Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 1 (March-April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Relationship between presence of genes encoding ESBLs and antimicrobial susceptibility pattern in *Escherichia coli* clinical isolates

Mohsen Mirzaee[1], Roohangiz Eftekhari[2], Neda Taghizadeh[3], Mohammad Reza Mehrabi[1]

1. Department of Laboratory Sciences, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran
2. Microbiology ward, Emmam khomeni Hospital. Boroujerd, Iran
3. Department of Microbiology, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2014/11/14
Accepted: 2015/02/19
Available online:2016/03/10

Article Subject:
Antibiotic Resistance

IJMM 1395; 10(1): 8-15

Corresponding author at:
Dr. Mohsen Mirzaee

Dept. of Laboratory Sciences, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran.

Tel:
+98 66 42513054

Email:
Mohsen1439@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: *Escherichia coli* harboring extended spectrum β-lactamase (ESBLs) are significantly resistant to other antibiotics and caused several health problems. The present study was carried out to characterize the ESBL types and to determine their pattern of resistance to four antimicrobial agents in clinical isolates of *E. coli*.

Materials and Methods: During April 2012 to May 2013, 500 clinical isolates of *E. coli* were collected from two hospitals in Boroujerd. Phenotypic screening and confirmation tests for ESBL detection and antibiotic susceptibility testing were performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Minimum inhibitory concentration of imipenem, meropenem, amikacin and ceftriaxone was determined by the E-test method. All ESBLs producing isolates were examined for presence of the TEM, SHV and CTX-M genes by PCR method.

Results: All of the studied isolates were susceptible to imipenem and meropenem. Additionally, among ESBLs producer isolates good susceptibility to amikacin and ceftriaxone (P-value < 0.05) was observed. The prevalence of the TEM, SHV and CTX-M genes among 190 ESBLs producing isolates was as follows: TEM positive: 61 (32.1%), SHV positive: 60 (31.6%) and CTX-M: 62 (32.6%). TEM, SHV and CTX-M genes occurred together in 25 (13.1%) of the isolates.

Conclusions: The high prevalence of *E.coli* producing ESBL in Boroujed hospitals reported. More than one ESBL was produced by many isolates, and this was correlated with increased resistance levels. Carbapenems continue to show good in vitro activity agent ESBLs producing organism.

Key Words: *Escherichia coli,* Beta-lactamases, Carbapenems

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Mirzaee M, Eftekhari R, Taghizadeh N, Mehrabi M R. Relationship between presence of genes encoding ESBLs and antimicrobial susceptibility pattern in Escherichia coli clinical isolates. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (1) :8-15.

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران
سال ۱۰، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۵
Journal homepage: www.ijmm.ir

ارتباط بین حضور ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف و الگوی حساسیت ضد میکروبی در جدایه های بالینی *اشریشیاکلی*

محسن میرزایی[۱]، روح انگیز افتخاری[۲]، ندا تقی زاده[۳]، محمدرضا مهرابی[۱]

۱. گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
۲. بخش میکروب شناسی، بیمارستان امام خمینی، بروجرد، ایران
۳. گروه میکروب شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۲۳
پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۹
انتشار آنلاین: ۱۳۹۴/۱۲/۲۱
موضوع:
مقاومت پادزیستی
IJMM 1395; 10(1): 8-15

نویسنده مسئول:
دکتر محسن میرزایی
گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
تلفن: ۰۶۶۴۲۵۱۳۰۵۴
پست الکترونیک:
Mohsen1439@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: *اشریشیا کلی* تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) به دلیل مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مشکلات درمانی فراوانی را ایجاد نموده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی حضور انواع ژن‌های مولد ESBLs در جدایه های بالینی *اشریشیاکلی* و تعیین الگوی مقاومت آنها در برابر آمیکاسین، سفتریاکسون، ایمی پنم و مروپنم می‌باشد.

مواد و روش ها: ۵۰۰ جدایه بالینی *اشریشیاکلی* طی فروردین ۱۳۹۱ تا اردیبهشت ۱۳۹۲ از دو بیمارستان شهرستان بروجرد جمع‌آوری شدند. آزمایش‌های غربالگری، تائید تولید ESBLs و حساسیت ضد میکروبی طبق دستورالعمل‌های CLSI انجام گرفت. حداقل غلظت مهارکننده (MICs) ایمی پنم، مروپنم، سفتریاکسون و آمیکاسین توسط روش E-test تعیین گردید. تمامی جدایه های مولد ESBLs، با روش PCR از نظر حضور ژن‌های TEM، SHV و CTX-M بررسی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان‌دهنده تمام جدایه های مورد بررسی نسبت به ایمی پنم و مروپنم حساس بودند. علاوه براین در بین جدایه های مولد ESBLs حساسیت مناسبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین و سیپروفلوکساسین (P-value $< ۰/۰۵$)مشاهده گردید. در ۱۹۰ جدایه مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف، فراوانی ژن‌های ESBLs به ترتیب: ۶۲ جدایه (۳۲/۶٪) واجد ژن CTX-M، ۶۱ جدایه (۳۲/۱٪) واجد ژن TEM و ۶۰ جدایه (۳۱/۶٪) واجد ژن SHV بودند. ۲۵ جدایه (۱۳/۱٪) حامل ژن‌های TEM، SHV و CTX-M بودند.

