

## Antibiotic Resistance Pattern and Prevalence of Beta-Lactamase CTX-M Gene in isolated ESBL-Producing *E.coli* in Mazandaran, Iran

Khalili A<sup>1</sup>, Zaboli F<sup>2\*</sup>, Nazarian Sh<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Master of Science , Department of Microbiology, Ayatollah AmoliBranch, Islamic Azad University, Amol, Iran

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Microbiology, Ayatollah AmoliBranch, Islamic Azad University, Amol, Iran

<sup>3</sup>Assistant Professor, Biology Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran.

### Abstract

**Background:** *E. coli* is one of the prevalent factors in human infections, especially urinary tract infections. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing bacteria causes resistance to cephalosporin. Furthermore, the enzyme with the origin of plasmid causes the bacterial resistance to beta-lactam antibiotics. The aim of this study was to determine antibiotic susceptibility patterns and prevalence of CTX-M-type ESBL in *E. coli* strains isolated from urine samples by phenotypic and genotypic methods.

**Methods:** This descriptive, cross-sectional study of six-month duration (from December to April 2016) was undertaken to investigate patients' antibiotic susceptibility. To fulfill that purpose, the urine samples of patients referred to seven clinics of the armed forces of the Mazandaran province were collected and antibiotic susceptibility of isolates by disk diffusion method on Mueller-Hinton agar was tested. To do confirmatory tests, the combined disk test method was performed. The test results were compared using standards Clinical and Laboratory standards (CLSI). Ultimately, after DNA extraction by PCR method, isolates of ESBL positive for the presence of the CTX-M gene were examined and data were analyzed with SPSS software.

**Results:** Of the total 180 patients, 41 isolates of *Escherichia coli* were separated. From those, 21 isolates (51.21%) had produced ESBL. In PCR, 4(9.75%) of the ESBL positive isolates contained CTX-M gene. The highest resistance to antibiotics was observed for ampicillin (75.6%), cefalotin (58.5%), and cefazolin (60.9%) and the highest amount of sensitivity to antibiotics was seen for imipenem (75.6%), gentamicin (70.7%), and cefotaxime (60.9%).

**Conclusion:** Based on the observed high percentage of resistance to the third-generation-sfalspvrn, it is vitally important to perform precise and accurate antibiogram. Avoiding excessive over-prescription of antibiotics for infections caused by ESBL-producing organism is an inevitable necessity.

**Key words:** *Escherichia coli*; Drug Resistance Microbial; PCR; CTX-M

Sadra Med Sci J 2018; 6(2): 101-112.

Received: Oct. 31st, 2017

Accepted: Apr. 21st, 2018

\*Corresponding Author: **Zaboli F**, Department of Microbiology, Ayatollah AmoliBranch, Islamic Azad University, Amol, Iran, m.zaboli1379@yahoo.com

مجله علوم پزشکی صدرا

دوره ۶، شماره ۲، بهار ۱۳۹۷، صفحات ۱۰۱ تا ۱۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۰۱ تاریخ دریافت: ۹۶/۰۸/۰۹

مقاله پژوهشی  
(Original Article)

## الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن بتالاکتامازی CTX-M در ایزوله های اشریشیاکلی مولد ESBL در استان مازندران

اکبر خلیلی<sup>۱</sup>، فاطمه زابلی<sup>۲\*</sup>، شهرام نظریان<sup>۳</sup><sup>۱</sup> کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران<sup>۲</sup> استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران<sup>۳</sup> استادیار، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

### چکیده

**مقدمه:** اشریشیاکلی یکی از عوامل شایع در عفونت انسانی بویژه عفونت دستگاه ادراری می باشد. اشریشیاکلی های تولید کننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف (ESBL) دارای مقاومت به سفالوسپورین می باشد. وجود این جدایه ها احتمال انتقال ژنهای مقاومت سفالوسپورینی و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سایر سویه ها را افزایش می دهد. لذا هدف از این مطالعه تعیین الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی و میزان فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف تیپ CTX-M در جدایه های اشریشیاکلی به روش فنوتیپی و ژنوتیپی بود.

**مواد و روش:** این مطالعه توصیفی، مقطعی به مدت شش ماه بر روی نمونه های ادراری مراجعین به ۷ درمانگاه از مراکز درمانی نیروهای مسلح استان مازندران طی دوره ۶ ماهه در فاصله زمانی آذر ۹۴ تا اردیبهشت ۹۵ انجام شد. گونه های اشریشیاکلی جداسازی و با روش های بیوشیمیایی تایید شدند. جهت بررسی حساسیت گونه ها از روش combined disk test استفاده گردید و نتایج با استاندارد CLSI مقایسه شد. گونه های مقاوم از نظر وجود ژن CTX-M، توسط روش PCR بررسی و داده ها با برنامه نرم افزاری SPSS تجزیه و تحلیل گردید.

