

بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی و ردیابی بتالاكتاماز طیف وسیع TEM در جدایه های بالینی اشریشیاکلايمولد ESBL در شهر رشت

مریم حقیقت پناه^{۱*}، نور امیرمظفري^۲، محمد فائزى^۱، محمد شناگرى^۳

(۱) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان

(۲) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

(۳) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کیلان

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۰

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۷

چکیده

مقدمه: E.coli یکی از عوامل شایع در عفونت های بیمارستانی محسوب می گردد. مقاومت آنتی بیوتیکی منجر به شکست درمان عفونت های ناشی از E.coli می شود. تولید بتالاكتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) توسط این باکتریاز علل مقاومت آنتی بیوتیکی است. این آنزیم ها منشاء پلاسمیدی داشته و اکثر آن ها مشتقاتی از آنزیم های TEM و SHV می باشند. هدف از این مطالعه تعیین میزان فراوانی ژن bla_{TEM} در سویه های E.coli مولد ESBLs جدا شده از بیماران بستری در ۶ بیمارستان شهر رشت بود.

مواد و روش ها: از نمونه های مختلف بیماران بستری شده، ۱۶۰ مورد اشریشیاکلاي جدا گردید. تست حساسیت آنتی بیوتیکی به روش Kirby-Bauer ارزیابی گردید و برای ایزوله های مقاوم، تست دابل دیسک به منظور شناسایی سویه های مولد ESBL انجام گرفت. سپس از سویه های مولد ESBL، DNA پلاسمیدی استخراج و با استفاده از PCR ژن bla_{TEM} شناسایی شد.

یافته های پژوهشی: از بین ۱۶۰ ایزوله E.coli جدا شده، بیشترین مقاومت سویه ها در برابر آموکسیسیلین بود و همه ایزوله ها به ایمنی پنم حساس بودند. در تمامی سویه ها ۵۱/۹ درصد تولیدکننده ESBL بودند و ژن bla_{TEM} در ۲۷ سویه (۳۲/۵ درصد) توسط روش PCR شناسایی شد.

بحث و نتیجه گیری: در این تحقیق، بیش از ۵۰ درصد ایزوله ها مولد ESBL بودند که بیش از نیمی از آن ها حامل ژن bla_{TEM} بودند. مقایسه این نتایج با سایر مطالعات انجام شده در این زمینه نشان می دهد که گسترش مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های بتالاكتام با انتقال ژن هایی مانند bla_{TEM} رابطه مستقیم دارد.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلاي، بتالاكتامازهای وسیع الطیف، bla_{TEM}

*نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان

Email: m.haghighatpanah@gmail.com

مقدمه

اشریشیاکلاهی به عنوان یکی از شایع ترین عوامل اتیولوژیک در عفونت های بیمارستانی به حساب می آید، (۱). *E.coli* یک باسیل گرم منفی، بی هوازی اختیاری و متحرک از خانواده *Enterobacteriaceae* است و عامل بیماری هایی از قبیل گاستروانتریت، سپسیس، مننژیت، عفونت دستگاه تنفسی، عفونت زخم و به خصوص عفونت ادراری می باشد، (۱،۲). بتالاکتام ها از جمله آنتی بیوتیک هایی هستند که برای کنترل عفونت های ناشی از این باکتری، از آن ها استفاده می شود. متأسفانه امروزه درمان این عفونت ها با مشکلات زیادی رو به رو شده است و یکی از دلایل آن اکتساب پلاسمیدهای کدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف توسط باکتری ها می باشد، (۱،۳). این آنزیم ها با هیدرولیز حلقه بتالاکتام اکسی ایمینوتا-لاکتام ها از قبیل پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها باعث غیر فعال شدن آن ها می گردند، (۴). در چندین سال اخیر، در سراسر دنیا اپیدمی های بسیاری از عفونت با ارگانیسم های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف گزارش شده است، (۵). میزان این عفونت ها در مقایسه با عفونت های ایجاد شده توسط باکتری های حساس به دارو بالا بوده و از ۴۲ تا ۱۰۰ درصد متغیر است، (۶). بتالاکتاماز TEM برای اولین بار در سال ۱۹۶۵ گزارش شد. این بتالاکتاماز اغلب در *Escherichia coli* و *Klebsiellapneumoniae* یافت می شود. از میان این بتالاکتامازها، بتالاکتاماز TEM-1 مسئول بیش از ۹۰ درصد مقاومت به آمپی سیلین در *Escherichia coli* می باشد. علاوه بر آن TEM-1 قادر به هیدرولیز پنی سیلین ها و سفالوسپورین های نسل اول مانند سفالوتین و سفالوریدین است. به طور عمده استفاده از سفالوسپورین های وسیع الطیف در بخش های بیمارستانی سبب گسترش بتالاکتامازهای وسیع الطیف شده است، (۵). تاکنون بیش از ۱۳۰ نوع آنزیم TEM شناسایی شده است که گزارش متفاوتی از شیوع برخی از آن ها در مناطق مختلف دنیا صورت گرفته است به طور مثال شایع ترین انواع این آنزیم ها در آمریکای شمالی، TEM-10، TEM-12 و TEM-26 می باشند، (۷). در یک مطالعه بر روی سویه های *E.coli* در ترکیه، فراوانی ژن TEM ۷۲ درصد و در بررسی مشابه دیگری در هند این میزان ۳۰ درصد گزارش شد، (۸،۹). مسجیدیان و همکاران در سال ۱۳۸۶ در اصفهان، فراوانی ژن TEM را در سویه های *E.coli* ۸۴/۶ درصد گزارش کردند، (۱۰). شناسایی سویه های مولد

