Antibiotic Resistance Pattern and Prevalence of Beta-Lactamase *CTX-M Gene* in isolated ESBL-Producing *E.coli* in Mazandaran, Iran

Khalili A[1], Zaboli F[2*], Nazarian Sh[3]

[1]Master of Science , Department of Microbiology, Ayatollah AmoliBranch,Islamic Azad University, Amol, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Ayatollah AmoliBranch,Islamic Azad University, Amol, Iran
[3]Assistant Professor, Biology Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran.

Abstract

Background: *E. coli* is one of the prevalent factors in human infections, especially urinary tract infections. Extended-spectrum ß-lactamase (ESBL) producing bacteria causes resistance to cephalosporin. Furthermore, the enzyme with the origin of plasmid causes the bacterial resistance to beta-lactam antibiotics. The aim of this study was to determine antibiotic susceptibility patterns and prevalence of CTX-M-type ESBL in E. coli strains isolated from urine samples by phenotypic and genotypic methods.

Methods: This descriptive, cross-sectional study of six-month duration (from December to April 2016) was undertaken to investigate patients' antibiotic susceptibility. To fulfill that purpose, the urine samples of patients referred to seven clinics of the armed forces of the Mazandaran province were collected and antibiotic susceptibility of isolates by disk diffusion method on Mueller-Hinton agar was tested. To do confirmatory tests, the combined disk test method was performed. The test results were compared using standards Clinical and Laboratory standards (CLSIS). Ultimately, after DNA extraction by PCR method, isolates of ESBL positive for the presence of the CTX-M gene were examined and data were analyzed with SPSS software.

Results: Of the total 180 patients, 41 isolates of Escherichia coli were separated. From those, 21 isolates (51.21%) had produced ESBL. In PCR, 4(9.75%) of the ESBL positive isolates contained *CTX-M* gene. The highest resistance to antibiotics was observed for ampicillin (75.6%), cefalotin (58.5%), and cefazolin (60.9%) and the highest amount of sensitivity to antibiotics was seen for imipenem (75.6%), gentamicin (70.7%), and cefotaxime (60.9%).

Conclusion: Based on the observed high percentage of resistance to the third-generation-sfalspvryn, it is vitally important to perform precise and accurate antibiogram. Avoiding excessive over-prescription of antibiotics for infections caused by ESBL-producing organism is an inevitable necessity.

Key words: Escherichia coli; Drug Resistance Microbial; PCR; CTX-M

Sadra Med Sci J 2018; 6(2): 101-112.
Received: Oct. 31st, 2017
Accepted: Apr. 21st, 2018

[*]Corresponding Author: **Zaboli F,** Department of Microbiology, Ayatollah AmoliBranch,Islamic Azad University, Amol, Iran, m.zaboli1379@yahoo.com

مقاله پژوهشی
(Original Article)

مجـــــله علـــــوم پزشکی صدرا
دوره ۶، شماره ۲، بهار ۱۳۹۷، صفحات ۱۰۱ تا ۱۱۲
تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۰۱ تاریخ دریافت: ۹۶/۰۸/۰۹

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن بتالاکتامازی CTX-M در ایزوله های *اشریشیاکلی* مولد ESBL در استان مازندران

اکبر خلیلی[۱] ، فاطمه زابلی[۲*]، شهرام نظریان[۳]

[۱]کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران
[۲]استادیار،گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران
[۳]استادیار، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع) ، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: *اشریشیاکلی* یکی از عوامل شایع در عفونت انسانی بویژه عفونت دستگاه ادراری می‌باشد. *اشریشیاکلی*های تولید کننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف (ESBL) دارای مقاومت به سفالوسپورین می باشد. وجود این جدایه ها احتمال انتقال ژنهای مقاومت سفالوسپورینی و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سایر سویه ها را افزایش می دهد. لذا هدف از این مطالعه تعیین الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی و میزان فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف تیپ *CTX-M* در جدایه های *اشریشیاکلی* به روش فنوتیپی و ژنوتیپی بود.

مواد و روش: این مطالعه توصیفی، مقطعی به مدت شش ماه برروی نمونه‌های ادراری مراجعین به ۷ درمانگاه از مراکز درمانی نیروهای مسلح استان مازندران طی دوره ۶ ماهه در فاصله زمانی آذر ۹۴ تا اردیبهشت ۹۵انجام شد.گونه های *اشریشیاکلی* جداسازی و با روش‌های بیوشیمیایی تایید شدند. جهت بررسی حساسیت گونه ها ازروش combined disk test استفاده گردید و نتایج با استاندارد CLSI مقایسه شد.گونه های مقاوم از نظر وجود ژن *CTX-M*،توسط روش PCR بررسی و داده ها با برنامه نرم افزاری SPSS تجزیه وتحلیل گردید.

