ORIGINAL ARTICLE

Frequency Of blaCTX-M, blaTEM and blaSHV Genes in Citrobacters Isolated from Imam Reza Hospital in Kermanshah

Alisha Akya[1],
Somayeh Jafari[2],
Kamal Ahmadi[3],
Azam Elahi[3]

[1]Associate Professor, Department of Medical Microbiology, Nosocomial Infection Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
[2] MSc in Medical Microbiology, Imam Reza Hospital, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
[3] MSc in Medical Microbiology, Student Research Committee, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received June 16, 2015 ; Accepted July 12, 2015)

Abstract

Background and purpose: *Citrobacter* species can cause opportunistic hospital-acquired infections and their treatment has become problematic following the acquisition of extended spectrum beta- lactamases (ESBLs). The purpose of this study was to determine the frequency of ESBL genes in clinical isolates in Kermanshah Imam Reza Hospital.

Materials and methods: In this study, 70 *Citrobacter* isolates were collected from various clinical specimens and confirmed by standard bacteriological tests and API20E Kit. After antibiotic susceptibility testing using disk diffusion method, the presence of ESBL phenotype was determined by combined disk test. Specific primers were used to detect *bla*CTX-M, *bla*TEM and *bla*SHV genes among isolates using PCR. Data was analyzed in SPSS V.18 applying Chi-Square test and Fisher's exact test.

Results: From 70 isolates of *Citrobacter*, 5 (7.1%) were phenotypically positive for ESBL. The PCR test determined 19 isolates (31.6%) genetically positive for ESBL, and the frequency of *bla*CTX-M, *bla*TEM and *bla*SHV genes were 21.3%, 11.4% and 1.4%, respectively. The highest antibiotic resistance of isolates was to cefazolin (84.8%), ampicillin (71.2%) and co-trimoxazole (36.4%), and the lowest was to gentamicin (9.1%), piperacillin/tazobactam (4.5%), and imipenem (1.5%).

Conclusion: The results showed that *Citrobacter freundiii* was the dominant species for hospital-acquired infections in Kermanshah. A high percentage of isolates contained ESBL genes and *bla*CTX-M was the most common. There was a high gap between the frequencies of genotypic and phenotypic for ESBL, which may indicate ESB genes are not highly expressed in *Citrobacter* isolates.

Keywords: *bla*CTX-M, *bla*SHV, *bla*TEM, *Citrobacter* Spp

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(127): 65-73 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۷ مرداد سال ۱۳۹۴ (۷۳-۶۵)

فراوانی ژن های *bla*CTX-M، *bla*TEM و *bla*SHV در ایزوله های سیتروباکتر جداشده از بیمارستان امام رضا (ع) در کرمانشاه

علیشا اکیا[1]
سمیه جعفری[2]
کمال احمدی[3]
اعظم الهی[3]

چکیده

سابقه و هدف: گونه‌های سیتروباکتر عفونت‌های فرصت طلب بیمارستانی ایجاد می‌کنند و به دنبال کسب بتالاکتامازهای دامنه گسترده (ESBL) درمان آن ها مشکل ساز شده است. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن های ESBL در ایزوله‌های سیتروباکتر در بزرگ ترین بیمارستان شهر کرمانشاه (امام رضا) در سال ۱۳۹۲-۱۳۹۳ بود.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر از نوع توصیفی- تحلیلی بود. در این مطالعه ۷۰ جدایه سیتروباکتر از نمونه‌های بالینی جمع‌آوری شد و به وسیله تست‌های استاندارد باکتری‌شناسی و کیت API 20E تایید شدند. پس از سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک، وجود آنزیم‌های ESBL از نظر فنوتیپی به روش آزمایش دیسک ترکیبی مشخص شد. از پرایمرهای اختصاصی جهت تعیین ژن‌های *bla*CTX-M، *bla*TEM و *bla*SHV در میان جدایه‌ها در آزمایش PCR استفاده شد. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ و آزمون فیشر و کای اسکویر (Chi-Square) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: از ۷۰ جدایه سیتروباکتر، ۵ (۷/۱ درصد) جدایه از نظر فنوتیپی برای تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز دامنه گسترده مثبت شدند. آزمایش PCR نشان داد از نظر ژنوتیپی ۱۹ ایزوله (۳۱/۶ درصد) ESBL مثبت شدند و فراوانی ژن‌های *bla*CTX-M، *bla*TEM و *bla*SHV به ترتیب ۲۱/۳ درصد، ۱۱/۴ درصد و ۱/۴ درصد بود. بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به سفازولین (۸۴/۸ درصد)، آمپی‌سیلین (۷۱/۲ درصد) و کوتریموکسازول (۳۶/۴ درصد) و کم‌ترین مقاومت نسبت به جنتامایسین (۹/۱ درصد)، پیپراسیلین/تازوباکتام (۴/۵ درصد) و ایمی‌پنم (۱/۵ درصد) بود.

