

بررسی ژنهای بتالاکتاماز طیف گسترده blaCTX-M، bla SHV، bla TEM در سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت‌های ادراری و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها

قاسم میراعلمی (MSc)^{1*}، مهدی پرویز (PhD)¹، سعید خلج‌زاده (PhD)¹

1- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی

دریافت: 93/12/11، اصلاح: 94/2/16، پذیرش: 94/4/13

خلاصه

سابقه و هدف: آنزیم‌های بتالاکتامازهای طیف گسترده، هیدرولیز کننده پنی‌سلین‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌باشند. هدف از این بررسی تعیین فراوانی سویه‌های اشریشیاکلی تولیدکننده ژنهای بتالاکتامازهای SHV، TEM، CTX-M با روش Multiplex PCR و ارتباط آنها با ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های اشریشیاکلی است. **مواد و روشها:** در این مطالعه مقطعی، تعداد 55 سویه اشریشیاکلی با استفاده از محیط کشت EMB آگار و کروم آگار E. coli از نمونه‌های ادراری جداسازی و بعد از تایید توسط آزمونهای بیوشیمیایی، آزمون تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن (DiskDiffusion) و با آنتی‌بیوتیک‌هایی انتخابی مطابق با دستورالعمل CLSI، انجام شد. حضور ژنهای blaSHV، blaTEM، blaCTX-M با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط PCR چندانگانه‌ای انجام گردید. **یافته‌ها:** بیشترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و اریترومايسين به ترتیب با 96% و 94/5% فراوانی و بیشترین میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و ایمی‌پنم با 67/2% فراوانی گزارش شد. از 55 نمونه مورد آزمایش 26 نمونه 47/27% واجد ژن TEM بوده و در 41 نمونه 74/54% ژن CTX-M شناسایی شد همچنین در 32/72% از نمونه‌ها هر دو ژن TEM و CTX-M به طور همزمان شناسایی و در 6 نمونه 10/9% هیچ یک از ژنهای مذکور شناسایی نگردید. همچنین ژن SHV در هیچ یک از نمونه‌ها شناسایی نشد. **نتیجه گیری:** نتایج آزمایشات نشان می‌دهد که تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در 70% از سویه‌های مورد مطالعه مشاهده شد که جهت جلوگیری از شیوع سویه‌های اشریشیاکلی تولیدکننده ESBL باید مراقبت‌های دقیق پزشکی و استفاده صحیح و به موقع از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب صورت پذیرد. **واژه‌های کلیدی:** اشریشیاکلی، بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، دیسک دیفیوژن، PCR چندانگانه‌ای.

مقدمه

بتالاکتامی باعث تبدیل آنها به مشتقات بدون فعالیت ضد باکتریایی می‌شوند (7). ژنهای مسئول بتالاکتامازها متنوع می‌باشند و می‌توانند به صورت اولیه بر روی کروموزوم قرار داشته باشند و یا در سطح پلاسمید قرار گیرند. عمده مقاومت باکتری‌های گرم منفی به واسطه آنزیم‌های بتالاکتامازی می‌باشد و دارای گروههای متنوعی از این آنزیم‌ها می‌باشند که به صورت کروموزومی و پلاسمیدی می‌باشند. در باکتری‌های گرم منفی تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی به طور وسیع از انتروباکتریاسه، هموفیلوس آنفلوانزا، موراکسلا، نایسریا گنوره‌آ، ویبریوکلا و سودوموناس آئروژینوزا گزارش شده است (8). آنزیم‌های TEM و SHV که پلاسمیدی بوده و انتشار گسترده‌ای دارند در این گروه قرار می‌گیرند (7). شرط لازم برای موثر بودن یک مهار کننده بتالاکتاماز آن است که این ماده دارای حلقه بتالاکتامی باشد تا بتواند در اثر حمله آنزیمی بتالاکتامازها یک ترکیب حد واسطه آسیل - آنزیم ایجاد کرده و با روندی آرام هیدرولیز گردد (8). در میان آنزیم‌های CTX-M در مقایسه با بقیه اعضاء بر طیف وسیع‌تری از بتالاکتام‌ها موثر

