Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:48 +0430 on Thursday July 19th 2018

ORIGINAL ARTICLE

Detection of Extended Spectrum Beta Lactamases on Class I Integron in Escherichia coli Isolated from Clinical Samples

Samane Mohebi[1],
Hossien Hossieni Nave[2],
Amin Norouzi[1],
Mohammadreza Kandehkar Gharaman[2],
Majid Taati Moghadam[1]

[1] Msc Student in Microbiology, Kerman Medical Students Research Committee, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
[2] PhD Student in Microbiology, School of Medicine, Kerman University of Medical sciences, Kerman, Iran

(Received, December 10, 2015 ; Accepted April 11, 2016)

Abstract

Background and purpose: Extended spectrum beta lactamases (ESBLs) are important causes of multidrug resistance (MDR) *Escherichia coli.* ESBL genes are usually located on conjugative plasmids or on integron structures. The aim of this study was to detect ESBLs on class I integron in *Escherichia coli* isolated from clinical samples.

Materials and methods: A descriptive cross-sectional study was performed in which 60 isolates of *E. coli* were collected from two hospitals in Kerman, Iran during three months. The isolates were identified using standard microbiological and biochemical techniques. Antibiotic susceptibility pattern of isolates was determined by disk agar diffusion method. ESBL-producing *E. coli* was determined using phenotypic double disc test. Then, Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect *int*I, *bla*-TEM, *bla*-SHV, and *bla*-CTX-M genes. Data analysis was done in SPSS applying Chi-square test.

Results: The highest and lowest rates of antibiotic sensitivities in isolated *E. coli* were found to amikacin and imipenem (3.3%) and ampicillin (66.6%), respectively. Multidrug resistance was detected in 43.3% of the samples. 45% of isolates were identified as ESBL producers. Prevalence of *bla*-TEM, *bla*-CTX-M and *bla*-SHV genes were 74.07%, 69.9%, and 7.4%, respectively. Class I integron was detected in 60% of the isolates.

Conclusion: In this study, we observed a significant association between ESBL and class I integron which confirms that ESBLs were located on integron class I and easily transferred into bacteria.

Keywords: *E. coli*, ESBL, class 1 integrons

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(138): 66-76 (Persian).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:48 +0430 on Thursday July 19th 2018

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۳۸ تیر سال ۱۳۹۵ (۷۶-۶۶)

بررسی وجود آنزیم های بتالاکتامازهای وسیع الطیف بر روی اینتگرون کلاس I در اشرشیاکلی جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان های کرمان

سمانه محبی[۱]
حسین حسینی نوه[۲]
امین نوروزی[۱]
محمدرضا کنده کار قهرمان[۲]
مجید طاعتی مقدم[۱]

چکیده

سابقه و هدف: بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs)، به عنوان گروهی از آنزیم‌های بتالاکتاماز، از عوامل مهم مقاومت دارویی چندگانه در اشریشیا کلی می‌باشند. ژن‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف معمولاً بر روی پلاسمیدها یا اینتگرون‌ها قرار دارند. هدف از این مطالعه، بررسی وجود آنزیم های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بر روی اینتگرون کلاس I در اشرشیاکلی جدا شده از نمونه‌های بالینی بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی مقطعی طی ۳ ماه، ۶۰ نمونه اشرشیاکلی از بیماران بستری در دو بیمارستان آموزشی کرمان (افضلی‌پور و شفاء) جمع‌آوری و جدایه‌ها توسط آزمایش‌های میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی تایید شدند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک‌دیفیوژن آگار و تولید آنزیم‌های ESBL با استفاده از روش Double disc تعیین گردید. در نهایت حضور ژن‌های *bla*-SHV, *bla*-TEM, *int*I و *bla*-CTX-M توسط PCR شناسایی شدند. آنالیز اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون Chi-square انجام گرفت.

یافته‌ها: براساس یافته‌های به دست‌آمده، بیش‌ترین و کم‌ترین درصد حساسیت، به ترتیب مربوط به آمیکاسین و ایمی‌پنم (۳/۳ درصد) و آمپی‌سیلین (۶۶/۶ درصد) بود. از مجموع ۶۰ نمونه، ۴۳/۳ درصد جدایه‌ها دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند. از مجموع ۶۰ جدایه، ۴۵ درصد از جدایه‌ها تولیدکننده ESBL بودند. فراوانی ژن‌های *bla*-TEM، *bla*-CTX-M و *bla*-SHV در جدایه‌های اشرشیاکلی به ترتیب ۷۴/۰۷ درصد، ۶۹/۹ درصد و ۷/۴ درصد بودند. در این مطالعه ۶۰ درصد جدایه‌ها دارای اینتگرون کلاس I بودند.

استنتاج: در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین اینتگرون کلاس I و آنزیم‌های ESBLs مشاهده شد که این ارتباط می‌تواند نشان‌دهنده حضور ژن‌های ESBLs بر روی اینتگرون کلاس I و انتقال سریع این ژن‌ها در باکتری باشد.