نتیجه‌گیری: شیوع بالای تولید ESBLs در *اشریشیاکلی* جدا شده از بیمارستان‌های شهر گزارش می‌شود. این پدیده با افزایش میزان مقاومت جدایه های حاوی چند ژن در ارتباط می‌باشد. نتایج بدست آمده نشان داد، کاربانم ها همچنان از تأثیر مناسبی روی جدایه های مولد ESBLs برخوردار هستند.

کلمات کلیدی: *اشریشیاکلی*، بتالاکتامازها، کاربانم ها

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

روش‌های مختلفی توسط باکتری‌ها به کار گرفته می‌شود تا از اثرات زیان‌بار آنتی‌بیوتیک‌ها مصون بمانند یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها که در باکتری‌های گرم منفی علیه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به کار گرفته می‌شود تولید آنزیم‌های بتالاکتامازي است (۱). بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs:Extended-Spectrum Beta-Lactamases) گروه بزرگ و در حال رشدی از آنزیم‌های بتالاکتاماز هستند که توسط باکتری‌های گرم منفی تولید می‌شوند. این آنزیم‌ها توانایی هیدرولیز تمامی سفالوسپورین ها و آزترئونام را داشته و توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازها مانند اسید کلاوولانیک مهار می‌شوند (۲). بتالاکتامازهای وسیع الطیف اغلب توسط پلاسمیدها منتقل می‌شوند و در اثر ایجاد جهش در ژن‌های TEM و SHV کلاسیک و باواسطه جایگزینی اسیدهای آمینه در جایگاه فعال این آنزیم‌ها توسعه می‌یابند (۳). اولین ارگانیسم تولیدکننده ESBLs از اعضای خانواده انتروباکتریاسه در سال ۱۹۸۳ در آلمان شناسایی گردید، از آن زمان به بعد افزایش روزافزون این سویه‌ها در سراسر جهان گزارش گردیده است (۴). بخشی از جدایه های تولیدکننده TEM و SHV هم‌زمان آنزیم‌های CTX-M را نیز تولید می‌نمایند (۵). بتالاکتامازهایCTX-M فعالیت بسیار بالایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌هایی از قبیل سفتریاکسون و سفوتاکسیم در مقایسه

www.SID.ir

جدول ۱ : ترادف پرایمرهای مورد استفاده و برنامه PCR به منظور تکثیر ژن‌های TEM، SHV و CTX-M

ژن‌های هدف	توالی پرایمرها	اندازه محصول (جفت باز)	شرایط PCR	منبع
TEM	AGATCAGTTGGGTGCACGAG TGC TTAATCAGTGAG GCACC	۷۵۰	94 °C for 3 min 35×{94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C 1 min, 72 °C for 10 min}	۳
SHV	TCAGCGAAAAACACCTTG CCCGCAGATAAATCACCA	۴۷۱	94 °C for 3 min 35×{94 °C for 1 min, 52 °C for 30 sec, 72 °C 1 min, 72 °C for 7 min}	۱۴
CTX-M	GACGAT GTCACT GGC TGAGC AGC CGCCGACGCTAATACA	۴۹۹	94 °C for 3 min 25×{94 °C for 30 sec, 55 °C for 30 sec, 72 °C 1 min, 72 °C for 7 min}	۲

