

Epidemiology of Extended Spectrum Beta Lactamases Producing E. coli Genes in Strains Isolated from Children with Urinary Tract Infection in North of Iran

Gohar Eslami¹,
 Mohammad Sadegh Rezai²,
 Ebrahim Salehifar³,
 Alireza Rafiei⁴,
 Taimour langae⁵,
 Mohammad Reza Rafati⁶,
 Kheironesa Shafahi⁷

¹ Associate Professor, Cardiovascular Research Center, Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Professor, Infection Diseases Research Center with Focus on Nosocomial Infection, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Pharmacotherapy and Translational Research, Center for Pharmacogenomics, College of Pharmacy, University of Florida, USA

⁶ Assistant Professor, Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ MSc in Microbiology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 18, 2014 Accepted October 14, 2015)

Abstract

Background and purpose: Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBLs) are one of the most important health care issues all over the world. Uropathogenesis are responsible for life threatening infections in children. In this study we aimed at investigating the epidemiology of CTX, TEM and VEB genes in pediatric UTI.

Materials and methods: Urine samples were collected during six months in Sari Bou Alisina Hospital. The samples were inoculated onto 5% blood agar and MacConkey's agar and the *E. coli* isolates were identified by standard methods. Minimum inhibitory concentration (MIC) of fourteen routine antibiotics was determined by agar dilution method. Resistance to Cefotaxime and ceftazidime was considered as ESBL producing bacteria. These isolates were then tested by Polymerase Chain Reaction (PCR) for the presence or absence of CTX, TEM and VEB beta-lactamase genes.

Results: Of 327 *E. coli* uropathogen, 100 (30.5%) were identified as ESBL producer. The ESBL-producing *E. coli* isolates were susceptible to carbapenems (66%) and amikacin (58%). The most prevalent ESBL genes were TEM (49%) following CTX (28%) and VEB (8%). TEM negative ESBL, were significantly more resistant to cefotaxime, ceftriaxone and amikacin ($P < 0.05$). VEB-producing strains were significantly more resistant to ceftazidime ($P < 0.05$). ESBLs were associated with resistance to cefixime, colistin and cefepime.

Conclusion: Regarding the high level of resistance to broad-spectrum antibiotics, more rational prescribing, empiric therapy assessment and TDM of broad-spectrum antibiotics are recommended.

Keywords: *E. coli*, ESBL, children, TEM, carbapenem

اپیدمیولوژی ژن های اشریشیاکلی مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در عفونت های ادراری کودکان در شمال ایران

گوهر اسلامی^۱
محمدصادق رضایی^۲
ابراهیم صالحی فر^۳
علیرضا رفیعی^۴
تیمور لنگایی^۵
محمد رضا رافتی^۶
خیرالنسا شفاهی^۷

چکیده

سابقه و هدف: مقاومت به باکتری های Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBLs) به عنوان یکی از اصلی ترین مشکلات درمانی مطرح می باشد. با توجه به اهمیت یوروپاتوژن ها در بروز عفونت های تهدید کننده حیات در اطفال، هدف از انجام این مطالعه بررسی اپیدمیولوژی ژن های مقاومت TEM, CTX, VEB در عفونت ادراری اطفال می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی نمونه های ادراری کودکان مراجعه کننده به بیمارستان بوعلی سینا ساری در طول ۶ ماه جمع آوری شد. بعد از تشخیص باکتری اشریشیاکلی براساس تست های استاندارد، تست حداقل غلظت مهاري (MIC) برای چهارده آنتی بیوتیک معمول با استفاده از روش رقیق سازی میکرو در آگار انجام شد. در صورت مقاومت به دو آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و سفنازیدیم، باکتری مولد ESBL در نظر گرفته شد. سپس استخراج DNA و PCR بر روی باکتری های ESBL انجام شد و بیان سه ژن CTX, TEM و VEB مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: از مجموع ۳۲۷ پاتوژن اشریشیاکلی، ۱۰۰ (۳۰/۵ درصد) مورد از آن ها مولد ESBL شناخته شدند. بالاترین حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به کاربامپنم ها (۶۶ درصد) و آمیکاسین (۵۸ درصد) وجود داشت. TEM (۴۹ درصد) شایع ترین ژن مولد ESBL شناخته شد و شیوع CTX و VEB به ترتیب ۲۸ و ۸ درصد بود. در ESBL های فاقد TEM، مقاومت نسبت به سفوتاکسیم، آمیکاسین و سفتریاکسون به صورت معنی داری بیش تر به دست آمد ($p < 0.05$). در سوش های مولد VEB مقاومت به سفنازیدیم به صورت معنی داری بیش تر بود ($p < 0.05$). در مجموع حضور ژن های مولد ESBL همراه با مقاومت بالا به سفیکسیم، کلستین و سفیم بود.

