ORIGINAL ARTICLE

# *Detection of CTX beta-lactamase Gene in Escherichia Coli Isolated from Urinary Tract Infection Using Polymerase Chain Reaction*

Mahya Manouchehri[1],
Mohammad Ahanjan[2]

[1] MSc Student in Microbiology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, Pediatric Infectious Disease Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 18, 2015 Accepted August 23, 2015)

## *Abstract*

**Background and purpose:** *Escherichia Coli* is one of the most common pathogens associated with nosocomial infection. Increasing use of beta Lactam Antibiotics in treatment of bacterial infections resulted in increments of drug resistance of such bacteria that is caused due to the production of B-lactamase enzymes. The beta lactamase – producing bacteria especially *E.coli* which is resistant to beta lactam antibiotics may pose great risks for patients. This study was conducted to determine the prevalence of CTX B-lactamase in *E.coli* isolates collected from hospitals in sari and Qaemshaher, Iran.

**Materials and methods:** In this study, 200 urine samples were collected from nephrology and infection departments in Qaemshaher Razi and Sari Imam Khomeini hospitals. The samples were cultured on EMB agar and incubated at $37^{oC}$ for 24 hours. *E.coli* isolates were detected in 120 samples using standard bio chemical tests. ESBL production was determined by combination disk method. Then, the susceptibility of isolates towards antibiotics was determined by standard disk diffusion method. The presence of CTX gene was determined applying PCR.

**Results:** From 120 samples identified as *Ecoli* 66 (55%) were ESBLs producing strains. PCR showed that from 66 isolates 40 (60%) contained CTX gene.

**Conclusion:** Our study showed high frequency of CTX gene in ESBL producing isolates. This indicates the role of enzyme in resistance to beta lactam containing antibiotics. This issue poses a serious harm to public and all necessary actions should be taken to prevent and control this problem.

***Keywords:*** *Escherichia Coli*, ESBL, antimicrobial, resistant, blaCTX

**J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(129): 36-45 (Persian).**

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۹ مهر سال ۱۳۹۴ (۴۵-۳۶)

# بررسی ژن مقاومت بتالاکتاماز CTX در اشرشیا کلی جدا شده از نمونه های عفونت ادراری بیمارستان های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

مهیا منوچهری [۱]
محمد آهنجان [۲]

## چکیده

**سابقه و هدف:** اشرشیا کلی به عنوان پاتوژن فرصت طلب شایع در عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شود. مصرف روزافزون آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام سبب ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری شده است که این مقاومت معمولاً در اثر تولید آنزیم های بتالاکتامازی است. تولید آنزیم بتالاکتاماز در باکتری‌ها به ویژه در اشرشیا کلی مشکلات فراوانی را برای درمان بیماران ایجاد نموده است. این مطالعه به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شیوع ژن CTX در اشرشیا کلی جدا شده از بیمارستان‌های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، شهرستان ساری انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی مقطعی ابتدا ۲۰۰ نمونه ادراری از بخش‌های عفونی و نفرولوژی بیمارستان‌های رازی قائم شهر و امام خمینی (ره) ساری گردآوری شده، پس از کشت بر روی محیط EMB آگار در دمای ۳۷$^{oC}$ به مدت ۲۴ ساعت و انجام تست‌های بیوشیمیایی برای تایید، از بین ۲۰۰ نمونه ۱۲۰ ایزوله اشرشیا کلی جدا سازی شد. برای شناسایی مولد بتالاکتاماز از روش دیسک ترکیبی استفاده شد. سپس حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با روش کربی بائر تعیین شد. بررسی حضور ژن بتالاکتامازی CTX با استفاده از روش PCR انجام گرفت.

**یافته‌ها:** از ۱۲۰ سویه مورد بررسی ۶۶ (۵۵ درصد) سویه مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بوده، پس از طی پروسه PCR برای شناسایی ژن CTX مشخص گردید از ۶۶ سویه بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت، ۴۰ ایزوله (۶۰ درصد) حاوی ژن مورد نظر بوده است.

**استنتاج:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ژن CTX شیوع بالایی در بین ایزوله‌های اشرشیا کلی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) دارد، که وجود این آنزیم در باکتری با مقاومت آنتی‌بیوتیکی رابطه مستقیمی دارد. امروزه این مسئله یکی از مشکلات بهداشتی جدی در سطح دنیاست که اقدامات لازم به جهت جلوگیری از این مشکل الزامی است.