با سفتازیدیم نشان می‌دهند، ولی جهش‌های نقطه‌ای می‌تواند باعث افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در برابر سفتازیدیم نیز شود (۶). عفونت‌های ناشی از ارگانیسم‌های مولد ESBLs، ممکن است با کاربابنم ها، آمینوگلیکوزیدها، سولفونامیدها و فلوروکینولونها درمان شوند. با این حال، پلاسمیدهای حاوی ژن‌های کد کننده ESBLs اغلب می‌توانند حاوی ژن‌های کد کننده مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها، سولفونامیدها و فلوروکینولون ها نیز باشند؛ بنابراین، این داروها ممکن است در برابر سویه‌های مولد ESBLs کمتر مؤثر باشند. بااین‌حال، گزارشات نشان می‌دهد که چنانچه این در آزمایش‌های تعیین حساسیت ضد میکروبی، حساس باشند. این داروها می‌توانند گزینه‌های درمانی مناسب برای درمان عفونت‌های ناشی از ارگانیسم‌های تولیدکننده ESBLs در نظر گرفته شوند (۸ ، ۷). کاربابنم ها از قبیل ایمی پنم و مروپنم داروهای انتخابی هستند که به منظور درمان عفونت‌های ناشی از ارگانیسم‌های مولد ESBLs بکار برده می‌شوند (۹). متأسفانه در سال ۱۹۹۷ براي نخستين بار سويه‌هاي *کلبسیلا پنومونیه* توليد كننده ESBL كه به ايمي پنم نيز مقاومت داشتند، جدا شدند. اين سويه‌ها حاوي بتالاكتامازهاي نوع AmpC بودند (۱۰). بدين ترتيب، درمان عفونت‌هاي اعضاي خانواده انتروباكتريا‌سه، خصوصاً عفونت‌هاي ناشي از سويه‌هاي مقاوم به سفالوسپورين هاي وسيع الطيف يک مشكل جدي محسوب مي‌شود. شناسايي ژن‌هاي شايع مولد ESBLs از قبيل TEM، SHV و CTX-M با استفاده از روش‌هاي مولكولي در باكتري‌هاي توليدكننده ESBLs و بررسي الگوي مقاومت دارويي آن‌ها مي‌تواند اطلاعات مفيدي در خصوص اپيدميولوژي و درمان ضد ميكروبي منطقي در برابر ارگانيسم‌هاي مولد ESBLs فراهم نمايد (۳).

هدف از مطالعه حاضر بررسی حضور انواع ژن‌های مولد ESBLs در جدایه های *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران و تعیین الگوی مقاومت آن‌ها در برابر چهار آنتی‌بیوتیک آمیکاسین، سفتریاکسون، ایمی پنم و مروپنم می‌باشد.

روش بررسی

در یک مطالعه توصیفی- تحلیلی ۵۰۰ جدایه بالینی *اشریشیاکلی* طی سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۱ از دو بیمارستان در شهرستان بروجرد جمع‌آوری شدند. این جدایه ها بعد از انتقال از بیمارستان به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد واحد بروجرد با انجام تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل چگونگي تخمير قندها در محيط TSI، بررسی تولید اندول و حرکت در محیط SIM و واکنش در محیط VP و MR و رشد در محیط سیمون سیترات و اوره آگار و در نهایت بررسي نتايج با استفاده از جداول استاندارد تعیین هویت گردیدند (۱۱).

آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی

آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه های مورد بررسی نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم (۳۰µg)، سفتریاکسون (۳۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، پیپراسیلین (۱۰۰µg)، تتراسایکلین (۳۰µg)، کوتریموکسازول (۲۳/۷۵+۱/۲۵µg)، سفپیم (۳۰µg)، ایمی پنم (۱۰µg) و آزترئونام (۳۰µg) (Mast. UK) با استفاده از روش Kirby-Bauer، طبق دستورالعمل انستیتو استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) انجام شد (۱۲). در این روش، سوسپانسیونی از باکتری با کدورتی معادل استاندارد نیم مک فارلند در محیط مولر هینتون براث تهیه کرده، سپس با استفاده از سواب استریل روی سطح محیط مولر هینتون آگار تلقیح و دیسک‌ها بافاصله مناسب روی سطح محیط قرار داده شدند. هاله عدم رشد هر یک از دیسک‌ها بعد از گرمخانه گذاری به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شدند.

www.SID.ir

تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MICs)

حداقل غلظت مهارکننده (MICs) آنتی‌بیوتیک‌های ایمی پنم، مروپنم، سفتریاکسون و آمیکاسین با استفاده از روش(AB Biodisk, Solna, Sweden) E-test طبق دستورالعمل شرکت سازنده تعیین گردید. معیارهای تفسیری مورد استفاده شامل دستورالعمل شرکت سازنده نوارهای E-test و انستیتو استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) بود. در این مطالعه از *اشریشیاکلی* ATCC ۲۵۹۲۲ ، *کلبسیلا پنومونیه* ATCC ۷۰۰۶۰۳ و *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC ۲۷۸۵۳ به عنوان سویه‌های کنترل به‌منظور کنترل صحت و دقت آزمایش‌های تعیین MIC استفاده گردید.