بتالاکتامازهای وسیع الطیف می تواند اطلاعات اپیدمیولوژیکی مفیدی از الگوی مقاومت میکروارگانیسم های عامل عفونت های بیمارستانی ارائه نموده و ما را در انتخاب صحیح آنتی بیوتیک راهنمایی نماید، (۳). از آن جایی که انجام تست های فنوتیپی به تنهایی قادر به تعیین سویه های مولد انواع آنزیم های ESBL نمی باشد لذا متدهای مولکولی یکی از کارآمدترین روش ها در تشخیص ژن های مرتبط با ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی می باشند و استفاده از این روش ها علی رغم هزینه های بالا نسبت به روش های فنوتیپی در تعیین سویه های مقاوم حائز اهمیت خواهد بود. با توجه به این که ژن TEM یکی از ژن های مربوط به ESBL می باشد و تحقیقات زیادی در این زمینه انجام پذیرفته است اما در طی بررسی های انجام شده توسط نویسندگان این مقاله، مشخص گردید که اطلاعات جامعی در زمینه میزان فراوانی این ژن در استان گیلان وجود نداشته است. بنا بر این، با توجه به این که میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در مناطق مختلف جغرافیایی، متفاوت است هدف اصلی این تحقیق، تعیین میزان شیوع این ژن در سویه های *E.coli* جدا شده از بیماران بستری در شهر رشت بود. تعیین فراوانی ژن TEM که از جمله ژن های ایجاد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های *E.coli* می باشد، از نظر اپیدمیولوژیکی بسیار حائز اهمیت است.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، تعداد ۱۶۰ ایزوله بالینی *E.coli* جهت بررسی محاسبه گردید. نمونه های جمع آوری شده جهت جداسازی سویه های اشریشیاکلاهی در محیط های کشت Blood Agar و EMB و Agar کشت و سپس در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. با استفاده از تست های میکروبیولوژیکی، کلنی های به دست آمده به عنوان اشریشیاکلاهی شناسایی و تایید گردید، (۱۱)

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: برای انجام این تست، سوسپانسیون میکروبی برابر با غلظت نیم مک فارلند تهیه و ، آلمان) کشت پر Merck بر روی محیط مولر هیتون آگار) ، MAST داده شد و سپس دیسک های آنتی بیوتیکی) Aztreonam 30, Gentamicin 10, Ciprofloxacin 5, Cefotaxime 30, Cotrimoxazole 25, Ofloxacin 5, Imipenem 10, Amoxicillin 25, Cefixime 5, Tetracycline 30, Cefepime 30, Cephalothin 30, Cefoxitin 30, Ampicillin 10, Nitrofurantoin 300, Nalidixic acid 30

یافته های پژوهش

از مجموع ۱۶۰ سویه اشریشیاکلاهی جدا شده از بیماران ۱۴۰ نمونه (۸۷/۵ درصد) از ادرار، ۱۴ نمونه (۸/۸ درصد) از خون، ۲ نمونه (۱/۳ درصد) از ترشح صفاقی، ۲ نمونه (۱/۳ درصد) از زخم و ۱ نمونه (۰/۶ درصد) از آسیت، ۱ نمونه (۰/۶ درصد) از ترشح کلیه بودند. از مجموع بیماران، ۱۰۶ نفر زن (۶۶/۲ درصد) و ۵۴ نفر مرد (۳۳/۸ درصد) بودند و میانگین سنی افراد مورد مطالعه $51/49 \pm 26/67$ سال بود به طوری که کم سن ترین فرد یک ماهه و مسن ترین فرد ۹۰ ساله بود. نتایج الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های E.coli جدا شده از نمونه های ادراری بر اساس جدول CLSI در جدول شماره ۱ آمده است.

در سویه های جدا شده از نمونه های ادراری، بیشترین مقاومت به آموکسی سیلین (۷۹/۳ درصد) و کمترین مقاومت به نیتروفورانتوئین (۱/۴ درصد) دیده شد. همه سویه ها به ایمی پنم حساس بودند. با توجه به نمودار شماره ۱، در سویه های E.coli جدا شده از نمونه های غیر ادراری بیشترین مقاومت به آموکسی سیلین (۹۰ درصد) و کمترین مقاومت به سفوکسیتین و کوآموکسی کلاو (۲۰ درصد) مشاهده شد. همه این سویه ها نیز به ایمی پنم حساس بودند. از میان سویه های مورد بررسی در این مطالعه که با روش دابل دیسک مورد بررسی قرار گرفتند، ۸۳ سویه (۵۱/۹ درصد) تولیدکننده ESBL بودند.

در مقایسه ای که بین درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در کل سویه های جدا شده از بیماران و سویه هایی که تنها تولیدکننده ESBL بودند انجام شد، ۹۸/۸ درصد سویه های E.coli مولد ESBL به آموکسی سیلین، سفوتاکسیم، سفتریاکسون مقاوم بودند. هم سویه های E.coli مولد ESBL و هم سویه های فاقد این آنزیم به ایمی پنم حساس بودند.