اشریشیاکلی شایعترین عامل عفونت‌های ادراری است (1). به طور معمول سویه‌های اشریشیاکلی در چهار گروه فیلوژنتیکی A، B1، B2 و D تقسیم‌بندی می‌شوند (2). اشریشیاکلی اوروپاتوژن (UPEC) بیشتر در گروه B2 تقسیم بندی شده و با جنسیت ارتباط دارند (1). اکثر عفونت‌های کسب شده از جامعه در افراد مونث کمتر از 10 سال یا در زنان بین سنین 20 تا 40 سال رخ می‌دهد (3،4). بتالاکتام‌ها دسته‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها بوده که به دلیل ساختمان مرکزی مشترک در یک دسته قرار می‌گیرند (5). آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی به واسطه جلوگیری و ممانعت از کامل شدن پپتید و گلیکان به واسطه مهار روند تشکیل پل‌های عرضی عمل می‌کنند، که این عمل باعث اختلال در بیوسنتز دیواره سلولی و اعمال سلول و در نتیجه تغییر شکل و لیز شدن سلول می‌شود (6). میکروارگانیزم‌ها، آنزیم‌هایی تولید می‌کنند که داروی فعال را تخریب می‌کند مانند بتالاکتامازهای تولید شده توسط باکتریهای گرم منفی (6). بتالاکتامازها از خانواده آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌باشند که با هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های

این مقاله حاصل پایان نامه قاسم میراعلمی دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه می‌باشد.

* مسئول مقاله: قاسم میراعلمی

می‌باشد. اولین آندمی‌های CTX-M در آمریکای لاتین و اروپای شرقی گزارش شد اما پس از سال 2000 گزارش فراوانی از گسترش این ژن به کشورهای اروپای غربی همچون یونان، فرانسه، انگلستان و اسپانیا و حتی از مغولستان گزارش شد (9). سویه‌ای از E.coli را که مقاوم به سفوتاکسیم بوده و خصوصیات TEM و یا SHV مشاهده نشد را تحت عنوان CTX-M-1 نامگذاری کرده که فعالیت هیدرولیتیک بر علیه سفوتاکسیم دارد (10). آنزیم TEM اولین ESBL شناسایی شده می‌باشد که به طور وسیعی در خانواده انتروباکتریاسه گسترش یافته و به عنوان رایج‌ترین بتالاکتاماز شناخته می‌شود که حتی به هموفیلوس آنفولانزا و نیسریا گنوره انتقال یافته است (4). بتالاکتامازهای SHV در بسیاری از این سویه‌ها ژن کدکننده این آنزیم بر روی کروموزوم قرار دارد اما باگذشت زمان این ژن وارد پلاسמיד شده و از این طریق به راحتی در میان سویه‌های باکتریایی منتشر شده است (11).

در سال‌های اخیر بروز پدیده مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه نگرانی‌های فراوانی را در جوامع پزشکی بدلیل شکست روند درمان پدید آورده است. لذا هدف این تحقیق بررسی تعیین فراوانی سویه‌های اشریشیاکلی تولیدکننده ژنهای بتالاکتامازهای CTX-M، SHV، TEM، وسیع‌الطیف با روش Multiplex PCR و ارتباط آنها با ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت‌های ادراری می‌باشد.

برنامه آزمون Multiplex-PCR: مرحله دناتوراسیون اولیه 95 درجه سانتیگراد به مدت 15 ثانیه، مرحله دناتوراسیون 94 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه، مرحله اتصال 61 درجه سانتیگراد به مدت 40 ثانیه، مرحله بسط 72 درجه سانتیگراد به مدت 2 دقیقه (تعداد 35 سیکل)، مرحله بسط نهایی 72 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه بوده است (14).

پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون در جدول 1 ذکر شده است. مخلوط‌های استفاده شده جهت انجام واکنش به این شرح می‌باشد: آب مقطر 12/35 میکرولیتر، PCR buffer 1X، به میزان 2 میکرولیتر، MgCl₂ به میزان 0/7 میکرولیتر، dNTP mix (5Mm) به میزان 0/5 میکرولیتر، پرایمرهای مورد استفاده هر کدام 0/6 میکرولیتر، آنزیم Taq polymerase به میزان 0/25 میکرولیتر، نمونه DNA 3 میکرولیتر در حجم نهایی 20 میکرولیتر تهیه و مورد استفاده قرار گرفت (14). آزمون Multiplex-PCR در دستگاه (BIORAD) انجام شد. جهت بررسی محصول نمونه‌ها بر روی ژل آگارز 2% انتقال داده شده و بعد از رنگ‌آمیزی در دستگاه ژل داگ (BIORAD) مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه 19 و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

در سال‌های اخیر بروز پدیده مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه نگرانی‌های فراوانی را در جوامع پزشکی بدلیل شکست روند درمان پدید آورده است. لذا هدف این تحقیق بررسی تعیین فراوانی سویه‌های اشریشیاکلی تولیدکننده ژنهای بتالاکتامازهای CTX-M، SHV، TEM، وسیع‌الطیف با روش Multiplex PCR و ارتباط آنها با ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت‌های ادراری می‌باشد.

در این مطالعه مقطعی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان 95%، تعداد 150 نمونه ادرار از آزمایشگاه‌های بالینی سطح شهر تهران جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل و روی محیط‌های بلاد آگار، مک‌کانکی آگار، EMB آگار و کروم آگار E.coli کشت داده شده و در 37 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت انکوباسیون گردیدند. بعد از شناسایی و تایید حضور باکتری E.coli، آزمون‌های بیوشیمیایی IMViC، TSI، Triple Sugar Iron Agar جهت تشخیص نهایی انجام شد و در نهایت تعداد 55 سویه باکتری اشریشیاکلی شناسایی و تایید گردید. بعد از تعیین هویت گونه‌های باکتری E.coli با آزمون‌های بیوشیمیایی، جهت انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش کربی بائر و بر طبق دستورالعمل CLSI

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان 95%، تعداد 150 نمونه ادرار از آزمایشگاه‌های بالینی سطح شهر تهران جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل و روی محیط‌های بلاد آگار، مک‌کانکی آگار، EMB آگار و کروم آگار E.coli کشت داده شده و در 37 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت انکوباسیون گردیدند. بعد از شناسایی و تایید حضور باکتری E.coli، آزمون‌های بیوشیمیایی IMViC، TSI، Triple Sugar Iron Agar جهت تشخیص نهایی انجام شد و در نهایت تعداد 55 سویه باکتری اشریشیاکلی شناسایی و تایید گردید. بعد از تعیین هویت گونه‌های باکتری E.coli با آزمون‌های بیوشیمیایی، جهت انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش کربی بائر و بر طبق دستورالعمل CLSI

جدول 1. پرایمرهای مورد استفاده جهت آزمون Multiplex-PCR

ژن هدف	طول محصول bp	توالی پرایمر (5' to 3')
bla-SHV.SE	747	ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG
bla-SHV.AS		TGC TTT GTT ATT CGG GCC AA
TEM-164.SE	445	TCG CCG CAT ACA CTA TTC TCA GAA TGA
TEM-165.AS		ACG CTC ACC GGC TCC AGA TTT AT
CTX-M-U1	593	ATG TGC AGC ACC AGT AAA GTG ATG GC
CTX-M-U2		TGG GTA AAG TAA GTG ACC AGA ATC AGC GG

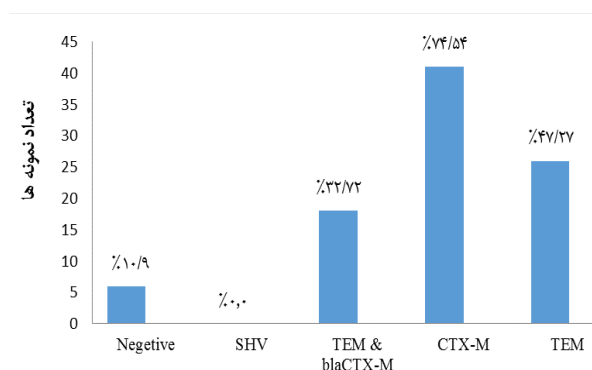
یافته ها

بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان مقاومت به آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و اریترومايسين به ترتیب با 96% و 94/5% فراوانی و بیشترین میزان حساسیت به آنتی بیوتیکهای سیپروفلوکساسین و ایمپنم با 67/2% فراوانی گزارش شده است (جدول 2). از 55 نمونه مورد آزمایش 26 نمونه واجد ژن TEM بوده و در 41 نمونه ژن CTX-M شناسایی شد. در 18 نمونه هر دو ژن TEM و CTX-M همزمان شناسایی شدند. در 6 نمونه هیچ یک از ژنهای مذکور شناسایی نگردید (نمودار 1).