یافته ها: از تعداد کل ۱۸۰ نمونه بیمار ۴۱ جدایه *اشریشیاکلی* جدا شد. از این تعداد ۲۱ جدایه (۵۱/۲۱٪) مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بودند. در تست PCR ۴ مورد (۹/۷۵ ٪) از جدایه ESBL واجد ژن *CTX-M* بودند. در بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی بیشترین مقاومت در برابرآنتی بیوتیک‌های آمپی‌سیلین(۷۵/۶ درصد) سفالوتین (۵۸/۵ درصد) و سفازولین(۶۰/۹ درصد)بود. بیشترین مقدار حساسیت در برابر آنتی بیوتیک‌های ایمی‌پنم (۷۵/۶ درصد) جنتامایسین (۷۰/۷ درصد) و سفوتاکسیم (۶۰/۹ درصد) بود.

بحث و نتیجه گیری: با توجه درصد بالای مقاومت به سفالسپورین‌های نسل سوم، انجام دقیق آنتی بیوگرام و پرهیز از تجویز بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها در عفونت‌های ناشی از ارگانیسم های تولیدکننده ESBL یک ضرورت اجتناب ناپذیر است.

واژگان کلیدی:اشریشیاکلی، مقاومت دارویی میکروبی، واکنش زنجیره ای پلیمراز، CTX-M

*نویسنده مسئول: **فاطمه زابلی**، استادیار،گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، m.zaboli1379@yahoo.com

مقدمه

عفونت ادراری یکی از شایعترین عفونت ها و رتبه دوم پس از عفونت دستگاه تنفسی را تشکیل می دهد. میزان عفونت ادراری در کشورهای در حال توسعه حداقل ۲۵۰ میلیون نفر تخمین زده شده است(۱). عامل اصلی عفونت های ادراری *اشریشیاکلی* است. *اشریشیاکلی* علت ۸۰ تا ۸۵ درصد عفونت های دستگاه ادراری است. باکتری پس از راه پیدا کردن به مثانه قادر است به دیواره مثانه بچسبد و بیوفیلم مقاوم در برابر پاسخ ایمنی بدن را تشکیل دهند. باکتری های دیگر همانند استافیلو کوکوس ساپروفیتیکوس ۱۰-۵٪ و همچنین ویروس‌ها، قارچها و سایرعوامل باکتریایی مانند *کلبسیلا*،*پروتئوس*، *سودوموناس* و *انتروباکتر* به ندرت ممکن است موجب آن شود. این موارد چندان معمول نبوده و به طور معمول به ناهنجاری سیستم ادراری و یا سوند ادراری مربوط هستند (۲).

آنتی بیوتیک های گروه پنی سیلین و سفالسپورین تحت عنوان بتالاکتام بطور وسیع جهت درمان عفونت ادراری مورد استفاده قرار می گیرند و مهار سنتز دیواره سلولی باکتری را سبب می شوند. این آنتی بیوتیک ها در چهار گروه اصلی پنی سیلین ها، سفالسپورین ها و کارباپنم ها و منو باکتام ها قرار می گیرند و در حال حاضر شایع ترین داروهای آنتی بیوتیکی مورد استفاده برای درمان عفونت های باکتریال هستند. استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک های بتالاکتام باعث ایجاد آنزیم های بتالاکتاماز توسط باکتری ها گردید. بتالاکتامازها انواع گوناگون دارند که در سال های اخیر گروهی از این بتالاکتامازها به نام بتالاکتامازهای وسیع الطیف (*ESBL*، (Extended spectrum beta-lactamases توسط باکتری ها تولید شده که باعث ایجاد مقاومت علیه آنتی بیوتیک بتالاکتام وسیع الطیف جدید شده است (۳). بتالاکتاماز های وسیع الطیف *ESBL* برای اولین بار در سال ۱۹۸۰ شناخته شدند که بیشتر از نوع TEM(Temoneira) و SHV (Sulphydrylvariable) بودند. این آنزیم ها پیشتر به وسیله جهش های نقطه یاز آنزیم های اصلی فاقد فعالیت وسیع الطیف به وجود آمده اند(۴). خانواده *CTX-M* برای نخستین بار در سال ۱۹۸۹ از آلمان گزارش شد و پس از آن در نواحی مختلف جهان گسترش پیدا کرد.این نوع آنزیم بیشتر در *اشریشیاکلی وکلبسیلا پنومونیه* گزارش شده اما در انتروباکتریاسه دیگر نیز یافت می شود (۵). در سال های اخیر *ESBL*های نوع *CTX-M* جایگزین انواع *TEM*و *SHV* در اروپا،کانادا، آفریقا وآسیا شده است و شایعترین نوع*ESBL* به حساب می آید(۶-۹). بتالاکتاماز های وسیع الطیف گروه *CTX-M* به خاطر فعالیت بیشتر علیه سفوتاکسیم نسبت به سفتازیدیوم از دیگر گروه های *ESBL* مانند*TEM* و *SHV* متمایز می شوند(۱۱و۱۰). طی سال های گذشته شیوع سویه های مولداین بتالاکتامازها در بین جدایه های کلینیکی رو به افزایش بوده و منجر به محدود سازی درمان های دارویی مناسب شده است.این آنزیم ها مقاومت دارویی چندگانه دارند که باعث افزایش شیوع عفونت و مرگ ومیر در بیماران بستری در بیمارستان، بویژه بیماران بخش مراقبت های ویژه هستند(۳). به نظر می رسد یکی از مهمترین فاکتورهای دخیل درایجاد سویه های *ESBL* تجویز بی رویه و خارج از محدوده دستورالعمل پذیرفته شده آنتی بیوتیک ها توسط پزشکان می باشد.درمان عفونت های ناشی از *اشریشیاکلی* های واجد آنزیم های بتالاکتاماز با مشکل مواجه است. از یک طرف مقاومت به طیف زیادی از آنتی بیوتیک های سفالوسپورین ها مشاهده می شود و از سویی دیگر بسیاری از ژن های مولد *ESBL* بر روی پلاسمیدهای بزرگی قرار دارند که می توانند انتقال دهنده ژنهای مقاومت به سایر عوامل ضد میکروبی از جمله تتراسایکلین، کلرامفنیکل و آمینوگلیکوزیدها باشند(۱۲و۱۳. با توجه به اینکه بسیاری از آزمایشگاه های تشخیص طبی، شناسایی سویه های مولد آنزیم های بتالاکتاماز را انجام نمی دهند، از این رو در این تحقیق به بررسی ژنوتیپی *ESBL* های*E.coli*جدا شده از نمونه

