Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دهم، شماره اول، فروردین ۹۵
صفحه ۳۰ الی ۳۹

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تعیین ژن‌های بتالاکتاماز با طیف وسیع (*blaTEM*، *blaSHV* و *blaCTX-M*) در سویه‌های *اشرشیاکلی* جداشده از نمونه‌های بالینی بیمارستان علی‌ابن‌ابیطالب قم

سعید شمس[1*]، علی هاشمی[2]، سمیه کرمانی[1]، محمد اسمخانی[3]، سمیرا تراشی[4]

[1]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

[2]گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

[3]بیمارستان علی‌ابن‌ابیطالب، قم، ایران.

[4]دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
سعید شمس، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
sshamsmed@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۳۱

تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۹

چکیده

زمینه و هدف: *اشرشیاکلی*، یک باکتری فرصت‌طلب گرم منفی است که باعث عفونت‌های شایع بیمارستانی ازجمله پنومونی، سپتی‌سمی، مننژیت، اسهال، باکتریمی‌و ...، می‌شود. مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان یک مشکل جدی برای سلامت انسان مطرح است، به‌گونه‌ای که سازمان بهداشت جهانی، سال ۲۰۱۱ را به‌عنوان سال مقاومت آنتی‌بیوتیکی درنظرگرفت. یکی از دلایل این مقاومت‌ها تولید بتالاکتامازها با طیف وسیع (ESBLs) بوده که قادر به هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با طیف وسیع می‌باشند. این مطالعه با هدف بررسی شیوع سویه‌های مقاوم به سفوتاکسیم و ارزیابی ژن‌های بتالاکتاماز با طیف وسیع (ESBL) *bla TEM*، *bla SHV* و *blaCTX-M* در ایزوله‌های *اشرشیاکلی* انجام شد.

روش بررسی: در این تحقیق Cross sectional در مدت زمان ۵ ماه (اردیبهشت ماه تا شهریور ماه سال ۱۳۹۳) نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه بیمارستان علی‌ابن‌ابیطالب (ع) قم شامل: خون، ادرار، زخم و ...، بررسی شدند. پس از شناسایی و جداسازی سویه‌های *اشرشیاکلی*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تولید ESBL آنها به‌وسیله متد دیسک دیفیوژن، MIC و روش Combination Disk برطبق دستورالعمل CLSI مشخص گردید. سپس PCR برای تعیین ژن‌های *TEM*، *SHV* و *blaCTX-M* انجام شد.

یافته‌ها: از بین ۱۶۰ *اشرشیاکلی* جداشده و براساس نتایج دیسک دیفیوژن و MIC، ۳۱ ایزوله (۱۹٪) مقاوم به سفوتاکسیم بودند. همچنین براساس نتایج فنوتیپی، ۲۴ (۷۷٪) ایزوله مقاوم به سفوتاکسیم تولیدکننده ESBL، شناسایی شدند.

ژن‌های *blaCTX-M*، *bla TEM* و *bla SHV* به ترتیب در ۹۰، ۴۲ و ۳٪ از سویه‌ها تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد شیوع بالای *اشرشیاکلی* تولیدکننده ESBL، بالا می‌باشد. بنابراین، نیاز به مدیریت مصرف آنتی‌بیوتیک و شناسایی منبع و انتشار ایزوله‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وجود دارد.

کلید واژه‌ها: *اشرشیاکلی*؛ بتالاکتاماز؛ بتالاکتاماز- ژنتیک؛ مقاومت باکتری به دارو.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Shams S, Hashemi A, Kermani S, Esmkhani M, Tarashi S. Determination of extended-spectrum Beta-lactamase genes (bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M}) in Escherichia coli strains isolated from clinical specimenes in Ali-Ibne Abi Talib Hospital in Qom, Iran. Qom Univ Med Sci J 2016;10(1):30-39.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:11 IRDT on Monday June 13th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:11 IRDT on Monday June 13th 2016

مقدمه

امروزه، استفاده بی‌رویه داروهای آنتی‌بیوتیکی بدون توجه به مصرف صحیح و درست آن، شایع است. در طول سالهای گذشته ظهور باسیل‌های گرم منفی مقاوم به داروهای بتالاکتام (پنی‌سیلین، سفالوسپورین، مونوباکتام (آزترونام) و کاربا‌پنم (ایمی‌پنم و مروپنم)، مشکلات اساسی را در حوزه سلامت ایجاد کرده؛ به‌گونه‌ای‌که عدم پاسخ مناسب به درمان و بالارفتن هزینه‌های مختلفی را برای بیماران درپی داشته است؛ حتی می‌توان گفت عفونت با این باکتری‌ها در سراسر جهان یک تهدید جدی برای بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان محسوب شده و می‌تواند میزان مرگ و میر بالایی را نیز به همراه داشته باشد. از موارد دیگر، پیشرفت مقاومت آنتی‌بیوتیکی با سطح پایین (Low-level) می‌باشد که ناشی از افزایش طول مدت درمان بوده و ممکن است با تست‌های حساسیت روتین در آزمایشگاه بیمارستان تعیین نشود. همچنین شیوع این باکتری‌ها عامل عمده‌ای در عفونت‌های بیمارستانی بوده و به‌راحتی بین بیماران منتقل می‌شود (۲،۱). به‌علاوه، در سالهای اخیر گسترش و انتشار سریع باکتری‌های مقاوم به چند دارو (Multi Drug Resistant, MDR)، به‌عنوان مشکل اصلی در سلامت عمومی مطرح است. از این‌رو سازمان بهداشت جهانی (WHO)، سال ۲۰۱۱ را سال مقاومت آنتی‌بیوتیکی نامید و آن را به‌عنوان یک تهدید همگانی منتشر کرد (۴،۳). علت این مقاومت در باکتری‌های مختلف، متفاوت است، ولی در باکتری‌های گرم منفی روده‌ای، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز، نقش اصلی را در مقاومت بازی می‌کند. این سویه‌ها قادرند به‌راحتی ژن مقاومت را از یک باکتری به باکتری‌های دیگر انتقال دهند. این آنزیم‌ها به‌عنوان دفاع اصلی باکتری‌های گرم منفی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌باشند. بتالاکتامازها طبق نظر Ambler، به چهار دسته مولکولی A، B، C، D تقسیم می‌شوند (۵). کلاس A بتالاکتامازها با طیف وسیع یا ESBLs (Extened-Spectrum-β-Lactamase) بوده و شامل: PER، SHV، TEM و CTX-M می‌باشد. ESBLs باکتری‌ها را به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های خانواده سفالوسپورین (از قبیل سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم) و مونوباکتام (آزترونام) مقاوم می‌کند.

