Archive of SID

Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Prevalence of CTX-3 family gene among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae from* patients hospitalized in Sina Hospital, Tabriz

Ali Pormohammad[1,2], Alka Hasani[1,2]*, Mohammad Aghazadeh[2], Mohammad Ahangarzadeh Rezaee[2], Akbar Hasani[3], Mohammad Reza Nahaei[2], Froogh Shams[2], Akbar Mohammadzadeh[4]

[1]Infectious and Tropical Medicine Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3]Department of Biochemistry and Clinical Laboratory, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[4]International Tabriz University of Medical Sciences, Aras, Iran
*Corresponding author; E-mail: dr.alkahasani@gmail.com

Received: 12 July 2014 Accepted: 31 August 2014 First Published online: 9 July 2017
Med J Tabriz Univ Med Sciences Health Services. 2017 June; 39(2):25-31

Abstract

Background: Emerging resistance to beta-lactam antibiotics among gram negative bacteria limits their usage. This study was done to determine the frequency of ESBLs producers and presence of CTX-M3 family gene (including CTX-M 3, 15, 22 subfamily) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from different clinical specimens in Sina Hospital, Tabriz

Methods: 71 isolates of *E. coli* and 63 *K. pneumoniae* were isolated from different clinical specimens sent to Division of Microbiology, Sina Hospital, Tabriz, Iran. Bacteria were identified by conventional phenotypic methods. ESBL production in *E. coli* and *K. pneumoniae* was first detected with combined disc method using Mueller-Hinton agar and later presence of CTX-M3 family gene was detected by PCR technique.

Results: In this study, 41 (57.74%) *E.coli* and 45 (71.42%) *K. pneumoniae* isolates were observed as ESBL producers. Among them, 30 (73.17%) *E. coli* and 26 (57.77%) *K.pneumoniae* were found carrying CTX-M3 gene. Among various antibiotics used for ESBL detection, highest resistance towards cefpodoxime (92%) was observed in *E.coli*, while in *K.pneumoniae* 90% isolates show resistance towards cefpodoxime and azterornam.

Conclusion: Our study revealed that there is a high frequency of ESBLs producing isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* in our hospital set up. The problem elucidates the importance of designing more controlled surveillance of antibiotic resistance and need for large-scale epidemiologic studies to identify outcomes of the ESBL-production in gram negative bacilli.

Keywords: *E.coli, Klebsiella pneumoniae*, Extended Spectrum beta- lactamase, CTX-3

How to cite this article: Pormohammad A, Hasani A*, Aghazadeh M, Ahangarzadeh Rezaee M, Hasani A, Nahaei M.R, Shams F, Mohammadzadeh A. [Prevalence of CTX-3 family gene among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from patients hospitalized in Sina Hospital, Tabriz]. Med J Tabriz Univ Med Sciences Health Services. 2017 June; 39(2):25-31. Persian.

© 2017 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

فراوانی خانواده ژنی CTX-M3 در میان ایزوله‌های بالینی *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان سینا، تبریز

علی پورمحمد[۲،۱]، آلکا حسنی[۱،۲]، محمد آقازاده[۲]، محمد آهنگرزاده رضایی[۲]، اکبر حسنی[۳]، محمد رضا نهایی[۲]، فروغ شمس[۲]، اکبر محمدزاده[۴]

[۱]مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
[۲]گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
[۳]گروه بیوشیمی و آزمایشگاه بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
[۴]دانشگاه علوم پزشکی شعبه بین المللی، ارس، ایران
* نویسنده رابط؛ ایمیل: dr.alkahasani@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۳/۴/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۹ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۴/۱۸
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۶ مرداد و شهریور ۱۳۹۶؛ ۳۹(۳): ۲۵-۳۱

چکیده

زمینه: ظهور مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام در میان باسیل های گرم منفی، کاربرد این آنتی‌بیوتیک‌ها را محدود ساخته است. این مطالعه بمنظور تعیین میزان فراوانی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs)و وجود خانواده ژنی CTX-M3 (شامل زیر خانواده های CTX-M ۲۲و۱۵و۳) در باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* ایزوله شده از نمونه‌های بالینی مختلف انجام شد.