استنتاج: نتایج نشان داد که سیتروباکتر فروندی گونه غالب در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی در کرمانشاه می‌باشد. فراوانی کلی جدایه‌های سیتروباکتر دارای ژن‌های ESBL بالا است و در این میان ژن *bla*CTX-M دارای بیش‌ترین شیوع نسبی می‌باشد. بین فراوانی فنوتیپی و ژنوتیپی ESBL در ایزوله‌های سیتروباکتر اختلاف زیادی وجود داشت که ممکن است نشانگر عدم بیان بالای ژن‌های ESBL در ایزوله سیتروباکتر باشد.

واژه های کلیدی: *bla*CTX-M، *bla*TEM، *bla*SHV، گونه های سیتروباکتر

مقدمه

سیتروباکتر (*Citrobacter*) باسیل گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری از خانواده انتروباکتریاسه ها است و گونه های مهم این باکتری شامل سیتروباکتر فروندی (*Citrobacter freundiii*)، سیتروباکتر کوسری (*C.koseri*)،

مولف مسئول: سمیه جعفری- کرمانشاه: باغ ابریشم، بلوار پرستار، بیمارستان امام رضا (ع)، آزمایشگاه E-mail: bartar2004@yahoo.com
۱. دانشیار، گروه میکروب شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۲. کارشناس ارشد میکروب شناسی، بیمارستان امام رضا، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه،کرمانشاه، ایران
۳. کارشناس ارشد میکروب شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
تاریخ دریافت :۱۳۹۴/۳/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۴/۳/۱۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۴/۲۱

سیتروباکتر امالانتیگوس (*C.amalantigus*)، سیتروباکتر براکیی (*C.braakii*) و سیتروباکتر یانگئی (*C.youngae*) هستند. این باکتری‌ها بیش‌تر در منابع آب، خاک، غذا و مجاری گوارشی حیوانات و انسان‌ها وجود دارند(۱). سیتروباکتر از جمله پاتوژن‌های فرصت طلبی است که می‌تواند باعث بیماری‌های مختلفی از جمله اسهال، سپتی سمی، مننژیت و عفونت مجاری ادراری و تنفسی به خصوص در گروه‌های پرخطر مثل نوزادان و افراد دارای نقص سیستم ایمنی شود(۲). سیتروباکتر به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی با مقاومت چند دارویی و با شیوع در حال افزایش در جهان شناخته شده است(۳). این باکتری به دلیل بالا بودن نرخ مرگ و میر عفونت‌های آن (۶۰-۳۰ درصد) و هم‌چنین توانایی ایجاد عفونت‌های تهدیدکننده حیات در افراد بستری در بیمارستان ها و مقاومت بالای دارویی دارای اهمیت است(۵-۳).