جدول 2. میزان حساسیت سویه های جداسازی شده به آنتی

بیوتیکهای مختلف با روش دیسک دیفیوژن

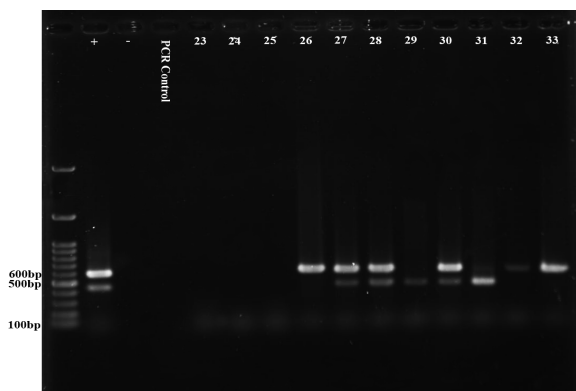
نوع آنتی بیوتیک	میزان حساسیت تعداد(درصد) Sensitive	حساسیت متوسط تعداد(درصد) Intermediate	میزان مقاومت تعداد(درصد) Resistance
سفوتاکسیم	7(12/8)	6(10/9)	42(76/3)
اریترومايسين	-	3(5/4)	52(94/6)
آمیکاسین	4(7/3)	47(85/4)	4(7/3)
تتراسایکلین	13(23/6)	4(7/3)	38(69/1)
کوتریموکسازول	9(16/3)	7(12/7)	39(71)
آمپی سیلین	-	7(12/8)	48(87/2)
سیپروفلوکساسین	37(67/2)	2(3/7)	16(29/1)
ایمپنم	37(67/2)	4(7/3)	14(25/5)
پنی سیلین	-	2(3/7)	53(96/3)
جنتامایسین	0	25(45/4)	30(54/6)



نمودار 1. توزیع فراوانی ژنهای مورد مطالعه برحسب تعداد و درصد

همچنین تمامی نمونه ها فاقد ژن SHV بودند (شکل 1). نتایج ضریب همبستگی بین ژن CTX-M و آنتی بیوتیکها نشان داد که ژن CTX-M دارای ارتباط معنی داری با آنتی بیوتیک ایمپنم در سطح 5% و آنتی بیوتیک سفوتاکسیم در سطح یک درصد داشت. با جود این ژن، مقاومت باکتری در برابر آنتی بیوتیک ایمپنم افزایش داشته است، که این افزایش مقاومت در برابر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم بیشتر می باشد. در حالی که ژن CTX-M رابطه معنی داری با سایر آنتی بیوتیکها نداشته و به عبارت دیگر وجود این ژن در نمونه های اندازه گیری شده باعث افزایش مقاومت باکتری ها در برابر این آنتی بیوتیکها نشده

است. نتایج ضریب همبستگی بین ژنهای شناسایی شده و آنتی بیوتیکها نشان داد که ژن TEM ارتباط معنی دار با آنتی بیوتیکها ندارد به عبارت دیگر وجود این ژن در نمونه های مورد آزمایش باعث افزایش مقاومت باکتری ها در برابر این آنتی بیوتیکها نشده است. با توجه به اینکه ژن SHV در هیچ نمونه ای یافت نشد بنابراین رابطه منطقی و معنی داری بین آن و آنتی بیوتیکها مشاهده نگردید.