روش کار: ۷۱ ایزوله *اشرشیا کلی* و ۶۳ *کلبسیلاپنومونیه* از نمونه‌های بالینی مختلف که به بخش میکروب شناسی بیمارستان سینای ، تبریز، ایران فرستاده شده بود انجام گرفت. باکتری‌ها با روشهای فنوتیپی مرسوم تعیین هویت شدند. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هینتون آگار تعیین شد. *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه*‌های تولید کننده‌ی ESBLs ابتدا به روش دیسک ترکیبی و سپس حضور خانواده ژنیCTX-M3 با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه از میان *اشرشیا کلی*۴۱ (۵۷/۷۴٪) ایزوله و در *کلبسیلاهای* مورد مطالعه ۴۵ (۷۱/۴۲٪) ایزوله تولید کننده‌ی ESBLs بودند. از بین *اشرشیاهای* ESBLs مثبت ۳۰ (۷۳/۱۷٪) ایزوله و از بین *کلبسیلاهای* ESBLs مثبت ۲۶ (۵۷.۷۷٪) ایزوله، دارای ژن CTX-M3 بودند. در بین آنتی‌بیوتیک-هایی که جهت شناسایی ESBLs بودن استفاده شد، بیشترین مقاومت در *اشرشیا کلی* به سسفپوداکسیم (۹۲٪) و در کلبسیلا به سفپودوکسیم (۹۰٪) و آزترئونام (۹۰٪) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه شیوع بالا از سویه‌های *اشرشیا کلی* و *کلبسیلا* نمونیه مولد ESBLs را در بیمارستان ما نشان داد. این مشکل اهمیت طراحی نظارت بیشتر کنترل شده بر مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و لزوم انجام مطالعات اپیدمیولوژیک گسترده برای شناسایی باسیل های گرم منفی مولد ESBLs را روشن می‌سازد.

کلید واژه ها: *اشرشیا کلی*، *کلبسیلا نمونیه*، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، CTX-M3

نحوه استناد به این مقاله: پورمحمد ع، حسنی آ، آقازاده م، آهنگرزاده رضایی م، حسنی ا، نهایی مر، شمس ف، محمدزاده ا. فراوانی خانواده ژنی CTX-M3 در میان ایزوله‌های بالینی *اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان سینا، تبریز. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۶؛ ۳۹(۳): ۲۵-۳۱

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اشریشیا کلی و *کلبسیلا* از اعضای خانواده *انتروباکتریاسه* می‌باشند که جزو پاتوژن‌های فرصت‌طلب بوده و از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌روند. بطوریکه *اشریشیا کلی* اولین پاتوژن کلیدی در عفونت‌های بیمارستانی بوده و در عین حال شایع‌ترین عامل ایجاد کننده عفونت‌های مجاری ادراری کسب شده از جامعه هم می‌باشد (۱)، پس از *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه* شایع‌ترین عامل ایجاد کننده عفونت‌های ادراری در بیماران با سیستم ایمنی تضعیف شده و دارای کاتتر است (۲). هر چند در گذشته اغلب عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری‌ها به طور موفقیت آمیز با آنتی‌بیوتیک‌هایی چون کینولون‌ها و بتالاکتام‌ها درمان می‌شدند (۱). اما در حال حاضر ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان پاتوژن‌های بیمارستانی از جمله *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* یکی از نگرانی‌های جدی جامعه پزشکی محسوب می‌شود (۳و۴).