**واژه های کلیدی:** اشرشیا کلی، ESBL، مقاومت آنتی بیوتیکی، بتالاکتاماز

## مقدمه

اشرشیاکلی (E.Coli) باکتری گرم منفی و عضو اصلی خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد(۱). این باکتری عامل بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی از قبیل مننژیت، سپسیس، گاستروانتریت و عفونت ادراری است.

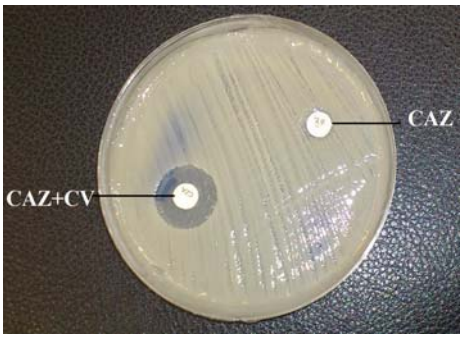
**مولف مسئول: محمد آهنجان**- ساری، کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: ahanjan2007@gmail.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار، گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی اطفال مازندران، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۱/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۲/۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۶/۱

E.Coli شایع‌ترین عامل عفونت ادراری می‌باشد که بیش از ۸۰ درصد موارد را به خود اختصاص می‌دهد(۳،۲). برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری معمولا از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله سفالوسپورین های وسیع الطیف و کارباپنم‌ها استفاده می‌شود(۴). این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها با تخریب دیواره سلولی باکتری باعث از بین رفتن آن‌ها می‌شوند(۵). مهم‌ترین مکانیسم مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام تولید آنزیم‌های بتا لاکتاماز می‌باشد که با هیدرولیز هسته مرکزی آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام باعث غیر فعال شدن آن‌ها می‌شوند(۶). پیدایش آنتی‌بیوتیک‌های جدید و مصرف بی‌رویه و نا منظم آن‌ها برای درمان بیماری‌های عفونی، منجر به ایجاد دسته جدیدی از این آنزیم‌ها به نام بتالاکتاماز وسیع الطیف شده است(۶). بتالاکتامازها به دو صورت مولکولی (Ambler) و عملکردی (Medeiros-Jacoby-Bush) طبقه‌بندی می‌شوند(۷).

در سال ۱۹۸۰ طبقه‌بندی مولکولار توسط Ambler پیشنهاد شد. بتالاکتامازها به لحاظ ساختار اولیه به ۴ دسته A، B، C، D تقسیم می‌شوند(۹،۸). گروه A، C، D بتالاکتامازهای سرینی هستند و گروه B برای عملکرد خود نیازمند روی (Zn) است(۹،۸). طبقه‌بندی بتالاکتامازها به لحاظ عملکردی به چهار گروه تقسیم می‌شود و این طبقه‌بندی از زمان جدا شدن سفالوسپورین‌ها از پنی‌سیلینازها آغاز شد(۱۱،۱۰). بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) از لحاظ مولکولی در کلاس A بوده و بر اساس طبقه بندی عملکردی در گروه دوم قرار دارند(۷). بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLS) در دهه ۱۹۸۰ شناسایی شدند و بیش‌تر از نوع SHV و TEM بودند. این آنزیم‌ها در اثر جهش نقطه‌ای از آنزیم‌های فاقد فعالیت وسیع الطیف به وجود آمده‌اند(۱۲). بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف توسط پلاسمیدهای قابل انتقال کدگذاری می‌شوند. بنابراین وجود آنزیم‌های بتالاکتاماز امکان مکانیسم مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را برای باکتری فراهم می‌کند(۱۳). بتالاکتامازهای تیپ CTX-M گروهی از ESBL ها هستند که از طریق پلاسمید کد می‌شوند(۱۴) و برای اولین بار در آلمان در سال ۱۹۸۹ شناسایی شدند(۷). این آنزیم‌ها (CTX-M) با بتالاکتامازهای تیپ TEM و SHV ارتباط ژنتیکی کمی دارند و شباهت زیادی میان آنزیم کروموزومی AmpC با آنزیم های CTX-M وجود دارد(۱۵). بتالاکتامازهای CTX بر اساس تغییرات اسیدآمینه به ۵ گروه اصلی $CTX-M_1$، $CTX-M_2$، $CTX-M_8$، $CTX-M_9$ و $CTX-M_{25}$ دسته‌بندی می‌شوند(۱۶). شیوع بتالاکتامازهای CTX-M در اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه بسیار بیش‌تر از سایر انتروباکتریاسه‌ها می‌باشد(۷). در حال حاضر $CTX-M_{15}$ که متعلق به زیر گروه $CTX-M_1$ است، به‌طور گسترده در سراسر جهان توزیع شده است و برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ در هند شناسایی شد(۱۷). آنزیم CTX-M عمدتاً سفوتاکسیم را هیدرولیز می‌کند و اغلب فعالیت ضعیفی نسبت به سفتازیدیم دارند، اگرچه برخی مانند $CTX-M_{15}$ فعالیت قوی در برابر سفتازیدیم دارد(۱۸). در سال‌های اخیر شیوع آنزیم‌های ESBL خصوصاً CTX-M افزایش پیدا کرده است(۱۹). این آنزیم‌ها باعث مقاومت به پنی‌سیلین و طیف وسیعی از سفالوسپورین‌های نسل سوم می‌شوند، اما به آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل سفامایسین و کاربپنم حساس هستند و عواملی مثل کلاولونیک اسید، تازوباکتام و سولباکتام باعث مهار عملکرد این آنزیم‌ها می‌شوند(۲۰). ضرورت انجام چنین تحقیقاتی با توجه به انتشار سریع این آنزیم‌ها در بین ارگانیسم‌ها و بالا رفتن میزان عفونت بیمارستانی در تمام بیمارستان‌ها احساس می‌شود. این مسئله در حال حاضر تبدیل به یکی از بحران‌های درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها شده است(۴). لذا هدف از این مطالعه بررسی فراوانی اشرشیاکلی تولیدکننده ESBL و هم چنین ارزیابی مولکولی بتالاکتامازهای CTX در باکتری اشرشیاکلی جدا شده از نمونه‌های ادراری می‌باشد.

## مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی مقطعی، تعداد ۲۰۰ نمونه ادراری در فاصله زمانی خرداد ۹۲ تا آذر ۹۲ برای بررسی شیوع، تایپینگ مولکولی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز در اشرشیاکلی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در بخش‌های عفونی و نفرولوژی بیمارستان رازی قائم شهر و امام خمینی (ره) ساری جمع‌آوری و پس از کشت بر روی محیط EMB آگار و انجام تست‌های بیوشیمیایی افتراقی نظیر TSI، سیمون سیترات، اوره آز، MR/VP، SIM، لیزین دکربوکسیلاز آگار و با استفاده از جداول استاندارد، ایزوله‌های اشرشیا کلی (E.Coli) جداسازی گردیدند. برای شناسایی فنوتیپی سویه‌های تولیدکننده ESBL پس از تایید وجود E.Coli به پیشنهاد سازمان جهانی CLSI از آزمون Combined disk استفاده شد. در این آزمون پس از تهیه محیط مولرهینتون آگار، سوسپانسیون میکروبی استاندارد با غلظت نیم مک فارلند (0.5Mc Farland Standard) تهیه گردید. ۱۵ دقیقه پس از پخش کردن کامل سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط مذکور، دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰ میکرو گرم)، سفتازیدیم کلاولونیک اسید (۳۰-۱۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم- کلاولونیک اسید (۱۰-۳۰ میکروگرم) به فاصله حداقل ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر بر روی محیط قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای $۳۷^{oC}$ هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های حاوی کلاولونیک اسید نسبت به بدون کلاولونیک اسید سنجیده شد. به‌طوری که اگر هاله عدم رشد اطراف دیسک سفتازیدیم- لاولونیک اسید بزرگ تر یا مساوی ۵ میلی‌متر نسبت به سفتازیدیم به تنهایی باشد و یا این که هاله عدم رشد اطراف دیسک سفوتاکسیم- کلاولونیک اسید بزرگ‌تر یا مساوی ۵ میلی‌متر نسبت به سفوتاکسیم به تنهایی باشد (تصویر شماره ۱)، سویه موردنظر را می‌توان بر طبق ضابطه CLSI به عنوان مولد ESBL در نظر گرفت. مقاومت آنتی‌بیوتیکی با انجام تست آنتی‌بیوگرام از طریق روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Baur-Kirby) و طبق استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standard institute) بر روی اشرشیاکلی‌های مولد ESBL با استفاده از دیسک آنتی‌بیوتیکی انجام گرفت(۳۲). برای این منظور سوسپانسیونی با غلظت نیم مک فارلند تهیه شده، سپس با استفاده از یک سواپ استریل، از آن نمونه برداشته و روی محیط مولر هینتون به طور کامل پخش شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک را روی محیط قرار داده و بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعته نتایج را بر اساس جدول استاندارد به اشکال حساس، مقاوم و حد واسط گزارش گردید. جهت این کار از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شرکت High media استفاده شد که شامل موارد زیر بودند: سفتازیدیم ($30\mu_g$)، سفوتاکسیم ($30\mu_g$)، سفتریاکسون ($30\mu_g$)، نالیدیکسیک اسید ($30\mu_g$)، مروپنم ($30\mu_g$)، ایمی پنم ($30\mu_g$)، سیپروفلوکساسین ($30\mu_g$)، افلاکساسین (30ug)، آمیکاسین ($30\mu_g$)، سفکسیم ($30\mu_g$)، جنتاماسین ($30\mu_g$)، سولفامتوکسازول تری متوپریم ($30\mu_g$)، نیتروفورانتوئین ($30\mu_g$).