های ادراری مراجعین بـه درمانگـاه هـای نیروهـای مسـلح استان مازنـدران مـی پـردازیم کـه سـهم قابـل تـوجهی از مراجعین را در استان مازندران تشکیل می دهند و تاکنون تحقیقی در این زمینه در این مراکز صورت نگرفته است.

مواد و روش

نمونه گیری و جداسازی سویه ها

در این مطالعه که بصورت توصیفی مقطعی بـوده کـه طـی دوره ۶ ماهه انجام گرفت. در این مطالعه قبل از شروع کـار طی هماهنگی های لازم با مسئولین درمانگاه های نیروهای مسلح استان مازندران در خصوص قلمرو مکانی انجام کار با موضوع ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی از نمونه هـای بالینی این مراکز انجام شده است. جامعه پـژوهش و مـورد مطالعه ما جهت ارزیابی کلیه مراجعین بیماربـه آزمایشـگاه درمانگـاه هـای نیروهـای مسـلح اسـتان مازنـدران شـامل درمانگاه تاسوعا بابل، درمانگـاه شـهید زاهـد پاشـا امیرکلـا بابل، درمانگاه باب الحـوائج بابلسـر، درمانگـاه ولیعصـر(عج) ساری، درمانگاه انصـار سـاری و درمانگـاه بقیـه الـه اعظـم نیروی انتظامی ساری بوده است. نمونه مورد مطالعه شامل نمونه های ادراری مراجعین به درمانگاه های فـوق در یـک دوره ۶ ماهه به روش تصادفی در فاصـله زمـانی آذر ۹۴ تـا اردیبهشت ۹۵ جمع آوری شده اسـت. جهـت جمـع آوری نمونه های ادرار از ظرف پلاستیکی استریل با درب گشاد و روش نمونـه گیـری از ادرار میـانی در شـرایط بهداشـتی استفاده شد. نمونه ادراری درمحیط بلاد آگـار و *EMB* بـا استفاده از لوپ کشت داده شدو در ۳۷ درجه به مـدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از گذشت ۲۴سـاعت محیطهـای کشت مورد بررسی قرار گرفتند و محیط هـایی کـه تعـداد کلنی آنها بـیش از۱۰۵بودبـه عنـوان نمونـه مثبـت تلقـی گردید.برای آزمایش شناسایی اشکال و آرایش های متفاوت باکتری‌ها از مشـاهده مسـتقیم بـاکتری و بـرای تشـخیص افتراقـی باسـیل هـای خـانواده آنتروباکتریاسـه از تسـت اکسیداز استفاده شد. این تست در خانواده آنتروباکتریاسـه به علت نداشتن آنزیم سیتوکروم اکسیداز منفی است. برای بررسی نحوه مصرف قندهای گلوکز و لاکتوز و تولید گـاز و تولیـد H_2S از تسـت *TSI* یـا *Triple suger iron agar* استفاده گردید.