این آنزیم‌ها بیشتر به‌وسیله پلاسمید کد می‌شوند (۶). عمده ESBLs از بتـــالاکتامازهای TEM-1 و SHV-1 مشتق می‌شود. به هر حال شیوع این ارگانیسم‌ها در نواحی جغرافیایی مختلف، متغیر است. CTX-M، بیشترین شیوع را در جهان داشته، ولی اغلب همراه با شیوع منطقه‌ای در اروپای شرقی، آمریکای جنوبی، آسیای جنوب شرقی و اخیراً در هند گزارش شده است.

آنزیم CTX-M عمدتاً در *اشرشیاکلی* وجود داشته و در عفونت‌های ادراری نیز دیده می‌شود. امروزه، آنزیم CTX-M-15 در سویه *اشرشیاکلی* در حال افزایش است (۷). این آنزیم در بین نوزادان، شایع‌ترین بتالاکتاماز با طیف وسیع بوده که باعث آلودگی آنها می‌شود. از طرفی، CTX-M-15 باعث مقاومت باکتری‌ها، به‌ویژه *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* به سفالوسپورین‌های نسل سوم از قبیل سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم و مونوباکتام‌ها (آزترونام) می‌گردد. ژن *CTX-M-15* در پلاسمیدهای حاوی NDM-1 و KPC نیز دیده شده است (۱۱-۸). *اشرشیاکلی*، باکتری باسیلی گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه بوده که جزئی از فلور طبیعی دستگاه گوارش محسوب می‌شود. این باکتری در خارج از دستگاه گوارش، عفونت‌های مختلفی از جمله عفونت دستگاه ادراری، عفونت جریان خون و سپسیس، منتژیت، پرئتونیت و پنومونی‌های بیمارستانی را ایجاد می‌کند (۱۲). امروزه، این باکتری مقاومت بالایی به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها پیدا کرده است و به‌ویژه برای بیماران بستری در بخش ICU، خطرآفرین است (۱۳). اگرچه بررسی مقاومت به سفوتاکسیم به روش دیسک دیفیوژن در آزمایشگاه‌های بالینی انجام می‌شود، ولی اطلاعات دقیقی از وجود آنزیم‌های بتالاکتاماز و حضور ژن‌های مقاوم و نوع آنها (که از نظر علم میکروب‌شناسی اهمیت دارند) در قم وجود ندارد.

مطالعات دیگر انجام‌شده در ایران، حضور ژن‌های متالوبتالاکتاماز را عمدتاً در *سودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتر* نشان می‌دهد و با توجه به جستجو در منابع معتبر، بررسی این ژن‌ها در ایران بر روی *اشرشیاکلی* در تعداد محدودی مطالعه انجام شده است (۱۵،۱۴). لذا طبق دستورالعمل WHO جهت کنترل شیوع مقاومت، همچنین وضعیت پراکندگی سویه‌های مقاوم در جهان، بررسی چنین مطالعاتی در مکان‌های مختلف توصیه شده است (۱۷،۱۶).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:11 IRDT on Monday June 13th 2016

بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی میزان شیوع *اشرشیاکلی* مقاوم به سفوتاکسیم، همچنین ارزیابی حضور ژن‌های *blaTEM*، *blaSHV* و *blaCTX-M* در ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک فوق انجام شد.

روش بررسی

در این تحقیق Cross sectional در مدت زمان ۵ ماه (اردیبهشت ماه تا شهریور ماه سال ۱۳۹۳)، مجموعه نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه بیمارستان شامل: خون، ادرار، زخم، ترشحات تنفسی و ...، از نظر حضور باکتری *اشرشیاکلی* بررسی شد. برای جداسازی باکتری مورد نظر، نمونه‌ها روی محیط‌های EMB و مک‌کانکی کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. جهت تأیید باکتری‌های جداشده از (Tripticle Sugar Iron agar) TSI، SIM، سیترات، اندول، رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز و اکسیداز استفاده شد.