درصد فراوانی تولید ESBL در سویه های E.coli جدا شده از نمونه های مردان (۶۴/۸ درصد) و زنان (۴۵/۳ درصد) بود و بیشترین میزان فراوانی تولید آنزیم های ESBL (۶۳/۶ درصد) در رده سنی ۵۱ تا ۷۰ سال مشاهده شد.

از ۸۳ سویه (۵۱/۹ درصد) تولیدکننده ESBL که آزمایش PCR بر روی آن ها انجام گرفت، در ۲۷ سویه (۳۲/۵ درصد) ژن bla_{TEM} مشاهده شد. (تصویر شماره ۱). سویه های E.coli حاوی ژن bla_{TEM} از نظر مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام و غیر بتالاکتام مورد بررسی

بر اساس متد M100-S22CLSI در پلیت مذکور قرار داده شد و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. در این تست با توجه به این که سویه های E.coli از نمونه های بالینی مختلف جدا شده بود دیسک گذاری بر اساس محل جداسازی سویه ها انجام گرفت. (۱۲) تست Double disk: به منظور انجام تست تأییدی جهت تولید ESBL از روش DDM مطابق با متد استاندارد M100-S22CLSI استفاده شد. (۱۲، ۱۳)

استخراج و PCR: استخراج پلاسمیدی طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده شرکت Fermentas (plasmid miniprep kit gene JET) انجام شد و جذب نوری DNA پلاسمیدی استخراج شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه Nanodrop اندازه گیری شد. واکنش PCR برای شناسایی ژن بتالاکتامازی TEM با اندازه ۱۰۸۰ pb با استفاده از پرایمرهای

-FTEM(ATAAAATTCTTGAAGACGAAA3'5') و TEM-R(GACAGTTACCAATGCTTAATCA 3'5') انجام شد، (۱۴). PCR برای هر واکنش با ۱ میکرولیتر پلاسمید استخراج شده، 1X buffer، mM Taq polymerase ۰/۵، MgCl₂ ۱/۵، mM dNTPs ۰/۲، از هر پرایمر و ۱۰ Pmol، dH₂O در طی سی سیکل انجام گردید. ژن مذکور طی برنامه ای شامل پیش انکوباسیون در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه، باز شدن دو رشته در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت سی ثانیه، اتصال پرایمرها در ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت سی ثانیه و پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت هفت دقیقه تکثیر یافت. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی Sybrsafe و در حضور DNA Ladder الکتروفورز گردید. هم چنین محصول PCR به منظور توالی یابی و تأیید نهایی باندهای مشاهده شده، در حجم و غلظت مشخص به همراه پرایمر اختصاصی خود به شرکت BioNeer کره ارسال گردید.

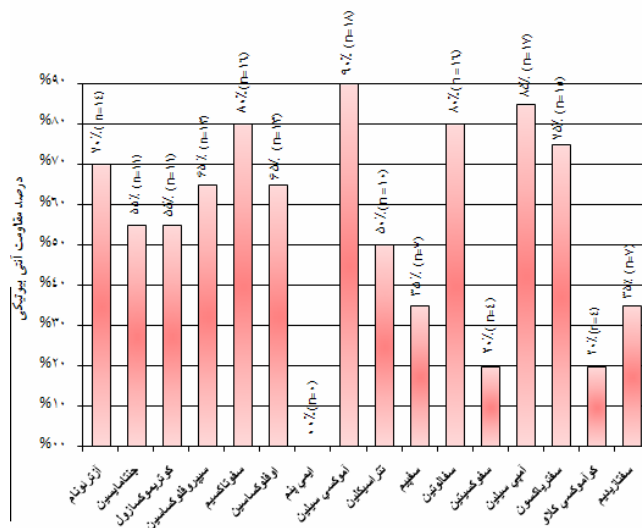
تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل نتایج از نرم افزار SPSS vol.16 استفاده شد. میزان شیوع و متغیرهای کیفی بر اساس درصد محاسبه گردید. در خصوص متغیر کیفی از آزمون Chi Square و Fischer exact test استفاده شد و P<0.05 به عنوان تفاوت معنی دار در نظر گرفته شد.

قرار گرفتند. (جدول شماره ۲ و ۳) با توجه به تفکیک دیسک گذاری بر اساس نوع نمونه، در بررسی انجام شده در سویه - هایی که تولیدکننده ESBL و واجد ژن bla_{TEM} بودند در مورد آنتی بیوتیک های بتالاکتام، بیشترین میزان مقاومت به سفالوتین و سفتریاکسون (۱۰۰ درصد) دیده شد و در رابطه با آنتی بیوتیک های غیر بتالاکتام، بیشترین میزان مقاومت به نالیدیکسیک اسید (۸۲/۶ درصد) و کمترین میزان