شناسایی و تائید تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف

به‌منظور شناسایی باکتری‌های تولیدکننده ESBLs در ابتدا آزمون غربالگري طبق دستورالعمل CLSI با استفاده از دیسك آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و سفتازیدیم انجام گردید. براي انجام این کار از سري دیسك‌های سفتازیدیم ۳۰µg و سفتازیدیم-کلاوولانیک اسید ۳۰/۱۰µg ، سفوتاکسیم ۳۰µg و سفوتاکسیم-کلاوولانیک اسید ۳۰/۱۰µg و روش انتشار از دیسک استفاده شد. سپس پلیت ها در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس برای مدت ۲٤ ساعت قرار داده شدند و قطر هاله عدم رشد اطراف هر عامل به تنهایی و در ترکیب با اسید کلاوولانیک سنجیده شد. افزایش ≤ ۵ mm قطر هاله دیسک‌های ترکیبي با کلاوولانیك اسید نسبت به دیسک‌های فاقد کلاولانیك اسید نشان‌دهنده این بود باکتري مولد ESBLs در نظر گرفتیم. در این روش از *اشریشیاکلی* ATCC ۲۵۹۲۲ ، *کلبسیلا پنومونیه* ATCC ۷۰۰۶۰۳ به عنوان سویه‌های کنترل به‌منظور کنترل صحت و دقت آزمایش استفاده گردید.

شناسایی ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف

واکنش PCR برای شناسایی ژن‌های TEM، SHV و CTX-M در ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی* (به عنوان تولید کننده ESBLs در روش فنوتیپی مورد شناسایی قرار گرفت) انجام شد. DNA الگو با استفاده از روشی که در ادامه می آید، جداسازی شدند: کشت تازه از ارگانیسم‌های مورد بررسی و سویه‌های کنترل را در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به حالت سوسپانسیون در آورده و در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند، سپس به منظور برداشتن بقایای سلولی از سانتریفوژ در دور ۸۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه استفاده گردید و از مایع رویی باقی مانده به عنوان منبع DNA الگو استفاده گردید (۲). مخلوط اصلی مورد استفاده برای واکنش PCR شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۲/۵ میکرولیتر از ۲۵ mM، $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر از dNTPs ۲ mM و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلی مراز، ۱۰/۲ میکرولیتر آب مقطر و ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرها مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت بعد ساخته شدن مخلوط اصلی در لوله‌های تکثی مجزا ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده به هر یک از لوله ها اضافه شده و حجم نهایی معادل ۲۵ میکرولیتر ایجاد می‌شود. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندرف (Master cycler® gradient) انجام گرفت. لیست پرایمرهای مورد استفاده و شرایط PCR برای هر یک از ژن‌های مورد بررسی در جدول ۱ آورده شده است (۱۴, ۳, ۲). برای مشاهده محصولات PCR، از ژل آگارز ۱/۵٪ با استفاده از بافر ۰/۵X TBE بکار برده شد. برای تعیین اندازه محصولات PCR از مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Qiagen) استفاده شد.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده ها و نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و نرم افزار Excel ۲۰۱۰ و آزمون آماری χ^2 انجام گرفت و P-value < ۰/۰۵ از نظر آماری با اهمیت و معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

حساسیت ضد میکروبی

جدول ۲ : انتشار MIC_{50} و MIC_{90} آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بین جدایه های اشریشاکلی مورد بررسی

آنتی‌بیوتیک	MIC (µg/ml)	MIC_{50} (µg/ml)	MIC_{90} (µg/ml)	درصد جدایه های غیر حساس	P-value *
ایمی پنم	۱-۰/۵	۰/۰۴	۰/۰۵	۰	۰
مروپنم	۰/۴-۰/۰۰۴	۰/۲	۰/۴	۰	۰
آمیکاسین	> ۲۵۶ -۰/۰۴	۴	۱۶	۲۲	۰/۰۰۳۳
سفتریاکسون	> ۲۵۶ -۰/۰۰۸	> ۲۵۶	۲۵۶	۴۴	۰/۹۱۲

*(P value > ۰/۰۵) نشان دهنده تفاوت معنی دار می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳ : توزیع انواع ژن‌های مولد ESBLs و الگوی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی بر مبنای حضور ژن‌های مختلف در جدایهای اشریشیاکلی مورد بررسی