مقاومت دارویی سویه‌های جداشده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (GM)، آمیکاسین (AK)، توبرامایسین (TOB)، سفوتاکسیم (CTX)، سفتریاکسون (CRO)، سولفومتوکسازول (SXT)، نالیدیکسیک اسید (NA)، سیپروفلوکساسین (CP)، سفتازیدیم (CAZ)، نورفلوکساسین (NOR)، سفکسیم (CFM)، ایمی‌پنم (IMI) و تتراسیکلین (TE) (ساخت شرکت پادتن طب) به روش دیسک دیفیوژن براساس پروتکل CLSI تعیین گردید.

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) سفوتاکسیم و سفتازیدیم بر روی سویه‌های مقاوم از مرحله دیسک دیفیوژن انجام شد. برای این منظور از روش میکرودایلوشن طبق دستورالعمل CLSI استفاده گردید. در ابتدا، ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث درون چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد، سپس با ریختن ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بیوتیک در چاهک اول، به‌صورت سریالی (تا ۸ رقت) رقت‌سازی (از رقت‌های ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲ میکروگرم برمیلی‌لیتر) انجام گرفت.

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، از باکتری‌ها نیم مک‌فارلند تهیه گردید و سپس به نسبت یک به ۲۰، رقیق‌سازی انجام شد (۵۰ میکرولیتر از ۰/۵ مک‌فارلند در ۹۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل) و ۱۰ میکرولیتر ازآن به همه چاهک‌ها اضافه گردید. انکوباسیون میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد.

برای شناسایی فنوتیپی باکتری‌های ESBL مثبت، روش Combined Test به کار برده شد. در این روش از دیسک‌های سفتازیدیم و سفتازیدیم/کلاوونیک اسید، سفوتاکسیم و سفوتاکسیم/کلاوونیک اسید، همچنین سفپودوکسیم و سفپودوکسیم/کلاوونیک اسید (MAST استفاده گردید. ایزوله‌ها با قطر هاله ممانعت از رشد دیسک سفالوسپورین همراه کلاوونیک اسید نسبت به دیسک سفالوسپورین به‌تنهایی، بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر به‌عنوان باکتری ESBL مثبت در نظر گرفته شدند.

برای استخراج DNA سویه‌های *اشرشیاکلی* از روش Boiling استفاده گردید، بدین صورت‌که ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل را داخل میکروتیوب ریخته، سپس ۴-۳ کلنی از کشت ۲۴ ساعته باکتری داخل آب مقطر پخش گردید. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در داخل آب در حال جوش گذاشته شدند. سوسپانسیون فوق به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ و مایع رویی جهت PCR (حاوی DNA) به میکروتیوب جدید انتقال داده شد. ژنوم تا انجام PCR در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

روش PCR برای شناسایی ژن‌های *blaTEM*، *blaSHV* و *blaCTX-M* در سویه‌های *اشرشیاکلی* ایزوله‌شده با استفاده از شرایط ذکرشده در جدول شماره ۱ و پرایمرهای اختصاصی (ساخت شرکت Bioneer کره) این ژن‌ها انجام گرفت (جدول شماره ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:11 IRDT on Monday June 13th 2016

جدول شماره ۱: شرایط PCR برای تکثیر ژن‌های *blaTEM*، *blaSHV* و *blaCTX-M*

مراحل واکنش	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (دقیقه)
Initial denaturation	۹۴	۵
Denaturation	۹۴	۱
Anealing	۵۵	۱
Extension	۷۲	۱
Final extension	۷۲	۵
Cycle total	۳۶	–

جدول شماره ۲: پرایمرهای مورد استفاده در انجام PCR

رفرنس	سایز قطعه	ژن هدف	توالی پرایمر
۱۶	392bp	CTX-M-F CTX-M-R	5'-GCGATGGGCAGTACCAGTAA-3' 5'-TTACCCAGCGTCAGATTCCG-3'
۱۷	864bp	SHV-F SHV-R	5′-TTAGCGTTCCCAGTGCTC-3' 5′-GGTTATGCGTTATATTCGCC-3'
۱۷	972bp	TEM-F TEM-R	5′-TCGGGGAAATGTGCGCG-3' 5′-TGCTTAATCAGTGAGGCACC-3'

برای انجام PCR، ۵ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومولاربه PCR Master Mix (شرکت سیناکلون-ایران) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر اضافه شد (جدول شماره ۳).

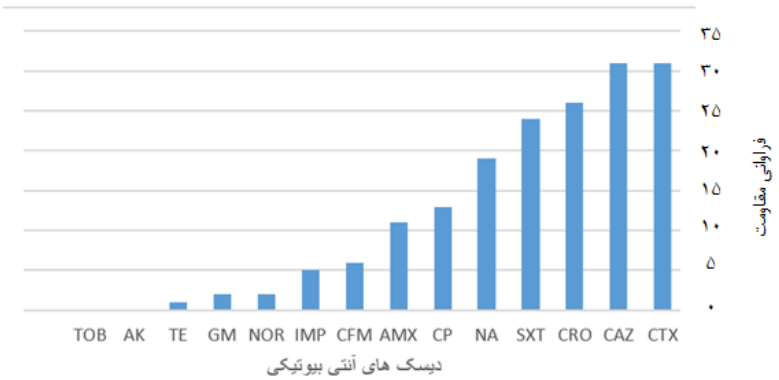
از سویه *E.coli*ATCC 29522 به‌عنوان کنترل منفی و از سویه‌های *K. pneumonia* ATCC 700603، *K. pneumonia* K5 و *K. Pneumonia* 7881، به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. الکتروفورز نمونه‌ها در ژل ۱٪ انجام گرفت و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، نتایج و وجود باند با دستگاه Gel doc (Bio-RAD) با نور UV مشاهد گردید.