واژه های کلیدی: اشرشیاکلی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، اینتگرون کلاس I، کرمان

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مانند پنی‌سیلین، سفالوسپورین‌ها، مونوباکتام و کارباپنام‌ها در اغلب موارد در سراسر جهان تجویز می‌شوند(۱). اما در سال‌های اخیر، تعداد متنوعی از بتالاکتامازهای جدید شناسایی شده‌اند

مولف مسئول: مجید طاعتی مقدم- کرمان: دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی E-mail: Majidtaati1367@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۲. دانشجوی دکتری باکتری شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۹/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۹/۲۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۱/۲۳

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:48 +0430 on Thursday July 19th 2018

که ظاهراً در پاسخ به استفاده بالینی از کلاس‌های جدید آنتی‌بیوتیک بتالاکتام به‌طور هشدار دهنده‌ای با افزایش مقاومت همراهند(۲). این آنزیم‌ها، دفاع عمده باکتری‌های گرم منفی در برابر آنتی‌بیوتیک بتالاکتام و مهم‌ترین عامل مقاومت می‌باشند. بتالاکتامازها آنزیم‌های باکتریایی هستند که با غیر فعال کردن و هیدرولیز ترکیبات بتالاکتام، باعث بی‌اثرشدن ترکیبات آنتی بیوتیک می‌شوند(۳). اگرچه بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) توصیف شده در طیف وسیعی از انتروباکتریاسه و پسودوموناسیه از نقاط مختلف دنیا گزارش شده‌اند، اما آن‌ها اغلب در *کلبسیلا پنومونیه* و *اشریشاکلی* شناسایی شدند(۴). درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌های مولد این آنزیم‌ها بسیار مشکل است، چون از یک سو باعث مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین‌ها می‌شوند و از سوی دیگر بسیاری از ژن‌های ESBL بر روی پلاسمیدهای بزرگی (بیش از ۱۰۰کیلو باز) قرار دارد که همزمان حامل ژن‌های مقاومت به سایر عوامل ضد میکروبی مثل آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، سولفونامیدها وتتراسایکلین نیز هست(۵). اگرچه ژن‌های کدکننده آنزیم‌های ESBL بر روی یک پلاسمید قابل انتقال قرار دارند، اما بیش‌تر ژن‌های ESBL که اخیراً شناسایی شده‌اند، به‌طور مکرر در ساختارهایی مانند اینتگرون یافت شده‌اند. بنابراین ژن‌های ESBL می‌توانند بر روی اینتگرون‌ها قرار گیرند و به‌راحتی توسط این عناصر ژنتیکی گسترش پیدا کنند(۶).

اینتگرون‌ها عناصر ژنتیکی هستند که شامل تعدادی ژن و محل ویژه الحاق برای سیستم نوترکیبی هستند که آن‌ها را قادر می‌سازد تا کاست‌های ژنی متحرک را به دست بیاورند و انتقال افقی آن‌ها در بین باکتری‌ها یکی از مهم‌ترین راه‌های انتشار ژن‌های مقاومت می‌باشد(۷). هم‌چنین مطالعات مختلف نشان می‌دهند که مقاومت چند داروئی در باکتری‌ها به‌صورت قابل ملاحظه‌ای در ارتباط با وجود اینتگرون‌ها و کاست‌های ژنی می‌باشند(۸،۷). اینتگرون کلاس I، شایع‌ترین اینتگرون در بین باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که ناحیه محافظت شده ´۳ آن حاوی ژن‌هایی است که سبب مقاومت به ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی و سولفونامیدها می‌شود. برای تشخیص حضور اینتگرون کلاس I، محققین از دو ناحیه به عنوان نواحی هدف برای شناسایی در باکتری‌ها استفاده کرده‌اند. یکی از این نواحی، ژن آنزیم اینتگراز است که هدف خوبی برای شناسایی اینتگرون کلاس I در نمونه و هم‌چنین تشخیص کلاس اینتگرون‌های موجود می‌باشد. یکی دیگر از نواحی مورد استفاده، ناحیه متغیر در بین دو ناحیه حفاظت شده در ساختار اینتگرون‌ها است. ناحیه متغیر اینتگرون‌ها محل قرارگیری کاست‌های ژنی می‌باشد که توسط دو ناحیه حفاظت شده CS–´۳ و CS-´۵ احاطه شده‌اند(۸). از آن‌جایی که اطلاعات محدودی در زمینه ارتباط آنزیم‌های ESBL با اینتگرون‌ها وجود دارد، هدف از این مطالعه بررسی نقش با اهمیت آنزیم‌های ESBL بر روی اینتگرون کلاس I می‌باشد.

مواد و روش ها

جمع‌آوری نمونه و شناسایی باکتری: در این مطالعه به روش توصیفی مقطعی طی مدت ۳ ماه، جدایه‌های اشرشیاکلی از بیمارستان‌های افضلی پور و شفا شهر کرمان از نمونه‌های بالینی شامل ادرار، خون، زخم و برونش از بیماران بستری و سرپایی جداسازی شد و به بخش میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه کرمان انتقال داده شد و سپس با توجه به روش‌های استاندارد تشخیصی و بیوشیمیایی شامل TSI، SIM، MR-VP، سیترات و اوره شناسایی گردیدند(۹).

تست تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جداشده با پیروی از دستورالعمل CLSI (Clinical and laboratory standard institute) و با استفاده از روش دیسک دیفیوژن انجام شد و آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده شامل دیسک‌های ایمی پنم (۱۰µg)، سفتازیدیم (۳۰µg)،

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:48 +0430 on Thursday July 19th 2018

جنتامایسین (۱۰µg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰µg)، کوتریموکسازول (۱/۲۵/۲۳/۷۵µg)، سفتریاکسون (۳۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg) ،آمپی سیلین (۱۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg) و سیپروفلوکساسین (۵µg) بودند که از شرکت Himedia هند خریداری شد(۱۰).