ارزیابی حساسیت ضد میکروبی

در این مرحله با استفاده از دستورالعمل *Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI*به منظور شناسایی اولیه ی ارگانیسم های تولیـد کننـده *ESBL*، از آزمون دیسک آگار دیفیـوژن (*Disk Agar Diffusion DAD*) استفاده شد(۱۲).الگوی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیـوژن بـا دیسـک هـای آنتـی بیـوتیکی جنتامایسـین(۳۰µg)،ایمـی پـنم(۳۰µg)، سـفتازیدیم(۳۰µg)، سفتریاکسـون(۳۰µg)، آمپـی سیلین(۱۰µg)، سفالکسـین(۳۰µg)، سـفالوتین(۳۰µg)، سفکسیم(۳۰µg)، سفازولین(۳۰µg)، سفاتوکسیم(۳۰µg) که از شرکت *Mast* تهیه شده بودند، انجام گرفت. از سویه اسـتاندارد اشریشـاکولی *ATCC 25922* نیـز بـه عنـوان کنترل کیفـی روش آنتـی بیـوگرام اسـتفاده شـد. کـاهش حساسیت در این سـویه هـا مـی توانـد گـواهی بـر وجـود مقاومت باشد.وجودهر نوع کاهش حساسیت در سویه هـای بررسی شده نشانگر مقاومت سویه به آنتـی بیوتیـک مـورد نظر می باشد.

ارزیابی تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف

برای تایید تولید بتالاکتاماز های وسیع الطیف در ارگانیسم هـای مقـاوم از روش*combined disk test* اسـتفاده گردیـــد(۱۳). در ایـــن روش هماننـــد الگـــوی روش *DAD*غربالی، پـس از تهیـه محـیط مـولر هینتـون آگـار، سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با غلظت نیم مک فارلنـد در تمام سطح محیط مذکور پخش شـد سـپس از دیسـک هـــای ۳۰ میکروگرمـــی سفوتاکســـیم و ســـفتازیدیوم در مجاورت دیسک مرکب آنهـا بـا ۱۰ میکروگـرم کلاولونیـک اسید در این محیط استفاده شد.در صورتی کـه قطـر هالـه عدم رشد باکتری اطراف دیسک ترکیبی حداقل ۵ میلیمتر

بیشتر از قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک منفرد همان آنتی بیوتیک باشد به عنوان سویه مولدبتالاکتاماز های وسیع الطیف قلمداد گردید.

شناسایی ژن مولد آنزیم بتا لاکتاماز *CTX-M*

برای تایید ژنوتیپی میکرو ارگانیسم های تولید کننده بتالاکتاماز بدست آمده از روش *PCR* استفاده شد. ابتدا چند کلنی از باکتری را در ۱۰*ml* محیط *TSB)Tryptic Soy Broth*مرک آلمان) کشت داده و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد ، با استفاده از روش *CTAB-NaCl* ژنوم جدایه های مورد نظر استخراج گردید.جهت بررسی میزان فراوانی ژنهای بتا لاکتاماز *CTX-M* تست *PCR* با استفاده از *DNA* استخراج شده و پرایمر های اختصاصی طراحی شده صورت گرفت (جدول ۱). واکنش *PCR* در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میلی مولار*MgCl2*، ۰/۲ میلی مولار*dNTPs*، ۱۰ پیکو مول از هر پرایمر و ۲۰۰ نانوگرم از *DNA* استخراج شده ، ۱ واحد آنزیم *Taq DNA polymerase* و ۲/۵ میکرو لیتر از بافر *10X PCR* بود.

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی اشریشیا کلی های مولد ***CTX-M***

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی پرایمر مورد استفاده	اندازه محصول (جفت باز)
CTXMU-F	*5′ ATGTGCAGYACCAGTAARGT 3′*	۵۹۴
CTXMU-R	*5′ TGGGTRAARTARGTSACCAGA 3′*	

برنامه دستگاه ترموسایکلرشامل: مرحله واسرشته شدن اولیه در دمای۹۴درجه سانتی گراد به مدت۵ دقیقه، که با۳۰سیکل با شرایط دمای واسرشته شدن۹۴ درجه سانتی گراد به مدت۴۵ ثانیه، مرحله اتصال در دمای۵۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن در دمای ۷۲درجه سانتی گراد به مدت۴۰ ثانیه و سیکل پایانی مربوط به مرحله طویل شدن دردمای۷۲درجه سانتی گراد به مدت ۵دقیقه ادامه یافت. درتحقیق حاضر به منظور اطمینان از چرخه *PCR* در نمونه هایی که از نظر ژن بتالاکتاماز *CTX-M* منفی بوده و در الکتروفورز نهایی فاقد باند می باشند، به عنوان کنترل به همراه پرایمر های اختصاصی ژن بتالاکتاماز *CTX-M* در واکنش *PCR* استفاده گردید. برای تائید و اطمینان از صحت آزمایش محصول *PCR* تعیین توالی شد. پس از دریافت جواب تعیین توالی، سکانس از طریق برنامه *blast* موجود در پایگاه *NCBI* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. محصول *PCR* برای بررسی وجود ژن های مورد نظر در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد که برای این منظور۶ میکرولیتر از محصول *PCR* و۴ میکرولیتر *Loading Buffer*با هم مخلوط و در چاهک ژل ریخته شد. دستگاه الکتروفورز برروی ولتاژ ۱۰۰ولت و۵۰ میلی آمپر تنظیم والکتروفورز انجام شد. ژل آگارز درمحلول اتیدیوم بروماید به مدت ۱۵دقیقه قرار داده شد وسپس وجود باند دردستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز نتایج و تست مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون تی تست و با نرم افزار*SPSS (Version 22)* انجام شد.