جدول شماره ۳: حجم مقادیر استفاده شده در واکنش PCR

مواد	کنترل مثبت و نمونه ها	کنترل منفی
مخلوطی از مواد PCR	۱۲/۵ میکرولیتر	۱۲/۵ میکرولیتر
پرایمر F	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر
پرایمرR	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر
DNA	۵ میکرولیتر	
آب	۵/۵ میکرولیتر	۱۰/۵ میکرولیتر
کل	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر

یافته‌ها

در این مطالعه از اردیبهشت ماه تا شهریور ماه سال ۱۳۹۳، ۱۶۰ سویه *اشرشیاکلی* جدا شد. براساس متد دیسک دیفیوژن (از نظر فراوانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها)، بیشترین مقاومت در برابر سفوتاکسیم و سفتازیدیم بود، درحالی‌که هیچ مقاومتی نسبت به آمیکاسین و توبرامایسین مشاهده نشد (نمودار شماره ۱).



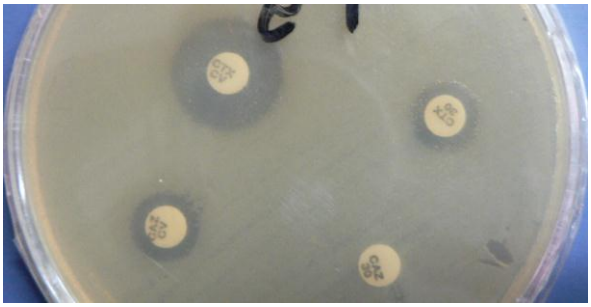
نمودار شماره ۱: فراوانی مقاومت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی براساس روش دیسک دیفیوژن.

www.SID.ir

Archive of SID

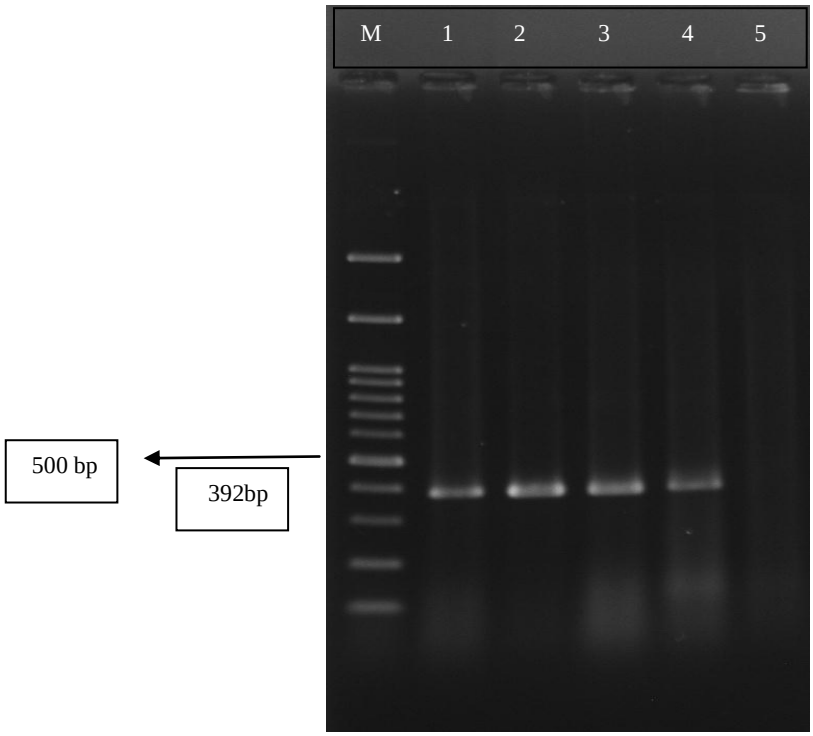
نتایج دیسک دیفیوژن و MIC (MIC≥32) نسبت به سفوتاکسیم نشان داد ۳۱ مورد (۱۹٪) از سویه‌ها، به این آنتی‌بیوتیک مقاوم هستند.

براساس نتایج تست تأیید فنوتیپی ESBL، ۲۴ ایزوله (۷۷٪) از سویه‌های مقاوم به سفوتاکسیم، دارای قطر هاله بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر در مجاورت دیسک سفالوسپورین همراه با کلاوونیک اسید بودند (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱: روش Combined Test بررسی فنوتیپی ESBL. قطر هاله برابر یا بیشتر از ۵ میلی‌متر، به‌عنوان ESBL مثبت درنظر گرفته می‌شود.

طبق نتایج PCR، سویه‌های مقاوم به سفوتاکسیم و سفتازیدیم، ژن‌های *bla CTX-M* در ۲۸ سویه (۹۰٪)، *bla TEM* در ۱۳ مورد (۴۲٪) و *blaSHV* در تنها یک مورد (۳٪) از سویه‌های مقاوم تعیین شدند (شکل ۳-۱). قسمتی از نتایج ژل الکتروفورز در شکل‌های ۴-۲ نمایش داده شده است.