ژن‌ها	TEM N= 61	SHV N= 60	CTX-M N= 62	TEM/SHV N= 35	TEM/CTX-M N= 35	SHV/CTX-M N= 32	TEM/SHV/CTX-M N= 25	* *P* –value
آنتی‌بیوتیک	(تعداد جدایه ها) و درصد مقاومت							
سفتازیدیم	٪۹۳/۴ (۵۷)	٪۱۰۰ (۶۰)	٪۸۹ (۵۵)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۹۴/۲ (۳۳)	٪۱۰۰ (۳۲)	٪۱۰۰ (۲۵)	*P* = ۰/۷۷۹
سفتریاکسون	٪۹۳/۴ (۵۷)	٪۱۰۰ (۶۰)	٪۱۰۰ (۶۲)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۱۰۰ (۳۲)	٪۱۰۰ (۲۵)	*P* = ۰/۷۶۸
آمیکاسین	٪۱۶/۳ (۱۰)	٪۱۸/۳ (۱۱)	٪۱۶/۱ (۱۰)	٪۱۴/۲ (۵)	٪۱۴/۲ (۵)	٪۱۲/۵ (۴)	٪۲۸ (۷)	*P* = ۰/۰۳۴۵
سیپروفلوکساسین	٪۱۳/۱ (۸)	٪۱۶/۶ (۱۰)	٪۱۷/۷ (۱۱)	٪۲۰ (۷)	٪۲۰ (۷)	٪۲۸/۱ (۹)	٪۲۴ (۶)	*P* = ۰/۰۳۱۱
پیپراسیلین	٪۹۵ (۵۸)	٪۱۰۰ (۶۰)	٪۹۱/۹ (۵۷)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۹۴/۲ (۳۳)	٪۱۰۰ (۳۲)	٪۱۰۰ (۲۵)	*P* = ۰/۷۵۴
تتراسایکلین	٪۷۸/۶ (۴۸)	٪۸۱/۶ (۴۹)	٪۸۲/۲ (۵۱)	٪۷۱/۴ (۲۵)	٪۸۰ (۲۸)	٪۷۸ (۲۵)	٪۸۰ (۲۰)	*P* = ۰/۵۴۵
کوتریماکسازول	٪۳۳/۸ (۲۵)	٪۳۷/۵ (۲۷)	٪۳۵/۸ (۲۸)	٪۵۷/۱ (۲۰)	٪۵۴/۲ (۱۹)	٪۶۵/۶ (۲۱)	٪۷۲ (۱۸)	*P* = ۰/۰۷۵
سفپیم	٪۱۰۰ (۶۱)	٪۱۰۰ (۶۰)	٪۱۰۰ (۶۲)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۱۰۰ (۳۲)	۱۰۰ (۲۵)	*P* = ۰/۸۱۲
ایمی پنم	۰٪	۰٪	٪۰	٪۰	٪۰	٪۰	٪۰	*P* = ۰
آزترئونام	٪۹۶/۷ (۵۹)	٪۹۸/۳ (۵۹)	٪۱۰۰ (۶۲)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۱۰۰ (۳۲)	۱۰۰ (۲۵)	*P* = ۰/۷۴۸

***(-) نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار (P value > ۰/۰۵) می‌باشد.**

از بین ۵۰۰ جدایه *اشریشیاکلی* مورد بررسی ۱۹۰ (۳۸٪) جدایه به عنوان ارگانیسم‌های تولید کننده ESBL مورد شناسایی قرار گرفتند. در جدول شماره ۲ توزیع مقادیر $MIC_{۵۰}$ و $MIC_{۹۰}$ آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی نشان داده شده است. نتایج حاصل از بررسی حساسیت ضد میکروبی در جدایه های مورد بررسی نشان داد که ۱۰۰٪ جدایه ها نسبت به ایمی پنم ۷۸٪ جدایه ها نسبت به آمیکاسین و ۵۶٪ نسبت به سفتریاکسون حساس بودند. علاوه بر این، جدایه های مولد ESBLs رنج مقاومت بالاتری را نسبت به چند آنتی‌بیوتیک در مقایسه با جدایه‌هایی که تولید کننده ESBL نبودند، نشان دادند.

از ۵۰۰ جدایه *اشریشیاکلی* ۳۶۰ (۷۲٪) جدایه از نمونه ادرار، ۵۰ (۱۰٪) جدایه از نمونه زخم، ۲۰ (۴٪) جدایه از نمونه تراشه، ۲۰ (۴٪) جدایه از نمونه خلط، ۲۵ (۵٪) جدایه از نمونه خون، ۱۰ (۲٪) جدایه از نمونه آبسه، ۱۰ (۲٪) جدایه از نمونه مایع مغزی و نخاعی، ۵ (۱٪) جدایه از نمونه بیوپسی جدا شدند.

مطابق نتایج حاصل از بررسی حساسیت ضد میکروبی، مروپنم، ایمی پنم، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین از تاثیر به مـراتب بالاتری (*P*-value < ۰/۰۵) در جدایه های مورد بررسی برخوردار بودند.

نتایج حاصل از آزمایش بررسی حساسیت ضد میکروبی نشان داد که ۱۹۰ جدایه (۳۸٪) مقاوم به سفتازیدیم، ۱۸۵ جدایه (۳۷٪) مقاوم به سفتریاکسون، ۱۱۰ جدایه (۲۲٪) مقاوم به آمیکاسین، ۱۰۵ جدایه (۲۱٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۲۰۰ جدایه (۴۰٪) مقاوم به پیپراسیلین، ۲۱۵ جدایه (۴۳٪) مقاوم به تتراسایکلین، ۳۲۰ جدایه (۶۴٪) مقاوم به کوتریماکسازول، ۱۷۵ جدایه (۳۵٪) مقاوم به آزترئونام و ۱۵۰ جدایه (۳۰٪) مقاوم به سفپیم و همه جدایه ها (۱۰۰٪) حساس به ایمی پنم بودند.