استنتاج: با توجه به میزان بالای مقاومت به کاربامپنم ها و آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، تجویز منطقی تر، ارزیابی درمان های تجربی و مانیتورینگ سطح خونی آنتی بیوتیک های وسیع الطیف در مراکز آموزشی- درمانی توصیه می گردد.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی، مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف، اطفال، ژن TEM، کاربامپنم

مقدمه

حیات در سراسر جهان می باشند (۱). باکتری های Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBLs) به

باسیل های گرم منفی مقاوم به آنتی بیوتیک یکی از عوامل اصلی عفونت های تهدید کننده

E-mail: Salehifare@yahoo.com

مؤلف مسئول: ابراهیم صالحی فر - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. دانشیار، مرکز تحقیقات قلب و عروق، گروه داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات عفونی باکتریا، عفونت های بیمارستانی، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استاد، گروه داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استاد، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. استادیار، گروه فارماکوتراپی، دانشگاه فلوریدا، امریکا
۶. دانشیار، گروه داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۷. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۹/۱۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۷/۲۲

عنوان مهم ترین باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها هستند (۲،۳). براساس معیارهای CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) در صورت مقاومت به بیش از یکی از آنتی بیوتیک های سفنازیدیم، آزترونام، سفوتاکسیم و سفتریاکسون پاتوژن به عنوان ESBL در نظر گرفته می شود (۴،۵). اشریشیاکلی یکی از پاتوژن های فرصت طلب بیمارستانی به ویژه در اطفال می باشد، که به علت دارا بودن پلاسمیدهای کدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف، به آنتی بیوتیک های بتالاکتام مقاوم می باشد. به همین دلیل، درمان عفونت های ناشی از اشریشیاکلی با مشکل مواجه شده است. مقاومت ضد میکروبی در اشریشیاکلی در سرتاسر جهان گزارش شده است و سرعت افزایش مقاومت در این باکتری، نگرانی های زیادی در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته ایجاد کرده است (۳). تاکنون در مناطق مختلف دنیا بیش از ۲۰۰ نوع ESBL شناسایی شد. اولین ژن های مولد، TEM و SHV بوده اند که از کلبسیلا نومونیه در اروپا غربی جدا شدند (۷). ژن VEB نیز اولین بار از باکتری اشریشیاکلی در کشور ویتنام جدا شد. در سال های اخیر ژن CTX که مولد آنزیم سفوتاکسیماز می باشد، رو به افزایش بوده است (۹،۸). این آنزیم عامل ایجاد مقاومت سفالوسپورین های نسل سوم به ویژه سفنازیدیم می باشد (۱۱،۱۰،۳). براساس رابطه ای که بین ژنوتیپ باکتری های مولد ESBL با مقاومت آنتی بیوتیکی گزارش شده است، حضور ژن CTX منجر به مقاومت به فلوروکینولون ها، آمینو گلیکوزیدها و کوتریماکسازل می گردد (۱۱). هم چنین آنتی بیوتیک ها و به ویژه آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، مهم ترین عامل ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و شیوع بالای ESBL گزارش شده است (۴-۱۲). عامل ۳۵ درصد عفونت های ادراری در کودکان در ایران، باکتری های اشریشیاکلی مولد بتا لاکتاماز وسیع الطیف گزارش شده است، که باتوجه به رو به رشد بودن آن و محدودیت های عوامل درمانی حایز اهمیت می باشد. با توجه به شیوع بالا و روز

افزون باکتری های مولد ESBL در کشور و هم چنین با توجه به اهمیت یوروپاتوژن ها در بروز عفونت های تهدید کننده حیات در اطفال، هدف از انجام این مطالعه بررسی رابطه بین بروز ژن های CTX، TEM و VEB با مقاومت آنتی بیوتیکی می باشد.

مواد و روش ها

نمونه گیری و جداسازی باکتری ها

در این مطالعه تجربی نمونه های ادرار در طول ۶ ماه (از دی ماه ۹۱ تا خرداد ماه ۹۲) در بیمارستان بوعلی سینا ساری (مرکز آموزشی - درمانی شمال ایران) جمع آوری شد. نمونه گیری از وسط ادرار به صورت استریل، سوپراپیک مئانه و یا کاتتر مئانه به دست آمد (۱۵). نمونه ها در محیط کشت آگار خون دار ۵ درصد و مک کانکی کشت داده شدند. سپس جداسازی اشریشیاکلی با استفاده از روش های استاندارد انجام شد.

تست حساسیت آنتی بیوتیکی

حساسیت آنتی بیوتیک ها با استفاده از تست دیسک دیفیوژن کربی بائر در مولر هیتون آگار انجام شد و با توجه به گایدلاین CLSI 2011 نتایج مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

تشخیص باکتری های مولد ESBL توسط روش رقیق سازی

میکرو ترقیقی (Microdilution)

ایزوله های مقاوم به سفوتاکسیم و سفتریاکسون به عنوان نمونه های مولد ESBL جهت انجام تست MIC (Inhibitory Concentration Minimum) با رقت های متوالی ارسال شدند. تست MIC برای چهارده آنتی بیوتیک از جمله سفنازیدیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفتری زوکسیم، سفپیم، سفیکسیم، جنتامایسین، آمیکاسین، مروپنم، ایمی پنم، سیروفلوکساسین، کوتریموکسازول، کلستین و پپیراسیلین - تازوباکتام با استفاده از روش رقیق سازی میکرو در آگار تعیین

شد (۲). جهت تعیین MIC محیط آگار مولر هینتون با دو برابر غلظت آنتی بیوتیک مورد نظر (از ۰/۵ µg/ml تا ۲۵۶ µg/ml و ۱۰ µl از سوسپانسیون میکروبی) مورد استفاده قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، رشد میکروبی مشاهده و ثبت شد. سپس براساس گایدلاین CLSI 2011 گزارش و به سه دسته مقاوم، حد واسط و حساس تقسیم شدند. در صورت مقاومت به دو آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و سفنازیدیم، باکتری، مولد ESBL در نظر گرفته شد (۱۸).