یافته ها

از ۱۸۰ نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری مورد بررسی، ۴۱ سویه *E.coli* جدا و توسط آزمون های بیوشیمیایی تایید شدند. محدوده سنی بیماران از زیر یک سال تا سن ۸۰سالگی متغیر بود و میانگین سنی بیماران ۳۵سال بود. ۲۷نفر۸۵/۶۵ درص از بیماران زن بودند و ۳۲نفر از بیماران در شهر سکونت داشتند.۳ مورد از

بیماران سابقه استفاده از سوند را داشتند و۱۴ مورد از بیماران سابقه حداقل یکبار عفونت ادراری در سال اخیر را گزارش کردند. ۸ بیمار نیز دارای علامت سوزش ادراری بودند. بر اساس نتایج حاصل از آزمون غربالی *DAD*، ۲۱ سویه به عنوان تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف تشخیص داده شدند. با استفاده از آزمون *combind disk test*همه ۲۱ سویه به عنوان تولید کننده نهایی *ESBL* تایید شدند (جدول ۲).

جدول ۲. نتایج تست های تاییدی مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی

هاله های توقف رشد	آنتی بیوتیک های دیسک ترکیبی
افزایش هاله	۲۱(۵۱ درصد)
عدم افزایش هاله	۲۰(۴۷ درصد)

نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت نسبت به ۱۰ آنتی بیوتیک انتخاب شده نیز در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳. نتایج ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

آنتی بیوتیک	حساس		نیمه حساس		مقاوم	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
ایمی پنم	۳۱	۷۵/۶۰	۴	۹/۷۵	۶	۱۴/۶۳
جنتامایسین	۲۹	۷۰/۷۳	۵	۱۲/۱۹	۷	۱۷/۰۷
سفتریاکسون	۲۳	۵۶/۰۹	۲	۴/۸۷	۱۶	۳۹/۰۲
آمپی سیلین	۶	۱۴/۶۳	۳	۷/۳۱	۳۲	۷۸/۰۴
سفالکسین	۱۷	۴۱/۴۶	۵	۱۲/۱۹	۱۹	۴۶/۳۴
سفالوتین	۱۲	۲۹/۲۶	۵	۱۲/۱۹	۲۴	۵۸/۵۳
سفکسیم	۲۲	۵۳/۶۵	۲	۴/۸۷	۱۷	۴۱/۴۶
سفازولین	۱۱	۲۶/۸۲	۵	۱۲/۱۹	۲۵	۶۰/۹۷
سفتازیدیم	۲۴	۵۸/۵۳	۳	۷/۳۱	۱۴	۳۴/۱۴
سفوتاکسیم	۲۵	۶۰/۹۷	۳	۷/۳۱	۱۳	۳۱/۷۰

در این بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی، بیشترین مقاومت در برابرآنتی بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۷۵/۶ درصد)، سفالوتین (۵۸/۵ درصد) و سفازولین(۶۰/۹ درصد)بود. بیشترین مقدار حساسیت در برابر آنتی بیوتیک‌های ایمی-پنم (۷۵/۶ درصد)، جنتامایسین (۷۰/۷ درصد) و سفوتاکسیم (۶۰/۹ درصد) بوده است. فراوانی ESBL در *اشریشیاکلی* به هیچ یک از عوامل دموگرافیک بیماران مثل محل زندگی، قومیت، جنس (جداول۴) و نیزعلائم بالین مثل سوزش، تکرر، دفع ناقص ادرار و درد پهلو بستگی نداشت($P>0/05$).

جدول ۴. توزیع فراوانی عوامل دموگرافیک در بیماران مبتلا به به عفونت های ادراری ناشی از اشریشیا کلی در گروه **ESBL** و غیر **ESBL**

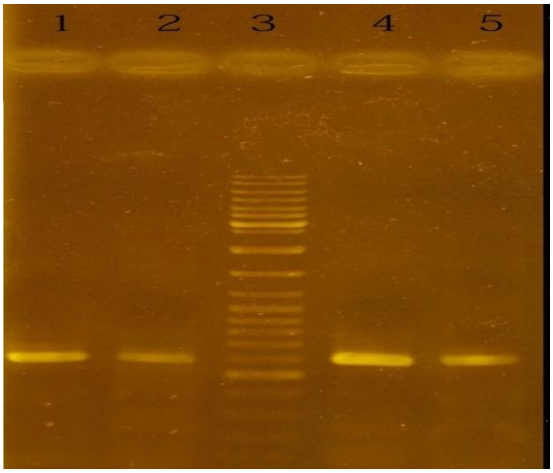
متغیر	شرح	تعداد(درصد) *ESBL*	تعداد(درصد) *NON ESBL*	*p-value*
محل زندگی	شهر	۱۴(۵۳/۸۴)	۱۲(۴۶/۱۵)	P>۰/۰۵
	روستا	۷(۴۶/۶۶)	۸(۵۳/۳۴)	
جنسیت	مرد	۱۶(۵۹/۲۹)	۱۱(۴۰/۷۴)	P>۰/۰۵
	زن	۵(۳۵/۷۴)	۹(۶۴/۲۸)	

ولـــی در اســـتفاده از ســـوند و ســـابقه عفونـــت ادراری در ســال اخیــر توزیــع فراوانــی *ESBL* و غیــر *ESBL* تفاوت معنی داری بود (جدول۵).