شکل 1. نتایج Multiplex PCR به ترتیب از چپ به راست: مارکر 50 bp، کنترل مثبت، نمونه های شماره 27، 28، 29، 30 و 31 واجد ژن TEM: 445 bp، نمونه های شماره 26، 27، 28، 30 و 33 واجد ژن CTX-M: 593bp

بحث و نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق مقاومت به پنی سیلین، سفوتاکسیم، جنتامایسین، اریترومايسين، تتراسایکلین، کوتریموکسازول و آمپی سیلین بالای 50% است. درواقع در تمام دنیا هنوز E.coli میکروارگانیسم غالب در عفونت های ادراری است که 90-80% موارد عفونت های ادراری را ایجاد می کند (3). Rafati و همکاران 20% عفونت نوزادان را ناشی از باکتری اشریشیاکلی گزارش نمودند (15). Dias Neto و همکاران در مطالعه ای بر روی 188 نمونه ادرار در برزیل، اشریشیاکلی را از 26% موارد جدا و بیشترین میزان مقاومت را نسبت به آمپی سیلین (27%) گزارش نمودند (16). Tamberkar و همکاران بیشترین میزان مقاومت را نسبت به آمپی سیلین (87%) و کوتریموکسازول (91%) و کمترین مقاومت را نسبت به نیتروفرانتوئین (29%) گزارش کردند (17). در مطالعه Tankhiwale و همکاران بر روی اشریشیاکلی، بیشترین مقاومت نسبت به کوتریموکسازول (82%) و آمپی سیلین (79/9%) و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفرانتوئین (38%) و سفتی زوکسیم (41/3%) گزارش شد (18). در تحقیقات Zamanzad و همکاران، بالاترین مقاومت ها نسبت به آمپی سیلین و کوتریموکسازول مشاهده گردید (19). در مطالعات گوناگون در نواحی مختلف اروپا و آمریکای شمالی در دهه 90، نشان داده شد که مقاومت به آمپی سیلین غالباً به بالاتر از 30% رسیده است (20). Tadesse و همکاران بیان کردند که یک روند رو به افزایش در مقاومت آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، سولفونامید، تتراسایکلین و جنتامایسین مشاهده شد. مقاومت چند دارویی نسبت به E.coli افزایش پیدا کرده به طوری که از دهه 1950 تا 2000 از 7/2% به 63/6% رسید و شایعترین فنوتیپ همکاری مقاومت در مورد تتراسایکلین و استرپتومايسين (29/7%) و تتراسایکلین و سولفونامید (29%) مشاهده شد (21). Bouzari و همکاران بیشترین درصد مقاومت به آمپی سیلین، و بیشترین حساسیت را در بین سویه ها،

به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدکسیک اسید، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین گزارش نمودند (22). در مطالعه مشابهی که توسط Mirsalehian و همکاران بیشترین درصد مقاومت مربوط به آمپی‌سیلین با 98/05% و کمترین درصد مقاومت مربوط به ای‌می‌پنم با 2/91% بود (23). در تحقیق حاضر نیز میزان مقاومت چند دارویی به 5 دارو و بیشتر حدود 60% گزارش شده است. در تحقیقی که در تایوان در سال 2005 انجام شد مقاومت سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی به روش MIC نسبت سیپروفلوکساسین 37/3% به دست آمد و در ترکیه 33% گزارش شده است (24 و 25). Kiffer و همکاران، فراوانی سویه‌های مقاوم اشریشیاکلی جدا شده از بخش‌های مختلف بیمارستانها نسبت به سفوتاکسیم را 14/6% گزارش کردند (26). در کشور چین این مقاومت 2/7% گزارش شده است (27). از دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه آمیکاسین می‌باشد که 7/3% از سویه‌های اشریشیاکلی نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاومت داشتند. مقاومت به ای‌می‌پنم در این مطالعه 25/5% بدست آمد در حالی که مقاومتی نسبت به این آنتی‌بیوتیک در اکثر کشورها گزارش نشده است. در ترکیه 8% از سویه‌های اشریشیاکلی ایزوله شده از بخش‌های ICU نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاومت داشتند (25). اختلاف مشاهده شده در این نتایج با سایر کشورها مربوط به الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک، منطقه جغرافیایی، تفاوت در الگوی مقاومت در مناطق مختلف و مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک در کشور ما می‌باشد. در این مطالعه 89% از سویه‌های اشریشیاکلی از گروه باکتری‌های تولید کننده ESBL شناسایی شدند. در مطالعه Ling و همکاران در چین فراوانی تولید ESBL در اشریشیاکلی 16% گزارش شده است (27). در مطالعه Duttaray و همکاران در هند که بر روی 187 سویه اشریشیاکلی و کلبسیلا صورت گرفت 53 ایزوله (29/1%) تولید کننده ESBL بودند (28). در مطالعه‌ای که در فرانسه بر روی 3062 ایزوله انتروباکتریاسه صورت گرفت، 16/2% از اشریشیاکلی‌ها تولید کننده ESBL بودند (29). در مطالعه گسترده‌ای که بین سال‌های 1998-2002 در کشورهای مختلف صورت گرفت درصد مقاومت سویه‌های اشریشیاکلی تولید کننده بتالاكتاماز به هفت آنتی‌بیوتیک به دست آمد که نتایج حاکی از مقاومت بالای این باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌باشد (30). این باکتری‌ها مانند سایر عفونت‌های بیمارستانی از طریق دست‌های آلوده پرسنل بیمارستان و تجهیزات آلوده پزشکی از جمله کاتترهای ادراری، عروقی و شریانی نیز انتقال می‌یابند. آنزیم‌های CTX-M، SHV، TEM، شیوع متفاوتی در اعضاء مختلف انتروباکتریاسه دارند به طوری که در مطالعه حاضر شیوع آنزیم‌های ESBL در اشریشیاکلی برای CTX-M 74/5%، SHV صفر درصد، TEM 47/2% می‌باشد، در مطالعه Mirsalehian بر روی نمونه‌های جدا شده از بیماران بستری در ICU 60% از اشریشیاکلی‌های جدا شده تولید کننده آنزیم ESBL بودند (23).