یافته ها

از مجموع ۳۲۷ پاتوژن اشریشیاکلی، ۱۰۰ (۳۰/۵ درصد) مورد از آن‌ها مولد ESBL شناخته شدند. با توجه به آزمون MIC (جدول شماره ۲)، ESBLها، بالاترین حساسیت آنتی بیوتیکی را نسبت به کاربامپنم‌ها (۶۶ درصد) و آمیکاسین (۵۸ درصد) نشان دادند. هم‌چنین بیش‌ترین مقاومت نسبت به سفیکسیم (۹۹ درصد)، کلستین (۸۲ درصد) و سیپروفلوکساسین (۷۶ درصد) مشاهده شد. براساس جدول شماره ۳، TEM (۴۹ درصد) شایع‌ترین ژن مولد ESBL شناخته شد و شیوع CTX ۲۸ درصد و VEB ۸ درصد بود. جدول شماره ۴ رابطه بین بیان ژن با مقاومت آنتی بیوتیک را نشان می‌دهد. با توجه به ارزش p ، در اکثر موارد تفاوت معنی‌داری بین حضور ژن و مقاومت آنتی بیوتیک‌ها مشاهده نشد. در مجموع حضور ژن‌های مولد ESBL همراه با مقاومت بالا به سفیکسیم، کلستین و سفپیم بود. در سوش‌های مولد VEB نیز مقاومت به سفنازیدیم به صورت معنی‌داری بیش‌تر مشاهده شد ($p=0/04$).

براساس نمودار شماره ۲، ۵۳/۴ درصد بیماران بستری و ۴۲/۹ درصد بیماران سرپایی حامل ژن مقاوم TEM بودند. در مجموع تفاوت معنی‌داری از لحاظ بروز این ژن در کودکان بستری و سرپایی مشاهده نشد ($p>0/05$). مطابق نمودار شماره ۳، بروز ژن CTX به

جدا سازی DNA و Genotyping جهت استخراج DNA باکتری، ابتدا تک کلونی از محیط کشت به همراه ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به میکروتیوپ منتقل شد. سپس استخراج با استفاده از کیت استخراج DNA (RTA، آنکارا، ترکیه) انجام شد. تشخیص ژن‌های باکتری با استفاده از توالی پرایمرهای PCR بررسی شد. جدول شماره ۱ توالی پرایمر و ویژگی حرارتی برای ژن‌های TEM، VEB و CTX را نشان می‌دهد. محصول PCR با استفاده از ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۱۲/۵ میکرولیتر mix master ۱:۱ × بافر PCR [tris-cl، محلول KCl، (NH₄)₂SO₄، 1.5 میلی [MgCl₂ pH8.7] 200 میکرومولار dNTP و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و ۰/۵ واحد DNA tag polymerase با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر. هم‌چنین به عنوان کنترل مثبت، اشریشیاکلی 35218ATCC برای ژن‌های CTX و TEM و سودوموناس 27853 ATCC برای ژن VEB استفاده شد. همه محصولات PCR در ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۵ دقیقه و رنگ آمیزی با اتیدיום بروماید

جداسازی DNA و Genotyping

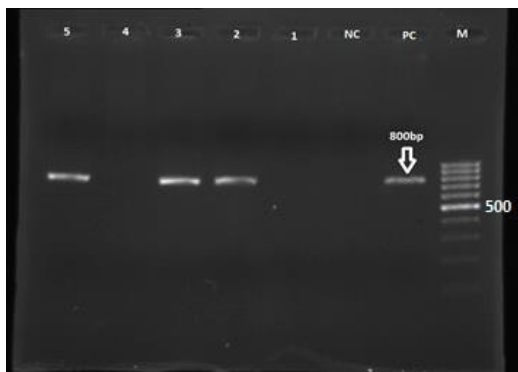
جهت استخراج DNA باکتری، ابتدا تک کلونی از محیط کشت به همراه ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به میکروتیوپ منتقل شد. سپس استخراج با استفاده از کیت استخراج DNA (RTA، آنکارا، ترکیه) انجام شد. تشخیص ژن‌های باکتری با استفاده از توالی پرایمرهای PCR بررسی شد. جدول شماره ۱ توالی پرایمر و ویژگی حرارتی برای ژن‌های TEM، VEB و CTX را نشان می‌دهد. محصول PCR با استفاده از ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۱۲/۵ میکرولیتر mix master ۱:۱ × بافر PCR [tris-cl، محلول KCl، (NH₄)₂SO₄، 1.5 میلی [MgCl₂ pH8.7] 200 میکرومولار dNTP و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و ۰/۵ واحد DNA tag polymerase با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر. هم‌چنین به عنوان کنترل مثبت، اشریشیاکلی 35218ATCC برای ژن‌های CTX و TEM و سودوموناس 27853 ATCC برای ژن VEB استفاده شد. همه محصولات PCR در ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۵ دقیقه و رنگ آمیزی با اتیدיום بروماید