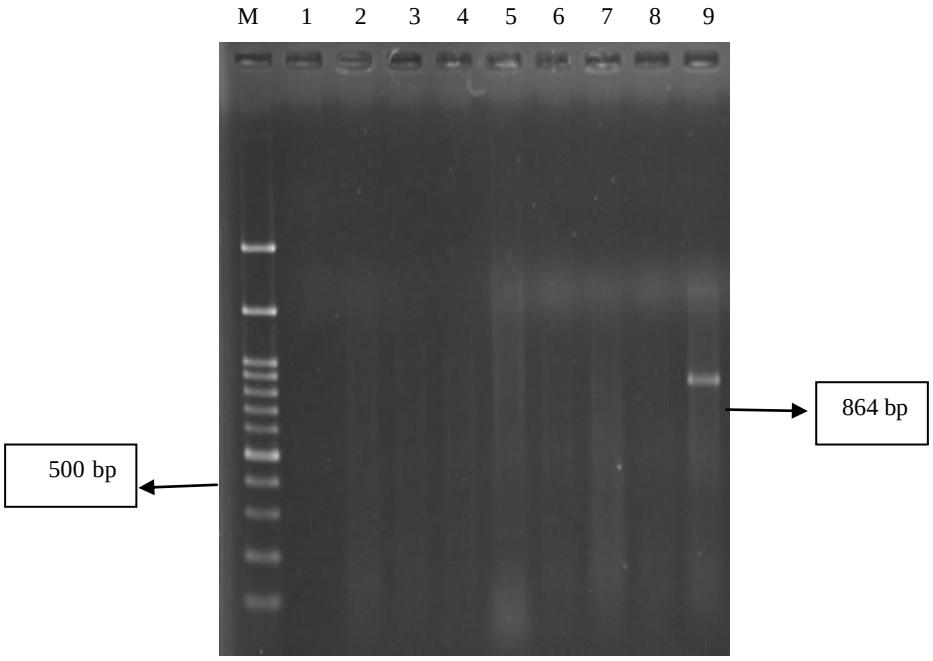
شکل شماره ۲: الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR ژن *bla CTX-M*:M مارکر 100bp، ستون ۱ کنترل مثبت، ستون‌های ۲، ۳ و ٤ نمونه‌های مثبت و ستون ۵ کنترل منفی.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:11 IRDT on Monday June 13th 2016

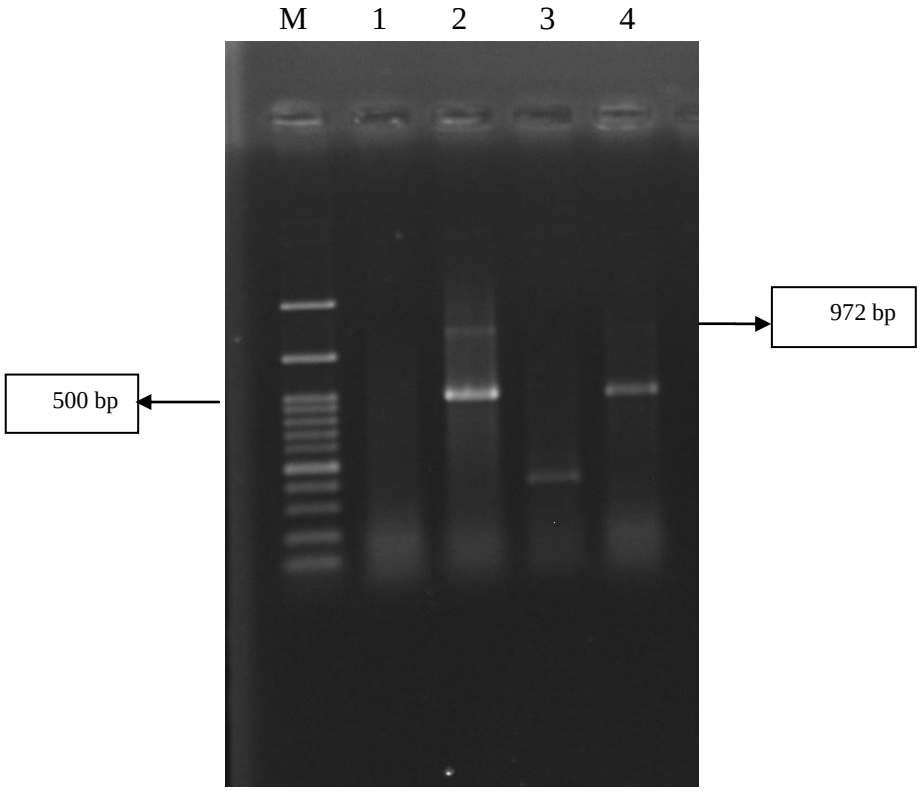
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:11 IRDT on Monday June 13th 2016



شکل شماره ۳: الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR ژن *bla SHV*: M مارکر 100bp، ستون ۱ کنترل منفی، ستون‌های ۸-۲ نمونه‌های منفی و ستون ۸ نمونه مثبت.