در اواخر دهه ۱۹۸۰ خبر شیوع عفونت‌های بیمارستانی بوسیله باسیل‌های گرم منفی که دارای پلاسمیدهای مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) بودند، منتشر شد که مقاومت به سفالوسپورین‌ها و دیگر بتالاکتام‌ها را موجب می‌شد (۳و۴). هرچند این مشکل اولین بار در اروپا (۵) مطرح شد اما بعد از آن گزارش‌های متعددی از سایر کشورها از جمله فرانسه (۶)، آمریکا (۷) و حتی ایران (۸) نیز منتشر شد. اغلب ژنهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مانند تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون‌ها به همراه پلاسمیدهای مقاومت به همراه هم انتقال می‌یابند و موجب مقاومت چند دارویی می‌شوند. بنابراین شکست درمان بالینی نسبت به آنتی بیوتیک‌های اشاره شده به ویژه هنگامی که از آنتی‌بیوتیک‌های نامناسب برای درمان عفونت‌های ناشی از ارگانیسم‌های مولد ESBLs استفاده می‌شود، رخ می‌دهد. بنابراین، اگر عفونت با ارگانیسم‌های مولد ESBLs را در نمونه‌های بالینی شناسایی کرده و آنتی‌بیوتیک مناسب را انتخاب کنیم منجر به درمان موفق عفونت خواهد شد (۹). بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs ها) به دو گروه اصلی متالو و سرینی تقسیم می‌شوند و در تقسیم‌بندی آمبلر به چهار گروه عمده A، B، C و D تقسیم می‌شوند که مهمترین آنها گروه آمبلر کلاس A سرینی می‌باشد که شامل سه ژن SHV، TEM و CTX-M می‌باشند. از این میان ژن‌های SHV و TEM بطور شایع در خانواده انتروباکتریاسه یافت می‌شوند (۱۰). اما آنزیم CTX-M اولین بار در سال ۱۹۸۹ از کشورهای اروپایی گزارش شد. تاکنون بیش از ۴۰ نوع بتالاکتاماز CTX-M مختلف شناسایی شده است که بیشتر در میان خانواده‌ی *انتروباکتریاسه* مانند *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* دیده می‌شوند. این آنزیم‌ها بر اساس شباهت توالی اسیدهای آمینه آنها در پنج شاخه اصلی فیلوژنتیک طبقه بندی شده‌اند (۱۱). برای مثال گروه ۱ CTX-M شامل ۳-، ۱۰-، ۱۲-، ۱۵-، ۲۸- و CTX-M-۱ می‌باشد (۱۲). آنزیم‌های CTX-M بدلیل فعالیت هیدرولیتیک بالا علیه سفوتاکسیم به این نام خوانده می‌شوند. با توجه به اینکه نتیجه بررسی‌های فنوتیپی در سویه‌های جمع‌آوری شده وجود مقاومت نسبت به سفوتاکسیم را در برخی از ایزوله‌ها نشان داد، بنابراین علاوه بر تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی ایزوله‌های مولد ESBLs، هدف اصلی مطالعه حاضر تعیین میزان شیوع ژن‌های خانواد CTX-M3 در ایزوله‌های بالینی *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* است، که با توجه به نتایج این تحقیق و الگوی مقاومت بدست آمده می‌توان آنتی بیوتیک مناسب را جهت درمان عفونت های مختلف *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا* به پزشک ارائه داد.

روش کار

مطالعه اخیر یک مطالعه آزمایشگاهی بوده است. ایزوله‌های باکتریایی مورد استفاده در این تحقیق از ۵۶۵ نمونه‌ی بالینی مختلف (شامل ادرار، خون، ترشحات و زخم) از خرداد تا دی ماه ۱۳۹۱ از بیماران بستری و سرپایی که به آزمایشگاه میکروب‌شناسی مرکز آموزشی-درمانی سینای تبریز ارسال شده بودند جداسازی و با استفاده از تست‌های میکروب‌شناسی بعنوان *اشریشیا کلی* یا *کلبسیلا پنومونیه* شناسایی شدند. بطور خلاصه، نمونه‌های ارسالی ابتدا در محیط‌های بلاد آگار و مکانکی آگار یا محیط EMB آگار (برای کشت ادرار) کشت شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه می‌شد. پس از رشد کلنی‌ها، جهت تعیین هویت و شناسایی *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* از تست‌های فنوتیپی شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز، واکنش در محیط TSI آگار، بررسی تحرک، تولید اندول و H_2S در محیط SIM، مصرف سیترات، دکربوکسیلاسیون لیزین، آرژینین و ارنیتین و تست‌های MR/VP استفاده گردید (۲۵). پس از تعیین هویت، نمونه‌ها در نوترینت براث حاوی ۱۵٪ گلیسرول کشت شده و در دمای ۲۰- سانتیگراد برای بررسی‌های بعدی ذخیره شدند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های باکتریایی با استفاده از دیسک‌های تهیه شده از شرکت MAST: سفپودوکسیم (۳۰میکروگرم)، آزترئونام (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و سفپیم (۳۰ میکروگرم) با روش کربی-بائر مطابق استاندارد CLSI تعیین شد (۲۶). برای شناسایی فنوتیپی تولید ESBLs در ایزوله‌ها از روش دیسک ترکیبی (Combined disk) استفاده شد. برای این تست از دیسک های سفتازیدیم ۳۰میکروگرم، سفتازیدیم + کلاولانیک اسید (۳۰-۱۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم، سفوتاکسیم+ کلاولانیک اسید (۳۰-۱۰میکروگرم) و سفپیم، سفپیم +کلاولانیک اسید (۳۰-۱۰میکروگرم) و سفپوداکسیم، سفپوداکسیم +کلاولانیک اسید

