب برای درمان این باکتری ها بسیار محدود خواهد شد، این امر می تواند منجر به تشدید روند بیماری، بستری شدن طولانی مدت در بیمارستان، هزینه های بالای درمان و افزایش میزان مرگ و میر در بیماران گردد، این مسایل از دلایل مهم نگرانی از گسترش سویه های ESBL می باشد (2).

تشخیص مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم با روش های کربی بوئر و نوارهای E-test و تعیین میزان MIC انجام می شود، مطابق دستورالعمل CLSI اعضای خانواده انتروباکتریاسه با MIC، بالاتر از حد تعریف شده برای مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم، پتانسیل ESBL بودن را داشته و باید با تست های بیشتری مورد مطالعه قرار گیرند. تایید تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف ESBL با تست تایید فنوتیپی با استفاده ازآنتی بیوتیک های سفالوسپورین نسل سوم و مهارکننده ی بتالاکتاماز به نام اسیدکلاولانیک به روش دیسک دیفیوژن نوارهایE-test این آنتی بیوتیک ها انجام می شود. روش ژنوتیپی و شناسایی ژن های مسئول در ESBL شدن نیز با PCR یا Sequencing صورت می پذیرد (3). دانش ما در مورد میزان مقاومت این باکتری ها در یک ناحیه جغرافیایی به مصرف صحیح ومعقول آنتی بیوتیک ها کمک خواهد کرد. بنابراین برعهده ی مسئولین بهداشتی و میکروب شناسی هر منطقه می باشد که با مانیتورینگ و نظارت دائمی بر باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک، بخصوص سویه های ESBL و تغییرات در فراوانی آنها را تحت کنترل داشته باشند تا در صورت ازدیاد موارد، راههایی را جهت تغییر رژیم دارویی و پیشگیری بروز مقاومت پیشنهاد کنند. در این مطالعه ما در تلاشیم تا میزان فراوانی مقاومت به سفالوسپورین نسل سوم (سفوتاکسیم) و توزیع MIC در *کلبسیلاهای* جدا شده از بیماران منطقه را تعیین کنیم، ضمن اینکه چشم اندازی از ESBL شدن در منطقه نیز بدست آید.

روش بررسی

طی مهر 1389 تا مهر 1390 تعداد 75 ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* از عفونت های بیماران بستری و سرپایی مراجعه کننده به مراکز آموزشی درمانی دولتی و آزمایشگاه های

خصوصی سطح شهر گرگان تهیه شد (اطلاعات منتشر نشده). برای تمامی نمونه ها، تعیین MIC با روش E-test (شرکت Liofilcheme- ایتالیا) انجام شد. به این منظور پس از آن که کدورت باکتری های کشت شده در محیط کشت مولرهینتون براث با استاندارد 0/5 مک فارلند تطابق داده شد، با استفاده از یک سواب استریل سوسپانسیون باکتری را بر روی سطح پلیت مولر هینتون آگار 3 بار با زاویه 60 درجه کشیده و سپس توسط پنس استریل نوار E-test را برداشته و به آرامی بر روی محیط کشت قرار داده و پس از گذشت 24-18 ساعت در 35 درجه سانتی گراد کمترین غلظت ممانعت از رشد بر اساس درجه بندی روی نوار E-test گزارش شد. چنانچه میزان MIC نمونه ها کمتر از 8 باشد حساس به سفوتاکسیم، 32-16 محدوده Intermediate و 64≤ مقاوم به سفوتاکسیم گزارش شد. اطلاعات بیماران و نتایج E-test در نرم افزار SPSS (version 16) وارد گردید.

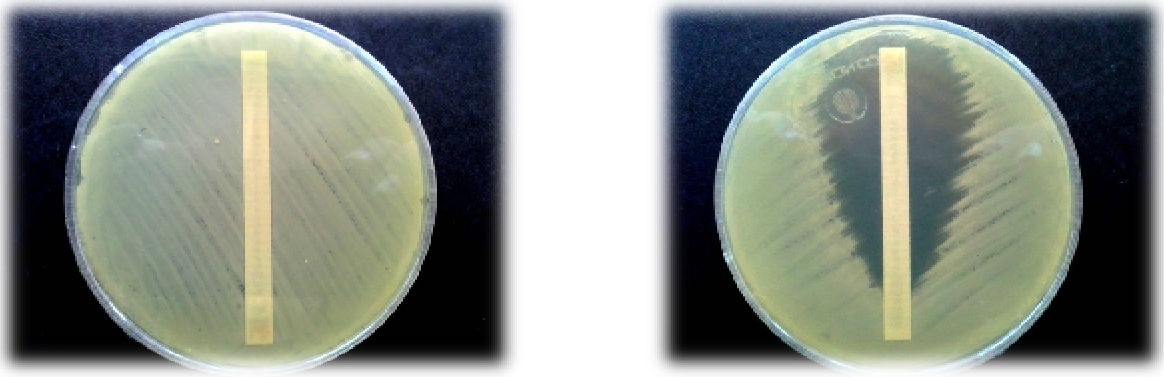
تحلیل آماری داده ها با محاسبه توزیع فراوانی داده ها، مقایسه و آنالیز نتایج و تست χ_2 ، Anova و مقایسه میانگین ها انجام شد. (در تمامی موارد $P<0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد)