بتالاکتامازهای دامنه گسترده (ESBL) از جمله عوامل انتشار وسیع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها بوده و انتقال آن‌ها به طور پیوسته در میان انتروباکتریاسه‌ها از جمله سیتروباکتر صورت می‌گیرد(۸-۶). این آنزیم‌ها دارای چهار گروه از A تا D بوده و دارای تنوع بالایی هستند، و در طی زمان و نیز از مکانی به مکان دیگر تنوع پیدا می‌کنند(۱۰-۷). وجود این آنزیم‌ها به‌طور گسترده در انتروباکتریاسه‌های جدا شده از بیماران بستری و هم‌چنین بررسی آلودگی در بخش‌های بیمارستان‌ها گزارش شده است(۱۱،۱۰). بنابراین انجام آزمایشات فنوتیپی ESBL و استفاده از روش‌های ملکولی اطلاعات بهتری از انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری‌ها به دست می‌دهد(۱۳،۱۲). انتظار می‌رود شیوع ESBLها در میان گونه‌های سیتروباکتر به دلیل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده در مراکز درمانی در حال افزایش باشد. از طرفی مطالعه روی گونه‌های سیتروباکتر در مقایسه با دیگر باکتری‌های بیماری‌زای خانواده انتروباکتریاسه کم‌تر صورت گرفته است. در نتیجه اطلاعات کمی در این مورد وجود دارد. هدف این مطالعه بررسی فراوانی ۳ نوع شایع ESBL یعنی *bla*CTX-M، *bla*TEM و *bla*SHV و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سیتروباکتر جداشده از نمونه‌های بالینی بود.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر از نوع توصیفی تحلیلی بود. در این تحقیق تعداد ۷۰ جدایه سیتروباکتر از ۱۸۰ نمونه بالینی مختلف (ادرار، مدفوع، خلط، زخم و خون) از بیماران بزرگ‌ترین بیمارستان در شهر کرمانشاه (امام رضا) در سال ۱۳۹۳-۱۳۹۲ جدا شد و مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های مذکور پس از جمع‌آوری اولیه در کنار باکس یخ و رعایت شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال داده شد. پس از جداسازی اولیه با استفاده از روش‌های میکروب‌شناسی و بیوشیمیایی، باکتری‌ها جدا شدند و جهت تأیید نهایی گونه‌ها از کیت API-20E (فرانسه BioMérieux) استفاده شد. سپس به‌منظور شناسایی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها از روش انتشار دیسک با سوش کنترل استاندارد (*E.coli* ATCC 25922) استفاده شد. از ایزوله‌های مورد بررسی سوسپانسیونی برابر غلظت نیم مک فارلند تهیه شد. پس از کشت بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک آلمان)، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فاصله ۲/۵ سانتی‌متری از هم روی پلیت قرار داده شدند و سپس به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند. نتایج حاصل با معیارهای CLSI سال ۲۰۱۳ مقایسه شد(۱۴). جدایه‌هایی که قطر هاله عدم رشد آن‌ها حداقل برای یکی از آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و آزترونام به‌ترتیب ۲۲، ۲۷، ۲۵ و۲۷ میلی‌متر و یا کم‌تر بود، طبق پیشنهاد CLSI از نظر داشتن ESBL بررسی شدند(۱۴). سپس برای غربالگری فنوتیپی ایزوله‌ها مولد ESBL، از روش دیسک ترکیبی استفاده شد. در این روش از دیسک‌های ۳۰ میکروگرمی سفوتاکسیم و سفتازیدیم در مجاورت دیسک مرکب آن‌ها، حاوی ۱۰ میکروگرم کلاولانیک اسید (انگلستان ,MAST)، در محیط مولر

هینتون آگار استفاده شد و آزمایش مانند روش انتشار دیسک انجام گرفت. در صورتی که قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف دیسک ترکیبی حداقل ۵ میلی‌متر و یا بیش‌تر از قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک منفرد همان آنتی‌بیوتیک بود، به عنوان سویه مولد بتالاکتامازهای دامنه گسترده قلمداد گردید(۱۴). در مرحله بعد جهت بررسی فراوانی ژن‌های *bla*CTX-M، *bla*TEM و *bla*SHV به کمک پرایمرهای اختصاصی طبق جدول شماره ۱، واکنش PCR انجام شد(۱۷-۱۵). ابتدا کل محتوای ژنومی باکتری با روش Boiling استخراج شد. به این منظور چندین کلنی خالص باکتری در ml ۰/۵ آب مقطر استریل حل شد و پس از ۵ دقیقه جوشاندن و خنک شدن در مرحله بعد، در دور g×۷۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جهت انجام واکنش PCR به لوله‌های اپندورف جدید منتقل شد و به عنوان DNA باکتری به کار رفت. برای واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، از ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix (سیناکلون ایران)، ۲ میکرولیتر DNA باکتری، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و آب مقطر دو بار تقطیر استریل تا حجم ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. مراحل دمایی PCR شامل ۵ دقیقه دناچوریشن اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ سیکل طبق جدول شماره ۱ و در آخر ۵ دقیقه اگستنشن در ۷۲ درجه سانتی گراد بود. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با دستگاه ژل داک بررسی شد.