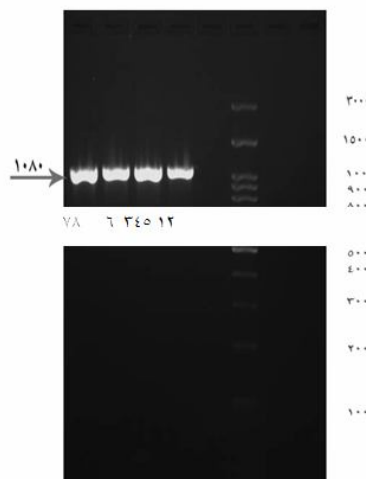
مقاومت به نیتروفورانتوئین (۴/۳ درصد) مشاهده گردید. با استفاده از آزمون آماری کای اسکوئر ارتباط معنی داری بین ESBL مثبت بودن و حضور ژن bla_{TEM} مشاهده گردید. هم چنین مشخص گردید که از نظر مقاومت آنتی بیوتیکی بین ایزوله های مولد آنزیم و فاقد آنزیم در مورد آنتی بیوتیک های مورد بررسی به استثنای ایمی پنم و نیتروفورانتوئین ارتباط معنی داری وجود داشت.

جدول شماره ۱. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های E.coli جدا شده از نمونه های ادراری

پاسخ آنتی بیوگرام		حساس		حد واسط		مقاوم	
آنتی بیوتیک		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
آزترئونام		۶۳	۴۵	۱۰	۷/۱	۶۷	۴۷/۹
جنتامایسین		۹۲	۶۵/۷	۷	۵	۴۱	۲۹/۳
کوآکسازول		۴۱	۲۹/۳	۱	۰/۷	۹۸	۷۰
سیپروفلوکساسین		۵۶	۴۰	۱۰	۷/۱	۷۴	۵۲/۹
سفتاکسیم		۴۹	۳۵	۱۲	۸/۶	۷۹	۵۶/۴
اوفلوکساسین		۷۰	۵۰	۰	۰	۷۰	۵۰
ایمی پنم		۱۲۹	۹۲/۱	۱۱	۷/۹	۰	۰
آموکسی سیلین		۲۵	۱۷/۹	۴	۲/۹	۱۱۱	۷۹/۳
تتراسیکلین		۴۷	۳۳/۶	۳	۲/۱	۹۰	۶۴/۳
سفیم		۸۳	۵۹/۳	۷	۵	۵۰	۳۵/۷
سفالوتین		۳۵	۲۵	۱۰	۷/۱	۹۵	۶۷/۹
سفکسیم		۵۵	۳۹/۳	۹	۶/۴	۷۶	۵۴/۳
سفوکسیتین		۱۰۳	۷۳/۶	۱۴	۱۰	۲۳	۱۶/۴
آمپی سیلین		۲۶	۱۸/۶	۴	۲/۹	۱۱۰	۷۸/۶
نیتروفورانتوئین		۱۳۴	۹۵/۷	۴	۲/۹	۲	۱/۴
نالیدیکسیک اسید		۳۰	۲۱/۴	۸	۵/۷	۱۰۲	۷۲/۹
سفتریاکسون		۵۸	۴۱/۴	۵	۳/۶	۷۷	۵۵
کوآموکسی کلاو		۶۳	۴۵	۴۶	۳۲/۹	۳۱	۲۲/۱
سفتازیدیم		۵۶	۴۰	۲۲	۱۵/۷	۶۲	۴۴/۳



نمودار شماره ۱. درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های جدا شده از نمونه های غیر ادراری (خون، آسیت، زخم، ترشحات صفاقی) بیماران مورد مطالعه



تصویر شماره ۱. ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به قطعه ۱۰۸۰ جفت بازی ژن TEMba. از چپ به راست: ردیف ۱: کنترل مثبت، ردیف ۲ و ۳: نمونه های TEMba مثبت، ردیف ۴: Blank، ردیف ۵: سایز مارکر، ردیف ۶ و ۷: مربوط به نمونه منفی

جدول شماره ۲. توزیع فراوانی نسبی مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام سویه های E.coli مولد بتالاکتامازهای وسیع - الطیف جدا شده از بیماران مورد مطالعه به تفکیک حضور و عدم حضور ژن bla_{TEM}

ESBL Negative				ESBL Positive				مقاومت
ژن bla _{TEM} مثبت N=.		ژن bla _{TEM} منفی N=۷۷		ژن bla _{TEM} مثبت N=۳۷		ژن bla _{TEM} منفی N=۵۶		
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	آنتی بیوتیک بتالاکتام
.	.	۶/۵	۵	۹۲/۶	۲۵	۹۱/۱	۵۱	آزترئونام
.	.	۱۶/۹	۱۳	۹۶/۳	۲۶	۱۰۰	۵۶	سفتوتاکسیم
.	.	.	.	۷/۴	۲	۷/۱	۴	ایمی پنم
.	.	۶۱	۴۷	۹۶/۳	۲۶	۱۰۰	۵۶	آموکسی سیلین
.	.	۲/۶	۲	۵۵/۶	۱۵	۷۱/۴	۴۰	سفپیم
.	.	۳۶/۴	۲۸	۱۰۰	۲۷	۱۰۰	۵۶	سفالوتین
.	.	۵/۲	۴	۲۲/۲	۶	۳۰/۴	۱۷	سفتوکستین
.	.	۵۹/۷	۴۶	۹۶/۳	۲۶	۹۸/۲	۵۵	آمپی سیلین
.	.	۱۳	۱۰	۱۰۰	۲۷	۹۸/۲	۵۵	سفتریاکسون
.	.	۱۰/۴	۸	۳۷	۱۰	۳۰/۴	۱۷	کوآموکسی کلاو
.	.	۲/۶	۲	۸۵/۲	۲۳	۷۸/۶	۴۴	سفتازیدیم
ژن bla _{TEM} مثبت N=.		ژن bla _{TEM} منفی N=۷۰		ژن bla _{TEM} مثبت N=۲۳		ژن bla _{TEM} منفی N=۴۷		
.	.	۱۰	۷	۹۵/۷	۲۲	۱۰۰	۴۷	سفتکسیم