**یافته ها:** از تعداد کل ۱۸۰ نمونه بیمار ۴۱ جدایه اشریشیاکلی جدا شد. از این تعداد ۲۱ جدایه (۵۱/۲۱٪) مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند. در تست PCR ۴ مورد (۹/۷۵٪) از جدایه ESBL واجد ژن CTX-M بودند. در بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی بیشترین مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (۷۵/۶ درصد) سفالوتین (۵۸/۵ درصد) و سفازولین (۶۰/۹ درصد) بود. بیشترین مقدار حساسیت در برابر آنتی بیوتیک های ایمپنم (۷۵/۶ درصد) جنتامایسین (۷۰/۷ درصد) و سفوتاکسیم (۶۰/۹ درصد) بود.

**بحث و نتیجه گیری:** با توجه درصد بالای مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم، انجام دقیق آنتی بیوگرام و پرهیز از تجویز بی رویه آنتی بیوتیک ها در عفونت های ناشی از ارگانیزم های تولیدکننده ESBL یک ضرورت اجتناب ناپذیر است.

**واژگان کلیدی:** اشریشیاکلی، مقاومت دارویی میکروبی، واکنش زنجیره ای پلیمرز، CTX-M

\* نویسنده مسئول: فاطمه زابلی، استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، m.zaboli1379@yahoo.com

## مقدمه

عفونت ادراری یکی از شایعترین عفونت‌ها و رتبه دوم پس از عفونت دستگاه تنفسی را تشکیل می‌دهد. میزان عفونت ادراری در کشورهای در حال توسعه حداقل ۲۵۰ میلیون نفر تخمین زده شده است (۱). عامل اصلی عفونت‌های ادراری *اشریشیاکلی* است. *اشریشیاکلی* علت ۸۰ تا ۸۵ درصد عفونت‌های دستگاه ادراری است. باکتری پس از راه پیدا کردن به مثانه قادر است به دیواره مثانه بچسبد و بیوفیلم مقاوم در برابر پاسخ ایمنی بدن را تشکیل دهند. باکتری‌های دیگر همانند *استافیلوکوکوس*، *سائروفیتیکوس* ۱۰-۵٪ و همچنین *ویروس‌ها*، *قارچ‌ها* و سایر عوامل باکتریایی مانند *کلبسیلا*، *پروتئوس*، *سودوموناس* و *انتروباکتر* به ندرت ممکن است موجب آن شود. این موارد چندان معمول نبوده و به طور معمول به ناهنجاری سیستم ادراری و یا سوند ادراری مربوط هستند (۲).

آنتی بیوتیک‌های گروه پنی سیلین و سفالسپورین تحت عنوان بتالاکتام‌ها بطور وسیع جهت درمان عفونت ادراری مورد استفاده قرار می‌گیرند و مهار سنتز دیواره سلولی باکتری را سبب می‌شوند. این آنتی بیوتیک‌ها در چهار گروه اصلی پنی سیلین‌ها، سفالسپورین‌ها و کارباپنم‌ها و منو باکتام‌ها قرار می‌گیرند و در حال حاضر شایع‌ترین داروهای آنتی بیوتیکی مورد استفاده برای درمان عفونت‌های باکتریال هستند. استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام باعث ایجاد آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز توسط باکتری‌ها گردید. بتالاکتامازها انواع گوناگون دارند که در سال‌های اخیر گروهی از این بتالاکتامازها به نام بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (*ESBL*)، (*Extended spectrum beta-lactamases*) توسط باکتری‌ها تولید شده که باعث ایجاد مقاومت علیه آنتی بیوتیک بتالاکتام وسیع‌الطیف جدید شده است (۳). بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف *ESBL* برای اولین بار در سال ۱۹۸۰ شناخته شدند که بیشتر از نوع *TEM*/*Temoneira* و *SHV* (*Sulphydrylvariable*) بودند. این آنتی‌بیوتیک‌ها بیشتر به