شناسایی بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)

برای شناسایی جدایه‌های تولیدکننده ESBLs از تست تاییدی فنوتیپی شامل دیسک‌های ترکیبی سفتازیدیم/ کلاولانیک اسید (۳۰/۱۰ µg) در مقایسه با سفتازیدیم (۳۰µg) و سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید (۳۰/۱۰ µg) در مقایسه با سفوتاکسیم (۳۰µg) که از شرکت Himedia هند خریداری شد، استفاده شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌های تولیدکننده ESBLs دارای قطر هاله عدم رشد به اندازه ۵ میلی‌متر یا بیش‌تر در اطراف دیسک‌های سفتازیدیم/ کلاولانیک اسید در مقایسه با سفتازیدیم و یا سفوتاکسیم /کلاولانیک اسید در مقایسه با سفوتاکسیم بودند. PCR جهت شناسایی ژن های *intI*، *bla-TEM*، *bla-SHV* و *bla-CTXM*، پس از تعیین جدایه‌هایی که از نظر فنوتیپی مثبت بودند، DNA نمونه‌های شناسایی شده به عنوان ESBLs با استفاده از روش جوشاندن جداسازی شد که در این روش، مقداری از کلنی‌های باکتری اشرشیاکلی به داخل یک اپندورف حاوی ۱ میلی‌لیتر آب مقطر انتقال داده و یک سوسپانسیون به وجود آمد و سپس اپندورف حاوی سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد و بعد از آن در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاوی DNA مورد نظر بوده که جهت انجام PCR استفاده گردید. در این روش با استفاده از کیت Master mix (شرکت آمپیکون دانمارک)، PCR انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده و هم‌چنین اندازه باندهای محصولات بر روی ژل الکتروفورز بر اساس رفرنس در جدول شماره ۱ ذکر گردیده است.

جهت انجام PCR در حجم نهایی، ۲۵ میکرولیتر در لوله‌های اپندروف از مخلوط کردن ۱۲/۵میکرولیتر مسترمیکس، ۳ میکرولیتر از DNA باکتری، ۱۰ pmol از پرایمر مورد نظر و حجم مناسبی از آب مقطر استریل استفاده شد و هم‌چنین واکنش PCR طبق برنامه‌ای که در جدول شماره ۲ قرار دارد، انجام گردید(۹). پس از انجام آزمایش PCR، محصولات PCR در ژل ۱/۵ درصد در TBE بافر به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ الکتروفورز گردید. برای رنگ آمیزی ژل، آن را به مدت ۱۵ دقیقه در تانک حاوی اتیدیوم بروماید قرار داده و سپس نتایج توسط دستگاه Geldocument مشاهده شدند. از سویه *استنتو باکتر بومانی* TMU1 به ترتیب برای کنترل مثبت ژن‌های *intI* و هم‌چنین از سویه *کلبسیلا پنومونیه* سویه *ATCC 700603* به‌عنوان سویه کنترل مثبت تولیدکننده ژن bla_{-SHV} و bla_{-CTXM} از سویه *اشریشیاکلی ATCC 35218* به عنوان کنترل مثبت ژن bla_{-TEM} استفاده گردید و هم‌چنین از سویه اشرشیاکلی *ATCC 25922* به عنوان سویه کنترل منفی در این مطالعه استفاده شد.

آنالیز اطلاعات

پس از جمع آوری داده ها، اطلاعات مربوط به هر جدایه باکتری، وارد نرم افزار SPSS-22 شد و با استفاده از آزمون آماری Chi-square رابطه بین اطلاعات آنالیز گردید. سطح معنی‌داری، کم تر از ۰/۰۵در نظرگرفته شد.

جدول شماره ۱: توالی پرایمر ها دمای آنیلینگ و محل قرار گیری ژن ها بر روی ژل آگاروز

ژن	توالی پرایمر	باند محصول (bp)	TM(ċ)	رفرنس
bla-SHV	F: TCAGCGAAAAACACCTTG R: TCCCGCAGATAAATCACC	۴۷۱	۵۶	۱۱
bla-TEM	F- GAGTATTCAACATTTCCGTGTC R- TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	۸۶۱	۵۹	۱۱
bla-CTXM	F- CGCTTTGCGATGTGCAG R- ACCGCGATATCGTTGGT	۵۵۰	۵۹	۱۲
intI	F: CAGTGGACATAAGCCTGTTC R: CCCGAGGCATAGACTGTA	۱۶۰	۵۵	

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:48 +0430 on Thursday July 19th 2018

جدول شماره ۲: شرایط نهایی مطلوب برای دستیابی به بهترین نتیجه PCR

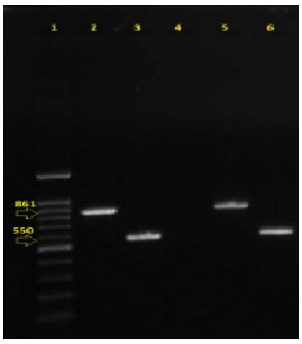
	شرایط تکثیر		دما (سانتی گراد)	زمان (ثانیه)
	واسرشتگی اولیه		۹۵	۳۰۰
	واسرشتگی		۹۵	۳۵
تعداد سیکل = ۳۰	آنیلینگ	ژن *intI*	۵۵	۴۰
		ژن *bla-TEM*	۵۹	
		ژن *bla-SHV*	۵۶	
		ژن *bla-CTX-M*	۵۹	
	گسترش		۷۲	۴۰
	گسترش پایانی		۷۲	۳۰۰