شکل شماره ٤: الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR ژن *bla TEM*: M مارکر 100bp، ستون ۱ کنترل منفی، ستون‌های ۲، ۳ و ٤ به ترتیب نمونه مثبت، نمونه منفی و کنترل مثبت.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:11 IRDT on Monday June 13th 2016

بحث

امروزه، افزایش مقاومت نسبت به کارباپنم‌ها (ایمی‌پنم، مروپنم، ارتاپنم و دوری‌پنم) و سفالوسپورین‌ها در بین باکتری‌ها، به‌خصوص گرم منفی، رو به افزایش است (۱۸). *اشرشیاکلی*، شایع‌ترین عامل سپتی‌سمی‌در اغلب بیمارستان‌ها بوده و علاوه بر آن، عامل درصد قابل‌توجهی از موارد پنومونی بیمارستانی می‌باشد. همچنین این ارگانیسم از علل مهم منتژیت در نوزادن، عفونت‌های ادراری، اسهال و سندرم اورمی‌همولیتیک به شمار می‌رود. در این میان، سویه‌های *اشرشیاکلی* تولیدکننده بتالاکتاماز با طیف وسیع (ESBL)، به‌عنوان عامل مهمی در عفونت‌های بیمارستانی مطرح است (۱۳،۹). به دلیل مقاومت بالای باکتری‌های مولد این آنزیم‌ها و ایجاد عفونت‌های شدید از قبیل سپتی‌سمی و پنومونی، خطر مرگ و میر ناشی از حضور این سویه‌ها نسبت به سایر باکتری‌های مقاوم به ایمی‌پنم در عفونت‌ها بیشتر است. شناسایی و تشخیص به‌موقع متالوبتالاکتامازها و بتالاکتامازها با طیف وسیع در باکتری‌های مقاوم به کارباپنم و سفالوسپورین‌ها، هم از لحاظ اپیدمیولوژیک و هم به‌منظور کمک به پزشکان در انتخاب داروی مناسب برای درمان موفق بیماران و نیز کنترل سویه‌های مقاوم به داروها و جلوگیری از انتشار چنین عفونت‌هایی در بیمارستان، ضروری به‌نظر می‌رسد.

بیشتر ESBLs در باکتری‌های گرم منفی از *TEM-1*، *TEM-2* و *SHV-2* منشأ گرفته و باعث مقاومت به آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، و دیگر پنی‌سیلین‌ها، همچنین به سفالوسپورین‌های نسل اول و نه نسل‌های آخر می‌شود. وقتی موتاسیون در ژن‌های کدکننده *TEM-1*، *TEM-2* و *SHV-2* اتفاق می‌افتد؛ بتالاکتامازهای جدیدی تولید می‌شود که قادرند سفالوسپورین‌های نسل سوم و آزترونام را هیدرولیز کنند. ESBLs تیپ *TEM* و *SHV* به‌طور تیپیک علیه سفامایسین‌ها (مانند سفوتتان، سفوکسیتین و سفمتازول) یا کارباپنم‌ها (مثل ایمی‌پنم، ارتاپنم و مروپنم) مؤثر نبوده و به‌طور عمده می‌توانند به‌وسیله مهارکننده‌های بتالاکتاماز (مانند کلاوولانات، سولباکتام و یا تازوباکتام) مهار شوند. در میان *انتروباکتریاسه آ* ممکن است ESBLs وجود داشته باشند که با تیپ‌های *TEM* و *SHV* مرتبط نباشند. این ESBLs شامل تیپ‌های *OXA* و *CTX-M* هستند.

CTX-M عمدتاً سفوتاکسیم را مؤثرتر از سفتازیدیم هیدرولیز می‌کند. برخلاف بیشتر ESBLs که در *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* و دیگر انتروباکتریاسه آ دیده می‌شود، ESBLs تیپ OXA عمدتاً در *سودوموناس آئروژینوزا* و به‌ندرت در *انتروباکتریاسه آ* یافت می‌شود (۱۱).

در مطالعه حاضر درصد باکتری‌های مقاوم به سفوتاکسیم، ۳۱ مورد (۱۹٪) بود که از این میان، شیوع *CTX-M* در ایزوله‌ها، ۹۰٪ تعیین گردید. در مطالعه حاضر شیوع بالای این ژن نسبت به سایر ژن‌های MBL، با دیگر مطالعات همخوانی داشت.

در تحقیق مؤیدنیا و همکاران، اگرچه شیوع MBL در سویه‌های بیمارستانی بسیار پایین بود، ولی شیوع ESBL در *اشرشیاکلی* جداشده از بیماران بستری، ۳۰۰ مورد (۴۱/۷٪) و در نمونه‌های خارج از بیمارستان، ۲۵٪ گزارش گردید (۲۰).