وسیله جهش‌های نقطه یاز آنتی‌بیوتیک‌های اصلی فاقد فعالیت وسیع‌الطیف به وجود آمده‌اند (۴). خانواده *CTX-M* برای نخستین بار در سال ۱۹۸۹ از آلمان گزارش شد و پس از آن در نواحی مختلف جهان گسترش پیدا کرد. این نوع آنتی‌بیوتیک بیشتر در *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* گزارش شده اما در *انتروباکتریاسه* دیگر نیز یافت می‌شود (۵). در سال‌های اخیر *ESBL*‌های نوع *CTX-M* جایگزین انواع *TEM* و *SHV* در اروپا، کانادا، آفریقا و آسیا شده است و شایع‌ترین نوع *ESBL* به حساب می‌آید (۶-۹). بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف گروه *CTX-M* به خاطر فعالیت بیشتر علیه سفوتاکسیم نسبت به سفنازیدیم از دیگر گروه‌های *ESBL* مانند *TEM* و *SHV* متمایز می‌شوند (۱۰ و ۱۱). طی سال‌های گذشته شیوع سویه‌های مولد این بتالاکتامازها در بین جدایه‌های کلینیکی رو به افزایش بوده و منجر به محدود سازی درمان‌های دارویی مناسب شده است. این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت دارویی چندگانه دارند که باعث افزایش شیوع عفونت و مرگ و میر در بیماران بستری در بیمارستان، بویژه بیماران بخش مراقبت‌های ویژه هستند (۳). به نظر می‌رسد یکی از مهمترین فاکتورهای دخیل در ایجاد سویه‌های *ESBL* تجویز بی‌رویه و خارج از محدوده دستورالعمل پذیرفته شده آنتی بیوتیک‌ها توسط پزشکان می‌باشد. درمان عفونت‌های ناشی از *اشریشیاکلی*‌های واجد آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز با مشکل مواجه است. از یک طرف مقاومت به طیف زیادی از آنتی بیوتیک‌های سفالوسپورین‌ها مشاهده می‌شود و از سوی دیگر بسیاری از ژن‌های مولد *ESBL* بر روی پلاسمیدهای بزرگی قرار دارند که می‌توانند انتقال دهنده ژنهای مقاومت به سایر عوامل ضد میکروبی از جمله تتراسایکلین، کلرامفنیکل و آمینوگلیکوزیدها باشند (۱۲ و ۱۳). با توجه به اینکه بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، شناسایی سویه‌های مولد آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز را انجام نمی‌دهند، از این رو در این تحقیق به بررسی ژنوتیپی *ESBL*‌های *E. coli* جدا شده از نمونه

بررسی نحوه مصرف قندهای گلوکز و لاکتوز و تولید گاز و تولید  $H_2S$  از تست *TSI* یا *Triple suger iron agar* استفاده گردید.

### ارزیابی حساسیت ضد میکروبی

در این مرحله با استفاده از دستورالعمل *Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI* به منظور شناسایی اولیه ی ارگانسیم های تولید کننده *ESBL* از آزمون دیسک آگار دیفیوژن (*Disk Agar Diffusion DAD*) استفاده شد (۱۲). الگوی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن با دیسک های آنتی بیوتیکی جنتامایسین ( $30 \mu g$ )، ایمپی پنم ( $30 \mu g$ )، سفتازیدیم ( $30 \mu g$ )، سفتریاکسون ( $30 \mu g$ )، آمپی سیلین ( $10 \mu g$ )، سفالکسین ( $30 \mu g$ )، سفالوتین ( $30 \mu g$ )، سفکسیم ( $30 \mu g$ )، سفازولین ( $30 \mu g$ )، سفاتوکسیم ( $30 \mu g$ ) که از شرکت *Mast* تهیه شده بودند، انجام گرفت. از سویه استاندارد اشريشاکولی *ATCC 25922* نیز به عنوان کنترل کیفی روش آنتی بیوگرام استفاده شد. کاهش حساسیت در این سویه ها می تواند گواهی بر وجود مقاومت باشد. وجود هر نوع کاهش حساسیت در سویه های بررسی شده نشانگر مقاومت سویه به آنتی بیوتیک مورد نظر می باشد.

### ارزیابی تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف

برای تایید تولید بتالاکتاماز های وسیع الطیف در ارگانسیم های مقاوم از روش *combined disk test* استفاده گردید (۱۳). در این روش همانند الگوی روش *DAD* غربالی، پس از تهیه محیط مولر هینتون آگار، سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با غلظت نیم مک فارلند در تمام سطح محیط مذکور پخش شد سپس از دیسک های ۳۰ میکرو گرمی سفوتاکسیم و سفتازیدیم در مجاورت دیسک مرکب آنها با ۱۰ میکرو گرم کللولونیک اسید در این محیط استفاده شد. در صورتی که قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف دیسک ترکیبی حداقل ۵ میلیمتر

های ادراری مراجعین به درمانگاه های نیروهای مسلح استان مازندران می پردازیم که سهم قابل توجهی از مراجعین را در استان مازندران تشکیل می دهند و تاکنون تحقیقی در این زمینه در این مراکز صورت نگرفته است.