جدول۵. توزیع فراوانی بعضی از علائم بالینی مبتلا به عفونت های ادراری ناشی از اشریشیا کلی در گروه *ESBL*وغیر *SBL*

علائم بالینی	*ESBL*	*NON ESBL*
سوزش ادرار	٪۵۸	٪۶۱,۹۰
تکرر ادرار	٪۶۱	٪۵۲,۱۰
دفع ناقص ادرار	٪۲۳,۱۰	٪۳۲,۸۰
درد پهلو	٪۳۶,۲۰	٪۳۱,۱۰
تب	٪۲۶,۱۰	٪۲۴,۹۰
سابقه مصرف آنتی بیوتیک	٪۶۴,۱۰	٪۶۷,۶۰
سابقه بستری	٪۱۹,۱۰	٪۱۲,۹۰
سابقه استفاده از سوند	٪۳۱,۷۰	٪۶,۱۰
سابقه ابتلا به عفونت ادراری در سال اخیر	٪۶۶,۹۰	٪۲۸,۱۰

در طی روش *PCR* که بر روی ۲۱ جدایـه *ESBL* انجـام شد، مشخص شد که از این میان ۴ مـورد (۹/۷۵ ٪) مولـد بتالاکتامازهای وسـیع الطیـف مثبـت واجـد ژن *CTX-M* تشخیص داده شدند (شکل ۱).



شکل ۱. شناسایی مولکولی ژن *CTX-M* در باکتری های جدا شده

ستون۱) محصول *PCR* تکثیر شده از باکتری شماره ۱،
ستون۲) محصول *PCR* تکثیر شده از باکتری شماره ۴،
ستون۳)نشانگر اندازه مولکولی(*DNA Ladder Mix*)،
ستون۴) محصول *PCR* تکثیر شده از باکتری شماره ۱۰،
ستون۵) محصول *PCR* تکثیر شده از باکتری شماره ۱۶

بحث

عفونت های ادراری از شایع ترین عفونت های ایجاد شده در انسان است و بیشترین علت مراجعه به پزشکان در گروه های مختلف سنی است. شایعترین ارگانیسم عفونت ادراری *اشریشیاکلی* می باشد که این ارگانیسم باعث ایجاد ۷۵ تا ۹۰ درصد از عفونت های ادراری در هر دو جنس زن و مرد می شود(۱۵ و۱۴).

باکتری *اشریشیاکلی* یکی از پاتوژنهای مهمی است که سبب افزایش مقاومت نسبت به اغلب آنتی بیوتیک ها شده است (۱۶و۱۷). در اکثر موارد به علت استفاده بی رویه و خودسرانه آنتی بیوتیک ها شاهد موارد زیادی از مقاومت های دارویی نسبت به آنتی بیوتیک ها در مناطق مختلف ایران و جهان به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه های ایجاد کننده و تفاوت در میزان مصرف آنتی بیوتیک ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی بیوتیک ها، متفاوت می باشند مقاومت باکتریها در برابر آنتی بیوتیک ها بصورت وراثتی و اکتسابی می باشد.

بتالاکتامازهای وسیع الطیف نه تنها در میان سویه های بالینی در کشورهای مختلف دارای شیوع متفاوتی می باشند بلکه در یک کشور نیز با توجه مکان جغرافیایی متفاوت هستند. در مطالعه ای که محمدکاظم شریفی و همکاران بر روی نمونه های ادراری در بیمارستانهای خوی انجام دادند ۲۹/۸ درصد از جدایه های مولد *ESBL* بودند که همه جدایه های آن به ایمی پنم حساس بودند و ۸۷/۵ درصد جدایه ها تولید کننده آنزیم گروه *CTX-M* بوده اند(۱۸)، ولی در مطالعه ما ۲۱جدایه (۵۱٪) مولد *ESBL* بودند که ۹/۷۵ درصد از این جدایه ها گروه *CTX-M* بودند. در این بررسی ۷۵٪ جدایه ها به ایمی پنم حساس بوده اند که این اختلاف نتایج را می توان در منبع عفونت، تعداد نمونه های بررسی شده و سیستم کنترل عفونت، نوع نمونه (بیمارستانی، سرپایی) عنوان کرد. در یک مطالعه که توسط یزدی و همکاران بر روی ۲۴۶ جدایه های *E.coli* جدا شده از بیمارستان‌های شهر تهران انجام دادند ۴۴/۳ درصد آن *ESBL* مثبت و ۶۸/۸ آن واحد ژن *CTX-M* بودند که ۴۷/۱ درصد آن مقاوم به سفتازیدیم و ۳۹/۲ آن مقاوم به سفوتاکسیم بودند (۱۹). در صورتی که در مطالعه ما میزان نمونه های *ESBL* مثبت ۵۱/۲۱ و میزان ژن *CTX-M* ۹/۷۵ درصد می باشد و میزان مقاومت به سفتازیدیم ۳۴/۱ درصد و میزان مقاومت به سفوتاکسیم ۳۱/۱۹ درصد بوده است که این اختلاف نتایج را به خصوص در میزان ژن *CTX* را می توان در نوع نمونه، میزان مصرف آنتی بیوتیک ها عنوان کرد.