خوشوقت و همکاران نیز (سال ۲۰۱۴) در مطالعه خود با بررسی ESBL و MBL در باکتری‌های *E.coli* Entero agg، شیوع *blaCTX-M* را ۶۳/۱٪ (۱۲/۱۹) گزارش کردند (۱۴). همچنین در مطالعه گودرزی و همکاران (سال ۲۰۱۴) که با هدف بررسی فراوانی ژن *blaCTX-M* در ۱۳۵ ایزوله‌های *اشرشیاکلی* جداشده از عفونت‌های ادراری در تهران انجام شد، ۷۵ سویه (۵۵/۵٪)، ESBL مثبت و از این میان، ۷۰ ایزوله (۹۳/۳٪) حامل ژن *blaCTX-M* بود(۲۱). در مطالعه حاضر شیوع TEM و SHV، فراوانی کمتری نسبت به CTX داشت که به ترتیب در ۱۳ (۴۲٪) و ۱ (۳٪) سویه مقاوم به سفوتاکسیم تعیین شدند. این نتیجه نیز با مطالعه Sana (سال ۲۰۱۱) همخوانی داشت. در این تحقیق که توسط Sana بر روی ۷۳ سویه *اشرشیاکلی* تولیدکننده ESBL در شمال لبنان انجام شد، ژن‌های *CTX-M* در ۷۲ سویه، ژن *OXA* در ۳۳ سویه، ژن *TEM* در ۱۶ سویه و ژن *SHV* در ۳ سویه تعیین گردید (۲۲). در تحقیق ریاحی و همکاران نیز با بررسی شیوع ژن‌های *TEM* و *SHV* در بین سویه‌های *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده مشخص گردید حدود ۴۳/۹٪ از سویه‌های *اشرشیاکلی*، تولیدکننده ESBL می‌باشند و فراوانی *TEM* و *SHV* در میان آنها به ترتیب ۲۰/۶٪ و ۱۴/۴٪ تعیین شد (۲۳). همچنین در تحقیق Martinez وهمکاران که ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* (۲۱ مورد) و *اشرشیاکلی* (۱۰۲ مورد) تولیدکننده CTX-M را

www.SID.ir

Archive of SID

از عفونت‌های ادراری در کلمبیا بررسی کردند، تولید ESBL در ۱۲ (۱۱/۷٪) سویه *اشرشیاکلی* تعیین شد که از این میان، ساب گروه فنوتیپی CTX-M-1 در ۷ سویه مشخص گردید (۲۴). در تحقیق Haque و همکاران (سال ۲۰۱۲) نیز در هند بر روی شیوع *اشرشیاکلی* تولیدکننده ESBL مشخص گردید فقط ۳ ایزوله، *bla-CTX-15* و ۲ سویه، آنزیم *bla-TEM-1* را تولید می‌کنند (۷). در مطالعه حاضر نیز همه سویه‌های مثبت *TEM*، دارای *CTX-M* بودند. به‌علاوه، تنها یک سویه حامل هر سه ژن *bla TEM/SHV/CTX-M* بود.

نتیجه‌گیری

در مجموع، از مطالعه بالا می‌توان نتیجه گرفت شیوع باکتری‌های مقاوم تولیدکننده ESBL، بالا می‌باشد که این امر می‌تواند زنگ خطری بر تجویز بی‌مورد پزشکان و عدم استفاده مناسب بیمار از سفالوسپورین‌ها باشد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد با اطلاع‌رسانی بیشتر و آگاهی عموم، می‌توان از پیشروی مقاومت و گسترش سویه‌های تولیدکننده ESBL جلوگیری کرد. در پایان، پیشنهاد می‌شود سایر ژن‌های دخیل در مقاومت به سفالوسپورین‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد.

References:

1. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDugal LK, Chaitrams J, McAllister S, et al. Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolate from a patient in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(1):275-80.
2. Jacoby GA, Munoz-Price LS. Mechanisms of disease:The new β-lactamases. N Engl J Med 2005;352:380-91.
3. Lye DC, Kwa AL, Chlebicki P. World health day 2011: Antimicrobial resistance and practical solutions. Ann Acad Med Singapore 2011;40(4):156-2.
4. Diene SM, Bruder N, Raoult D, Rolain JM. Real-time pcr assay allows detection of the new delhi metallo-β-lactamase (ndm-1)-encoding gene in france. Int J Antimicrob Agents 2011;37(6):544-6.
5. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta- lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(3):969-76.
6. Taherpour A, Hashemi A. Detection of OqxAB efflux pumps, OmpK35 and OmpK36 porins in extended-spectrum-β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates from Iran. Hippokratia 2013;17(4):355-8.
7. Haque SF, Ali SZ, TP M, Khan AU. Prevalence of plasmid mediated blaTEM-1 and blaCTX-M-15 type extended spectrum beta-lactamases in patients with sepsis. Asian Pac J Trop Med 2012;5(2):98-102.
8. Ruiz de Alegría C, Rodríguez-Baño J, Cano ME, Hernández-Bello JR, Calvo J, Román E, et al. Klebsiella pneumoniae strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: Microbiological and clinical features. J Clin Microbiol 2011;49(3):1134-6.
9. Fallah F, Taherpour A, Vala MH, Hashemi A. Global Spread of New Delhi mettallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). Arch Clin Infect Dis 2012;6(4):171-7.
10. Virgincar N, Iyea S, Stacey A, Maharjan S, Pike R, Perry C, et al. Klebsiella pneumoniae producing KPC carbapenemase in a district general hospital in the UK. J Hosp Infect 2011;78(4):293-6.
11. Paterson DL. Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. Am J Med 2006;119:S20–S8.
12. Vidal JE, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic Escherichia coli. Salud Publica Mex 2007;49(5):376-86.
13. Brusselaers N, Vogelaers D, Blot S. The rising problem of antimicrobial resistance in the intensive care unit. Ann Intensive Care 2011;1-7.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:11 IRDT on Monday June 13th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

14. Khoshvaght H, Haghi F, Zeighami H. Extended spectrum betalactamase producing enteroaggregative Escherichia coli from young children in Iran. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2014;7(2):131-6.