### مواد و روش

#### نمونه گیری و جداسازی سویه ها

در این مطالعه که بصورت توصیفی مقطعی بوده که طی دوره ۶ ماهه انجام گرفت. در این مطالعه قبل از شروع کار طی هماهنگی های لازم با مسئولین درمانگاه های نیروهای مسلح استان مازندران در خصوص قلمرو مکانی انجام کار با موضوع ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی از نمونه های بالینی این مراکز انجام شده است. جامعه پژوهش و مورد مطالعه ما جهت ارزیابی کلیه مراجعین بیمار به آزمایشگاه درمانگاه های نیروهای مسلح استان مازندران شامل درمانگاه تاسوعا بابل، درمانگاه شهید زاهد پاشا امیرکلا بابل، درمانگاه باب الحوائج بابلسر، درمانگاه ولیعصر (عج) ساری، درمانگاه انصار ساری و درمانگاه بقیه اله اعظم نیروی انتظامی ساری بوده است. نمونه مورد مطالعه شامل نمونه های ادراری مراجعین به درمانگاه های فوق در یک دوره ۶ ماهه به روش تصادفی در فاصله زمانی آذر ۹۴ تا اردیبهشت ۹۵ جمع آوری شده است. جهت جمع آوری نمونه های ادرار از ظرف پلاستیکی استریل با درب گشاد و روش نمونه گیری از ادرار میانی در شرایط بهداشتی استفاده شد. نمونه ادراری در محیط بلاد آگار و *EMB* با استفاده از لوپ کشت داده شد در ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیطهای کشت مورد بررسی قرار گرفتند و محیط هایی که تعداد کلنی آنها بیش از ۱۰۵ بود به عنوان نمونه مثبت تلقی گردید. برای آزمایش شناسایی اشکال و آرایش های متفاوت باکتری ها از مشاهده مستقیم باکتری و برای تشخیص افتراقی باسیل های خانواده آنتروباکتریاسه از تست اکسیداز استفاده شد. این تست در خانواده آنتروباکتریاسه به علت نداشتن آنزیم سیتوکروم اکسیداز منفی است. برای

روش *CTAB-NaCl* ژنوم جدایه های مورد نظر استخراج گردید. جهت بررسی میزان فراوانی ژنهای بتا لاکتاماز *CTX-M* تست *PCR* با استفاده از *DNA* استخراج شده و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده صورت گرفت (جدول ۱). واکنش *PCR* در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میلی مولار *MgCl2*، ۰/۲ میلی مولار *dNTPs*، ۱۰ پیکو مول از هر پرایمر و ۲۰۰ نانوگرم از *DNA* استخراج شده، ۱ واحد آنزیم *Taq DNA polymerase* و ۲/۵ میکرو لیتر از بافر *10X PCR* بود.

بیشتر از قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک منفرد همان آنتی بیوتیک باشد به عنوان سوپه مولدبتالاکتامازهای وسیع الطیف قلمداد گردید.

### شناسایی ژن مولد آنزیم بتا لاکتاماز *CTX-M*

برای تایید ژنوتیپی میکرو ارگانیسم های تولید کننده بتالاکتاماز بدست آمده از روش *PCR* استفاده شد. ابتدا چند کلنی از باکتری را در ۱۰ ml محیط *Tryptic (TSB) Soy Broth* (مرک آلمان) کشت داده و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد، با استفاده از

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی اشریشیا کلی های مولد *CTX-M*

اندازه محصول (جفت باز)	توالی نوکلئوتیدی پرایمر مورد استفاده	پرایمر
۵۹۴	5' ATGTGCAGYACCAGTAARGT 3'	<i>CTXMU-F</i>
	5' TGGGTRAARTARGTSACCAGA 3'	<i>CTXMU-R</i>

ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد که برای این منظور ۶ میکرولیتر از محصول *PCR* و ۴ میکرولیتر *Loading Buffer* با هم مخلوط و در چاهک ژل ریخته شد. دستگاه الکتروفورز بر روی ولتاژ ۱۰۰ ولت و ۵۰ میلی آمپر تنظیم و الکتروفورز انجام شد. ژل آگارز در محلول اتیدیوم بروماید به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد و سپس وجود باند در دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز نتایج و تست مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون تی تست و با نرم افزار *SPSS (Version 22)* انجام شد.

### یافته ها

از ۱۸۰ نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری مورد بررسی، ۴۱ سویه *E. coli* جدا و توسط آزمون های بیوشیمیایی تایید شدند. محدوده سنی بیماران از زیر یک سال تا سن ۸۰ سالگی متغیر بود و میانگین سنی بیماران ۳۵ سال بود. ۲۷ نفر ۸۵/۶۵ درصد از بیماران زن بودند و ۳۲ نفر از بیماران در شهر سکونت داشتند. ۳ مورد از