یافته ها

در این مطالعه از ۶۰ جدایه اشرشیاکلی، ۵۴ (۹۰ درصد) جدایه‌ها از بیماران مبتلا به عفونت ادراری و میزان جدایه جداسازی شده از خون، زخم و برونش به ترتیب ۲ (۳/۴ درصد)، ۱ (۱/۶ درصد) و ۳ (۵ درصد) بودند. با توجه به نتایج به دست آمده از آنتی‌بیوگرام، بیش‌ترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین (۶۶/۶ درصد) وجود داشت و هم‌چنین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول (۶۰ درصد)، نالیدیسیک اسید (۴۳/۳ درصد)، سفتریکسون (۴۳/۳ درصد)، در سطح قابل توجه‌ای بود. کم‌ترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین و ایمی‌پنم (۳/۳ درصد) مشاهده شد که این آنتی‌بیوتیک‌ها موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها علیه جدایه‌های اشرشیاکلی می‌باشد. حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین (۷۵ درصد)، جنتامایسین (۸۸/۳ درصد)، سفتریاکسون (۶۱/۶ درصد)، سفوتاکسیم (۵۵ درصد) و سفتازیدیم (۵۵ درصد) نیز در سطح بالایی می‌باشد. جدول شماره ۳ جزئیات به دست آمده از نتایج آنتی‌بیوگرام را نشان می‌دهد. هم‌چنین آنالیز اطلاعات آنتی‌بیوگرام نشان داد که الگوی مقاومت در نمونه‌ها جداسازی شده از ادرار، خون، زخم و مایعات برونش با هم متفاوت می‌باشد. نتایج آنتی‌بیوگرام نشان می‌دهد که ۲۶ جدایه (۴۳/۳ درصد) اشرشیاکلی حداقل به سه خانواده آنتی‌بیوتیکی مقاوم (Multi Drug Resistance) بودند. جدول شماره ۴ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعداد جدایه‌های MDR را نشان می‌دهد. هم‌چنین نتایج تست دیسک ترکیبی جهت شناسایی فنوتیپی جدایه‌های ESBLs نشان داد که ۲۷ جدایه (۴۵ درصد) به‌طور فنوتیپی تولیدکننده ESBLs بودند. بعد از انجام تست‌های فنوتیپی جهت شناسایی جدایه‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف، PCR برای جدایه‌های فنوتیپی مثبت نشان داد که تمامی جدایه‌هایی که از لحاظ فنوتیپی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بودند، دارای حداقل یک ژن از سه ژن *bla-TEM*، *bla-SHV* و *bla-CTXM* بودند. بیش‌ترین شیوع در جدایه‌های تولیدکننده ESBLs، ژن *bla-TEM* به خود اختصاص داد که ۲۰ جدایه (۷۴/۰۷ درصد) از ۲۷ جدایه تولیدکننده ESBLs، تولیدکننده این ژن بودند و کم‌ترین شیوع را ژن *bla-SHV* که در ۲ جدایه‌ها (۷/۴ درصد) مشاهده شد و ۱۷ جدایه (۶۹/۹ درصد) دارای ژن *bla-CTXM* بودند و هم‌چنین هیچ کدام از جدایه‌های تولیدکننده ESBLs، به‌طور همزمان دارای هر سه ژن به *bla-TEM*، *bla-SHV* و *bla-CTXM* نبودند (تصاویر شماره ۱ و ۲).

جدول شماره۳: درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک درجدایه‌های اشرشیاکلی و انواع نمونه های بالینی

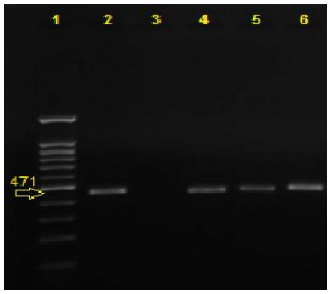
آنتی بیوتیک	ادرار (درصد)	خون (درصد)	زخم (درصد)	برونش (درصد)	کل نمونه ها: حساس (درصد)	کل نمونه ها: نیمه حساس (درصد)	کل نمونه ها: مقاوم (درصد)
ایمی پنم	۱۳/۳	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۹۳/۳	۳/۳	۳/۳
آمیکاسین	۳/۳	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۹۵	۱/۶	۳/۳
آمپی سیلین	۵۸/۳	۱/۶	۱/۶	۵/۰	۳۰	۳/۳	۶۶/۶
سیپروفلوکساسین	۲۱/۶	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۷۵	۳/۳	۲۱/۶
جنتامایسین	۱۱/۶	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۸۸/۳	۰/۰	۱۱/۶
سفتریاکسون	۳۳/۳	۰/۰	۰/۰	۳/۳	۶۱/۶	۱/۶	۳۶/۶
سفتازیدیم	۲۸/۳	۰/۰	۰/۰	۳/۳	۵۵	۸/۳	۳۶/۶
نالیدیکسیک اسید	۳۸/۳	۱/۳	۰/۰	۳/۳	۴۸/۳	۸/۳	۴۳/۳
سفوتاکسیم	۳۵	۰/۰	۰/۰	۳/۳	۵۵	۱/۶	۴۳/۳
کوتریموکسازول	۶۰	۱/۶	۱/۶	۳/۳	۳۵	۵/۰	۶۰



تصویر شماره۱: نشان دهنده وجود ژن *bla-TEM* (۸۶۱ bp) و *bla-CTXM*

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:48 +0430 on Thursday July 19th 2018

(۵۵۰bp) می‌باشد. چاهک شماره۱ مارکر (۱۵۰۰bp-۱۰۰)، چاهک شماره ۴ سویه کنترل منفی، چاهک شماره ۲ و ۳ سویه کنترل مثبت و چاهک شماره ۵ و ۶ جدایه های بالینی دارای ژن های *bla-TEM* و *bla-CTXM* می باشند.



تصویر شماره ۲: نشان‌دهنده باندهای ژن *bla-SHV* (۴۷۱ bp) می‌باشد. چاهک شماره ۱ مارکر(۱۵۰۰bp-۱۰۰)، چاهک شماره۳ سویه کنترل منفی، چاهک شماره ۲ سویه کنترل مثبت و چاهک شماره ۴، ۵ و ۶ جدایه های بالینی دارای ژن *bla-SHV* می باشند.