نتایج حاصل از واکنش PCR، فراوانی حضور ژن‌های TEM، SHV و CTX-M در ۱۹۰ جدایه مولد ESBLs مورد بررسی به ترتیب شامل ۶۲ جدایه (۳۲/۶٪) واجد ژن CTX-M ، ۶۱ جدایه

www.SID.ir

(۳۲/۱٪) واجد ژن TEM و ۶۰ جدایه (۳۱/۶٪) واجد ژن SHV بودند و ۷ جدایه (۳/۷٪) مولد ESBL در روش فنوتیپی واجد هیچ یک از ژن‌های مورد بررسی نبود. ۲۵ جدایه (۱۳/۱٪) واجد تمامی ژن‌های TEM، SHV و CTX-M بودند. به صورت کلی جدایه‌هایی که واجد هر سه ژن‌های TEM، SHV و CTX-M بودند، از مقاومت بالاتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها برخوردار بودند. نتایج حاصل از الگوی مقاومت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و حضور ژن‌های مختلف کد کننده بتالاکتامازها در جدول ۳ آورده شده است.

بحث

امروزه افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های مختلف یک مشکل جدی در بحث درمان عفونت‌های ناشی از این میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. از این میان *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای ایجادکننده عفونت می‌باشد، به‌طوری که حدود ۶۰٪ باکتریمی های ناشی از *اشریشیاکلی* های مولد ESBLs منجر به مرگ می‌شود. به نظر می‌رسد یکی از عوامل مؤثر در انتشار و افزایش بروز این ارگانیسم‌ها مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله دسته بتالاکتام ها باشد (۱۵). قابل توجه است که همه ارگانیسم‌های مولد ESBLs به صورت قابل توجهی فقط به کارباپنم ها حساس باقی مانده‌اند (۳). مطالعات و گزارش‌های متعددی در خصوص افزایش و شیوع رو به رشد ارگانیسم‌های مولد ESBLs از مناطق مختلف در کشور وجود دارد (۱۸-۱۶). به نحوی‌که افزایش شیوع ارگانیسم‌های مولد ESBLs باعث ایجاد نگرانی شده است. کارباپنم ها به عنوان عوامل دارویی مناسب به منظور درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی دارای مقاومت چند دارویی مطرح می‌باشند (۱۹). خوشبختانه مقامت نسبت به کارباپنم ها در کشور در بین اعضای خانواده انتروباکتریاسه در میزان پائینی قرار داشته و درمان موفق عفونت‌های مختلف با استفاده از این عوامل در بالین گزارش می‌گردد. گزارش‌های متعددی در خصوص الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیاکلی* جدا شده از مناطق جغرافیایی و بیمارستان‌های مختلف انتشار یافته است (۲۰). *اشریشیاکلی* های مولد ESBLs دیده شده که نسبت به تعداد زیادی از دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مقاوم می‌باشند. در مطالعه حاضر سطح بالایی از مقاومت نسبت به کوتریماکسازول و سطح متوسط از مقاومت نسبت به پیپراسیلین و تتراسایکلین مشاهده شد، این در حالی است که حدود ۳۷٪ از جدایه های موجود در این مطالعه نسبت به سفتازیدیم و سفتریاکسون مقاوم بودند. همان‌طور که در مطالعه حاضر مشاهده می‌شود سفپیم و آزترئونام نیز دارای فعالیت ضد میکروبی تقریباً شبیه به سفتازیدیم و سفتریاکسون دارند.