15. Mansouri S, Kalantar Neyestanaki D, Shokoohi M, Halimi S, Beigverdi R, et al. Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs Types of β-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli producing extended spectrum β-lactamases in Kerman, Iran. Jundishapur J Microbiol 2014;7(2):e8756.

16. Hashemi A, Fallah F, Erfanimanesh S, Hamedani P, Alimehr S, Goudarzi H. Detection of β-Lactamases and Outer membrane porins among Klebsiella pneumoniae strains isolated in Iran. Scientifica (Cairo) 2014;2014:726179.

17. Goudarzi H, Aghamohamma S, Hashemi A, Nikmanesh B, Noori M. Distribution of blaTEM, blaSHV and blaCTX-M Genes among Escherichia coli isolates causing urinary tract infection in children. Arch Clin Infect Dis 2013;8:e16207.

18. Altoparlak U, Aktas F, Celebi D, Ozkurt Z, Akcay MN. Prevalence of metallo-β- lactamase among Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii isolated from burn wounds and invitro activites of antibiotic combinations against these isolates. Burns 2005;31(6):707-10.

19. Scoulica EV, Neonakis IK, Gikas AI, Tselentis YJ. Spread of blaVIM-1-producing E. coli in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the blaVIM-1 metallo-_-lactamase gene. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;48(3):167–72.

20. Moayednia R, Shokri D, Mobasherizadeh S, Baradaran A, Fatemi SM, Merikhi A. Frequency assessment of β-lactamase enzymes in Escherichia coliand Klebsiella isolates in patients with urinary tract infection. J Res Med Sci 2014;19:S41–S45.

21. Goudarzi M, Sabzehali F, Tayebi Z, Azad M, Boromandi S, Hashemi A, et al. Prevalence of bla CTX-M Gene in Multi-Resistant Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infections, Tehran, Iran. Novelty Biomedi 2014:2(4):107-13.

22. Sana T, Rami K, Racha B, Fouad D, Marcel A, Hassan M, et al. Detection of genes TEM, OXA, SHV and CTX-M in 73 clinical isolates of Escherichia coli producers of extended spectrum Beta-lactamases and determination of their susceptibility to antibiotics. Med Pub J 2011;1(1):1-5.

23. Riyahi Zaniani F, Meshkat Z, Naderi Nasab M, Khaje-Karamadini M, Ghazvini K, Rezaee A, et al. The prevalence of TEM and SHV genes among extended-spectrum Beta-lactamases Producing Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae. Iran J Basic Med Sci 2012;15(1):654-60.

24. Martinez P, Garzon D, Mattar S. CTX-M-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumonia isolated from community-acquired urinary tract infections in Valledupar, Colombia. Brazl J Infect Dis 2012;16(5):420–5.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:11 IRDT on Monday June 13th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Determination of Extended-spectrum Beta-lactamase Genes (bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M}) in Escherichia coli Strains Isolated from Clinical Specimenes in Ali-Ibne Abi Talib Hospital in Qom, Iran

Saeed Shams[1*], Ali Hashemi[2], Somayeh Kermani[1], Mohammad Esmkhani[3], Samira Tarashi[4]

[1]Cellular & Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

[2]Department of Microbiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[3]Ali-Ibne Abitaleb Hospital, Qom, Iran.

[4]Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

***Corresponding Author:** **Saeed Shams,** Cellular & Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

Email: sshamsmed@gmail.com

Received: 20 Apr, 2015

Accepted: 31 Aug, 2015

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:11 IRDT on Monday June 13th 2016

Abstract

Background and Objectives: *Escherichia coli* (*E.coli*) is an opportunistic Gram-negative bacterium, which causes common nosocomial infections, including pneumonia, septicemia, meningitis, diarrhea, bacteremia, etc. Antibiotic resistance is a serious problem for human health, so that the World Health Organization in called the year 2011 as the year of antibiotic resistance. One of the reasons of these resistances is production of broad-spectrum β-lactamases (ESBLs), which are able to hydrolyze broad-spectrum β-lactam antibiotics. This study was performed aiming at determining the prevalence of cefotaxime-resistant strains and evaluating the ESBL genes (*bla TEM*, *bla SHV* and *blaCTX-M*) in *E. coli* isolates.

Methods: In this cross-sectional study during a 5-month period (April to September 2014), specimens sent to the laboratory of Ali-Ibne Abi Talib Hospital of Qom, such as blood, urine, wound, etc., were examined. After identification and isolation of *E.coli* strains, their antibiotic resistance and ESBL production were determined by disk diffusion method, MIC, and combination disk method according to CLSI guidline. Then, detection of bla_{CTX-M}, $_{SHV}$, and $_{TEM}$ genes was performed using PCR.

Results: Of 160 isolated *E. coli* and based on the results of disk diffusion and MIC, 31 (19%) isolates were resistant to cefotaxime. Also, based on the phenotypic results, 24 (77%) cefotaxime-resistant ESBL-producing strains, were idetified. The bla_{CTX-M}, bla_{TEM}, and bla_{SHV} genes were determined in 90%, 42%, and 3% of the strains, respectively.

Conclusion: The results revealed that prevalence of ESBL-producing *E .coli* is high. Therefore, there is a need to manage the use of antibiotics and identify the source and distribution of β-lactamase-producing isolates.

Keywords: *Escherichia coli*; Beta-Lactamases; Beta-Lactamases-Genetics; Drug Resistance, Microbial.

www.SID.ir