برنامه دستگاه ترموسایکلر شامل: مرحله واسرشته شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، که با ۳۰ سیکل با شرایط دمای واسرشته شدن ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و سیکل پایانی مربوط به مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه ادامه یافت. در تحقیق حاضر به منظور اطمینان از چرخه *PCR* در نمونه هایی که از نظر ژن بتالاکتاماز *CTX-M* منفی بوده و در الکتروفورز نهایی فاقد باند می باشند، به عنوان کنترل به همراه پرایمرهای اختصاصی ژن بتالاکتاماز *CTX-M* در واکنش *PCR* استفاده گردید. برای تایید و اطمینان از صحت آزمایش محصول *PCR* تعیین توالی شد. پس از دریافت جواب تعیین توالی، سکانس از طریق برنامه *blast* موجود در پایگاه *NCBI* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. محصول *PCR* برای بررسی وجود ژن های مورد نظر در

سویه به عنوان تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف تشخیص داده شدند. با استفاده از آزمون *combine disk test* همه ۲۱ سویه به عنوان تولید کننده نهایی *ESBL* تایید شدند (جدول ۲).

بیماران سابقه استفاده از سوند را داشتند و ۱۴ مورد از بیماران سابقه حداقل یکبار عفونت ادراری در سال اخیر را گزارش کردند. ۸ بیمار نیز دارای علامت سوزش ادراری بودند. بر اساس نتایج حاصل از آزمون غربالی *DAD*، ۲۱

جدول ۲. نتایج تست های تاییدی مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی

آنتی بیوتیک های دیسک ترکیبی	هاله های توقف رشد
۲۱ (۵۱ درصد)	افزایش هاله
۲۰ (۴۷ درصد)	عدم افزایش هاله

بیوتیک انتخاب شده نیز در جدول ۳ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت نسبت به ۱۰ آنتی

جدول ۳. نتایج ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

مقاوم		نیمه حساس		حساس		آنتی بیوتیک
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۱۴/۶۳	۶	۹/۷۵	۴	۷۵/۶۰	۳۱	ایمی پنم
۱۷/۰۷	۷	۱۲/۱۹	۵	۷۰/۷۳	۲۹	جنتامایسین
۳۹/۰۲	۱۶	۴/۸۷	۲	۵۶/۰۹	۲۳	سفتراکسون
۷۸/۰۴	۳۲	۷/۳۱	۳	۱۴/۶۳	۶	آمپی سیلین
۴۶/۳۴	۱۹	۱۲/۱۹	۵	۴۱/۴۶	۱۷	سفالکسین
۵۸/۵۳	۲۴	۱۲/۱۹	۵	۲۹/۲۶	۱۲	سفالوتین
۴۱/۴۶	۱۷	۴/۸۷	۲	۵۳/۶۵	۲۲	سفکسیم
۶۰/۹۷	۲۵	۱۲/۱۹	۵	۲۶/۸۲	۱۱	سفازولین
۳۴/۱۴	۱۴	۷/۳۱	۳	۵۸/۵۳	۲۴	سفتازیدیم
۳۱/۷۰	۱۳	۷/۳۱	۳	۶۰/۹۷	۲۵	سفتواکسیم

سفتواکسیم (۶۰/۹ درصد) بوده است. فراوانی *ESBL* در اشریشیاکلی به هیچ یک از عوامل دموگرافیک بیماران مثل محل زندگی، قومیت، جنس (جدول ۴) و نیز علائم بالین مثل سوزش، تکرر، دفع ناقص ادرار و درد پهلو بستگی نداشت ( $P > 0.05$ ).

در این بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی، بیشترین مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (۷۵/۶ درصد)، سفالوتین (۵۸/۵ درصد) و سفازولین (۶۰/۹ درصد) بود. بیشترین مقدار حساسیت در برابر آنتی بیوتیک های ایمی - پنم (۷۵/۶ درصد)، جنتامایسین (۷۰/۷ درصد) و

جدول ۴. توزیع فراوانی عوامل دموگرافیک در بیماران مبتلا به عفونت های ادراری ناشی از اشریشیا کلی در گروه **ESBL** و غیر

### ESBL

متغیر	شرح	تعداد(درصد) <i>ESBL</i>	تعداد(درصد) <i>NON ESBL</i>	<i>p-value</i>
محل زندگی	شهر	۱۴(۵۳/۸۴)	۱۲(۴۶/۱۵)	$P > 0.05$
	روستا	۷(۴۶/۶۶)	۸(۵۳/۳۴)	
جنسیت	مرد	۱۶(۵۹/۲۹)	۱۱(۴۰/۷۴)	$P > 0.05$
	زن	۵(۳۵/۷۴)	۹(۶۴/۲۸)	

تفاوت معنی داری بود (جدول ۵).