درمطالعه ای که مجتبی مهدی پوردر بیماران سرپایی وبستری دربیمارستان یحیی نژاد بابل انجام دادند از۱۸۴۲کشت ادرار انجام شده ۸۴مورد*E.coli* مثبت که ۲۹مورد (٪۳۴/۵) مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند که۲۰مورد(٪۶۹)واجد ژن *CTX-M* بودندکه ازمطالعه ما بیشتر بوده است که این تفاوت ممکن است نشان از سابقه

های قبلی مواجهه با عفونت ومصرف بیشترآنتی بیوتیک بوده باشد(۲۰).

همچنین طی تحقیقی که مهاجری و همکاران بر روی ۲۰۰جدایه *E.coli* درشهر کرمانشاه انجام دادند میزان مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم ۷۵-۶۳ درصد بود که پنجاه و چهار مورد (۲۷٪) ازجدایه های مورد بررسی *ESBL*تولید کردندکه ۵۳ جدایه (۹۸٪) از جدایه های دارای آنزیم *CTX*مثبت بودند که این تفاوت ممکن است به مناطق نمونه گیری، مشخصات بیماران مورد بررسی عامل ان باشدو یابه تفاوت ژنتیکی افراد وتفاوت ژنتیکی سویه ها مربوط باشد(۱۰).

با توجه به نتایج این تحقیق که نمونه های ادراری بودند، از این میان ۶۵/۸۵ ٪ نمونه های مربوط به زنان بوده اند که نشان می دهد عفونت ادراری در زنان شایع‌تر بوده و دلیل بروز این مشکل مربوط به آناتومی خاص دستگاه ادراری و کوتاه بودن مجرای ادراری در زنان می باشد در مطالعه حاضر جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها کمترین مقاومت به ایمی پنم مشاهده شده که در مقایسه با مطالعه شریفی و همکارانش در خوی(۱۸) و مهسا یزدی در تهران(۱۹)، حقیقت پناه و همکاران در رشت(۲۱) و محمد حامد در مصر(۲۲) مطابقت دارد که نشان می دهد که کارباپنم ها از جمله آنتی بیوتیک های پایدار در برابر ارگانیسم های تولید کننده بتالاکتازهای وسیع الطیف به خصوص *E.coli*می باشند.

شناسایی سریع سویه های تولید کننده *ESBL* در آزمایشگاه های میکروب شناسی بسیار مهم و ضروری است. درمان تجربی عفونت های مقاوم در برابر دارو باعث افزایش هزینه ها، عوارض جانبی برای بیمار و به خطر افتادن جان بیمار می گردد.انتخاب آنتی بیوتیک باید بر اساس نوع پاتوژن، الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی، مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیک، میزان تحمل به دارو ایمنی بیمار انجام گیرد به همین دلیل تمامی مراکز درمانی باید دارای سیاست مدون و برنامه های مناسب جهت استفاده از آنتی بیوتیک ها باشند که هدف از این کار اطمینان از تجویز مناسب آنتی بیوتیک موثر و اقتصادی آنتی بیوتیک ها جهت پیشگیری از ایجاد میکروارگانیسم های مقاوم و کاهش انتشار آنها باشد.

نتیجه گیری

با توجه به اهمیت نقش این آنتی بیوتیک های در درمان عفونت های باکتریایی مقاومت به این آنتی بیوتیک های وسیع الطیف خطر بزرگی بخصوص برای بیماران بستری در بیمارستان محسوب می شود و بزودی جهت جایگزینی آنها نیاز به آنتی بیوتیک های جدید خواهیم داشت. با توجه به حساسیت بالای همه جدایه مورد مطالعه به ایمی پنم و جنتامایسین، این توصیه را به ما رهنمون می سازد که در درمان عفونت های باکتریال با کمک متخصصین آزمایشگاه به دنبال تعیین الگوی حساسیت دقیق از یک بتالاکتام در ترکیب با یک بازدارنده بتالاکتاماز استفاده می شود بدین طریق از گسترش بتالاکتازهای وسیع الطیف در بین سویه های مختلف باکتریایی کاسته شده و از بسط عفونت های مقاوم و نیز روز افزون شدن مرگ و میر در مراکز درمانی پیشگیری شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی برای فراهم کردن امکانات لازم جهت اجرای این طرح دانشجویی کمال تشکر را دارند. نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

1. Nicolle LE. Uncomplicated urinary tract infection in adults including uncomplicated pyelonephritis. Urol Clin North Am. 2008;35:1-12.