**تصویر شماره ۱:** تست Combined Disk

جهت استخراج DNA ایزوله های مورد بررسی، از کیت استخراج DNA (Genomic DNA kit-1 دنازیست) استفاده شد و طبق دستورالعمل کیت، استخراج DNA صورت گرفت. جهت بررسی فراوانی ژن بتالاکتاماز

CTX تست PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (ساخت Bioneer کره) صورت گرفت. توالی پرایمرهای مذکور بدین صورت می باشد:

CTX-MU1: ATGTGCAGTACCAGTAAGGT

CTX-MU2: TGGGTAAAGTAGGTCACCAGA

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰µL شامل: ۱۰µL Master mix، ۰/۵µL پرایمر ۱۰ Pmol/ µL از هر کدام، ۲µL DNA الگو، ۷µL H2O.

برنامه دستگاه ترموسایکلر برای بررسی ژن CTX به این ترتیب بود:

دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه می‌باشد. سیکل اصلی با ۳۵ بار تکرار شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۳/۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه قرار گرفت. در نهایت محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۹۵ به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شده و توسط سایبرگرین رنگ‌آمیزی گشت. سپس توسط دستگاه آشکار ساز ژل تحت تاثیر نور UV با طول موج ۲۳۰ نانومتر باندهای مربوطه مشاهده و عکس برداری شدند. در نهایت با استفاده از DNA الگو که حاوی قطعاتی با وزن مولکولی مشخص است، محصول شناسایی گردید. برای کنترل مثبت از باکتری Klebsiella pneumoniae 7881 استفاده شد که ذاتاً دارای ژن مزبور می‌باشند.

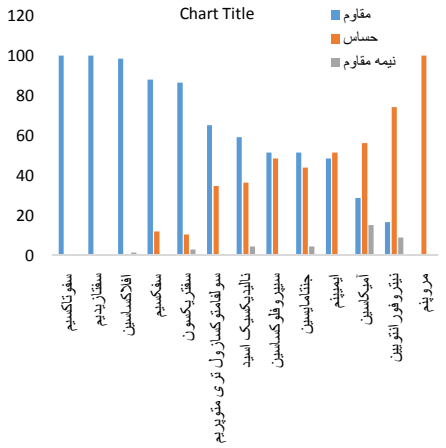
## یافته ها

از ۲۰۰ نمونه ادراری مورد بررسی، ۱۳۲ نمونه (۶۶ درصد) مونث و ۶۸ نمونه (۳۴ درصد) مذکر بودند. به طوری که کم سن ترین فرد ۲ ساله و مسن ترین فرد ۸۵ ساله بود. با انجام تست‌های بیوشیمیایی، ۱۲۰ ایزوله اشرشیاکلی شناسایی شدند. در طی آزمون سینرژیسم دوبل، تعداد ۶۶ (۵۵ درصد) سویه به عنوان تولید کننده بتالاکتاماز تعیین شدند. درصد فراوانی تولید ESBL در سویه های E.coli جدا شده از نمونه‌های مردان (۳۳/۳ درصد) و زنان (۶۶/۷ درصد) بود و بیش‌ترین میزان فراوانی تولید آنزیم‌های ESBL در رده ی سنی ۳۵-۱۶ سال مشاهده شد (جدول شماره ۱).

نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت اشرشیاکلی‌های مولد آنزیم بتالاکتاماز نسبت به ۱۳ آنتی‌بیوتیک در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. در این آزمون بیش‌ترین مقاومت به ترتیب در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم (۱۰۰ درصد) و سفتازیدیم (۱۰۰ درصد) و افلاکساسین (۹۸/۵ درصد) بوده و این در حالی است که بیش‌ترین حساسیت به ترتیب در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم (۱۰۰ درصد)، نیتروفورانتوئین (۷۴/۲ درصد) و آمیکاسین (۵۶/۱ درصد) بوده است (جدول شماره ۲).