ولی در استفاده از سوند و سابقه عفونت ادراری در سال اخیر توزیع فراوانی *ESBL* و غیر *ESBL*

جدول ۵. توزیع فراوانی بعضی از علائم بالینی مبتلا به عفونت های ادراری ناشی از اشریشیا کلی در گروه *ESBL* و غیر *SBL*

علائم بالینی	<i>ESBL</i>	<i>NON ESBL</i>
سوزش ادرار	%۵۸	%۶۱،۹۰
تکرر ادرار	%۶۱	%۵۲،۱۰
دفع ناقص ادرار	%۲۳،۱۰	%۳۲،۸۰
درد پهلو	%۳۶،۲۰	%۳۱،۱۰
تب	%۲۶،۱۰	%۲۴،۹۰
سابقه مصرف آنتی بیوتیک	%۶۴،۱۰	%۶۷،۶۰
سابقه بستری	%۱۹،۱۰	%۱۲،۹۰
سابقه استفاده از سوند	%۳۱،۷۰	%۶،۱۰
سابقه ابتلا به عفونت ادراری در سال اخیر	%۶۶،۹۰	%۲۸،۱۰

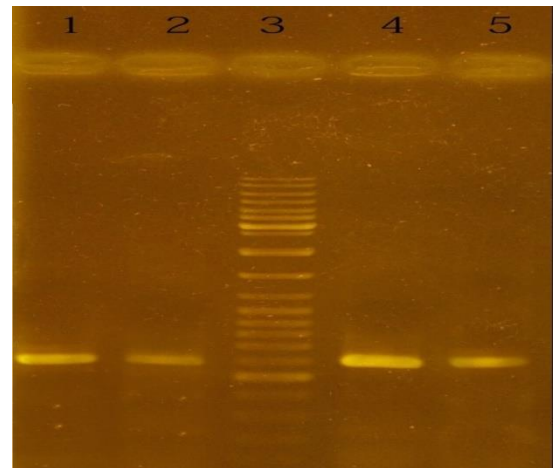
بتالاکتامازهای وسیع الطیف مثبت واجد ژن *CTX-M* تشخیص داده شدند (شکل ۱).

در طی روش *PCR* که بر روی ۲۱ جدایه *ESBL* انجام شد، مشخص شد که از این میان ۴ مورد (۹/۷۵٪) مولد

می باشند مقاومت باکتریها در برابر آنتی بیوتیک ها بصورت وراثتی و اکتسابی می باشد.

بتالاکتامازهای وسیع الطیف نه تنها در میان سویه های بالینی در کشورهای مختلف دارای شیوع متفاوتی می باشند بلکه در یک کشور نیز با توجه مکان جغرافیایی متفاوت هستند. در مطالعه ای که محمدکاظم شریفی و همکاران بر روی نمونه های ادراری در بیمارستانهای خوی انجام دادند ۲۹/۸ درصد از جدایه های مولد *ESBL* بودند که همه جدایه های آن به ایمی پنم حساس بودند و ۸۷/۵ درصد جدایه ها تولید کننده آنزیم گروه *CTX-M* بوده اند (۱۸)، ولی در مطالعه ما ۲۱ جدایه (۵۱٪) مولد *ESBL* بودند که ۹/۷۵ درصد از این جدایه ها گروه *CTX-M* بودند. در این بررسی ۷۵٪ جدایه ها به ایمی پنم حساس بوده اند که این اختلاف نتایج را می توان در منبع عفونت، تعداد نمونه های بررسی شده و سیستم کنترل عفونت، نوع نمونه (بیمارستانی، سرپایی) عنوان کرد. در یک مطالعه که توسط یزدی و همکاران بر روی ۲۴۶ جدایه های *E. coli* جدا شده از بیمارستان های شهر تهران انجام دادند ۴۴/۳ درصد آن *ESBL* مثبت و ۶۸/۸ آن واحد ژن *CTX-M* بودند که ۴۷/۱ درصد آن مقاوم به سفتازیدیم و ۳۹/۲ آن مقاوم به سفوتاکسیم بودند (۱۹). در صورتی که در مطالعه ما میزان نمونه های *ESBL* مثبت ۵۱/۲۱ و میزان ژن *CTX-M* ۹/۷۵ درصد می باشد و میزان مقاومت به سفتازیدیم ۳۴/۱ درصد و میزان مقاومت به سفوتاکسیم ۳۱/۱۹ درصد بوده است که این اختلاف نتایج را به خصوص در میزان ژن *CTX* را می توان در نوع نمونه، میزان مصرف آنتی بیوتیک ها عنوان کرد.