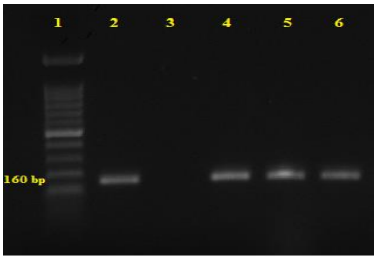
جدول شماره ۴: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های MDR اشرشیاکلی

ردیف	تعداد	الگوی مقاومت
۱	۲	AM, SXT, CTX, CRO, NA, CIP, IPM, GM, CAZ
۲	۲	AM, SXT, CTX, CRO,NA, CIP, GM, AN, CAZ
۳	۱	AM, CTX, CRO, NA, CIP, IPM, GM, CAZ
۴	۱	AM, SXT, CTX, CRO, NA, CIP, CAZ
۵	۲	AM, SXT, CTX, CRO, NA, CIP, GM, CAZ
۶	۲	AM, SXT, CTX, CRO, NA, CIP, CAZ
۷	۱	AM, SXT, CTX, CRO, CIP, IPM, CAZ
۸	۱	AM, SXT, CTX, CRO, NA, IPM, CAZ
۹	۵	AM, SXT, CTX, CRO, NA, CAZ
۱۰	۲	AM, SXT, CTX, CRO, AN, CAZ
۱۱	۳	AM, SXT, CTX, CRO, CAZ
۱۲	۳	AM, SXT, NA
۱۳	۱	SXT, CIP, IPM

AM: آمپی‌سیلین، SXT: کوتریموکسازول، CTX: سفوتاکسیم، CRO: سفتریاکسون، NA: نالیدیکسیک اسید، CIP: سیپروفلوکساسین، IPM: ایمی پنم، GM: جنتامایسین، CAZ: سفتازیدیم، AN: آمیکاسین

جدول شماره ۵ نشان می‌دهد که مقاومت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها در جدایه‌های تولیدکننده ESBLs بیش‌تر از جدایه‌های فاقد ESBLs می‌باشد و هم‌چنین رابطه معنی‌داری بین جدایه‌های تولیدکننده ESBLs و مقاومت به جنتامایسین، سفالوسپورین‌ها، آمپی‌سیلین، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین در این مطالعه مشاهده شد (جدول شماره ۴). مقاومت به بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم، کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید و آمپی‌سیلین در جدایه‌های تولیدکننده ESBLs نسبت به جدایه‌های فاقد آنزیم ESBLs بسیار بالاتر می‌باشد. از طرفی رابطه معنی‌داری بین جدایه‌های تولیدکننده ESBLs و مقاومت MDR وجود داشت (p=۰/۰۰۲).

بررسی فراوانی اینتگرون کلاس I در ۶۰ جدایه اشرشیاکلی نشان داد که ۳۶ جدایه (۶۰ درصد) دارای اینتگرون کلاس I بودند (تصویر شماره ۳) و ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون کلاس I و مقاومت در سویه‌های MDR وجود نداشت (p=۰/۷). اما ارتباط معنی‌داری بین اینتگرون کلاس I و آنزیم‌های ESBLs مشاهده شد (p=۰/۰۳) که از ۳۶ جدایه‌ای که از نظر آنزیم ESBLs مثبت بودند، ۲۰ جدایه دارای اینتگرون کلاس I بودند.



تصویر شماره۳: نشان‌دهنده باندهای ژن*intI* (۱۶۰bp) می‌باشد. چاهک شماره ۱ مارکر (۱۵۰۰bp-۱۰۰)، چاهک شماره ۳ سویه کنترل منفی، چاهک شماره ۲ سویه کنترل مثبت و چاهک شماره ۴، ۵ و ۶ جدایه های بالینی دارای ژن *intI* می باشند

جدول شماره ۵: میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف در جدایه‌های ESBLs فاقد ESBLs

آنتی بیوتیک	جدایه های فاقد ESBLs (درصد)	جدایه های تولیدکننده ESBLs (درصد)	سطح معنی داری
ایمی پنم	۰/۰ درصد	۷/۴ درصد	۰/۰۷
آمیکاسین	۰/۰ درصد	۷/۴ درصد	۰/۵
آمپی سیلین	۴۵/۴ درصد	۸۸/۸ درصد	۰/۰۰۱
سیپروفلوکساسین	۳ درصد	۴۸/۱ درصد	۰/۰۰۲
جنتامایسین	۰/۰ درصد	۲۵/۹ درصد	۰/۰۰۲
سفتریاکسون	۰/۰ درصد	۷۷/۷ درصد	۰/۰۰۰
سفتازیدیم	۳ درصد	۱۰۰ درصد	۰/۰۰۰
نالیدیکسیک اسید	۱۸/۱ درصد	۷۷/۷ درصد	۰/۰۸
سفوتاکسیم	۳ درصد	۱۰۰ درصد	۰/۰۰۰
کوتریموکسازول	۲۹/۳ درصد	۸۱/۴ درصد	۰/۰۰۵

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:48 +0430 on Thursday July 19th 2018