2. Amdekar S, Singh V, Singh DD. Probiotic therapy: immunomodulating

approach toward urinary tract infection. Curr Microbiol. 2011;63:484.

3. Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, Goering RV, Nathan C, Bush K, et al. Multiple antibiotic–resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. Jama. 1999;281:517-23.

4. Raveh D, Yinnon AM, Broide E, Rudensky B. Susceptibilities of ESBL-producing Enterobacteriaceae to ertapenem, meropenem and piperacillin-tazobactam with and without clavulanic acid. Chemotherapy. 2007;53:185-9.

5. Matthew M. Plasmid-mediated β-lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. J Antimicrob Chemother. 1979;5:349-58.

6. Sidjabat HE, Paterson DL, Adams-Haduch JM, Ewan L, Pasculle AW, Muto CA, et al. Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates at a tertiary medical center in western Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:4733-9.

7. Khalaf NG, Eletreby MM, Hanson ND. Characterization of CTX-M ESBLs in Enterobacter cloacae, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Cairo, Egypt. BMC infect dis. 2009;9:84.

8. Moubareck C, Daoud Z, Hakimé NI, Hamzé M, Mangeney N, Matta H, et al. Countrywide spread of community-and hospital-acquired extended-spectrum β-lactamase (CTX-M-15)-producing Enterobacteriaceae in Lebanon. J Clin Microbiol. 2005;43:3309-13.

9. Poirel L, Decousser J-W, Nordmann P. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a blaCTX-M β-lactamase gene. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:2938-45.

10. Mohajeri P, Izadi B, Rezai M, Falahi B, Khademi H, Ebrahimi R. Assessment of the frequency of extended spectrum beta lactamases producing *Escherichia coli* isolated from Urinary tract infections and its antibiotic resistance pattern in kermanshah. J Ardabil Univ Med Sci. 2011;11:86-94.

11. Kurokawa H, Shibata N, Doi Y, Shibayama K, Kamachi K, Yagi T, et al. A new TEM-derived extended-spectrum β-lactamase (TEM-91) with an R164C substitution at the Ω-loop confers ceftazidime resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:2981-3.

12. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol rev. 2005;18:657-86.

13. Petroni A, Corso A, Melano R, Cacace ML, Bru AM, Rossi A, et al. Plasmidic extended-spectrum β-lactamases in Vibrio cholerae O1 El Tor isolates in Argentina. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:1462-8.

14. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of bla CTX-M-type and bla PER-2 β-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals.J Antimicrob Chemother. 2006;57:975-8.

15. Winokur P, Canton R, Casellas J-M, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clin Infect Dis. 2001;32:S94-S103.

16. Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez M, Costa N, Korbenfeld D, et al. Extended-spectrum β-lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:2864-7.

17. Pallecchi L, Malossi M, Mantella A, Gotuzzo E, Trigoso C, Bartoloni A, et al. Detection of CTX-M-type β-lactamase genes in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy children in Bolivia and Peru. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(12):4556-61.

18. Azarsa M, Shirazi M, Rastegar Lari A, Owlia P, Molla Aghamirzaei H, Sabbaghi A, et al. The frequency of extended spectrum beta lactamase and CTX MI of *Escherichia coli* isolated from the urine tract infection of patients by phenotypic and pcr methods in the city of khoy in iran. ZUMS Journal. 2011;19:53-61.

19. Yazdi M, Nazemi A, Mir Inargasi M, Khataminejad MR, Sharifi S, M. BK. Prevalence of shv/ctx-m/tem (esbl) beta-lactamase resistance genes in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in tehran, iran. Med Lab J. 2010;4:7.

20. Zaboli F, Mahdipour Mir SM. Evaluation of antibiotic resistance and CTX-M gene in ESBL-producing *Escherichia coli* by PCR among urine samples of patients reffering to Yahyanejad hospital of Babol city, Iran. Hakim Jorjani J. 2017;4:34-47.

21. Haghighatpanah M, Amirmozafari N, Faezi M, Shenagari M. Investigating the Level of Antibiotic Resistance and Detection of Betalactamase of blaTEM High Frequency in the ESBLs Producing *E. coli* Isolated in Rasht. Sjimu 2014;22:180-189.

22. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β-lactamases. Res Microbiol. 2004;155(6):409-21.

Cite this article as:
Khalili A, Zaboli F, Nazarian Sh. Antibiotic Resistance Pattern and Prevalence of Beta-Lactamase *CTX-M Gene* in isolated ESBL-Producing *E.coli* in Mazandaran, Iran. Sadra Med Sci J 2018; 6(2): 101-112.