در مطالعه ای که مجتبی مهدی پوردر بیماران سرپایی وبستری در بیمارستان یحیی نژاد بابل انجام دادند از ۱۸۴۲ کشت ادرار انجام شده ۸۴ مورد *E. coli* مثبت که ۲۹ مورد (۳۴/۵٪) مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند که ۲۰ مورد (۶۹٪) واحد ژن *CTX-M* بودند که از مطالعه ما بیشتر بوده است که این تفاوت ممکن است نشان از سابقه



شکل ۱. شناسایی مولکولی ژن *CTX-M* در باکتری های جدا شده

- ستون ۱) محصول *PCR* تکثیر شده از باکتری شماره ۱،  
ستون ۲) محصول *PCR* تکثیر شده از باکتری شماره ۴،  
ستون ۳) نشانگر اندازه مولکولی (*DNA Ladder Mix*).  
ستون ۴) محصول *PCR* تکثیر شده از باکتری شماره ۱۰،  
ستون ۵) محصول *PCR* تکثیر شده از باکتری شماره ۱۶

## بحث

عفونت های ادراری از شایع ترین عفونت های ایجاد شده در انسان است و بیشترین علت مراجعه به پزشکان در گروه های مختلف سنی است. شایعترین ارگانسیم عفونت ادراری *اشریشیاکلی* می باشد که این ارگانسیم باعث ایجاد ۷۵ تا ۹۰ درصد از عفونت های ادراری در هر دو جنس زن و مرد می شود (۱۵ و ۱۴).

باکتری *اشریشیاکلی* یکی از پاتوژنهای مهمی است که سبب افزایش مقاومت نسبت به اغلب آنتی بیوتیک ها شده است (۱۶ و ۱۷). در اکثر موارد به علت استفاده بی رویه و خودسرانه آنتی بیوتیک ها شاهد موارد زیادی از مقاومت های دارویی نسبت به آنتی بیوتیک ها در مناطق مختلف ایران و جهان به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه های ایجاد کننده و تفاوت در میزان مصرف آنتی بیوتیک ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی بیوتیک ها، متفاوت



کار اطمینان از تجویز مناسب آنتی بیوتیک موثر و اقتصادی آنتی بیوتیک ها جهت پیشگیری از ایجاد میکروارگانیسم های مقاوم و کاهش انتشار آنها باشد.

### نتیجه گیری

با توجه به اهمیت نقش این آنتی بیوتیک های در درمان عفونت های باکتریایی مقاومت به این آنتی بیوتیک های وسیع الطیف خطر بزرگی بخصوص برای بیماران بستری در بیمارستان محسوب می شود و بزودی جهت جایگزینی آنها نیاز به آنتی بیوتیک های جدید خواهیم داشت. با توجه به حساسیت بالای همه جدایه مورد مطالعه به اپمی پنم و جنتامایسین، این توصیه را به ما رهنمون می سازد که در درمان عفونت های باکتریال با کمک متخصصین آزمایشگاه به دنبال تعیین الگوی حساسیت دقیق از یک بتالاکتام در ترکیب با یک بازدارنده بتالاکتاماز استفاده می شود بدین طریق از گسترش بتالاکتازهای وسیع الطیف در بین سویه های مختلف باکتریایی کاسته شده و از بسط عفونت های مقاوم و نیز روز افزون شدن مرگ و میر در مراکز درمانی پیشگیری شود.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی برای فراهم کردن امکانات لازم جهت اجرای این طرح دانشجویی کمال تشکر را دارند. نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

### منابع

1. Nicolle LE. Uncomplicated urinary tract infection in adults including uncomplicated pyelonephritis. Urol Clin North Am. 2008;35:1-12.
2. Amdekar S, Singh V, Singh DD. Probiotic therapy: immunomodulating

های قبلی مواجهه با عفونت و مصرف بیشتر آنتی بیوتیک بوده باشد (۲۰).

همچنین طی تحقیقی که مهاجری و همکاران بر روی ۲۰۰ جدایه *E. coli* در شهر کرمانشاه انجام دادند میزان مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم ۶۳-۷۵ درصد بود که پنجاه و چهار مورد (۲۷٪) از جدایه های مورد بررسی *ESBL* تولید کردند که ۵۳ جدایه (۹۸٪) از جدایه های دارای آنزیم *CTX* مثبت بودند که این تفاوت ممکن است به مناطق نمونه گیری، مشخصات بیماران مورد بررسی عامل آن باشد و یابه تفاوت ژنتیکی افراد و تفاوت ژنتیکی سویه ها مربوط باشد (۱۰).

با توجه به نتایج این تحقیق که نمونه های ادراری بودند، از این میان ۶۵/۸۵٪ نمونه های مربوط به زنان بوده اند که نشان می دهد عفونت ادراری در زنان شایع تر بوده و دلیل بروز این مشکل مربوط به آناتومی خاص دستگاه ادراری و کوتاه بودن مجرای ادراری در زنان می باشد در مطالعه حاضر جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها کمترین مقاومت به اپمی پنم مشاهده شده که در مقایسه با مطالعه شریفی و همکارانش در خوی (۱۸) و مهسا یزدی در تهران (۱۹)، حقیقت پناه و همکاران در رشت (۲۱) و محمد حامد در مصر (۲۲) مطابقت دارد که نشان می دهد که کاربایتم ها از جمله آنتی بیوتیک های پایدار در برابر ارگانیسم های تولید کننده بتالاکتازهای وسیع الطیف به خصوص *E. coli* می باشند.