www.SID.ir

Archive of SID

(۳۰-۱۰میکروگرم)، آزترئونام (۳۰ میکروگرم) که به فاصله ۲۰ میلی متری از یکدیگر قرار گرفت، استفاده گردید. بعد انکوباسیون به مدت ۲۴ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف از طریق افزایش قطر هاله عدم رشد به اندازه ۵ میلی متر یا بیشتر نسبت به آنتی بیوتیک ها در ترکیب هر کدام از آنها با کلاولانیک اسید نشان دهنده تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف بود (۲۶). از سویه *کبسیلا پنومونیه* ۷۰۰۶۰۳ATCC و *اشریشیاکلی* با ۲۵۹۲۲ATCC به ترتیب جهت کنترل مثبت و منفی برای تایید و عدم تایید سویه های تولید کننده ESBL استفاده شد.

برای انجام روش‌های مولکولی، ابتدا DNA ژنومی سویه‌های مورد آزمایش با روش SDS-Proteinase K اصلاح شده با CTAB استخراج شد (۱۴). در ادامه، وجود خانواده ژنی CTX-M3 در باکتری‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی زیر و به کمک روش PCR ارزیابی شد.

CTX-M۳G-F (۵-GTTACAATGTGTGAGAAGCAG-۳)

CTX-M۳G-R (۵-CCGTTTCCGCTATTACAAAC-۳)

سپس PCR بر اساس برنامه زیر انجام گرفت (۲۷):

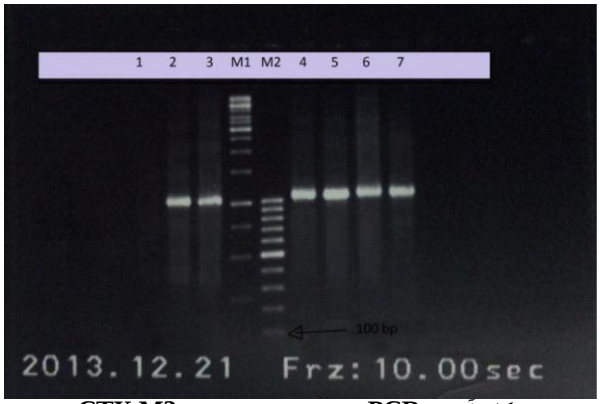
به ترتیب دمای پیش واسرشت شدن، واسرشت شدن، اتصال آغازگر، طویل شدن، طویل شدن نهایی: ۹۵، ۹۴، ۶۰، ۷۲، ۷۲ درجه سانتی گراد و به ترتیب ۵، ۱، ۱، ۱، ۱۰ دقیقه در ۳۰ دور تکرار انجام گرفت. در نهایت داده‌ها بصورت درصد فراوانی گزارش و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ بکار گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه از ۵۶۵ نمونه‌ی بالینی مختلف (شامل ادرار، خون، ترشحات و زخم)۷۱(۱۲/۵۶ ٪) ایزوله *اشرشیاکلی* و ۶۳ (۱۱/۱۵٪) مورد *کلبسیلا پنومونیه* از نمونه‌های مختلف بیماران مراجعه کننده به بیمارستان سینای تبریز ایزوله گردید. از بین نمونه‌های *اشرشیاکلی* ۴۲ (۵۹/۱۵) و از بین نمونه‌های *کلبسیلا* ۳۹ (۶۱/۹ ٪) مورد از جنس مذکر و بقیه‌ی نمونه‌ها از خانم‌ها جدا شدند. از نمونه‌های *اشرشیاکلی* بررسی شده ۴۱ (۵۷/۷۴٪) مورد مولد ESBLs بودند. در حالیکه ۴۵ (۷۱/۴۲٪) مورد از ایزوله‌های کلبسیلا بعنوان ESBLs مثبت شناسایی شدند. در تست بتالاکتاماز هیچ یک از سفلوسپورین‌ها بر روی هیچ یک از دو ارگانیسم موثر نبودند و تنها سفتازیدیم از لحاظ آماری معنی دار بود. ($p<0.001$) در این تحقیق میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفپودوکسیم ۶۶ (۹۲٪)، آزترئونام ۵۶ (۷۸٪)، سفتازیدیم ۴۷ (۶۶/۱ ٪)، سفوتاکسیم ۴۹ (۶۹٪)، سفپیم ۲۰ (۲۸٪) و در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه بصورت سفپودوکسیم ۵۷ (۹۰٪)، آزترئونام ۵۷ (۹۰٪)، سفتازیدیم ۵۵ (۸۷٪)، سفوتاکسیم ۵۴ (۸۵٪) و سفپیم ۱۵ (۲۳٪) تعیین شد. از بین اشرشیاهای ESBLs مثبت ۳۰ (۷۳/۱۷٪) مورد و از بین کلبسیلاهای مولد ESBLs مثبت۲۶ (۵۷/۷۷٪) مورد در آزمایش PCR دارای ژن CTX-M3 تعیین شدند (شکل). در جدول رابطه ی بین خانواده ژنی CTX-M3 و تولید ESBL در نمونه‌های مختلف *اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه* اشاره شده است.