در مطالعه حاضر، داروهایی از قبیل سیپروفلوکساسین و آمیکاسین نشان داده شد که به‌صورت کاملاً معنی‌دار باعث مهار جدایه های مولد ESBLs می‌شوند. علاوه براین، ایمی پنم و مروپنم آنتی‌بیوتیک بسیار مؤثر ($P < ۰/۰۵$) در تمامی جدایه های مورد بررسی بود. نتایجی مشابه نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر در خصوص حساسیت نسبت به فلوروکینولون ها و آمینوگلیکوزیدها در ارگانیسم‌های مولد ESBLs نیز گزارش گردیده است (۲۰ ، ۲). با توجه به مشاهده ما و سایر گزارش‌ها می‌توان پیشنهاد نمود که آنتی‌بیوتیک‌های از قبیل سیپروفلوکساسین و آمیکاسین نیز علاوه بر آنتی‌بیوتیک‌های دسته کارباپنم ها می‌تواند در درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم‌ها در بالین مفید باشند. بتالاکتامازهای نوع CTX-M گروه بزرگی از بیش از ۳۰ الل ژنی هستند که در ۵ گروه فیلوژنیک قرار داده می‌شوند (۲۲). در بسیاری از کشورها گروهای مختلفی از آنزیم‌های CTX-M مشاهده می‌شود، بااین‌حال با توجه به مطالعات متعدی که در ایران انجام‌گرفته CTX-M-۱۵ نوع غالب در ایران می‌باشد (۲۳). در مطالعه حاضر از ۱۹۰ جدایه مولد ESBLs مورد بررسی به ۶۲ جدایه (۳۲/۶٪) واجد ژن CTX-M بودند. فروانی ژن‌های CTX-M در مطالعات مختلف صورت گرفته در کشور بسیار متفاوت می‌باشد که این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از انتشار کلونال ارگانیسم‌های مولد این آنزیم‌ها در مناطق و یا بیمارستان‌ها یا حتی بخش‌های مختلف باشد (۲). در مطالعه حاضر، فراوانی ژن‌های TEM و SHV در جدایه های مورد بررسی تقریباً به یک میزان بوده و ۳۵ جدایه (۱۸/۴٪) هم‌زمان حامل هر دو ژن TEM و SHV بودند و ۲۵ جدایه (۱۳/۱٪) واجد تمامی ژن‌های TEM، SHV و CTX-M بودند. نتایج بدست آمده از میزان MIC سفتریاکسون در جدایه هایی که حاوی هر سه ژن بودند ۱۲۸ ≤ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، حال آنکه این میزان در جدایه های حاوی یک ژن بین ۳۲-۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. از آنجا که پلاسمیدها غالباً می‌توانند ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و ژن‌های مولد ESBLs را هم‌زمان حمل نمایند، بین وجود مقاومت به این عوامل ممکن است رابطه معنی‌داری وجود داشته باشد. علاوه براین، مقاومت کروموزومی نسبت به فلوروکینولونها در جدایه های مولد ESBLs در بین اعضای خانواده انتروباکتریاسه معمول می‌باشد (۲۴). همانطور که در مطالعه حاضر نیز مشخص گردید در جدایه هایی که تعداد ژن‌های بیشتری را داشتند مقاومت بیشتری نیز نسبت به آمیکاسین مشاهده می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط Ben-Amiو همکارانش انجام شد نیز مشابه مطالعه ما رنج مقاومت بالاتری نسبت به آمینوگلیکوزیدها در مقایسه با جدایه های غیر ESBLs مشاهده گردید (۲۵). در مطالعه‌ای که توسط Paterson و همکارانش انجام گرفته نیز مشابه مطالعه حاضر ارتباط زیادی بین مقاومت نسبت به فلوروکینولونها و تولید ESBLs مشاهده گردید (۲۶). حضور ژن‌های TEM، SHV

Archive of SID
www.SID.ir

و CTX-M به همراه عدم نفوذپذیری مناسب دارو در اثر تغییر در غشاء باکتری، ممکن است باعث ایجاد مقاومت نسبت به کاباپنم ها نیز شود (۲۷). احتمال بروز این واقعه در کشور ما که میزان مقاومت با واسطه ESBLs بالاست می‌تواند بسیار نگران کننده باشد. این امر نشان‌دهنده اهمیت درمان آنتی‌بیوتیکی منطقی، جلوگیری از گسترش این سویه‌ها در بیمارستان‌ها و درک پیامدهای بالینی ناشی از عفونت با ارگانیسم‌های مولد ESBLs می‌باشد. بالا بودن میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ارگانیسم‌های ایجادکننده عفونت‌های بالینی پیشنهادکننده بررسی مکانیسم‌های دخیل در ایجاد مقاومت و بررسی فعالیت ضد میکروبی داروهای جدید در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند به روند درمان مؤثر این عفونت‌ها کمک نماید.

تقدیر و تشکر

انجام این طرح تحقیقاتي با حمایت مالي معاونت پژوهشي دانشگاه آزاد اسلامي واحد بروجرد انجام گردیده است. بدین‌وسیله از زحمات این معاونت تشکر و قدرداني به عمل می‌آید.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

Reference

1. Li Q, Lee JY, Castillo R, Hixon MS, Pujol C, Doppalapudi VR, et al. NB2001, a novel antibacterial agent with broad-spectrum activity and enhanced potency against β-lactamase-producing strains. Antimicrob agents chemother. 2002; 46(5):1262-8.

2. Mirzaee M, Owlia P, Mansouri S. Distribution of CTX-M β-lactamase genes among Escherichia coli strains isolated from patients in Iran. Lab Med. 2009; 40(12):724-7.

3. Geyer CN, Hanson ND. Rapid PCR amplification protocols decrease the turn-around time for detection of antibiotic resistance genes in Gram-negative pathogens. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;31;77(2):113-7.

4. Lina TT, Khajanchi BK, Azmi IJ, Islam MA, Mahmood B, Akter M, et al. Phenotypic and Molecular Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli in Bangladesh. PloS one. 2014;9(10):e108735.