جدول شماره ۳. توزیع فراوانی نسبی مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به برخی آنتی بیوتیک های غیربتالاکتام سویه های E.coli مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف جدا شده از بیماران مورد مطالعه به تفکیک حضور و عدم حضور ژن bla_{TEM}

ESBL Negative				ESBL Positive				مقاومت
ژن bla _{TEM} مثبت N=.		ژن bla _{TEM} منفی N=۷۷		ژن bla _{TEM} مثبت N=۲۷		ژن bla _{TEM} منفی N=۵۶		
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	آنتی‌بیوتیک غیر بتالاکتام
.	.	۶/۵	۵	۴۸/۱	۱۳	۴۸/۱	۳۴	جنتامایسین
.	.	۵۴/۵	۴۲	۷۰/۴	۱۹	۸۵/۷	۴۸	کوآتریموکسازول
.	.	۲۶	۲۰	۵۹/۳	۱۶	۹۱/۱	۵۱	سیپروفلوکساسین
.	.	۴/۲۳	۱۸	۵۹/۳	۱۶	۸۷/۵	۴۹	اوفلوکساسین
.	.	۴۸/۱	۳۷	۷۰/۴	۱۹	۷۸/۶	۴۴	تتراسیکلین
ژن bla _{TEM} مثبت N=.		ژن bla _{TEM} منفی N=۷0		ژن bla _{TEM} مثبت N=۲3		ژن bla _{TEM} منفی N=47		
.	.	.	.	۴/۳	۱	۲/۱	۱	نیتروفورانئوئین
.	.	۵۱/۴	۳۶	۸۲/۶	۱۹	۱۰۰	۴۷	نالیدیکسیک اسید

بحث و نتیجه گیری

امروزه مقاومت آنتی بیوتیکی به بتالاکتام های وسیع الطیف در میان ایزوله های بالینی به ویژه E.coli از معضلات روند درمان عفونت های بیمارستانی است، (۳). مصرف گسترده آنتی بیوتیک ها باعث افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری شده به طوری که مقاومت این باکتری به بتالاکتام ها در سراسر دنیا گزارش شده است، (۱۵). 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 به مکان جغرافیایی متفاوت هستند. (۱) با توجه به نتایج این تحقیق ۸۷/۵ درصد نمونه ها، اداری بودند که از این میان ۹۳/۴ درصد آن مربوط به زنان بود که نشان می دهد عفونت اداری در زنان شایع تر بوده و دلیل بروز این مشکل مربوط به آناتومی خاص دستگاه اداری و کوتاه بودن مجرای اداری در زنان می باشد. در مطالعه انجام شده توسط فاضلی در سال ۱۳۸۷ که بر روی ۲۷۸ ایزوله بالینی E.coli انجام شد، ۶۲ درصد نمونه ها

اداری بودند، (۱). هم چنین در مطالعه مسجدیان در سال ۱۳۸۶ و کلانتر در سال ۲۰۱۰ نیز بیشترین نمونه ها همانند مطالعه حاضر، نمونه های اداری بودند. (۱۶، ۱۰)

هم چنین در مطالعه حاضر جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها، آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفوزن توسط نوزده دیسک آنتی بیوتیکی انجام گرفت و نیز بر روی ایزوله های بالینی تفکیک دیسک گذاری بر حسب نوع نمونه انجام شد که در کل ایزوله ها اعم از ایزوله های اداری و ایزوله های غیر اداری بیشترین مقاومت به ترتیب به آموکسی سیلین (۸۰/۶ درصد) و آمپی سیلین (۷۹/۴ درصد) مشاهده شد. تمامی ایزوله ها به ایمی پنم حساس بودند. در سویه های جدا شده از نمونه های اداری بیشترین مقاومت به نالیدیکسیک اسید (۷۲/۹ درصد) و کوتریموکسازول (۷۰ درصد) و سفالوتین (۶۷ درصد) و کمترین مقاومت به نیتروفورانتوئین (۱/۴ درصد) دیده شد و در سویه های جدا شده از نمونه های خون، زخم، آسیت و ترشحات صفاقی، بیشترین مقاومت به سفالوتین و سفوتاکسیم (۸۰ درصد) مشاهده گردید. در مطالعه ای که توسط شاهچراغی و همکاران در سال ۱۳۸۶ انجام گرفت الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی برای تمامی نمونه ها نسبت به پنج آنتی بیوتیک بررسی شد و بیشترین مقاومت سویه ها (۴۲/۹ درصد) به کوتریموکسازول بود، (۱۷). در مطالعه انجام شده توسط مهرگان در سال ۲۰۰۸، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در کل نمونه ها نسبت به ۱۸ دیسک حاوی آنتی بیوتیک بررسی شد که بیشترین مقاومت به تتراسیکلین (۹۴/۵ درصد) بود، (۱۸). بر اساس نتایجی که Mohamed Hamed و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مصر به دست آوردند، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین (ایران: ۵۴/۴ درصد، مصر: ۴۱/۳ درصد) در کشور ما بالاتر از مصر ولی میزان مقاومت به جنتامایسین (ایران: ۳۲/۵ درصد، مصر: ۶۵/۵ درصد) در کشور ما پایین تر از مصر بوده است، (۴). مطالعه حاضر از نظر تعداد آنتی بیوتیک های مورد مطالعه بیشتر از مطالعات دیگر بود.