جدول شماره ۱: توالی پرایمرها و شرایط دمایی در PCR ژن‌های TEM، VEB و CTX

ژن‌ها	توالی پرایمرها	شرایط دمایی	سایز (bp)
TEM	F: TAATCAGTGAGGCACCTATCTC R: GAGTATTCAACATTTCCGIGTC (21)	94°C 3min → 35×[94°C 30sec, 45°C 45sec, 72°C 40sec] → 72°C 7 min	۸۰۰
CTX	F: TTGCGATGTGTCAGTACCAAGTAA R: CGATATCGTTGGTGGCATA (25)	94°C 5min → 40×[94°C 45sec, 53.1°C 45sec, 72°C 1min] → 72°C 7 min	۵۹۳
VEB	F: CGACTTCCATTTCCCGATGC R: GGACTCTGCAACAAATACGC (29)	93°C 3min → 40×[93°C 1min, 54.9°C 1min, 72°C 1min] → 72°C 7 min	۵۸۵

F: Forward primer, R: Reverse primer

صورت معنی داری در بیماران سرپایی بیشتر گزارش شد ($p=0/04$). به گونه‌ای که ۳۸ درصد از بیماران سرپایی و ۲۱ درصد بیماران بستری حامل این ژن بودند. بر اساس نمودار شماره ۴، تفاوت معنی داری از لحاظ بروز ژن VEB در بیماران بستری و سرپایی مشاهده نشد ($p>0/05$).



نمودار شماره ۱: تصویر ژل آگارز ژن TEM در نمونه اشریشیاکلی مولد ESBL (bp) ۸۰۰.

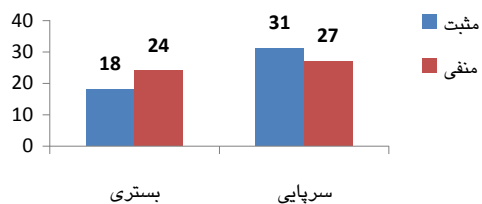
M: مارکر (۱۰۰ bp)

PC (Positive control): باکتری کلیسیلا پنومونی ۷۸۸۱،

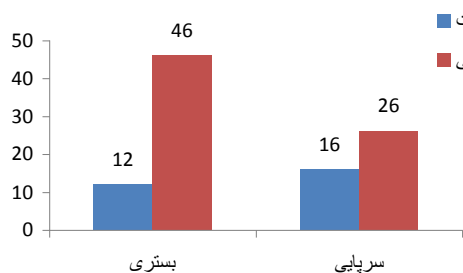
NC (Negative control): E. coli ATCC25922،

۲، ۳ و ۵: نمونه‌های مثبت حامل ژن TEM،

۱ و ۴: نمونه‌های منفی فاقد ژن TEM



نمودار شماره ۲: توزیع فراوانی ژن TEM در اطفال بستری و سرپایی ($p=0/2$)



نمودار شماره ۳: توزیع فراوانی ژن CTX در اطفال بستری و سرپایی ($p=0/04$)

جدول شماره ۲: مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری اشریشیاکلی مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف بر اساس تست رقت متوالی

آنتی بیوتیک ها	مقاوم (درصد)	حد واسط (درصد)	حساس (درصد)
سفالوسپورین ها:			
سفپیم	۶۷	۱۳	۲۰
سفکسیم	۹۹	۰	۱
سفتراکسون	۲۸	۴۲	۳۰
سفتازیدیم	۱۹	۲۶	۵۵
سفتی زوکسیم	۴۶	۲۷	۲۷
سفتوتاکسیم	۱۳	۴۰	۴۷
کارباپنم:			
ایمی پنم	۲۳	۱۱	۶۶
مروپنم	۱۸	۱۵	۶۷
آمینوگلیکوزیدها:			
آمیکاسین	۳۴	۸	۵۸
جتتامیسین	۳۷	۱۲	۵۱
متفرقه:			
سیروفلوکساسین	۷۶	۰	۲۴
کلستین	۸۲	۰	۱۸
کوتریماسازول	۶۵	۷	۲۸
پیراسیلین/تازوبکتام	۲۰	۳۸	۴۲

جدول شماره ۳: توزیع فراوانی ژن های مقاوم CTX، TEM و VEB در باکتری های جدا شده اشریشیاکلی مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف

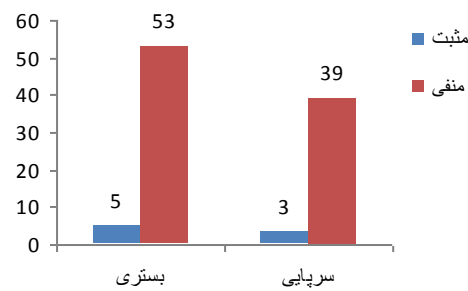
ژن های مقاوم	فراوانی ژن ها
TEM	۴۹
CTX	۲۸
VEB	۸
TEM & CTX	۱۲
VEB & TEM	۵