5. Roschanski N, Fischer J, Guerra B, Roesler U. Development of a Multiplex Real-Time PCR for the Rapid Detection of the Predominant Beta-Lactamase Genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-Type AmpCs in Enterobacteriaceae. PloS one. 2014;9(7):e100956.

6. Pitout JD. Infections with extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae. Drugs. 2010;70(3):313-33.

7. Shen D, Winokur P, Jones RN. Characterization of extended spectrum β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae from Beijing, China. Int J Antimicrob Agents. 2001;18(2):185-8.

8. Essack SY. Treatment options for extended-spectrum β-lactamase-producers. FEMS microbiol lett. 2000;190(2):181-4.

9. Kanj SS, Kanafani ZA, editors. Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum β-lactamase–producing enterobacteriaceae, carbapenem-resistant enterobacteriaceae, and multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa. Mayo Clinic Proceedings; 2011; 86 (3): 250-259.

10. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in Klebsiella pneumoniae is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the foss of an outer membrane protein. Antimicrob agents chemother. 1997;41(3):563-9.

11. P. Bailey & Scott's. diagnostic microbiology. 13rd ed. Elsevier Health Sciences; 2013.

12. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne PM-S.

13. Hanson ND, Thomson KS, Moland ES, Sanders CC, Berthold G, Penn RG. Molecular characterization of a multiply resistant Klebsiella pneumoniae encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. J Antimicrob Chemother.

Archive of SID

www.SID.ir

1999;44(3):377-80.

14. Zaniani FR, Meshkat Z, Nasab MN, 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.

15. Melzer M, Petersen I. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing E. coli compared to non-ESBL producing E. coli. J Infect. 2007;55(3):254-9.

16. Mansouri S, Neyestanaki DK, Shokoohi M, Halimi S, Beigverdi R, Rezagholezadeh F, et al. Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs types of β-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli producing Ex-tended Spectrum β-lactamases in Kerman, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2014;7(2): 12-16.

17. Moghaddam MN, Beidokhti MH, Jamehdar SA, Ghahraman M. Genetic properties of blaCTX-M and blaPER β-lactamase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae by polymerase chain reaction. Iran J Basic Med Sci. 2014;17(5):378.

18. Ghasemi Y, Archin T, Kargar M, Mohkam M. A simple multiplex PCR for assessing prevalence of extended-spectrum β-lactamases producing Klebsiella pneumoniae in Intensive Care Units of a referral hospital in Shiraz, Iran. Asian Pac J Trop Dis. 2013;6(9):703-8.

19. Patel TS, Nagel J. Clinical Outcomes of Enterobacteriaceae Infections Stratified by Carbapenem Minimum Inhibitory Concentrations. J clin microbiol. 2014:JCM. 03057-14.

20. Kazemnia A, Ahmadi M, Dilmaghani M. Antibiotic Resistance Pattern of Different Escherichia coli Phylogenetic Groups Isolated from Human Urinary Tract Infection and Avian Colibacillosis. Iran Biomed J . 2014;18(4):219-24.

21. Moayednia R, Shokri D, Mobasherizadeh S, Baradaran A, Fatemi SM, Merrikhi A. Frequency assessment of β-lactamase enzymes in Escherichia coli and Klebsiella isolates in patients with urinary tract infection. J Res Med Sci . 2014:S41.

22. Mirzaee M, Pourmand M, Chitsaz M, Mansouri S. Antibiotic Resistance to Third Generation Cephalosporins Due to CTX-M-Type Extended-Spectrum β-Lactamases in Clinical Isolates of Escherichia coli. Iran J Public Health. 2009;38(1):10-7.

23. Peerayeh SN, Rostami E, Siadat SD, Derakhshan S. High Rate of Aminoglycoside Resistance in CTX-M-15 Producing Klebsiella pneumoniae Isolates in Tehran, Iran. Lab Med. 2014;45(3):231-7.

24. Serefhanoglu K, Turan H, Timurkaynak FE, Arslan H. Bloodstream infections caused by ESBL-producing E. coli and K. pneumoniae: risk factors for multidrug-resistance. Braz J Infect Dis. 2009;13(6):403-7.

25. Ben-Ami R, Schwaber M, Navon-Venezia S, Schwartz D, Giladi M, Chmelnitsky I, et al. Influx of Extended-Spectrum β-Lactamase—Producing Enterobacteriaceae into the Hospital. Clin Infect Dis. 2006;42(7):925-34.

26. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, Mohapatra S, Trenholme GM and et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β-lactamase production in Klebsiella pneumoniae isolates causing bacteremia. Cli Infect Dis. 2000; 30(3):473-8.

27. Livermore DM, Sefton AM, Scott GM. Properties and potential of ertapenem. J Antimicrob Chemother. 2003;52(3):331-44.

Archive of SID

www.SID.ir