در تحقیق Melzer و همکاران 60/8% باکتری‌های منجر به مرگ، ناشی از اشریشیاکلی‌های تولید کننده ESBL بوده است (31). در مطالعه Tasil و همکاران در ترکیه تولید آنزیم بتالاكتاماز وسیع‌الطیف در سویه‌های اشریشیاکلی معادل 17% و در مطالعه Villagas در کلمبیا 3/3-4/7% گزارش شده است (32 و 33). از طرفی مطالعه Zhou در شانگهای نشان داده است 47/4% اشریشیاکلی‌های جدا شده از بیماران، تولید کننده آنزیم فوق بوده‌اند (34). مقایسه نتایج تحقیق ما با سایر مطالعات نشان می‌دهد که میزان ESBL در سویه‌های

ایزوله شده از کشورهای مختلف و همچنین در یک کشور از یک بیمارستان با بیمارستان دیگر متفاوت می‌باشد که این مساله بستگی به سیستم کنترل عفونت و نحوه درمان بیماران آن بیمارستان دارد. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق به طور کل 49 نمونه CTX-M مثبت در ایزوله‌ها شناسایی شد که شیوع کلی 74/5% ژن CTX-M را نشان می‌دهد، میزان شیوع این ژن در نمونه‌های مقاوم جدا شده مشابه با میزان شیوع در مطالعات در نقاط دیگر جهان بود به طوری که در کره جنوبی 44/1% از نمونه‌های مقاوم حامل ژن CTX-M بودند (35). در مطالعه Eisner و همکاران در سال 2006 در اتریش بر روی شیوع CTX-M 58% از اشریشیاکلی‌های تولید کننده CTX-M بودند (36). Monstein در تحقیقات خود میزان جداسازی ژنهای CTX-M، TEM، SHV را به ترتیب 3 نمونه، 2 نمونه و 1 نمونه گزارش نموده، همچنین فراوانی هر سه ژن در یک نمونه و دو ژن CTX-M، TEM در 13 نمونه شناسایی گردید (14). در مطالعه SoltanDallal و همکاران از میان 161 ایزوله اشریشیاکلی، 79/5% از ایزوله‌های اشریشیاکلی مولد ESBL بوده که این نتایج در مقایسه با نمونه‌های اشریشیاکلی مورد بررسی تحقیق حاضر کاملاً همخوانی داشته به طوری که نتایج این مطالعه 89% از سویه‌ها را مولد ESBL نشان داد (37). در مطالعه SoltanDallal ژن TEM بررسی و درصد مقاومت به این ژن 57/8% گزارش گردید. که در این مورد نیز با نتایج بدست آمده از تحقیق ما مشابه می‌باشد. در نتایج مطالعه ما درصد مقاومت به ژن TEM 47/2% بود (37). علت بیشتر این تشابهات می‌تواند به منابع و منشأ این باکتری مرتبط باشد چرا که در هر دو بررسی نمونه‌های جمع‌آوری شده از شهر تهران بود. در مطالعه Pak-Leung Ho در هنگ کنگ از بین 46 نمونه اشریشیاکلی 8 نمونه مولد ESBL شناخته شدند. همچنین از این تعداد باکتری‌های مقاوم 7 مورد دارای پلاسمید CTX-M بودند (38).