یافته ها

حداقل غلظت مشاهده شده محدوده بین 0/0016 تا 256 بوده و نتایج آن در جدول 1 آورده شده است. 26 نمونه (34/6%) با توجه به نتایج MIC مقاوم به سفوتاکسیم بودند. 22 مورد کاملا به غلظت 256µg مقاوم بوده و هیچ گونه هاله ای در اطراف نوار E-test مشاهده نشد (تصویر1).

جدول1- توزیع MIC در ایزوله های *کلبسیلا پنومونیه* شهر گرگان در سال 90-1389

		وضعیت حساس یا مقاوم بودن	فراوانی کل	سابقه مصرف آنتی بیوتیک		بستری بودن بیمار		سابقه استفاده از سوند ادراری		دفع ناقص ادرار	
				دارد(55)	ندارد(20)	سرپائی(46نفر)	بستری(29نفر)	دارد(28)	ندارد(47)	دارد(20)	ندارد(55)
توزیع MIC	0.0016-8	S	45(%60)	%48.9	%60	%71.7	%41.4	%39.3	%72.3	%35	%69.1
	16-32	I	4(%5.3)	%4.4	%5.3	%6.5	%3.4	%7.1	%4.3	%10	%5.3
	64-128	R	4(%5.3)	%6.7	%5.3	%4.3	%6.9	%3.6	%5.3	%10	%5.3
	128-256	R	22(%29.3)	%40	%29.3	%29.3	%48.3	%50	%29.3	%45	%29.3
میانگین MIC		-	8.16	109.95	39.1	49.76	132.13	134.55	50.07	125.27	65.73
Pvalue		-	-	P=0.008		P=0.003		P=0.003		P=0.019	



شکل 1- انجام E-test برای ایزوله های *کلبسیلا پنومونیه* شهر گرگان در سال 90-1389

بحث

مطالعات مختلف در ایران نشان می دهد که درصد مقاومت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفپیم و سایر آنتی بیوتیک ها در حال افزایش است، این مسئله نشان می دهد که نیاز است پیگیری های مکرری از الگوی مقاومت باکتری های به عمل آید تا بتوان دستورالعمل درمانی مناسب تری را برای بیماران تهیه نمود. سطح مقاومت ESBL نیز به سرعت تغییر کرده و درصورت عدم رعایت شرایط استاندارد کاربرد داروها، ممکن است آمار مقاومت افزایش یابد. مطالعه ای که توسط James و همکاران در آمریکا انجام شد، نشان داد که میزان شیوع ESBL در این کشور از 4/1% در سال 2000 به 27/3% در 2006 افزایش یافته است(4) در بررسی حاضر مشاهده گردید که 26 مورد (34/6%) از 75 ایزوله *کلبسیلا* پنومونیه مقاوم به سفوتاکسیم بودند که این آمار در محدوده آمار سایر مطالعات صورت گرفته در ایران می باشد. این آمار در مطالعات مختلف، متفاوت گزارش شده است، کمترین آمار مربوط به مطالعه ی بهزادیان نژاد در تهران و ایراجیان در شهر سمنان به ترتیب 14/28% و22/4% بوده (5،6). و بالاترین آمار مربوط به نمونه های تهیه شده از بیماران در دو مطالعه در تهران است که به ترتیب 84% و 89% می باشد(8،7). در مطالعه صورت گرفته بر ایزوله های *کلبسیلا* پنومونیه جدا شده از نمونه های تنفسی در سه شهر تهران، تبریز و ایلام نیز میزان مقاومت به سفوتاکسیم 68.6% گزارش شده است(9). مطالعات Florijn در 2002، Akpaka در2010 در کانادا میزان مقاومت به سفوتاکسیم به روشE-test را به ترتیب 49/3% و 44/3% گزارش نموده اند(3،10). آمارها میزان بالاتری از این مقاومت را هم بیان داشته اند، 60% ایزوله های مورد مطالعه در بررسی صورت گرفته در سال 2007 در نروژ توسط Tofteland و همکاران ESBL بوده و کاملاً به سفوتاکسیم مقاوم بودند (11). جامعه مورد مطالعه (بستری یا سرپایی، بستری در ICU یا سایر بخش ها)، سن بیمار، مدت بستری بودن، اقدامات تهاجمی تشخیصی یا درمانی برای بیمار، نوع آنتی بیوتیک مورد استفاده (کدام نوع سفالوسپورین) و شرکت سازنده از دلایل این تفاوت ها هستند(4). 40 ایزوله از ایزوله های مورد بررسی در مطالعه بهزادیان نژاد نیز کاملاً به غلظت 256µg سفوتاکسیم مقاوم بوده و تمامی این ایزوله ها در تست تایید فنوتیپی ESBL بودند(5). این امر بیانگر اهمیت مقاومت به سفوتاکسیم و خطر ESBL شدن را مطرح می سازد. Astal نیز در مطالعه ای در سال 2003، این امر را مورد بررسی قرار داد، 3/6% از ایزوله ها به روش E-test مقاوم به سفوتاکسیم بوده و در تایید غربالگری به روش E-test نیز 3/3% ایزوله ها ESBL بودند (12). مقایسه و تایید نتایج مطالعه ی حاضر نیز با روش تست تایید فنوتیپی و تعیین میزان ESBL می تواند باارزش باشد. از آنجایی که این مطالعه بر