**جدول شماره ۱:** فراوانی ایزوله اشرشیاکلی ESBL بر حسب سن و جنس

| | گروه سنی | | | |
|---|---|---|---|---|
| | کم تر از ۱۶ | ۱۶-۳۵ | بالاتر از ۳۵ | جمع |
| | تعداد (درصد) | تعداد (درصد) | تعداد (درصد) | تعداد (درصد) |
| زن | ۱۶(۹/۱) | ۲۹(۴۴) | ۹(۱۳/۶) | ۴۴(۶۷/۷) |
| مرد | ۳(۴/۵) | ۱۵ (۲۲/۷) | ۴ (۶/۱) | ۲۲ (۳۳/۳) |
| جمع | ۹ (۱۳/۶) | ۴۴ (۶۶/۷) | ۱۳ (۱۹/۹) | ۶۶ (۱۰۰) |

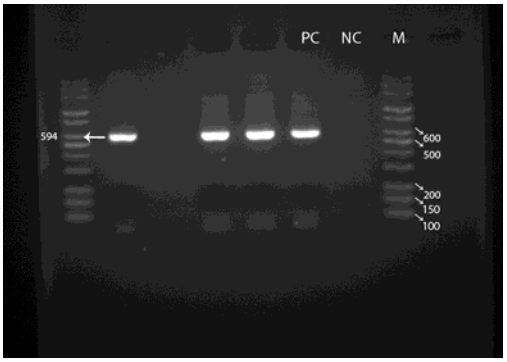



**نمودار شماره ۱:** الگوی مقاومت ایزوله های اشرشیاکلی مولد ESBL نسبت به آنتی بیوتیک ها

در آزمایش PCR از مجموع ۶۶ ایزوله، وجود قطعه مربوط به ژن CTX، ۶۰ درصد ایزوله مثبت و باعث تولید محصولاتی در اندازه‌ی مورد انتظار شد که در الکتروفورز بر روی ژل آگارز به صورت باندهایی در محدوده‌های ۵۹۴ bp آشکار شدند که باعث اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفتند (تصویر شماره ۲).

**جدول شماره ۲:** الگوی مقاومت اشرشیاکلی مولد ESBL جدا شده از نمونه های بالینی نسبت به آنتی بیوتیک

| نوع آنتی بیوتیک | مقاوم تعداد (درصد) | نیمه مقاوم تعداد (درصد) | حساس تعداد (درصد) |
|---|---|---|---|
| سفوتاکسیم | (۱۰۰)۶۶ | ۰ | ۰ |
| سفتازیدیم | (۱۰۰)۶۶ | ۰ | ۰ |
| سفتریکسون | (۸۶/۴)۵۷ | (۳)۲ | (۱۰/۶)۷ |
| نالیدیکسیک اسید | (۵۹/۱)۳۹ | (۴/۵)۳ | (۳۶/۴)۲۴ |
| مروپنم | ۰ | (۱۰۰)۶۶ | ۰ |
| ایمیپنم | (۴۸/۵)۳۲ | ۰ | (۵۱/۵)۳۴ |
| سیپروفلوکساسین | (۵۱/۵)۳۴ | ۰ | (۴۸/۵)۳۲ |
| افلاکساسین | (۹۸/۵)۶۵ | ۰ | (۱/۵)۱ |
| آمیکاسین | (۲۸/۸)۱۹ | (۱۵/۲)۱۰ | (۵۶/۱)۳۷ |
| سفکسیم | (۸۷/۹)۵۸ | ۰ | (۱۲/۱)۸ |
| جنتامایسین | (۵۱/۵)۳۴ | (۴/۵)۳ | (۴۳/۹)۲۹ |
| سولفامتوکسازول تری متوپریم | (۶۵/۲)۴۳ | ۰ | (۳۴/۸)۲۳ |
| نیتروفورانتوین | (۱۶/۷)۱۱ | (۹/۱)۶ | (۷۴/۲)۴۹ |




**تصویر شماره ۲:** الکتروفورز محصول PCR ژن $bla_{TEM}$ اشرشیاکلی در ژل آگارز NC- کنترل منفی PC_ کنترل مثبت (کلبسیلا سویه 7881)