آنالیز آماری

نتایج آزمایش‌های مختلف انجام شده به همراه مشخصات نمونه‌های مورد بررسی در یک فایل اکسل (Excel) جمع آوری گردید و با نرم افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ ارتباط متغیرها با استفاده از آزمون فیشر و کای اسکویر (Chi-Square) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها

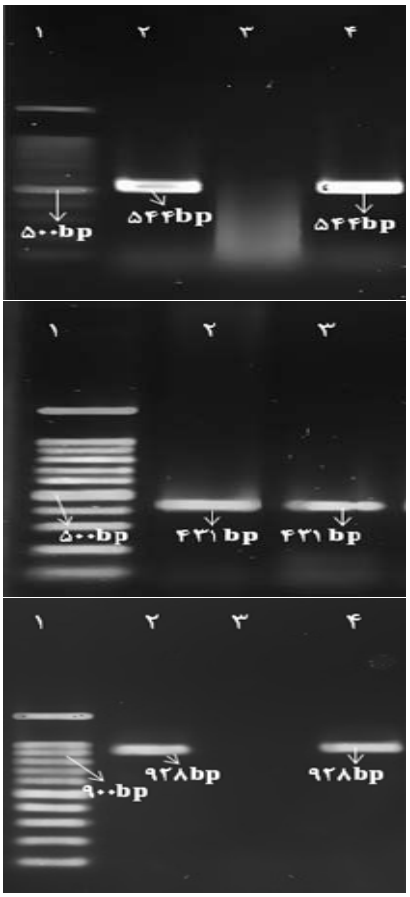
از ۷۰ نمونه مورد بررسی، ۴۲ نمونه از بیماران خانم و ۲۸ نمونه مربوط به آقایان بود. میانگین سنی کل بیماران ۲۹/۷ ± ۳۹/۸ سال بود. بیش‌ترین فراوانی جدایه‌ها مربوط به سیتروباکتر فروندی با ۶۰ ایزوله (۸۵/۷ درصد) بود. بیش ترین فراوانی نمونه ها در این پژوهش مربوط به نمونه ادرار با ۳۹ (۵۵/۷ درصد) نمونه بود و سپس به ترتیب مدفوع با ۱۶ (۲۲/۹ درصد)، خلط ۸ (۱۱/۴ درصد)، زخم ۵ (۷/۱ درصد) و خون ۲ (۲/۹ درصد) نمونه قرار داشتند. مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های سیتروباکتر نسبت به ۱۵ آنتی بیوتیک در جدول شماره ۲ و نتایج PCR ژن‌های *bla*CTX-M، *bla*TEM و *bla*SHV در جدول شماره ۳ و تصویر شماره ۱ آمده است. در کل از نظر ژنوتیپی ۱۹ ایزوله (۳۱/۶ درصد) مولد ESBL بودند. رابطه معنی‌داری بین ژن‌های ESBL با جنسیت (p=۰/۶۱) و سن بیماران (p=۰/۵۹) وجود نداشت. هم‌چنین بین شیوع ژن‌های ESBL و بخش‌های بیمارستانی و نیز بستری و سرپایی بودن بیماران رابطه معنی‌داری نبود (p=۰/۸). اما بین ژن CTX-M با مقاومت به سفتازیدیم (p=۰/۰۱۹) و ژن TEM با مقاومت به ایمی‌پنم(p=۰/۰۱۴) رابطه معنی‌داری با آزمون Chi-Square به دست آمد (جدول شماره ۴).

جدول شماره ۱: پرایمرها و سیکل های دمایی مورد استفاده در PCR

Product size (bp)	35 Cycles			Sequence (5'-3')	Primer
	Extension ۷۲°C	Annealing ۳۰ Sec	Denaturation۹۴°C		
۵۴۴	۴۰ Sec	۵۱°C	۳۰Sec	*F:TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA* *R:CGATATCGTTGGTGGTGCCATA*	*bla*CTX-M
۴۳۱	۳۰ Sec	۶۱°C	۳۰Sec	*F:AGTGCTGCCATAACCATGAGTG* *R:CTGACTCCCCGTCGTGTAGATA*	*bla*TEM
۹۲۸	۶۰ Sec	۶۴°C	۳۰ Sec	F:ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC *R:TTTATGGCGTTACCTTTGACC*	*bla*SHV

جدول شماره ۲: فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های سیتروباکتر به آنتی بیوتیک ها