در مطالعه حاضر از هیچ یک از سویه‌ها ژن SHV جدا نشد. در مطالعه Shahcheraghi و همکاران جهت شناسایی ژن SHV در ایزوله‌های اشریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا شیوع این ژن به ترتیب 6% و 28% گزارش شد که با نتیجه تحقیق حاضر همخوانی دارد (11). حدود 47/2% از نمونه‌های مورد بررسی مطالعه حاضر حاوی ژن TEM بودند در حالی که شیوع ژن TEM در یک مطالعه‌ای که در ترکیه و بر روی نمونه‌های باکتری‌های رودهای بدست آمده از بیمارستان انجام شد 52/7% بر آورد گردید در حالی که در تایوان نگران کننده بوده و به 81% در سویه‌های اشریشیاکلی کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر گزارش شده است (24). در مطالعه Shahcheraghi و همکاران بر روی سویه‌های اشریشیاکلی شیوع این ژن 24%، در مطالعه Zamanzad 48/7% و Mirsalehian 84/6% گزارش شد (23 و 19 و 11 و 1). لازم است برای جلوگیری از افزایش مقاومت و شکست در درمان، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی طبق استانداردهای CLSI بطور دقیق تعیین شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد بویژه آقای دکتر کیومرث امینی و همچنین از آقای دکتر علیرضا مختاری که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

Evaluation of Antibiotic Resistance in Extended-spectrum Beta-lactamase (ESBL) Genes in the E. coli Isolates of Urinary Infections

Gh. Miraalami (MSc)*¹, M. Parviz (PhD)¹, S. Khalajzadeh (PhD)¹

1.Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 17(8); Aug 2015; PP:19-26

Received: March 2th 2015, Revised: May 6th 2015, Accepted: July 4th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) enzymes hydrolyze cephalosporins and penicillins. This study aimed to determine the frequency of Escherichia coli strains producing SHV, TEM and CTX-M β -lactamase genes and their association by inducing antibiotic resistance.

METHODS: In this cross-sectional study, 55 E. coli strains were isolated from urinary samples and cultured on eosin methylene blue (EMB) agar and CHROMagar. After biochemical examinations, antibiotic susceptibility test was performed using the disk-diffusion method according to the guidelines of the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). In addition, the presence of blaCTX-M, blaTEM and blaSHV genes was evaluated using specific multiplex polymerase chain reaction (PCR) primers.

FINDINGS: In this study, the highest antibiotic resistance was observed against penicillin and erythromycin (96% and 94.5%, respectively), while the highest susceptibility was reported for ciprofloxacin and imipenem (67.2%). Out of 55 samples, 26(47.27%) had the TEM gene, and CTX-M gene was detected in 41 (74.54%) samples. Moreover, TEM and CTX-M genes were simultaneously detected in 32.72% of the samples, while in six samples (10.9%), neither of these genes were present. The SHV gene was not detected in any of the samples.

CONCLUSION: According to the results of this study, the production of ESBL was identified in 70% of the investigated E. coli isolates. Therefore, accurate and timely medical care, as well as the use of appropriate antibiotics, is required to prevent the outbreak of ESBL-producing E. coli strains.

KEY WORDS: *Escherichia coli*, *Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)*, *Disk-Diffusion*, *Multiplex PCR*.

Please cite this article as follows:

Miraalami Gh, Parviz M, Khalajzadeh. Evaluation of Antibiotic Resistance in Extended-spectrum Beta-lactamase (ESBL) Genes in the E. coli Isolates of Urinary Infections. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(8):19-26.