مبنای E-test سفوتاکسیم انجام شده است، ممکن است مواردی از ایزوله های ESBL که به سایر سفالوسپورین های نسل سوم مانند سفتازیدیم و سفتریاکسون مقاومند در نظر نگرفته شده باشد. همچنین انجام مطالعات ژنوتیپی می تواند منجر به شناسایی ژنوتیپ غالب ESBL در منطقه شود.

نتیجه گیری

از آنجاییکه حدود 34% از کلبسیلاهای منطقه ESBL بوده و در حد متوسط کشوری است، ضروری است تیم های کنترل عفونت بیمارستانی روند تغییرات مقاومت را بصورت ممتد پیگری نموده تا از گسترش مقاومت در بیمارستان و هزینه های مضاعف بر بیماران جلوگیری شود.

References

1. Moor CT, Roberts SA, Simmons G, Briggs S, Morris AJ, Smith J, et al. *Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteria: factors associated with infection in the community setting, Auckland, New Zealand*. J Hosp Infect. 2008; 68(4):355-62.

2. Shayanfar N, Rezaei M, Ahmadi M, Ehsanipour F. *Evaluation of extended spectrum beta lactamase (ESBL) positive strains of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in bacterial cultures*. Iran. J. Pathol. 2010; 5(1): 34-9.

3. Florijn A, Nijssen S, Smitz F, Verhoef J, Fluit A. *Comparison of E-tests and double disk diffusion tests for the detection of Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2002; 21:241-43.

4. Lewis JS, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH. *First Report of the Emergence of CTX-M Type ESBLs as the Predominant ESBL Isolated in a U.S. Healthcare System*. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(11): 4015–4021.

5. 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.*Razi. 2008; 60(2): 37-45.

6. Irajian G, Jazayeri-Moghadas A, Beheshti A. *Prevalence of extended-spectrum beta lactamase positive and multidrug resistance pattern of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates, Semnan, Iran.* IRAN. J. MICROBIOLogy. 2009; 1(1): 49- 53.

7. Feizabadi MM, Mahamadi-Yeganeh S, Mirsalehian A, Azimi P, Mirafshar SM, Mahboobi M, et al. *Genetic characterization of ESBL-producing strains of Klebsiella pneumoniae from Tehran hospitals.* J Infect Dev Ctries. 2010; 4(10): 609-615.

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

9. Ghafourian S,Bin Sekawi Z, Sadeghifard N, Mohebi R, kumari Neela V, Maleki A, et al. *The Prevalence of ESBLs Producing Klebsiella pneumoniae Isolates in Some Major Hospitals, Iran.* The Open Microbiology Journal. 2011; 5: 91-95.

10. Akpaka PE, Legall B, Padman J. *Molecular Detection and Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-lactamase Genes Prevalent in Clinical Isolates of Klebsiella pneumoniae and E coli from Trinidad and Tobago*. West Indian Med J. 2010; 59 (6): 591-96.

11. Tofteland s, Haldorsen b, Dahl KH, Simonsen GS, Steinbakk M, Walsh TR, et al. *Effects of Phenotype and Genotype on Methods for Detection of Extended Spectrum-Lactamase-Producing Clinical Isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Norway.* Journal Of Clinical Microbiology. 2007; 45(1): 199–205.

12. Astal Z, Sharif FA, Abdallah SA, Fahd MI. *Extended spectrum beta-lactamases in Eschericia coli isolated from community-acquired urinary tract infections in the Gaza Strip, Palestine.* Ann Saudi Med J. 2004; 24(1): 55-57.