آنتی بیوتیک ها	۶۰ سیتروباکترفروندی تعداد (درصد)	۶ سیتروباکترکوسری تعداد(درصد)	جمع مقاومت تعداد(درصد)
سفازولین	۵۲(۸۶/۷)	۴(۶۶/۷)	۵۶(۸۴/۸)
سفپودوکسیم	۱۶(۲۶/۷)	۲(۳۳/۳)	۱۸(۲۷/۳)
سفوتاکسیم	۱۳(۲۱/۷)	۳(۵۰)	۱۶(۲۴/۲)
سفتازیدیم	۱۲(۲۰)	۳(۵۰)	۱۵(۲۲/۷)
سفترياکسون	۱۰(۱۶/۷)	۳(۵۰)	۱۳(۱۹/۶)
آمپی سیلین	۴۳(۷۱/۷)	۴(۶۶/۷)	۴۷(۷۱/۲)
پیپراسیلین/تازوباکتام	۲(۳/۳)	۱(۱۶/۷)	۳(۴/۵)
ایمی پنم	۰(۰)	۱(۱۶/۷)	۱(۱/۵)
ارتاپنم	۰(۰)	۱(۱۶/۷)	۱(۱/۵)
مروپنم	۰(۰)	۱(۱۶/۷)	۱(۱/۵)
آزترونام	۱۲(۲۰)	۲(۳۳/۳)	۱۴(۲۱/۲)
توبرامایسین	۱۲(۲۰)	۱(۱۶/۷)	۱۳(۱۹/۷)
جنتامایسین	۴(۶/۷)	۲(۳۳/۳)	۶(۹/۱)
کوتریموکسازول	۲۱(۳۵)	۳(۵۰)	۲۴(۳۶/۴)
سیپروفلوکساسین	۱۰(۱۶/۷)	۴(۶۶/۷)	۱۴(۲۱/۲)



تصویر شماره ۱: نتایج PCR ژن های *bla*CTX-M، *bla*TEM و *bla*SHV: (*bla*CTX-M): ۱- مارکر (۱۰۰ bp)، ۲- کنترل مثبت (۵۴۴bp)، ۳- کنترل منفی، ۴- نمونه مثبت (۵۴۴bp)،: (*bla*TEM): ۱- مارکر (۱۰۰ bp)، ۲- کنترل مثبت (۴۳۱bp)، ۳- نمونه مثبت (۴۳۱bp)،: (*bla*SHV): ۱- مارکر (۱۰۰ bp)، ۲- کنترل مثبت (۹۲۸bp)، ۳- کنترل منفی، ۴- نمونه مثبت (۹۲۸bp).

جدول شماره ۳: فراوانی گونه های سیتروباکتر و فراوانی ژن های ESBL در آن ها

گونه های سیتروباکتر	گونه ها تعداد (درصد)	فنوتیپی ESBL تعداد (درصد)	فراوانی ژن های ESBL *bla*SHV تعداد (درصد)	*bla*TEM تعداد (درصد	*bla*CTX-M تعداد (درصد
سیتروباکتر فروندی	۶۰ (٪۸۵/۷)	۵ (٪۸/۳)	۱۳ (٪۲۱/۷)	۸ (٪۱۳/۳)	۱ (٪۱/۶)
سیتروباکتر کوسری	۶ (٪۸/۶)	۰	۲ (٪۳۳/۳)	۰	۰
سیتروباکتر براکی	۴(٪۵/۷)	۰	۰	۰	۰
جمع کل	۷۰ (٪۱۰۰)	۵ (٪۷/۱)	۱۵ (٪۲۱/۴)	۸ (٪۱۱/۴)	۱ (٪۱/۴)

جدول شماره ۴ : مقایسه حساسیت ایزوله ها به سفتازیدیم و ایمی پنم با توجه به داشتن ژن های CTXM و TEM

نوع آنتی بیوتیک	حساسیت آنتی بیوتیکی	TEM gene منفی	TEM gene مثبت	CTXM gene منفی	CTXM gene مثبت	سطح معنی داری
ایمیپنم	مقاوم	۵	۳			۰/۰۱۴
	حساس	۵۷	۵			
سفتازیدیم	مقاوم			۱۲	۸	۰/۰۱۹
	حساس			۴۲	۷	