## بحث

در مطالعه حاضر از مجموع ۱۲۰ ایزوله E.Coli، ۶۶ (۵۵ درصد) ایزوله دارای ESBLs بودند که ۴۰ مورد (۶۰ درصد) از آن‌ها حاوی ژن CTX می‌باشند. در مطالعه مشابهی مسجدیان و همکاران با بررسی ۱۴۸ سویه اشرشیاکلی و ۷۰ سویه کلبسیلا پیومونیه با دو روش دیسک ترکیبی و دیسک دوگانه به ترتیب ۵۱ درصد و ۷۰ درصد را مولد ESBL گزارش نمودند. این محققین سویه‌های اشرشیاکلی و کلسبیلا پنومونیه را به ترتیب ۵۰ درصد و ۶۳ درصد دارای پلاسمید مقاومت مربوط به آنزیم ESBL گزارش نمودند(۲۵) که نتایج مطالعات آن‌ها با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعه ای که توسط مباشرکار و همکاران در تبریز صورت گرفت، مشخص شد از میان ۴۱ ایزوله اشرشیا کلی، ۴۰ ایزوله (۹۷/۵۶ درصد) ESBL مثبت بودند(۲۶).

Meyer و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که فراوانی باسیل‌های مولد ESBL در ICU های کشور آلمان، از ۱۴ درصد در سال ۲۰۰۱ به ۵۲/۱ درصد در سال ۲۰۰۷ رسید. محققین معتقدند توجه و شناسایی اشرشیاکلی‌های مقاوم به بتالاکتاما اهمیت ویژه‌ای دارد(۲۷).

میرزایی و همکارانش ۱۶۰ ایزوله اشرشیا کلی را از نظر تولید بتالاکتاماز CTX-M با روش PCR بررسی کردند که ۳۷/۸ درصد مثبت بودند. گروه $CTX\text{-}M_I$ و گروه $CTX\text{-}M_{II}$، ۲/۱ درصد موارد مثبت بودند(۱۹).

در مطالعه دیگری که توسط شهید و همکارانش انجام شد، شیوع ژن bla CTX-M را در ۹۳ نمونه E.Coli مورد بررسی قرار دادند و مشخص کردند که از ۹۳ نمونه، ۷۲ نمونه (۷۷/۴ درصد) به وسیله PCR، CTX-M مثبت بودند(۲۸) که این نتایج نسبت به مطالعه حاضر از فراوانی بیش‌تری برخوردار است و می‌تواند نگران‌کننده باشد. Bonnedahl و همکارانش در جنوب فرانسه به بررسی کلبسیلاپنومونیه و اشرشیاکلی در نمونه‌های بالینی پرداختند و با استفاده از نوارهای MIC و با انجام PCR به این نتیجه رسیدند که ۴۷/۱ درصد نمونه‌ها، به آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر تتراسیکلین، آمپی‌سیلین و غیره مقاومت داشته و در این میان ۹/۴ درصد آن‌ها دارای آنزیم ESBL بوده و ۶ درصد از این گروه حامل پلاسمید bla CTX-M می‌باشند(۲۹). در

مطالعه حاضر از نظر بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های E.Coli مولد ESBL، مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و سفتازیدیم ۱۰۰ درصد و نسبت به افلاکساسین ۸۶/۴ درصد بود. در حالی که در تحقیقی که توسط شاهچراغی در سال ۱۳۸۶ انجام شد، از میان نمونه‌های ESBL مثبت، ۴۴/۷ درصد به سفوتاکسیم، ۴۸/۵ درصد به سفتریاکسون و ۴۷/۶ درصد به سفتازیدیم مقاوم بودند(۳۰). در این مطالعه میزان مقاومت بیش‌تری در نمونه‌های دارای ESBL نسبت به این سه آنتی‌بیوتیک وجود دارد که این اختلاف قابل توجه، نشانگر افزایش مقاومت به این داروها در کشور ما نسبت به گذشته است.