بحث

در جهت کاهش هزینه‌های درمانی و شناسایی عوامل مهم بیماری‌زا در بیمارستان و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جهت کنترل شیوع این عوامل، اتخاذ یک استراتژی نوین در درمان و تشخیص این سویه ها ضروری می‌باشد. درمان این عفونت‌ها، که در سال‌های گذشته به آسانی با آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین قابل در مان بودند، متاسفانه امروزه با کسب انواع مقاومت‌ها از جمله تولید آنزیم‌های ESBLs و کاست‌های ژنی بیماریزا نظیر اینتگرون‌ها، دارای درمانی مشکل و پرهزینه شده اند(۱۴). در این مطالعه بیش‌ترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین وجود داشت و هم‌چنین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول، نالیدیسیک اسید و سفتریکسون در سطح قابل توجه‌ای بود. کم‌ترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین و ایمی‌پنم مشاهده شد که این آنتی‌بیوتیک‌ها موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها علیه گونه‌های اشرشیاکلی می‌باشد. هم‌چنین در این مطالعه مقاومت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها در جدایه‌های ESBLs بیش‌تر از جدایه‌های فاقد ESBLs می‌باشد. مطالعات زیادی در ایران و سایر نقاط جهان انجام شده که مشابه نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌باشد که در این میان می‌توان به مطالعه‌ای که توسط مهرگان و همکاران در تهران انجام شد اشاره کرد که این محققین گزارش کردند که موثرترین آنتی‌بیوتیک علیه جدایه‌های اشرشیاکلی، ایمی‌پنم می‌باشد و مقاومت یه تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص در سفالوسپورین‌ها، در جدایه‌های تولیدکننده ESBLs بیش‌تر از جدایه‌های فاقد ESBLs بود که این نتایج مشابه با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد(۱۵). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط بهروزی و همکاران در کرج انجام شد، بیش‌ترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین گزارش شد، اما مقاومت به سفالوسپورین‌ها در جدایه‌های اشرشیاکلی بالاتر از نتایج به دست آمده از این مطالعه بود(۱۶).

در مطالعه‌ای که توسط Hassan و همکاران انجام شد، این محققین نیز بیش‌ترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و بیش‌ترین حساسیت را نسبت به آنتی‌بیوتک ایمی پنم گزارش کردند که این نتایج مشابه با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد(۱۷).

در مطالعه‌ای که Hawser و همکاران نیز انجام دادند، میزان حساسیت به ایمی‌پنم در جدایه‌های اشرشیاکلی از تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بیش‌تر بود و هم چنین مقاومت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها در جدایه‌های اشرشیاکلی همانند نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر در جدایه‌های تولیدکننده ESBLs بیش‌تر از جدایه‌های فاقد ESBLs گزارش شد(۱۸). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط Jain و همکاران انجام شد، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در جدایه‌های تولیدکننده ESBLs بیش‌تر از جدایه‌های فاقد ESBLs می‌باشد که مشابه با نتایج مطالعه حاضر است(۱۹).

نتایج آنتی‌بیوگرام نشان می‌دهد که ۲۶ جدایه (۴۳/۳ درصد) اشرشیاکلی، MDR بودند. در مطالعه‌ای که توسط Rezaee و همکاران در تبریز انجام شد، ۸۴/۲ درصد از جدایه‌های اشرشیاکلی، MDR بودند که این میزان فراوانی جدایه‌های MDR بسیار بالاتر از نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌باشد و نشان می‌دهد فراوانی این ایزوله‌ها در نقاط مختلف متفاوت است(۲۰). اما در مطالعه‌ای که توسط Ho و همکاران در مالزی انجام شد، ۴۶ درصد از جدایه‌های اشرشیاکلی دارای مقاومت MDR بودند که این میزان از فراوانی مشابه با نتایج به دست آمده از این مطالعه است(۲۱).

نتایج PCR نشان داد۲۷ جدایه(۴۵ درصد) تولیدکننده ESBLs بودند. بیش‌ترین شیوع را در جدایه‌های تولیدکننده ESBLs، ژن *bla-TEM* به خود اختصاص داد که ۲۰ جدایه (۷۴/۰۷ درصد) از ۲۷ جدایه تولیدکننده ESBLs، تولیدکننده این ژن بودند و کم‌ترین شیوع را ژن *bla-SHV داشت* که در ۲ جدایه (۷/۴ درصد) مشاهده شد و ۱۷ جدایه (۶۹/۹ درصد) دارای ژن *bla-CTX-M*

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:48 +0430 on Thursday July 19th 2018

بودند. در مطالعه‌ای که توسط مهرگان و همکاران انجام شد، ۶۷/۲ درصد از جدایه‌های اشرشیاکلی تولیدکننده ESBLs بودند که این میزان شیوع، بیش‌تر از نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر می‌باشد. در پژوهشی که توسط جزایری و همکاران در سمنان انجام شد، ۱۷/۴۵ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی تولیدکننده ESBLs بودند که این میزان شیوع، پایین‌تر از مطالعه حاضر می‌باشد(۲۲). هم‌چنین Pakzad و همکاران نشان دادند که ۲۸ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی دارای ESBLs بودند(۲۳). Hassan و همکاران میزان شیوع ESBLs را در جدایه‌های اشرشیاکلی۵۴ درصد گزارش کردند(۱۷). از طرفی در ژاپن، Suzuki و همکاران نشان دادند که ۸۴ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی تولیدکننده آنزیم ESBLs می‌باشند(۲۳). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط Jain و همکاران انجام شد، نشان دادند که ۶۳/۳ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی تولیدکننده ESBLs بودند(۱۹). در مطالعه منوچهری و همکاران که در سال ۲۰۱۵ انجام شد، اعلام کردند که ۶۰ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی، دارای بتالاکتاماز CTXM بوده است(۲۴).

در مطالعه دیگری که توسط رضایی و همکاران در سال ۲۰۱۵ صورت‌گرفت، فراوانیESBLs را درجدایه‌های اشرشیاکلی ۳۰/۵ درصد گزارش کردند که TEM با شیوع ۴۹ درصد بیش‌ترین شیوع را به خودش اختصاص داد و SHV و CTXM ترتیب ۴۴ درصد و ۲۸ درصد شیوع داشتند که همانند مطالعه حاضر، بیش‌ترین فراوانی را TEM به اختصاص داده است(۲۵). نتایج به دست آمده از این مطالعات نشان می‌دهد که شیوع آنزیم‌های ESBLs در نقاط مختلف جهان و حتی در نقاط مختلف یک کشور متفاوت است و گزارش‌ها نشان‌دهنده افزایش این آنزیم‌ها در چند سال گذشته می‌باشد.