جدول شماره ۲: حضور ژن های مقاوم و مقاومت آنتی بیوتیک ها در سوش های اشریشیاکلی مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف

آنتی بیوتیک ها	TEM (تعداد (درصد)	CTX (تعداد (درصد)	VEB (تعداد (درصد)
سفالوسپورین ها:			
سفپیم	۳۸ (۷۷,۶)	۲۳ (۸۲,۱)	۶ (۷۵)
سفکسیم	۴۹ (۱۰۰)	۲۷ (۹۶,۴)	۸ (۱۰۰)
سفتراکسون	۲۹ (۵۹,۲)	۲۲ (۷۸,۶)	۴ (۵۰)
سفتازیدیم	۲۲ (۴۴,۹)	۱۱ (۳۹,۳)	۶ (۷۵)*
سفتی زوکسیم	۳۴ (۶۹,۴)	۲۳ (۸۲,۱)	۶ (۷۵)
سفتوتاکسیم	۲۱ (۴۲,۹)	۱۸ (۶۴,۳)	۵ (۶۲,۵)
کارباپنم:			
ایمی پنم	۱۴ (۲۸,۶)	۱۱ (۳۹,۳)	۳ (۳۷,۵)
مروپنم	۱۲ (۲۴,۵)	۹ (۳۲,۱)	۳ (۳۷,۵)
آمینوگلیکوزیدها:			
آمیکاسین	۱۴ (۲۸,۶)	۱۳ (۴۶,۴)	۳ (۳۷,۵)
جتتامیسین	۲۱ (۴۲,۹)	۱۴ (۵۰)	۵ (۶۲,۵)
متفرقه:			
سیروفلوکساسین	۳۴ (۶۹,۴)	۲۱ (۷۵)	۵ (۶۲,۵)
کلستین	۳۹ (۷۹,۶)	۲۳ (۸۲,۱)	۶ (۷۵)
کوتریماسازول	۳۴ (۶۹,۴)	۲۱ (۷۵)	۴ (۵۰)
پیراسیلین/تازوبکتام	۲۹ (۵۹,۲)	۱۵ (۵۳,۶)	۴ (۵۰)

* تفاوت معنی دار آماری (ارزش P کم تر از ۰/۰۵)

مقاومت به کوتریماکسازول و ۹۱/۶ درصد مقاومت به فلوروکینولون‌ها مشاهده شد (۲۸). این تفاوت ممکن است به دلیل روش‌های مختلف ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. در مطالعه حاضر مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها با روش رقت متوالی ارزیابی شد، که از روش دیسک دقیق‌تر می‌باشد. در مطالعات دیگر در مالزی و اسپانیا مقاومت نسبت به هر دو داروی کوتریماکسازول و سپروفلوکساسین کم‌تر گزارش شد (۲۹،۳۰). این دو دارو درمان‌های موثر در درمان عفونت‌های ادراری (اشریشیاکلی) می‌باشند. افزایش مقاومت نسبت به این داروها در مطالعه ما نشان می‌دهد، این عوامل به عنوان آنتی‌باکتریال تجربی نمی‌توانند اثربخشی لازم را دارا باشند. مطالعات مختلفی در بزرگسالان اثربخشی کلستین را بر علیه باکتری‌های کلبسیلا نومونیه و اشریشیاکلی مولد ESBL نشان دادند (۳۱). از طرفی مقاومت نسبت به این دارو روند رو به رشدی داشته است (۳۲). با وجود اثربخشی این دارو بر علیه آسینتوباکتر و سودوموناس، میزان اثربخشی آن در اشریشیاکلی مولد ESBL هنوز چندان مشخص نیست (۳۳،۳۲). هم‌چنین با توجه به مقاومت بالا نسبت به این دارو در این مطالعه، کلستین عامل آنتی‌باکتریال مناسب بر علیه این سوش‌ها در اطفال نمی‌باشد. کاربامپنم‌ها به عنوان عوامل آنتی‌باکتریال موثر در درمان ESBL‌ها گزارش شده است (۳۵،۳۴،۲۹،۲۰). در مطالعه‌ای در عربستان سعودی مقاومت به این دسته از داروها ۱۴ درصد گزارش شد (۳۶). یکی از یافته‌های نگران‌کننده مطالعه حاضر مقاومت بالا نسبت به کاربامپنم‌ها (۳۴ درصد) می‌باشد، که می‌تواند این سوش‌ها را به عوامل تهدیدکننده حیات در اطفال مبدل سازد. مقاومت تهدیدکننده حیات در اثر مصرف غیرمنطقی آنتی‌بیوتیک‌ها بویژه آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف می‌باشد. هم‌چنین مطالعه‌ای که در این مرکز توسط ناصحی و همکاران انجام شد، تجویز زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها بویژه سفتریاکسون، در مقایسه با سایر مراکز درمانی را نشان داد (۳۷). در دو دهه اخیر TEM شایع‌ترین ژن مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف



نمودار شماره ۴: توزیع فراوانی ژن VEB در موارد بستری و سرپایی (p=۰/۵)

بحث

شیوع نسبتاً بالای باکتری‌های مولد ESBL (۳۰/۵ درصد) و مقاومت بالا به عوامل آنتی‌باکتریال وسیع‌الطیف (۳۴ درصد مقاومت به کاربامپنم‌ها) از یافته‌های نگران‌کننده در این مطالعه بود. شیوع اشریشیاکلی مولد ESBL در مطالعات نقاط مختلف دنیا، تفاوت گزارش شده است. در بسیاری از مطالعات بسیار نزدیک به این مطالعه (۳۰ درصد) بود (۲۱-۱۹). در تعدادی از مطالعات این عدد کم‌تر گزارش شد: هند (۲۷ درصد)، لبنان (۱۳/۳ درصد)، کره (۲/۹ درصد) و ترکیه (۱۷ درصد) (۲۴،۲۳). هم‌چنین در بسیاری از مطالعات نیز شیوع آن بیشتر گزارش شد (۲۶،۲۵،۲۳،۲۱). نتایج نشان می‌دهد، شیوع باکتری‌های ESBL در کشورهای مختلف و حتی در مراکز مختلف درمانی متفاوت می‌باشد. مصرف بیش از اندازه آنتی‌بیوتیک‌ها از مهم‌ترین عوامل شیوع بالای این باکتری‌ها و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف می‌باشد. در مطالعات قبلی که در همین مرکز انجام شده بود وضعیت مقاومت باکتری‌های ESBL نسبت به سایر عوامل آنتی‌باکتریال مانند آمینوگلیکوزیدها، کوتریماکسازول و تتراسایکلین‌ها نیز مقاومت چشم‌گیری را نشان دادند. مقاومت به این عوامل منجر به پیچیده‌تر شدن درمان جهت انتخاب عوامل آنتی‌باکتریال موثر می‌گردد (۲۷). در مطالعه حاضر مقاومت بالایی نسبت به آمیکاسین (۳۴ درصد)، کلستین (۸۲ درصد) و کوتریماکسازول (۶۵ درصد) وجود داشت. در مطالعه Babypadmini و همکارانو با استفاده از روش دیسک دیفیوژن ۷۴ درصد

دیگری که در این مرکز جهت بررسی مصرف منطقی آمیکاسین انجام شد تا ۳۰ درصد تجویز آمیکاسین غیرمنطقی گزارش شد (۴۱). نتایج مطالعه ما تایید کننده آن می باشد که در صورت بروز ژن CTX سفنازیدیم عامل موثرتری خواهد بود.

یکی از یافته های مهم مطالعه ما بروز بالای ژن مقاوم CTX به ویژه در بیماران سرپایی بوده است. این ژن در سال های اخیر رشد چشم گیری داشته به گونه ای که در عفونت های اکتسابی از جامعه نیز در حال گسترش می باشد. در مطالعه ای که توسط Falagas و همکاران انجام شد، نیز گسترش روزافزون این ژن مقاوم به ویژه در جامعه به عنوان عامل تهدید کننده حیات شناخته شد (۱۳). با توجه به مقاومت بالای آنتی بیوتیکی که در سوش های حامل CTX مطالعه حاضر دیده شد، این ژن می تواند عامل ایجاد مقاومت عفونت های ادراری اطفال در جامعه و بیمارستان باشد. در نتیجه جلوگیری از گسترش روزافزون آن اهمیت به سزایی در بهبود پیامد این بیماران خواهد داشت. انجام تست های تشخیصی سوش های ESBL در عفونت های اکتسابی از جامعه و بیمارستان جهت انتخاب صحیح درمان کودکان مبتلا به عفونت ادراری و همچنین جهت جلوگیری از شیوع روزافزون این سوش ها توصیه می گردد.

با توجه به میزان بالای مقاومت به کاربپنم ها و آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، تجویز منطقی تر، ارزیابی درمان های تجربی و مانیتورینگ سطح خونی آنتی بیوتیک های وسیع الطیف در مراکز آموزشی-درمانی توصیه می گردد. هم چنین انجام سریع تر تست های تشخیصی جهت شناسایی پاتوژن های ESBL، در عفونت های ادراری کودکان به منظور جلوگیری از شیوع این ارگانسیم ها در عفونت های اکتسابی از جامعه اکیداً توصیه می شود.