جدول: رابطه ی بین خانواده ژنی CTX-M3 و تولید ESBL در نمونه های مختلف *اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه*

باکتری		نمونه ها			
		ترشحات داخل تراشه	زخم	خون	ادرار
اشرشیاکلی	تعداد نمونه	(n=۰)	(n=۹)	(n=۱۲)	(n=۵۰)
	ESBL +	–	۵(۵۵/۵۵٪)	۷ (۵۸/۳۳٪)	۲۹(۵۸٪)
	CTX-M3 (بین ESBL مثبت ها)	–	۳(۶۰٪)	۷(۱۰۰٪)	۲۰(۶۸/۹۶٪)
کلبسیلا پنومونیه	تعداد نمونه	(n=۲)	(n=۲۶)	(n=۱۹)	(n=۱۶)
	ESBL +	۲(۱۰۰٪)	۲۰ (۷۶/۹۲٪)	۱۱(۵۷/۸۹٪)	۱۲(۷۵٪)
	CTX-M3 (بین ESBL مثبت ها)	۱(۵۰٪)	۱۳(۶۵٪)	۴(۳۶/۳۶٪)	۴ (۳۳/۳۳٪)



شکل: آزمون PCR جهت تعیین حضور ژن CTX-M3

خط ۱: کنترل منفی – خط: ۲و۳و۴و۵و۶و۷ سویه های مثبت از نظر حظور ژن CTX-M3 – خط: M1 مارکر kb ۱، خط M2 مارکر bp۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در مطالعات قبلی نشان داده شده که باسیل‌های گرم منفی تولید کننده ESBLs و بخصوص *اشرشیا کلی کلبسیلا پنومونیه* عوامل پاتوژنی خطرناک برای ایجاد عفونت‌ها در جامعه و بیمارستان می‌باشند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که در بیماران مبتلا به عفونت‌هایی چون سپتی‌سمی که توسط ارگانیسم‌های تولید کننده ESBLs ایجاد می‌شوند، میزان مرگ و میر به طور قابل توجهی نسبت به افرادی که با سویه‌های غیر مولد ESBLs عفونی شده‌اند، بالاتر است (۱۵). از بین *اشرشیاکلی‌های* جدا شده از جنس مذکر، بیشترین تعداد نمونه مربوط به نمونه ادراری ۲۸ (۶۶.۶۶٪) و از جنس مونث، باز هم بیشترین تعداد نمونه مربوط به نمونه ادراری ۲۲ (۷۵.۸۶٪) می باشد. و از بین نمونه‌های *کلبسیلاهای* جدا شده از جنس مذکر، بیشترین تعداد نمونه مربوط به نمونه زخم ۱۸ (۴۶.۱۵٪) بوده و از جنس مونث، بیشترین تعداد نمونه مربوط به نمونه خون ۹ (۳۷.۵٪) می‌باشد که نشان می دهد در بین عفونت های مختلف *اشرشیاکلی*، این باکتری بیشتر موجب عفونت ادراری می شود (بخصوص در خانمها) ولی در بین عفونت های مختلف *کلبسیلا* الگوی خاصی دیده نشد و میزان عفونت در نمونه‌های مختلف تقریبا نزدیک هم است.