کارباپنم ها از جمله آنتی بیوتیک های پایدار در برابر ارگانیزم های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف به خصوص E.coli می باشند. در مطالعه حاضر در کل نمونه ها هیچ مقاومتی به ایمی پنم مشاهده نشد که این نتیجه با یافته های فاضلی در سال ۱۳۸۶، (۱)، شاهچراغی در سال ۱۳۸۶، (۱۷)، و Mohamed Hamed در سال ۲۰۰۶ در مصر، (۴)، و Hasan Nazik در سال ۲۰۱۱ در ترکیه مشابه می باشد. (۱۹)

در مطالعه حاضر، سویه هایی که مقاوم به آنتی بیوتیک های بتالاکتام بودند به منظور انجام تست تأییدی جهت تولید ESBL با استفاده از روش (Double Disk) از نظر فنوتیپی مورد بررسی قرار گرفتند که ۵۱/۹ درصد (۸۳ سویه) تولید کننده آنزیم های بتالاکتامازی وسیع الطیف بودند. نتایج منتشره از تحقیقات علمی مختلف نشان می دهد که درصد سویه های E.coli تولیدکننده ESBL در مطالعه انجام شده توسط فاضلی در سال ۱۳۸۶ (۵۳/۹ درصد)، (۱)، مسجدیان در سال ۱۳۸۶ (۵۱ درصد)، (۱۰)، مهرگان در سال ۲۰۰۸ (۶۷/۲ درصد)، (۱۸)، کلانتر در سال ۲۰۱۰ (۶۱/۸ درصد) در ایران، (۱۶)، و Van Cao در سال ۲۰۰۲ (۳۲ درصد) در ویتنام، (۲۰)، Bali در سال ۲۰۰۴ (۸۴ درصد) در ترکیه، (۸)، Mohamed Hamed در سال ۲۰۰۶ (۶۰/۹ درصد) در مصر، (۴)، Sharma در سال ۲۰۱۰ (۷۰ درصد) در هند، (۹)، Alessandra Carattoli در سال ۲۰۰۸ (۱۷/۲ درصد) در ایتالیا بود، (۲۱). نتایج حاصل از مطالعات انجام شده در ایران نیز بیانگر این است که متأسفانه شیوع باکتری های تولیدکننده ESBL در کشور ما هم بالا می باشد و بیش از نیمی از سویه ها تولیدکننده ESBL هستند که این مسئله منجر به شکست درمان می گردد و میزان ESBL در سویه های ایزوله شده از کشورهای مختلف و هم چنین در یک کشور و در هر بیمارستان متفاوت می باشد که این مسئله به سیستم کنترل عفونت و رژیم درمانی بستگی دارد. (۲۲)

هم چنین در مطالعه حاضر (۳۲/۵ درصد) سویه های تولیدکننده ESBL به کوآموکسی کلاو مقاوم بودند. در مطالعه انجام شده توسط مهرگان در سال ۲۰۰۸، ۶۹/۷ درصد سویه های تولیدکننده ESBL مقاوم به کوآموکسی کلاو بودند. میزان مقاومت بالا به این آنتی بیوتیک در مطالعه فوق نشان می دهد که برخی سویه ها توانایی مقاومت به مهارکننده های بتالاکتامازی را کسب کرده اند. (۱۸)

در این مطالعه میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های تولیدکننده ESBL نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام از نظر آماری مورد بررسی قرار گرفت که ۹۸/۸ درصد از سویه های ESBL مثبت به سفوتاکسیم و سفتریاکسون و ۸۰/۷ درصد از سویه های ESBL مثبت به سفتازیدیم مقاوم بودند در حالی که در تحقیقی که توسط شاهچراغی در سال ۱۳۸۶ انجام شد از میان نمونه های ESBL مثبت، ۴۴/۷۷ درصد به سفوتاکسیم، ۴۸/۵۷ درصد به سفتریاکسون، ۴۷/۶ درصد به سفتازیدیم مقاوم

بودند، (۱۷). در این مطالعه میزان مقاومت بیشتری در نمونه های واجد ESBL نسبت به این سه آنتی بیوتیک وجود دارد که این امر بیانگر افزایش مقاومت به این داروها در کشور ما نسبت به گذشته است که با توجه به این نتایج بایستی برای جلوگیری از افزایش مقاومت، در مصرف این آنتی بیوتیک ها دقت نمود.