در اشریشیاکلی شناخته شد (۳۵،۲۹،۲۰). در مطالعه ای در تایلند نیز شایع ترین ژن TEM (۷۶ درصد)، سپس CTX و VEB به ترتیب با فراوانی ۵۲/۸ درصد و ۱۶/۷ درصد بودند. در مطالعه حاضر بعد از TEM، به ترتیب CTX (۲۸ درصد) و VEB (۸ درصد) کم ترین شیوع را داشتند. هم چنین، در مجموع ۱۷ سوش، همزمان حامل دو ژن مقاوم بودند. در سال های اخیر CTX رشد قابل توجهی داشت و به عنوان یکی از شایع ترین ژن های مولد مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف به ویژه در اشریشیاکلی مطرح می باشد. با توجه به این نکته که بیان بعضی از ژن ها با مقاومت به عوامل آنتی بیوتیک خاص ارتباط دارد. رشد روزافزون CTX منجر به بروز مقاومت به کینولون ها در باکتری های بتالاکتاماز وسیع الطیف می شود (۲۷) و این امر منجر به عدم کارایی مناسب کینولون ها در درمان این عفونت ها شده است. در مطالعه حاضر علی رغم مقاومت ۷۶ درصد نسبت به سیپروفلوکساسین، ارتباط معنی داری بین وجود ژن ها و مقاومت به کینولون ها مشاهده نشد. در مطالعه Bragner و همکاران مقاومت نسبت به فلوروکینولون ها در گروه مولد CTX و حساسیت نسبت به سیپروفلوکساسین در سوش های مولد TEM و SHV به صورت چشم گیری بیش تر گزارش شد (۲۷). در مطالعه حاضر ۷۵ درصد سوش های مولد CTX به کینولون ها و ۵۰ درصد نسبت به آمینوگلیکوزیدها مقاوم بودند. مقاومت نسبت به کینولون ها به صورت قابل توجهی در مطالعه Eldestein و همکاران (۲۱ درصد) کم تر گزارش شد (۳۸) و در مقابل در مطالعه Mendoneca و همکاران (۹۳ درصد) میزان مقاومت بیش تر بود (۳۹). نتایج مختلف در مطالعات می تواند در تفاوت روش نمونه گیری باشد، در مطالعه دیگر بر خلاف مطالعه حاضر نمونه های اشریشیاکلی تنها از ادرار جدا سازی نشد. هم چنین در سوش های مولد CTX مقاومت نسبت به سفوتاکسیم بیش تر از سفنازیدیم گزارش شد (۴۰،۳۸). در مطالعه

References

1. Girish N, Saileela K, Mohanty SK. Extended

Spectrum beta-Lactamase Producing Klebsiella

- pneumoniae and Escherichia coli in Neonatal Intensive Care Unit. *J Bacteriol Parasitol* 2012; 3(4):1-3.
2. Bhat MA, Sageerabano S, Kowsalya R, Sarkar G. The Occurrence of CTX-M Type Extended Spectrum Beta Lactamases among Escherichia Coli Causing Urinary Tract Infections in a Tertiary Care Hospital in Puducherry. *J Clin Diag Res* 2012; 6(7): 1203-1206.
 3. Bhattacharjee A, Sen MR, Prakash P, Gaur A, Anupurba S. Increased prevalence of extended spectrum \hat{I}^2 lactamase producers in neonatal septicaemic cases at a tertiary referral hospital. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26(4): 356-360.
 4. Bradford PA. Extended-spectrum \hat{I}^2 -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 933-951.
 5. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB. Extended-spectrum \hat{I}^2 -lactamases in Klebsiella pneumoniae bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-type \hat{I}^2 -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(11): 3554-3560.
 6. Lal P, Kapil A, Das BK, Sood S. Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum b-lactamases (ESBLs) producing Klebsiella sp. isolated from a tertiary care hospital. *Indian J Med Res* 2007; 125(2): 173-178.
 7. Rodríguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Muniain MA, Perea EJ, Pérez-Cano R, et al. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum \hat{I}^2 -lactamase-producing Escherichia coli as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin Infect Dis* 2006; 42(1): 37-45.
 8. Jemima SA, Verghese S. Multiplex PCR for blaCTX-M & blaSHV in the extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing gram-negative isolates. *Indian Med Res* 2008; 128(3): 313-317.
 9. Rupp   E, Hem S, Lath S, Gautier V, Ariey F, Sarthou JL, et al. CTX-M \hat{I}^2 -lactamases in Escherichia coli from community-acquired urinary tract infections, Cambodia. *Emerging Infectious Diseases* 2009; 15(5): 741.
 10. Shukla I, Tiwari R, Agrawal M. Prevalence of extended spectrum-lactamase producing Klebsiella pneumoniae in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol* 2004; 22(2): 87-91.
 11. Liem TBY, Filius PMG, Linden VD, Janknegts R, Natsch S, Vulto AG. Changes in antibiotic use in Dutch hospitals over a 6-year period: 1997-2002. *Antimicrobial drug use in hospitalized children* 2011; 63(9): 60.
 12. Oteo Js, Bautista V, Lara N, Cuevas O, Arroyo M, Fernández S, et al. Parallel increase in community use of fosfomycin and resistance to fosfomycin in extended-spectrum \hat{I}^2 -lactamase (ESBL) producing Escherichia coli. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(11): 2459-2463.
 13. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum \hat{I}^2 -lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect* 2009; 73(4): 345-354.
 14. Askarian M, Maharlouie N. Irrational antibiotic use among secondary school teachers and university faculty members in Shiraz, Iran. *Int J Prev Med* 2012; 3(12): 839-845.
 15. Bazzaz BS, Naderinasab M, Mohamadpoor AH, Farshadzadeh Z, Ahmadi S, Yousefi F. The prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and

Klebsiella pneumoniae among clinical isolates from a general hospital in Iran. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2009; 56(1): 89-99.