در مطالعه حاضر میزان برای شناسایی فنوتیپی تولید ESBLs در ایزوله‌ها از روش دیسک ترکیبی (Combined disk) استفاده شد که شیوع ESBLs در ایزوله‌های کلبسیلا ۷۱/۴۲ ٪ و در سویه‌های اشرشیاکلی ۵۷/۷۴٪ گزارش گردید، در صورتی که در مطالعه Parven و همکاران در سال ۲۰۱۱ در هند فقط ۳۹/۲٪ از کلبسیلا *پنومونیه*‌ها و ۶۰/۸ ٪ از سویه‌های اشرشیاکلی ها تولیدکننده ESBLs بوده‌اند (۱۶). در تحقیق دیگری که حسین‌زادگان و همکاران در سال ۱۳۸۶ در لرستان انجام دادند، از مجموع ۲۲۵ نمونه بالینی E. coli، ۵۳(۲۳/۵۵٪) مورد ESBLs مثبت بودند (۱۷). همچنین بر اساس مطالعه بیات ماکو و همکاران در سال ۱۳۸۹ در تبریز، میزان شیوع ESBLs بین اشرشیاکلی‌های جدا شده ۴۹/۲٪ گزارش شد (۲۷). در مطالعات اشاره شده نیز از روش دیسک ترکیبی جهت شناسایی فنوتیپی تولید ESBLs در ایزوله‌ها از روش دیسک ترکیبی (Combined disk) استفاده شده است. علاوه بر این نتایج سایر مطالعات انجام یافته میزان شیوع ESBL در بین ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه را در آمریکای لاتین حدود ۵۴/۴ ٪ و در اروپا ۶.۲۲ ٪ نشان می‌دهد. بنابراین داده‌های بدست آمده از این تحقیق در مقایسه با مطالعات اشاره شده به خصوص تحقیقی که توسط بیات ماکو و همکاران در منطقه جغرافیایی مشابه و در برهه زمانی تقریبا نزدیکی انجام داده‌اند، نشان دهنده افزایش شیوع ESBLs در *کلبسیلا پنومونیه* و *اشرشیاکلی* در ایران و بویژه منطقه شمال غرب ایران می‌باشد. درباره میزان شیوع ژن CTX-M3 مطالعات نسبتاً محدودی در دنیا انجام گرفته است. برای مثال در تحقیقی که توسط Bhat و همکاران در سال ۲۰۱۲ در هند انجام گرفت ۸۴٪ از *اشرشیاکلی های* جدا شده از نمونه‌های ادراری دارای ژن CTX-M3 بوده‌اند (۱۸). علاوه بر این، بر اساس پژوهشی که توسط Anna و همکاران در سوئد روی ۲۰۰ نمونه *اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده ESBL انجام گرفت، ۸۷٪ ایزوله‌ها واجد ژن CTX-M بودند (۱۵). علاوه بر این در مطالعه‌ای که توسط آرچین و همکاران در سال ۱۳۹۲ در شیراز انجام شد ۵۵٪ سویه‌های کلبسیلا نمونیه دارای ژن CTX-M بودند (۱۹) بطوریکه بر اساس نتایج این پژوهش از بین *اشرشیاکلی های* ESBLs مثبت ۳۰ (۷۳/۱۷ ٪) مورد و از بین کلبسیلا پنومونیه های ESBLs مثبت ۲۶ مورد (۵۷/۷۷٪) دارای ژن CTX-M3 تشخیص داده شدند. با توجه مطالعات انجام شده نتایج و داده های مختلفی از وجود ژن CTX-M3 در بین سویه ها گزارش شده است و نسبت به داده‌هایی که در این تحقیق بدست آمده است، افزایش تقریبی مقاومت در مطالعه ما دیده می‌شود که خود جای بسی نگرانی دارد و در مورد اغلب باکتری‌هایی که دارای ژن آنزیم بتالاکتاماز می‌باشند با وجود نشان دادن حساسیت در آزمایشگاه، درمان بالینی عفونت‌های حاصل از این باکتری‌ها با شکست مواجه می‌شود. همچنین باکتری‌هایی که مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف هستند علاوه بر بتالاکتام‌ها به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مقاوم می‌شوند که این موضوع بسیار نگران کننده است (۲۱). بنابراین توصیه می‌شود کلیه سویه‌های *اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه* از نظر تولید آنزیم های بتالاکتاماز مورد ارزیابی قرار گرفته و در برخی موارد که نمونه از لحاظ مورفولوژی (مثلا در تست دیسک ترکیبی) از لحاظ تولید بتالاکتاماز تقریباً منفی بود، ولی واجد ژن تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز بودند بصورت بالقوه مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در نظر گرفته شود (۲۴-۲۲). با توجه به موارد اشاره شده ضرورت غربالگری ایزوله‌ها و شناسایی ژن‌هایی که توسط آنها حمل می‌شود جهت درمان مناسب و پیشگیری‌های اولیه خصوصاً در بیماران در معرض خطر و یا در افراد دچار بیماری‌های خاص احساس می‌شود.