در مطالعه حسین و همکاران که در پاکستان انجام شده بود، از ۱۲۱ نمونه اشریشاکلی جداشده ار نمونه‌های کلینیکی ESBL و AMPC بتالاکتاماز به ترتیب ۷۸ و ۴۳ شناسایی گردید که بیش‌ترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۸۹ درصد)، بعد از آن به سیپرفلوکساسین (۸۷/۶ درصد) و سفپیم (۸۷ درصد) را نشان داده که کلاس‌های مختلف A و C ژن‌های بتالاکتاماز را گزارش نموده‌اند(۳۱) که با تحقیق حاضر همخوانی دارد. در مطالعه Idowu از ۱۰۲ باکتری گرم منفی جدا شده، ۳۶ مورد ESBL بوده که در تحقیق حاضر ۵۵ درصد ESBL را نشان داد که نسبت به بررسی Idowu بیش‌تر می‌باشد که دلیل آن می‌تواند افزایش روزافزون ESBL در بین باکترهای گرم منفی باشد(۳۳). در بررسی Kumar و همکاران در سال ۲۰۱۴، از ۱۸۰ مورد E.coli مقاوم به سفالوسپورین‌های نسل سوم، ۵۵/۵۵ درصد تولیدکننده ESBL بوده‌اند که با بررسی ما کاملا مطابقت دارد(۳۴). در مطالعه محمود اصف حبیب در سال ۲۰۱۳ در پاکستان، به افزایش ESBL در اشریشیاکلی از ۳۳/۷ درصد در سال ۲۰۰۵ به ۶۰ درصد در سال ۲۰۰۹ اشاره دارد که مقاومت به سفوتاکسیم و سفتازیدیم بالای ۸۵ درصد بود، مخصوصاً در نمونه‌های جدا شده ار ادرار، این افزایش چشم‌گیر بوده و از ۹/۵ درصد به ۶۴/۷ درصد رسیده است(۳۵) که با توجه به تحقیق‌های انجام شده ما و سایر موارد، این افزایش نگران‌کننده بوده و لزوم بررسی سالانه چنین تحقیقاتی کمک به درمان بیماران و استراتژی درمان را در بیمارستان‌ها تغییر خواهد داد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه و سایر مطالعات انجام شده، به نظر می‌رسد مصرف گسترده و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام وسیع‌الطیف و انتقال توسط پرسنل بیمارستان‌ها و انتقال بیمار به بیمار، باعث افزایش روزافزون سویه‌های مولد ESBLs در جامعه شده است. استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به ویژه سفالوسپورین‌ها باعث افزایش شیوع آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBL) در اشرشیاکلی (شایع‌ترین عامل عفونت ادراری) شده است. لذا شناسایی انواع گونه‌های آنزیم‌های بتالاکتامازی وسیع الطیف در شناسایی نوع آنتی‌بیوتیک های موثر در درمان عفونت‌های مقاوم و جلوگیری از افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مفید می‌باشد. هم‌چنین انجام تست‌های آنتی‌بیوگرام قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک باعث جلوگیری از مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شود.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کاربرد بالینی این تحقیق در اعلام نتایج به پزشکان بیمارستان‌های مورد تحقیق و هم‌چنین درصد ESBL و آنتی‌بیوتیک‌های حساس و مقاوم در داشتن پروتکل مصرف آنتی‌بیوتیک مسمر ثمر خواهد بود.

## سپاسگزاری

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد میکرب شناسی می‌باشد. نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات بیولوزی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به خاطر تأمین هزینه‌ها و همکاری نهایت تشکر را دارند.

## References

1. Brooks G, Carroll KC, Butel J. Jawetz, Melnick & Adelberg. Medical Microbiology. McGraw-Hill Education; 26th ed. 2013.
2. Fazeli H, Hoseini MM, Mohammadi Ghalaei P. Frequency and resistance pattern of extended spectrum beta lactamase producing Escherichia coli in clinical specimen of Alzahra hospital in Isfahan, Iran, 2007. J Shahrekord Univ Med Sci 2009; 10(4): 58-64.
3. Ramos NL, Saayman ML, Chapman TA, Tucker JR, Smith HV, Faoagali J, et al. Genetic relatedness and virulence gene profiles of Escherichia coli strains isolated from septicaemic and uroseptic patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010; 29(1): 15-23.
4. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18(4): 657-686.
5. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8(4): 557-584.
6. Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver A, et al. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum β-lactamase confirmation methods for Escherichia coli with isolates collected during Project ICARE. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41(7): 3142-3146.
7. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. J Hosp Infect 2009; 73(4): 345-354.
8. Sirot D. Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. J Antimicrob Chemother. 1995; 36(Suppl A):19-34.
9. Öztürk H, Ozkirimli E, Özgür A. Classification of Beta-lactamases and penicillin binding proteins using ligand-centric network models.. PLoS One 2015; 10(2): e0117874.
10. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. Res Microbiol 2004; 155(6): 409-421.
11. Matthew M. Plasmid-mediated beta-lactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution. J Antimicrob Chemother 1979; 5(4): 349-358.
12. Raveh D, Yinnon AM, Broide E, Rudensky B. Susceptibilities of ESBL-producing Enterobacteriaceae to ertapenem, meropenem and piperacillin-tazobactam with and without clavulanic acid. Chemotherapy 2007; 53(3): 185-189.
13. Ruppé E. Epidemiology of expanded-spectrum beta-lactamases: The rise of CTX-M Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi: l'avènement des CTX-M. Antibiotiques 2010; 12(1): 3-16.
14. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. Int J Antimicrob Agents 2000; 14(2): 137-142.
15. Duttaroy B, Mehta S. Extended spectrum b lactamases (ESBL) in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. Indian J Pathol Microbiol. 2005;48(1):45-48
16. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(1): 1-14.
17. Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and

gene association with insertion sequence ISEcp1. FEMS Microbiol Lett 2001; 201(2): 237-241.

18. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β-lactamase CTX-M-3. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2002; 50(6): 1031-1034.
19. Mirzaee M, Pourmand MR, Chitsaz M, Mansouri S. Antibiotic Resistance to Third Generation Cephalosporins Due to CTX-M-Type Extended-Spectrum ??-Lactamases in Clinical Isolates of Escherichia coli. Iranian Journal of Public Health 2009; 38(1): 10-17.
20. Rupp ME, Fey PD .Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. Drugs 2003; 63(4): 353-365.
21. Paterson DL, Yu VL. Extended-spectrum beta-lactamases: a call for improved detection and control. Clin Infect Dis 1999; 29(6): 1419-1422.
22. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14(4): 933-951.
23. Aubert D, Girlich D, Naas T, Nagarajan S, Nordmann P. Functional and structural characterization of the genetic environment of an extended-spectrum beta-lactamase blaVEB gene from a Pseudomonas aeruginosa isolate obtained in India. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(9): 3284-3290.
24. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol 2006; 9(5): 466-475.
25. Nakhaei Moghaddam M, Forghanifard MM, Moshrefi Sh. Prevalence and Molecular Characterization of Plasmid-mediated Extended-Spectrum β-Lactamase Genes ($bala_{TEM}$, $bla_{CTX}$ and $blA_{SHV}$) Among Urinary *Escherichia coli* Clinical Isolates in Mashhad, Iran. Iran J Basic Med Sci 2012; 15(3): 833–839.
26. Mobasher Kare Jeddi AR, Nahaei M, Mobayyen H, Pornour M, Sadeghi J. Molecular study of extended-spectrum beta-lactamase (SHVtype) in Esherichia coliand Klebsiella pneumoniaeisolated from Medical Centers of Tabriz. Iranian Journal of Medical Microbiology 2009; 2(3,4): 9-17.
27. Meyer E, Gastmeier P, Schwab F. The burden of multiresistant bacteria in German intensive care units. J Antimicrob Chemother 2008; 62(6): 1474-1476.
28. Ahmed SF, Ali MMM, Mohamed ZK, Moussa TA, Klena JD. Fecal carriage of extended-spectrum β-lactamases and AmpC-producing Escherichia coli in a Libyan community. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014; 13: 22.
29. Bonnedahl J, Drobni M, Gauthier-Clerc M, Hernandez J, Granholm S, Kayser Y, et al. Dissemination of Escherichia coli with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. PloS One 2009; 4(6): e5958.
30. Shahcheraghi F, Noveiri H, Nasiri S. Detection of bla TEM and bla SHVgenes among clinical isolates of E. coli from Tehran hospitals. Iran J Med Microbiol 2007; 1(3): 1-8.
31. Hussain M, Hasan F, Shah AA, Hameed A, Jung M, Rayamajhi N, et al. Prevalence of class A and AmpC β-lactamases in clinical Escherichia coli isolates from Pakistan Institute of Medical Science, Islamabad,

Pakistan. Jpn J Infect Dis 2011; 64(3): 249-252.

32. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Hanson KE, Anstrom KJ, Perfect JR, et al. Comparative Evaluation of Etest and Sensititre YeastOne Panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 Reference Broth Microdilution Method for Testing *Candida* Susceptibility to Seven Antifungal Agents. J Clin Microbiol 2007; 45(3): 698-706.
33. Idowu OJ, Onipede AO, Orimolade AE, Akinyoola LA, Babalola GO.Extended-spectrum Beta-lactamase Orthopedic Wound Infections in Nigeria. J Glob Infect Dis 2011; 3(3): 211-215.
34. Kumar D, Singh AK, Ali MR, Chander Y. Antimicrobial Susceptibility Profile of Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL) Producing Escherichia coli from Various Clinical Samples. Infect Dis (Auckl) 2014; 7: 1-8.
35. Muhammad Asif H, Yasra S, Aamir A, Muhammad S, Abdul H. Rapid emergence of ESBL producers in E. coli causing urinary and wound infections in Pakistan. Pak J Med Sci 2013; 29(2): 540-544.