در مطالعه حاضر مقایسه الگوی مقاومت آنتی - بیوتیکی در میان سوش های تولیدکننده ESBL ($n=83$) و سوش هایی که این آنزیم ها را تولید نمی کردند ($n=77$) نسبت به آنتی بیوتیک های غیر بتالاکتام انجام گرفت و مشاهده شد که میزان مقاومت در باکتری های تولیدکننده ESBL نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، کوتریموکسازول، اوفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید بالاتر می باشد. در مطالعه مشابه فاضلی در سال ۱۳۸۶ نشان داده شد که مقاومت باکتری های تولیدکننده ESBL به آنتی بیوتیک های فوق بالا بوده که با نتایج مطالعه ما مطابقت دارد، (۱). در مطالعه حاضر ۳۲/۵ درصد سویه های مولد ESBL واجد ژن bla_{TEM} بودند و از کل سویه های جدا شده از بیماران، در ۱۶/۹ درصد سویه ها ژن bla_{TEM} شناسایی شد در حالی که در مطالعه انجام شده در اصفهان توسط مسجedian در سال ۱۳۸۶، ۸۴/۶ درصد سویه های E.coli واجد ژن bla_{TEM} بودند، (۱۰). در تحقیق انجام شده توسط مبین در سال ۱۳۸۸ در تبریز ۸۷/۵ درصد سویه ها تولیدکننده bla_{TEM} بودند، (۲۳). در یک مطالعه در ترکیه توسط Bali در سال ۲۰۱۰، شیوع ژن bla_{TEM} ۷۲ درصد برآورد گردید، (۸). در بررسی مشابهی در سال ۲۰۰۹ توسط

نخعی در مشهد شیوع این ژن ۵۶/۸ درصد گزارش شد، (۲۴). با توجه به نتایج مطالعات ذکر شده، میزان فراوانی ژن bla_{TEM} در مطالعه ما پایین بود که این میزان مشابه نتیجه حاصل از بررسی Sharma در سال ۲۰۱۰ در هند، (۳۰ درصد bla_{TEM}) می باشد، (۹). نتایج متفاوت با سایر مطالعات در کشور می تواند نشان دهنده این مسئله باشد که احتمالاً ژن های دیگری در منطقه مورد مطالعه ما در اعطای مقاومت به بتالاکتام ها دخیل می باشند.

با توجه به افزایش مقاومت نسبت به سفالوسپورین های نسل سوم که از جمله داروهای مورد استفاده در درمان عفونت های بیمارستانی می باشند، می بایست به منظور جلوگیری از شکست درمان و کنترل عفونت ها، تست آنتی بیوگرام قبل از تجویز آنتی بیوتیک انجام گردد و از مصرف بی رویه آنتی بیوتیک های بتالاکتام جلوگیری شود. تشخیص سویه های تولیدکننده این آنزیم ها ضروری می - باشد. انجام بررسی های مولکولی در کنار آزمون های فنوتیپی در تشخیص این مقاومت ها مؤثر بوده و از آن جایی که در این مطالعه میزان فراوانی ژن TEM پایین بود پیشنهاد می گردد ژن های دیگر مسئول در ایجاد مقاومت نیز بررسی شوند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات جناب آقای دکتر علی مجتهدی و هم چنین کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی رشت سرکار خانم حاجی پور، خانم اسدپور و آقای رضازاده و تمامی عزیزانی که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند صمیمانه قدردانی می شود.

Reference

1. Fazeli H, Hoseini M, Mohammadi P. [Frequency and antibiotic susceptibility of ESBL-producing Escherichia coli in clinical samples isolated from Alzahra Hospital in Esfahan, Iran]. *Sharkord J Med Sci* 2008; 10:58-64. (Persian)
2. Ramos N, Saayman M, Chapman T, Tucker J. Genetic relatedness and virulence gene profiles of Escherichia coli strains isolated from septicemic and uroseptic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:15-23.
3. Chaudhary U, Aggarwal R. Extended spectrum-lactamases (ESBL) - An emerging threat to clinical therapeutics. *Indian J Med Microbiol* 2004; 22:75-80.

4. Al-Agamy M, Ashour M, Wiegand I. First description of CTX-M β -lactamase-producing clinical Escherichia coli isolates from Egypt. *Int J Antimicrob Agent* 2006; 27:545-8.
5. Bradford, P. Extended-spectrum beta lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol* 2001; 14: 933-51.
6. Sadegh M, Nahaii M, Soltandlal M. [Resistance ESBLs in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in hospital patient and out-patient]. *Tabriz J Med Sci* 2008; 30: 79-86. (Persian)
7. Jacoby G, Munoz-Price L. The New β -lactamases. *N Engl J Med* 2005; 352:380-91.