16. Representatives L. Practice Parameter: The Diagnosis, Treatment, and Evaluation of the Initial Urinary Tract Infection in Febrile Infants and Young Children. American Academy of Pediatrics. Committee on Quality Improvement. Subcommittee on Urinary Tract Infection. *Pediatrics* 1999; 103(4): 843-856.
17. Cockerill FR. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement. 2011: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
18. Wayne P. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing .Twenty-first informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI document. M100-S21; 2011; 32(1).
19. Kochaksaraii B, Nasrolahiomran A, Javid N, Yazdi M, Ghaemi EA. Extended spectrum beta lactamase producing *E.coli* isolated from Gorgan, North of Iran. *Medical Laboratory Journal* 2012; 6(1).
20. Moosavian M, Deiham B. Distribution of TEM, SHV and CTX-M Genes among ESBL-producing Enterobacteriaceae isolates in Iran. *Afr J Microbiol Res* 2012; 6(26): 5433-5439.
21. Manoharan A, Premalatha K, Chatterjee S, Mathai D; SARI Study Group. Correlation of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta lactamases among Enterobacteriaceae with their in vitro antimicrobial susceptibility. *Indian J Med Microbiol* 2012 ; 29(2): 161-164.
22. Arbabi L, Rahbar M, Jabbari M, Mohammad zadeh M, Azimi L, Ebrahimzadeh Namvar A. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *E.coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections in Milad Hospital, Tehran, Iran. *Health Med* 2012; 6(11): 2818-2822.
23. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Prevalence of ESBLs genes among multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in Tehran. *Microb Drug Resist* 2009; 15(1): 37-39.
24. Ananthan S, Subha A. Cefoxitin resistance mediated by loss of a porin in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Indian J Med Microbiol* 2005; 23(1): 20-23.
25. Mirzaee M, Pourmand MR, Chitsaz M, Mansouri S. Antibiotic resistance to third generation cephalosporins due to CTX-M-type extended-spectrum \hat{I}^2 -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Public Health* 2009; 38(1): 10-17.
26. Nakhaei Moghaddam, Forghanifard MM, Moshrefi S. Prevalence and Molecular Characterization of Plasmid-mediated Extended-Spectrum \hat{I}^2 -Lactamase Genes (blaTEM, blaCTX and blaSHV) Among Urinary *Escherichia coli* Clinical Isolates in Mashhad, Iran. *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15(3): 833-839.
27. Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, et al. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum \hat{I}^2 -lactamase type. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(1): 54.-61
28. Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum-lactamases in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*-Prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol* 2004; 22(3): 172-174.

29. Lim TL, Yasin R, Yeo CC, Puthuchearry S, Thong KL. Characterization of multidrug resistant ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from hospitals in Malaysia. *Journal of biomedicine and biotechnology*, 2009.
30. Oteo JI, Lázaro E, de Abajo FJ, Baquero F, Campos J. Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(4): 546-553.
31. Ku YH, Lee MF, Chuang YC, Chen CC, Yu WL. In vitro activity of colistin sulfate against Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta lactamases. *J Microbiol Immunol Infec* 2013; S1684-1182.
32. Benenson S, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Adler A, Strahilevitz J, Moses AE, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* endocarditis in a young adult: Successful treatment with gentamicin and colistin. *Int J Infect Dis* 2009; 13(5): e295-e298.
33. Walkty A, DeCorby M, Nichol K, Karlowsky JA, Hoban DJ, Zhanel GG. In vitro activity of colistin (polymyxin E) against 3,480 isolates of gram-negative bacilli obtained from patients in Canadian hospitals in the CANWARD Study, 2007-2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(11): 4924-4926.
34. Manoharan A, Premalatha K, Chatterjee S, Mathai D. Correlation of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta lactamases among Enterobacteriaceae with their in vitro antimicrobial susceptibility. *Indian J Med Microbiol* 2011; 29(2): 161-164.
35. Rezai MS, Salehifar E, Rafiei A, Langaee T, Rafati M, Shafahi K, et al. Characterization of Multidrug Resistant Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* among Uropathogens of Pediatrics in North of Iran. *Biomed Research International* 2015.
36. Kader AA, Kumar AK. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase among multidrug resistant gram-negative isolates from a general hospital in Saudi Arabia. *Saudi Med J* 2004; 25(5): 570-574.
37. Salehifar E, Nasehi M, Eslami G, Sahraei S3, Alizadeh Navaei R4. Determination of antibiotics consumption in Buali-Sina Pediatric Hospital, Sari 2010-2011. *Iran J Pharm Res* 2014; 13(3): 995-1001.
38. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Strachounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(12): 3724-3732.
39. Mendonca N, Leitao J, Manageiro V, Ferreira E. Spread of extended-spectrum β -lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(6): 1946-1955.
40. Baraniak A, Fiett J, Sulikowska A, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(1): 151-159.
41. Eslami G, Ebrahim Salehifar E, Behbudi M, Rezai MS. Rational Use of Amikacin in Buali-Sina Hospital in Sari 2011. *J Mazand Univ Med Sci* 2013; 23(100): 2-9 (Persian).