بحث

گونه‌های سیتروباکتر تمایل به ایجاد عفونت‌های فرصت طلب بیمارستانی با مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی دارند. ژن‌های مختلف ESBL در سال‌های اخیر در نقاط مختلف جهان در میان انتروباکتریاسه‌ها از جمله گونه‌های سیتروباکتر گسترش یافته‌اند(۱۹-۱۷). در این مطالعه بیش‌ترین موارد عفونت سیتروباکتر در بیماران زن میانسال و بیش‌ترین نمونه‌ها مربوط به ادرار و سپس ترشحات مجاری تنفسی بود. با توجه به شیوع بالاتر عفونت ادراری در خانم‌ها، شیوع بیش‌تر عفونت سیتروباکتر در آن‌ها قابل توجیه است. بیش‌ترین ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی در بین گونه‌های سیتروباکتر متعلق به سیتروباکتر فروندی بود که این میزان فراوانی با نتایج مطالعات دیگر همخوانی دارد و به نظر می‌رسد گونه غالب در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی در کرمانشاه باشد(۲۱،۲۰). در مطالعه ما مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های نسل سوم سفالوسپورین‌ها و فلوروکینولون‌ها از مطالعات دیگر پایین تر بود. مثلاً در مطالعاتی که در هندوستان و ژاپن انجام شد، بیش‌ترین مقاومت به سفوتاکسیم (۸۹ درصد)، سفتازیدیم (۸۱/۵ درصد)، سیپروفلوکساسین (۷۵/۳ درصد) و آزترئونام

(۷۴/۷ درصد) و کم‌ترین مقاومت به آمیکاسین (۱۷/۹ درصد)، جنتامایسین (۲۲/۴ درصد)گزارش شد. نتایج این مطالعات در مورد آمینوگلیکوزیدها به مطالعه ما نزدیک است(۱۹، ۲۲). طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ در ایران بر روی ۱۲ ایزوله سیتروباکتر، بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به تتراسایکلین (۹۲ درصد)، نالیدیکسیک اسید (۸۳ درصد)، جنتامایسین (۶۷ درصد) و توبرامایسین (۵۰ درصد) دیده شد که از نتایج مطالعه ما بالاتر بود. از طرفی از ۱۲ ایزوله سیتروباکتر، ۳ ایزوله (۲۵ درصد) ESBL مثبت بودند که این نتیجه با یافته‌های ما همخوانی دارد(۲۳). از سوی دیگر در مطالعه ما بین فراوانی فنوتیپی و ژنوتیپی ESBL در ایزوله‌های سیتروباکتر اختلاف بالایی وجود داشت که ممکن است نشانگر عدم بیان ژن‌های ESBL در ایزوله‌های سیتروباکتر باشد و این پدیده تا حدی مقاومت پایین‌تر ایزوله‌ها را نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم توجیه می‌کند. در مطالعه ما شیوع نسبتاً بالایی از ژن‌های ESBL در سیتروباکتر فروندی وجود داشت که تاییدی بر گسترش ژن‌های مقاومت در این پاتوژن فرصت طلب است. در مطالعه‌ای در لهستان از مجموع ۲۳۸۸ ایزوله انتروباکتریاسه با بیش‌ترین فراوانی نمونه‌های ادراری،۴۴ نمونه به عنوان سیتروباکتر فروندی گزارش شد که از این تعداد ۱۳ (۲۹/۵ درصد) مورد آن‌ها دارای ژن‌های ESBL بودند. در مطالعه‌ای دیگر در تایلند از ۱۰۵ ایزوله سیتروباکتر ۱۸/۷ درصد حاوی ژن‌های ESBL بودند. در مطالعه‌ای در هندوستان ۳۷ درصد ایزوله‌های سیتروباکتر ESBL مثبت بودند(۲۲،۲۵،۲۴). نتایج این مطالعات با نتایج مطالعه ما مشابهت دارد. اما در مطالعات دیگر میزان پایین‌تری برای شیوع ESBL در ایزوله‌های سیتروباکتر گزارش شده است. مثلاً در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۷-۱۹۹۶ بر روی ایزوله‌های انتروباکتریاسه حاصل از بیماران بستری صورت گرفت، ۱۱/۴ درصد از ایزوله‌های سیتروباکتر فروندی، ESBL مثبت بودند(۱۹). هم‌چنین در مطالعه‌ای در ژاپن شیوع ESBL ها ۰/۲درصد گزارش شد و در بررسی دیگری درکره جنوبی بین ۲۰/۶ تا ۴/۹ درصد گزارش گردید. مطالعات دیگری در آمریکا نیز شیوع ESBL ها در سیتروباکتر فروندی ۰/۹ درصد و در سیتروباکتر کوسری ۳/۵ درصد به دست آمده است(۲۵). تفاوت در نتایج این مطالعات می‌تواند نشان دهنده تفاوت در گسترش ژن‌های ESBL در مناطق مختلف جهان باشد و به نظر می‌رسد در کشورهای در حال توسعه شیوع بالاتر باشد. از نظر میزان فراوانی انواع ژن‌های ESBL در سیتروباکتر در مطالعه ما بیش‌ترین شیوع ژن‌های ESBL مربوط به ژن *bla*CTX-M بود که با نتایج اکثر مطالعات همخوانی دارد. در مطالعه ای در لهستان، بیش‌ترین فراوانی با ۲۵ درصد برای CTX-M و سپس SHV با ۴/۵ درصد بود(۲۵،۲۴). در مطالعه‌ی دیگری در تایلند، بیش‌ترین شیوع در ژن‌های CTX-M و TEM گزارش شد که از این لحاظ با نتایج ما سازگار است(۲۶). از طرف دیگر در مطالعات دیگری شیوع ژن SHV از ژن‌های دیگر بالاتر بوده است. مثلاً در مطالعه‌ای در کانادا بر روی سیتروباکتر، بیش‌ترین میزان شیوع ژن‌های ESBL مربوط به SHV (۲۲/۲ درصد) بود. هم‌چنین در ژاپن میزان شیوع این ژن ۱۹/۳ درصد و در کره جنوبی ۴/۹ درصد گزارش شده است(۲۷). این تفاوت در نتایج بیانگر تفاوت در انتشار ژن‌های مورد بررسی در مناطق مختلف دنیا می‌باشد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نتایج این مطالعه نشان داد که درصد بالایی از سیتروباکترهای جدا شده دارای ژن‌های ESBL هستند و از میان آن‌ها ژن *bla*CTX-M بیش‌ترین فراوانی را در این منطقه دارا می‌باشد. از لحاظ مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کم‌ترین مقاومت به کارباپنم‌ها مشاهده شد. ولی در این تحقیق مقاومت بالایی به آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل سفازولین، آمپی‌سیلین و کوتریموکسازول دیده شد، اما در مورد سفالوسپورین‌های نسل سوم مقاومت پایین‌تر بود. بین فراوانی فنوتیپی و ژنوتیپی ESBL در ایزوله‌های سیتروباکتر اختلاف زیادی وجود داشت که ممکن است نشانگر