نتیجه گیری

بتالاکتامازهای وسیع الطیف شیوع روز افزون دارند و در این مطالعه نیز میزان فراوانی بالایی از شیوع *E.coli* و *K.pneumoniae* مولد ESBLs نشان داده شد که این داده ها ما را به توصیه های زیر رهنمون می‌سازد که در درمان عفونت باکتریال، با کمک متخصصین آزمایشگاه و به دنبال تعیین الگوی حساسیت دقیق، از یک بتالاکتام در ترکیب با یک بازدارنده بتالاکتاماز استفاده شود. بدین طریق از گسترش بتالاکتامازهای وسیع الطیف در بین سویه های مختلف باکتریال کاسته شده و از بسط عفونت های مقاوم، و

www.SID.ir

Archive of SID

نیز از روز افزون شدن مرگ ومیر در مراکز درمانی پیشگیری می-شود. در ادامه این مطالعه تعیین دقیق تیپ های مختلف آنزیم CTX-M و سایر آنزیم های ESBLs با روشهای مولکولی دیگر از قبیل PCR-RFLP، REP-PCR و تعیین توالی این ژنها توصیه می‌شود.

قدردانی

این طرح با حمایت مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری (با شماره ۱۰- ۹۲) تبریز اجرا شده است. در اجرای این طرح پرسنل آزمایشگاه بیمارستان سینا تبریز (خانم لیلا دهقانی و ژیلا خواجه محمدی) همکاری صمیمانه داشته اند. از ریاست مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری تبریز و همه همکاران گرامی تقدیر و تشکر به عمل می آید. این مقاله منتج از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد آقای علی پور محمد می باشد.