شناسایی سریع سویه های تولید کننده *ESBL* در آزمایشگاه های میکروب شناسی بسیار مهم و ضروری است. درمان تجربی عفونت های مقاوم در برابر دارو باعث افزایش هزینه ها، عوارض جانبی برای بیمار و به خطر افتادن جان بیمار می گردد. انتخاب آنتی بیوتیک باید بر اساس نوع پاتوژن، الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی، مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیک، میزان تحمل به دارو ایمنی بیمار انجام گیرد به همین دلیل تمامی مراکز درمانی باید دارای سیاست مدون و برنامه های مناسب جهت استفاده از آنتی بیوتیک ها باشند که هدف از این

9. Poirel L, Decousser J-W, Nordmann P. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a blaCTX-M  $\beta$ -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2938-45.
10. Mohajeri P, Izadi B, Rezai M, Falahi B, Khademi H, Ebrahimi R. Assessment of the frequency of extended spectrum beta lactamases producing *Escherichia coli* isolated from Urinary tract infections and its antibiotic resistance pattern in kermanshah. *J Ardabil Univ Med Sci.* 2011;11:86-94.
11. Kurokawa H, Shibata N, Doi Y, Shibayama K, Kamachi K, Yagi T, et al. A new TEM-derived extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (TEM-91) with an R164C substitution at the  $\Omega$ -loop confers ceftazidime resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2981-3.
12. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol rev.* 2005;18:657-86.
13. Petroni A, Corso A, Melano R, Cacace ML, Bru AM, Rossi A, et al. Plasmidic extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:1462-8.
14. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of bla CTX-M-type and bla PER-2  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:975-8.
- approach toward urinary tract infection. *Curr Microbiol.* 2011;63:484.
3. Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, Goering RV, Nathan C, Bush K, et al. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *Jama.* 1999;281:517-23.
4. 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;53:185-9.
5. Matthew M. Plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. *J Antimicrob Chemother.* 1979;5:349-58.
6. Sidjabat HE, Paterson DL, Adams-Haduch JM, Ewan L, Pasculle AW, Muto CA, et al. Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates at a tertiary medical center in western Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:4733-9.
7. Khalaf NG, Eletreby MM, Hanson ND. Characterization of CTX-M ESBLs in *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Cairo, Egypt. *BMC infect dis.* 2009;9:84.
8. Moubareck C, Daoud Z, Hakimé NI, Hamzé M, Mangeney N, Matta H, et al. Countrywide spread of community-and hospital-acquired extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (CTX-M-15)-producing Enterobacteriaceae in Lebanon. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3309-13.

- Prevalence of shv/ctx-m/tem (esbl) beta-lactamase resistance genes in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in tehran, iran. Med Lab J. 2010;4:7.
20. Zaboli F, Mahdipour Mir SM. Evaluation of antibiotic resistance and CTX-M gene in ESBL-producing *Escherichia coli* by PCR among urine samples of patients referring to Yahyanejad hospital of Babol city, Iran. Hakim Jorjani J. 2017;4:34-47.
21. Haghghatpanah M, Amirmozafari N, Faezi M, Shenagari M. Investigating the Level of Antibiotic Resistance and Detection of Betalactamase of blaTEM High Frequency in the ESBLs Producing *E. coli* Isolated in Rasht. Sjim 2014;22:180-189.
22. 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):409-21.
15. Winokur P, Canton R, Casellas J-M, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clin Infect Dis. 2001;32:S94-S103.
16. Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez M, Costa N, Korbenfeld D, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:2864-7.
17. Pallecchi L, Malossi M, Mantella A, Gotuzzo E, Trigoso C, Bartoloni A, et al. Detection of CTX-M-type  $\beta$ -lactamase genes in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy children in Bolivia and Peru. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(12):4556-61.
18. Azarsa M, Shirazi M, Rastegar Lari A, Owlia P, Molla Aghamirzaei H, Sabbaghi A, et al. The frequency of extended spectrum beta lactamase and CTX MI of *Escherichia coli* isolated from the urine tract infection of patients by phenotypic and pcr methods in the city of khoy in iran. ZUMS Journal. 2011;19:53-61.
19. Yazdi M, Nazemi A, Mir Inargasi M, Khataminejad MR, Sharifi S, M. BK.

Archive of SID

Cite this article as:

Khalili A, Zaboli F, Nazarian Sh. Antibiotic Resistance Pattern and Prevalence of Beta-Lactamase *CTX-M Gene* in isolated ESBL-Producing *E.coli* in Mazandaran, Iran. *Sadra Med Sci J* 2018; 6(2): 101-112.