عدم بیان بالای ژن‌های ESBL در ایزوله سیتروباکتر باشد. نتایج این مطالعه لزوم دقت بیش تر در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در درمان عفونت‌های سیترو باکتر را خاطر نشان می کند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی کرمانشاه تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Jones ME, Avison MB, Damdinsuren E, MacGowan AP, Bennett PM. Heterogeneity at the beta-lactamase structural gene ampC amongst citrobacter spp. assessed by polymerase chain reaction analysis: potential for typing at a molecular level. J Med Microbiol1994; 41(3): 209-214.
2. Lavigne JP, Defez C, Bouziges N, Mahamat A, Sotto A. Clinical and molecular epidemiology of multidrug-resistant Citrobacter spp. Infections in a French university hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007; 26(6): 439-441.
3. Banjara MR, Sharma AP, Joshi AB, Tuladhar NR, Ghimire P, Bhatta DR. Surgical wound infections in patients of Tribhuvan university Teaching Hospital. Nepal Med Coll J 2003; 3: 41-45.
4. Jha AK, Singh JB, Dutta D. Microorganisms present in discharging otitis media in a group of patients in kathmandu. Nepal Med Coll J 2007; 9(3): 196-198.
5. Misra B, Gandham N, Sardar M, Ujagare M, Angadi K, Vyawahare CH, et al. High prevalence of Multi-Drug resistant Citrobacter spp. From tertiary car hospital, Pimpri, Pune, India. J Pharm Biomed Sci 2012; 25(25): 158-63.
6. Jarlier V, Nicolas MH, Fornier G. Extended broad-spectrum B lactamases conferring transferable resistance to newer B lactan agents in Enterobacteriaceae Hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988; 10(4): 867-878.
7. Sabate M, Tarrago R, Navarro F, Miro E, verges C, Barbe J, et al. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing B-lactamases (CTX-M) from Escherichia coli in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(7): 1970-1973.
8. Jacoby GA, Han P. Detection of extended – spectrum B-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. J clin Microbiol 1996; 34(4): 908-911.
9. Mulvey JR, Bryce E, Boyd D, Ofner-Agostini M, Christianson S, Simor AE, et al. Ambler class A extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella spp in Canadian hospital. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(4): 1204-1214.
10. Bush K, Jacoby GA, Medeires A. A functional classification scheme for B-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents chemother. 1995; 39(6): 1211-1233.
11. Bradford PA. Extended-spectrum B-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14(4): 933-951.
12. Mirelis B, Navarro F, Miro E, Mesa RJ, Coll P, Parta G. Community transmission of extended-spectrum B-lactamase. Emerg Infect Dis 2003; 9(8): 1024-1025.