بررسی فراوانی ژن اینتگرون کلاس I در این مطالعه نشان داد که ۳۶ جدایه (۶۰ درصد) اشرشیاکلی دارای این ژن بودند. در مطالعه‌ای که ژاپنی و همکاران در جنوب ایران در سال ۱۳۸۷ انجام دادند، ۴۴/۸ درصد از جدایه‌های اشرشیاکلی دارای ژن اینتگرون بودند که تا حدودی به مطالعه حاضر نزدیک می‌باشد(۲۶). هم‌چنین در سال ۱۳۹۰، رضایی و همکاران در غرب ایران فراوانی اینتگرون کلاس I را در جدایه‌های اشرشیاکلی ۲۲/۰۵ درصد گزارش کردند که این میزان فراوانی پایین‌تر از نتایج مطالعه حاضر می‌باشد(۲۰). در مطالعه‌ای که توسط نجیبی و همکاران در تهران (۱۳۹۱) انجام شد، نشان دادند که ۸۲ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی دارای اینتگرون کلاس I بودند(۲۷). در سال ۱۳۹۲، رنجبران و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی جدایه‌های اشرشیاکلی انجام دادند، مشخص کردند که ۸۶ درصد جدایه‌ها دارای اینتگرون کلاس I بودند که این میزان فراوانی بالاتر از نتایج به دست آمده از این مطالعه است(۲۸). در سایر نقاط جهان، مطالعات زیادی در زمینه فراوانی اینتگرون‌ها در باکتری‌ها صورت گرفته است. در مطالعه‌ای که توسط Kang و همکاران درکره انجام شد، ۳۳ درصد از نمونه‌های بالینی اشرشیاکلی دارای اینتگرون کلاس I بودند(۲۹). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط Mathai و همکاران در هند انجام شد، ۳۶/۲ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی دارای اینتگرون کلاس I بودند(۳۰). در مالزی، Ho و همکاران طی بررسی که بر روی جدایه‌های اشرشیاکلی انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که ۳/۱ درصد آن‌ها دارای اینتگرون کلاس I بودند که بسیار پایین‌تر از نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌باشد(۲۱).

مطالعات فوق در زمینه فراوانی ژن اینتگرون نشان می‌دهد که فراوانی اینتگرون بر اساس توزیع جغرافیایی این ژن‌ها در شهرهای مختلف ایران و کشورهای مختلف متفاوت می‌باشد که در برخی نقاط جغرافیایی، فراوانی اینتگرون کم‌تر از مطالعه حاضر است، اما در برخی نقاط جغرافیایی، فراوانی اینتگرون بالاتر از نتایج به دست آمده از این مطالعه است و این می‌تواند زنگ خطری برای افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی باشد.

در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین اینتگرون کلاس I و آنزیم‌های ESBLs مشاهده شد که این

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:48 +0430 on Thursday July 19th 2018

ارتباط می‌تواند نشان دهنده حضور ژن‌های ESBLs بر روی اینتگرون کلاس I و انتقال سریع این ژن‌ها در باکتری اشرشیاکلی باشد. مطالعات زیادی توسط محققین صورت گرفته است که مشابه با نتایج به دست آمده از این مطالعه و تاییدکننده حضور ژن‌های ESBLs بر روی اینتگرون‌ها می‌باشد. Stürenburg، Machado و همکاران طی مطالعه‌ای که انجام دادند، مشخص کردند که جایگاه ژن‌های ESBLs بر روی اینتگرون می باشد و رابطه معنی‌داری بین حضور ژن‌های ESBLs و اینتگرون وجود دارد(۳۲،۳۱). اما برخلاف نتایج به دست آمده از این مطالعات، Ho و همکاران رابطه معنی‌داری بین ژن‌های ESBLs و اینتگرون مشاهده نکرده‌اند و در مطالعه‌ای که توسط Kang و همکاران انجام شد، این محققین به حضور ژن‌های ESBLs بر روی پلاسمید اشاره نموده‌اند که این یافته‌ها با نتایج به دست آمده از این مطالعه مطابقت ندارد(۲۹،۲۱).

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که ژن های ESBLs، می‌تواند بر روی اینتگرون قرارگیرد و به آسانی در باکتری‌های گرم منفی نظیر اشرشیاکلی منتقل شوند. در این مطالعه شیوع بالای آنزیم‌های ESBLs و اینتگرون کلاس I در اشرشیاکلی جداشده از نمونه‌های بالینی نشان می‌دهد که به کارگیری سیاست‌هایی جهت کنترل عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها بسیار با اهمیت است. هم‌چنین به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، ظهور این عوامل بیماریزا باعث مشکلات فراوان در درمان و ایجاد عفونت‌های مقاوم قابل انتقال در میان باکتری‌ها شده است، بنابراین آزمایشگاه‌های میکروب شناسی تشخیصی، باید تکنیک‌های مناسبی برای شناسایی این عوامل بیماریزا داشته باشند. در نهایت پیشنهاد می‌شود با انجام مطالعات مولکولی و اپیدمیولوژی در زمینه شیوع و شناسایی آنزیم‌های ESBLs و اینتگرون‌ها و ارتباط این ژن‌ها با عفونت‌ها تا حدودی بتوان از عوارض این عوامل بیماری‌زا جلوگیری نمود.

سپاسگزاری

در این مطالعه مراتب قدردانی و تشکر خود را از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به دلیل حمایت مالی و اجرایی اعلام می‌داریم.