8. Bali E, Acik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum β -lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacterbaumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. *Afr J Microbiol Res* 2010; 4:650-4.
9. Sharma J, Sharma M, Ray P. Detection of TEM&SHV genes in *Escherichia coli* & *Klebsiellapneumoniae* isolates in a tertiary care hospital from India. *Ind J Med Res* 2010; 132:332-6.
10. Masjedian F, Valehi F, Talebi A, Rastegarlar A. [Molecular analysis of resistance to broad-spectrum antibiotics in *Escherichia coli* & *Klebsiellapneumoniae* isolates, Iran]. *J Med Microbiol* 2007; 1:27-34. (Persian)
11. Mohajeri P, Izadi B, Rezaii M, Falahi B, Khademi H, Ebrahimi R. [Surveying of ESBL production in *E. coli* isolated from urinary tract infections and antibiotic resistance in Kermanshah]. *Ardebil Uni Med J* 2011; 11:86-94. (Persian)
12. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-Second informational supplement. Wayne, Pennsylvania: Clinical Laboratory Standards Institute Document M100-S22; 2012. P.32.
13. Eemry CH, Weymouth L. Detection and clinical significance of extended-spectrum β -lactamases in a tertiary-care medical center. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2061-7.
14. Lewis J, Herrera M, Wickes B, Patterson J, Jorgensen J. First Report of the Emergence of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBLs) as the Predominant ESBL Isolated in a U.S. Health Care System. *J Antimicrob Agent Chemother* 2007; 51:4015-21.
15. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strain of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Res Microbiol* 2004; 155: 409-21.
16. Kalantar D, Mansouri S. [Emergence of multiple β -lactamases produced by *Escherichia coli* clinical isolates from hospitalized patient in Kerman, Iran]. *Jundishapur J Microbiol* 2010; 3:137-45. (Persian)
17. Shahcheraghi F, Nasiri S, Noviri F. [Detection of bla_{TEM} & bla_{SHV} antibiotic-resistant genes in *E. coli* strain isolated from clinical specimens from hospitals in Tehran, Iran]. *J Med Microbiol* 2007; 1:1-8. (Persian)
18. Mehrgan H, Rahbar M. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. *Int J Antimicrob Agent* 2008; 31:147-51. (Persian)
19. Nazik H, Öngen B, Yildirim E, Ermis F. High prevalence of CTX-M-type β -lactamase in *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and displaying antibiotic co-resistance. *Afr J Microbiol Res* 2011; 5:44-9.
20. Cao V, Lambert T, Quynh ND, Kim-Loan H, Hoang N, Arlet G, Courvalin P. Distribution of extended-spectrum β -Lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. *J Antimicrob Agent Chemother* 2002; 46: 3739-43.
21. Carattoli A, Fernández A, Varesi P, Fortini D, Gerardi S, Penni A, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -Lactamases isolated in Rome, Italy. *J Clin Microbiol* 2008; 46:103-8.
22. Yazdi M, Nazemi A, Mirnargesi M. [The Prevalence of β -lactamase resistance SHV/CTX-M/TEM genes in *E. coli* strain isolated from urine samples in Tehran, Iran]. *J Lab Med* 2009; 4: 48-54. (Persian)
23. Mobin H, Nahaii M, Mobasher A, Sadeghi J. [Prevalence of β -lactamase enzymes (SHV, TEM & CTX-M) in *E. coli* isolated from Imam Reza hospital in Tabriz]. *J Microbiol* 2005; 2:33-9. (Persian)
24. Nakhaii M, Forghanifard F, Moshrefi S. [Prevalence and molecular characterization of plasmid-mediated extended-spectrum β -Lactamase genes (bla_{TEM}, bla_{CTX} and bla_{SHV}) among urinary *Escherichia coli* clinical isolates in Mashhad, Iran]. *Iran J Bas Medical Sci* 2011; 15:833-9. (Persian)

Investigating the Level of Antibiotic Resistance and Detection of Beta-lactamase of bla_{TEM} High Frequency in the ESBLs Producing *E. coli* Isolated in Rasht

Haghighatpanah M¹*, Amirmozafari N², Faezi M¹, Shenagari M³

(Recived: September 1, 2013

Accepted: March 8, 2014)

Abstract

Introduction: *E. coli* is one of the most frequent causes of nosocomial infections. Antimicrobial resistance leads to failure in treatment of hospital infections caused by *E. coli*. Production of extended-Spectrum Beta-lactamases (ESBLs) is one of the causes of antibiotic resistance in these bacteria. These enzymes are predominantly plasmid mediated and are derived from TEM and SHV type enzymes. The aim of this study was to investigate the frequency of bla_{TEM} genes in ESBL-producing *E. coli* strains isolated from admitted patients in six hospitals in Rasht, Iran.

Materials & Methods: Among all clinical samples, 160 *E. coli* were taken from various samples of hospitalized patients after diagnosis of *E. coli*. Antibiotic resistance was surveyed by Kirby-Bauer method. For resistant isolates, double disk phenotypic confirmatory test was carried out in order to diagnosis ESBL-producing strains. Then,

DNA extracted and bla_{TEM} genes were detected using PCR from ESBL-producing strains.

Finding: Among the 160 clinical isolates of *E. coli* which were collected, the maximum resistance to amoxicillin was observed in all strains, all were susceptible to Imipenem, and 51.9% of strains were ESBL positive, and 27 strains (32.5%) of bla_{TEM} genes were observed using PCR.

Discussion & Conclusion: In this study, more than 50% were detected as ESBL-producing strains which mean that more than half of the isolates were bla_{TEM} positive. Comparing these results with other studies in this field shows a direct relation between development of resistance to beta-lactam antibiotics and genes transfer such as bla_{TEM}.

Keywords: *E. coli*, ESBLs, bla_{TEM}

1. Dept of Microbiology, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

2. Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

*(Corresponding author)