13. Blondeau JM. Extended–spectrum beta-lactamases. Semin Respir Infect 2001; 16(3): 169-176.
14. Clinical And Laboratory Standard Institue. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second. 22th ed. USA: Wayne PA. M100-S22. 2012; 32(3): 50-51.
15. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Russian hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(12): 3724-3732.
16. Kim J, Jeon S, Rhie H, Lee B, Park M, Lee H, et al. Rapid Detection of Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL) for Enterobacteriaceae by use of a Multiplex PCR-based Method. Infect Chemother 2009; 41(3): 181-184.
17. Keyvani H, Hakemivala M, Talebnia-chalanbari Z, Mirbagheri F, Baghri-bejestani F. Phenotypic and molecular study of ESBL production among Escherichia coli strains isolated from patients admitted to hospital orthopedic wounds Akhtar and Firoozgar Tehran, 2000-2001. Iran J Infect Dis Trop Med 2012; 17(59): 29-31 (Persian).
18. Shahid M. *Citrobacter* spp. Simultaneously Harboring *bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*ampC, and Insertion Sequences IS*26* and *orf513*: an Evolutionary Phenomenon of Recent Concern for Antibiotic Resistance. J Clin Microbiol 2010; 45(5): 1833-1838.
19. Pałucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Concurrent outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw hospital. J Antimicrob Chemother 1999; 44(4): 489-99.
20. Choi SH, Lee JE, Park SJ, Kim MN, Choo EJ, Kwak YG, et al. Prevalence, microbiology, and clinical characteristics of extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacter spp., Serratia marcescens, Citrobacter freundii, and Morganella morganii in Korea. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007; 26(8): 557-561.
21. DiPersio JR, Deshpande LM, Biedenbach DJ, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Evolution and dissemination of extended-spectrum B-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae: epidemiology and molecular report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2003). Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 51(1): 1-7.
22. Mohan S, Agarwal J, Srivastava R, Singh M.Observations on citrobacter species from a tertiary care health center with special reference to multi-drug resistance and presence of CTX-M gene. Indian J Pathol Microbiol 2014; 57(3): 439-441.
23. Ghorbani-Dalini S. Molecular detection of ESBL s production and antibiotic resistance patterns in Gram negative bacilli isolated from urinary tract infections. Indian J Pathol Microbiol (IJPM) 2014; 57(2): 244-248.
24. Empel J, Baraniak A, Literacka E, Mrówka A, Fiett J, Sadowy E, et al. Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in Enterobacteriaceae isolates from Polish hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(7): 2449-2454.
25. Kanamori H, Yano H, Hirakata Y, Endo S, Arai K, Ogawa M, et al. High prevalence of extended-spectrum b-lactamases and qnr determinants in Citrobacter species from Japan: dissemination of CTX-M-2. J Antimicrob Chemother 2011; 66(10): 2255-2262.

26. Kiratisin P, Henprasert A. Resistance phenotype-genotype correlation and molecular epidemiology of Citrobacter, Enterobacter, Proteus, Providencia, Salmonella and Serratia that carry extended-spectrum β-lactamases with or without plasmid-mediated AmpC β-lactamase genes in Thailand. Trans R Soc Trop Med Hyg 2011; 105(1): 46-51.
27. Pepperell C, Kus JV, Gardam MA, Humar A, Burrows LL. Low-Virulence *Citrobacter* Species Encode Resistance to Multiple Antimicrobials. Antimicrob Agents Chemoter 2002; 46(11): 3555-3560.