References

1. Goettsch W, Van Pelt W, Nagelkerke N, Hendrix MG, Buiting AG, Petit PL. Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in The Netherlands. *J Animicrob Agent Chemother*apy 2000; **46**: 223-228. doi: 10.1093/jac/46.2.223
2. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella spp*. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; **11**: 589-603.
3. Howard S, Robert C. Moellering Jr. Antimicrobal- drug resistance. *Nengl Med* 1996; **335**: 345-633. doi: 10.1056/NEJM199611073351907
4. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β-lactamases accelerated by genrration of β-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; **24**: 19-S45. doi: 10.1093/clinids/24.Supplement_1.S19
5. Knothe H , Shah P, Kremery V, Anatal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandol and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens*. *Infection* 1983; **24**: 315-317. doi: 10.1007/BF01641355
6. Petit A, Gerbaud G, Sirot D, Courvalin P, Sirot J. Molecular epidemiology of TEM-3(CTX-1)β-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**: 219-224.
7. Rice LB, Willey SH, Papanicolaou GA. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum β-lactamase at Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1990; **34**: 2193-2199.
8. Karami A, Naghavi KH, Sorouri R, Ranjbar R, Khalilpo A. Use of a MAMA-PCR Method to detect *gyr*A mutations in Nalidixic Acid Resistant Clinical Isolates of *Escherichia coli*. *Iranian J Publ Health* 2008; **37**: 42-47.
9. Ghafourian S, Sekawi Z, Sadeghifard N, Mohebi R, Vasantah Kumari N, Maleki A, et al. The Prevalence of ESBLs Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Some Major Hospitals, Iran. *The Open Microbiology Journal* 2011; **5**: 91-95.
10. Barthelemy M, Peduzzi J, Bernard H, Tancrede C, Labia R. Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca Biochim Biophys Acta* 1992; **112**: 15-22. doi: 10.1016/0167-4838(92)90121-S
11. Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**(7): 1936-1942.
12. Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum Beta-Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**(1): 1-14. doi: 10.1128/AAC.48.1.1-14.2004
13. Pakzad I, Ghafourian S, Taherikalani M, Sadeghifard N, Abtahi H, Rahbar M. qnr Prevalence in Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBLs) and None-ESBLs Producing *Escherichia coli* isolated from Urinary Tract Infections inCentral of Iran. *Iranian J Basic Medical Sciences* 2011; **35**: 458-464.
14. Shahcheraghi F, Moezi H, Feizabadi MM. Distribution of TEM and SHV beta-lactamase genes among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Tehran. *Med Sci Monit* 2007; **13**: 247-250.
15. Onnberg A, Mölling P, Zimmermann J, Söderquist B. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β-lactamases with focus on CTX-M in a low-endemic area in Sweden. *APMIS* 2011; **119**: 287-295. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02730.x
16. Parveen M, Manivannan S, Harish B, Parija S. Study of CTX-M Type of Extended Spectrum B-Lactamas among Nosocomial Isolates of *Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in* South India. *Indian J Microbiol* 2012; **52**(1): 35-40. doi: 10.1007/s12088-011-0140-3

www.SID.ir

Archive of SID

17. Hosseinzadegan H, Hasani A, Azadpor M, Soleiman Nejad S, Mohammadi F. Identification B-lactamase producing gram negative broad spectrum of bacteria isolated from clinical cases. *Iran J Experiment Sci* 2007; **1**: 33-38.
18. Malini A, SageeraBanoo S, KoWSalya R, Gauta P, SarKar S. The Occurrence of CTX-M3 Type Extended Spectrum Beta Lactamases among *Escherichia Coli* Causing Urinary Tract Infections in a Tertiary Care Hospital in Pondicherry. *D JCDR* 2012; **6**: 1203-1206.
19. Archin T, Kargar M, Ghasimi Y, Afsaliyan A. Molecular detection of beta lactamase genes –blaCTX M, blaTEM, blaSHV and study of antibiotic resistance pattern in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from ICUs of Namazi Hospital, Shiraz Armaghane-danesh 2014; **10**: 816-825.
20. Bayat Makoo Zh, Binesh E, Hasani A, Nagili B. Study on Prevalence of Extended Spectrum , Lactamase Producing Gram Negative Bacilli in Clinical Specimens Isolated From Hospitalized Patients in Tabriz Sina Hospital. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences* 2010; **32**: 11-15.
21. Patzer JA, Dzierzaniwska D, Pawinska A, Turner PJ. High activity of meropenem against Gran negative bacteria from a pediatric intensive Care Unit, 2001-2005. *Antimicrobial agents* 2007; **2**: 211-212. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.09.012
22. Gould CV, Umscheid CA, Agarwal RK, Kuntz G, Pegues DA. Guideline for prevention of catheter associated urinary tract infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; **31**(4): 319-326. doi: 10.1086/651091
23. Salverda ML, De Visser JA, Barlow M. Natural evolution of TEM-1 beta-lactamase; experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbial Rev* 2010; **34**(6): 1015-1036. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00222.x
24. Tetsuya Y, Hiroshi K, Naohiro S, Keigia S. A preliminary survey of extended spectrum beta lactamases in clinical isolates of Klebsiella *pnenumoniea and Escherichia coli* in Japan. *Microbiology letters* 2000; **184**(1): 53-56.
25. Bailey &Scott's. Diagnostic Microbiology. In: Betty AF, Daniel FS, Alice SW editors. Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier, 2007; PP: 172-178.
26. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2011.
27. Pagani L, Dell'Amico R, Migliavacca M, D'Andrea E, Giacobone G, Amicosante E, et al. Multiple CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 4264-4269. doi: 10.1128/JCM.41.9.4264-4269.2003

www.SID.ir