References

1. Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. Escherichia coli sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant E. coli infections in the United States. Clin Infect Dis 2010; 51(3): 286-294.
2. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. Clin Infect Dis 1997; 24(Suppl 1): S19-45.
3. Bush K. New beta -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis 2001; 32(7): 1085-1089.
4. Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. Biochem J 1991; 276(Pt 1): 269-270.
5. Perilli M, Celenza G, De Santis F, Pellegrini C, Forcella C, Rossolini GM, et al. E240V substitution increases catalytic efficiency toward ceftazidime in a new natural TEM-type extended-spectrum beta-lactamase, TEM-149, from Enterobacter aerogenes and Serratia marcescens clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(3): 915-919.
6. Machado E, Cantón R, Baquero F, Galán JC, Rollán A, Peixe L, et al. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. Antimicrob

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:48 +0430 on Thursday July 19th 2018

Agents Chemother 2005; 49(5): 1823-1829.

7. Yan H, Li L, Zong M, Alam MJ, Shinoda S, Shi L. Occurrence and characteristics of class1 and 2 integrons in clinical bacterial isolate from patients in south China. J Health Sci 2010; 56(4): 442-450.
8. Ramírez MS, Piñeiro S. Argentinian Integron Study Group, Centrón D. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(2): 699-706.
9. Koneman EW. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 24th Informational Supplement. M100-S24 2014; 34(1): 1-226.
11. Zaniani FR, Meshkat Z, Naderi Nasab M, Khaje-Karamadini M, Ghazvini K, Rezaee A, et al. The prevalence of TEM and SHV genes among extended-spectrum beta-lactamases producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Iran J Basic Med Sci 2012; 15(1): 654-660.
12. Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, Boyer M, Chanal C, Sirot J. CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14 beta-lactamases from Enterobacteriaceae isolated in France. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(2): 534-537.
13. Yan ZQ, Shen DX, Cao JR, Chen R, Wei X, Liu LP, et al. Susceptibility patterns and molecular epidemiology of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strains from three military hospitals in China. Int J Antimicrob Agents 2010; 35(3): 269-273.
14. Marty L, Jarlier V. Surveillance des bactéries multirésistantes: justification, rôle du laboratoire, indicateurs, données françaises récentes. Pathologie et Biologie 1998; 46(4): 217-226.
15. Mehrgan H, Rahbar M. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Int J Antimicrob Agents 2008; 31(2): 147-151.
16. Behrooozi A, Rahbar M, Yousefi JV. Frequency of extended spectrum beta-lactamase (ESBLs) producing Escherichia coli and klebseilla pneumonia isolated from urine in an Iranian 1000-bed tertiary care hospital. Afr J Microbiol Res 2010; 4(9): 881-884.
17. Hassan SA, Jamal SA, Kamal M. Occurrence of multidrug resistant and ESBL producing E. coli causing urinary tract infections. Journal of Basic and Applied Science 2011; 7(1): 39-43.
18. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Badal RE, Hsueh PR, Paterson DL. Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(8): 3280-3284.
19. Jain A, Roy I, Gupta MK, Kumar M, Agarwal SK. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria in septicaemic neonates in a tertiary care hospital. J Med Microbiol 2003; 52(5): 421-425.
20. Rezaee MA, Sheikhalizadeh V, Hasani A. Detection of integrons among multi-drug resistant (MDR) Escherichia coli strains isolated from clinical specimens in northern west of Iran. Braz J Microbiol 2011; 42(4): 1308-1313.
21. Ho WS, Balan G, Puthucheary S, Kong BH, Lim KT, Tan LK, et al. Prevalence and characterization of multidrug-resistant and

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:48 +0430 on Thursday July 19th 2018

extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli from pediatric wards of a Malaysian hospital. Microb Drug Resist 2012; 18(4): 408-416.

22. Moghadas AJ. Prevalence of extended-spectrum beta lactamase positive and multidrug resistance pattern of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates, Semnan, Iran. Iran J Microbiol 2009; 1(1): 49-53.
23. Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino J, Ito K, Arakawa Y. Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli in Japan by clonal spread. J Antimicrob Chemother 2009; 63(1): 72-79.
24. Manouchehri M, Ahanjan M. Detection of CTX beta-lactamase Gene in Escherichia Coli Isolated from Urinary Tract Infection Using Polymerase Chain Reaction. J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(129): 36-45 (Persian).
25. 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 Res Int 2015; 2015: 309478.
26. Japoni A, Gudarzi M, Farshad S, Basiri E, Ziyaeyan M, Alborzi A, et al. Assay for integrons and pattern of antibiotic resistance in clinical Escherichia coli strains by PCR-RFLP in Southern Iran. Jpn J Infect Dis 2008; 61(1): 85-88.
27. Najibi S, Bakhshi B, Fallahzad S, Pourshafie MR, Katouli M, Sattari M, et al. Distribution of class 1 integrons among enteropathogenic Escherichia coli. Can J Microbiol 2012; 58(5): 637-643.
28. Ranjbaran M, Zolfaghari M, Japoni-Nejad A, Amouzandeh-Nobaveh A, Abtahi H, Nejad M, et al. Molecular investigation of integrons in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from urinary tract infections. J Mazandaran Univ Med Sci 2013; 23(105): 20-27 (Persian).
29. Kang HY, Jeong YS, Oh JY, Tae SH, Choi CH, Moon DC, et al. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in Escherichia coli isolates from humans and animals in Korea. J Antimicrob Chemother 2005; 55(5): 639-644.
30. Mathai E, Grape M, KRONVALL G. Integrons and multidrug resistance among Escherichia coli causing community- acquired urinary tract infection in southern India. Apmis 2004; 112(3): 159-164.
31. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect 2003; 47(4): 273-295.
32. Machado E, Ferreira J, Novais Â, Peixe L, Cantón R, Baquero F, et al. Preservation of integron types among Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(6): 2201-2204.