*Corresponding Author: Gh. Miraalami (MSc)

Address: No.81, Third Floor, Afra Surgery Center, Dollat Ave, Pasdaran Ave, Tehran, I.R.Iran.

Tel: +9821 22568893

Email: Ghmiraalamy@gmail.com

References

1. Toval F, Schiller R, Meisen I, Putze J, Kouzel IU, Zhang W, et al. Characterization of urinary tract infection-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2014;82(11):4631-42.
2. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(10):4555-8.
3. Arbeloa A, Oates CV, Marches O, Hartland EL, Frankel G. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* type III secretion effector EspV induces radical morphological changes in eukaryotic cells. *Infect Immun*. 2011;79(3):1067-76.
4. Baraniak A, Fiett J, Sulikowska A, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(1):151-9.
5. Kong KF, Schnepel L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*. 2010;118(1):1-36.
6. Lausova A, Bujdakova H, Kettner M. Beta-Lactam antibiotics mechanisms of action and resistance in Enterobacteriaceae. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 1997;46(2):73-80.
7. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med*. 2005;352(4):380-91.
8. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):161-82.
9. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(2):165-74.
10. Bonnedahl J, Drobni M, Gauthier-Clerc M, Hernandez J, Granholm S, Kayser Y, et al. Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. *PLoS One*. 2009;4(6):e5958.
11. Shahcheraghi F, Nikbin V, Shorj F. PCR detection of PER & VEB & SHV and TEM β -lactamases in multidrug resistant *P. aeruginosa* isolated from wound infections in two hospitals of Tehran. *Iran J Med Microbiol*. 2008;1(4):21-7. [In Persian]
12. Wikler MA. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006.
13. Wayne P. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. 2012. Available at: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E.pdf>
14. Monstein H, Osthalm-Balkhed A, Nilsson MV, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS*. 2007;115(12):1400-8.
15. Rafati MR, Farhadi R, Nemati-Hevelai E, Chabra A. Determination of frequency and antibiotic resistance of common bacteria in late onset sepsis at the neonatal ward in boali-sina hospital of Sari, Iran. *J Babol Univ Med Sci*. 2014;16(6):64-71. [In Persian]
16. Alireza Mobasher Kare Jeddi, Mohammadreza Nahaei *, Hayedeh Mobayyen, Majid Pornour, Javid Sadeghi. Molecular study of extended-spectrum beta-lactamase (SHV type) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Medical Centers of Tabriz. *Iran J Med Microbiol*. 2009;2(3-4):9-17. [In Persian]
17. Dias Neto JA, da Silva LDM, Martins ACP, Tiraboschi RB, Domingos ALA, Suaid HJ, et al. Prevalence and bacterial susceptibility of hospital acquired urinary tract infection. *Acta Cir Bras*. 2003;18(Suppl 5):36-8.
18. Tambekar DH, Dhanorkar DV, Gulhane SR, Khandelwal VK, Dudhane MN. Antibacterial susceptibility of some urinary tract pathogens to commonly used antibiotics. *Afr J Biotechnol*. 2006;5(17):1562-5.
19. Tankhiwale SS, Jalgaonkar SV, Ahamad S, Hassani U. Evaluation of extended spectrum betalactamase in urinary isolates. *Indian J Med Res*. 2004;120(6):553-6.

20. Zamanzad B, Daiham B, Nafisi MR, Karimi A. The Prevalence of TEM-1 gene in ESBLs producing strains of E.coli, Klebsiella and Enterobacter isolated from teaching hospital samples using PCR. J Hamedan Univ Med Sci. 2008;14(4):19-25. [In Persian]
21. Caselli E, Powers RA, Blaszczak LC, Wu CY, Prati F, Shoichet BK. Energetic, structural, and antimicrobial analyses of Betalactam side chain recognition by lactamases. Chem Biol. 2001;8(1):17-31.
22. Tadesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ, et al. Antimicrobial drug resistance in Escherichia coli from humans and food animals, United States, 1950-2002. Emerg Infect Dis. 2012;18(5):741-9.
23. Bouzari S, Jafari A, Azizi A, Oloomi M, Nataro J. Short report: characterization of enteroaggregative Escherichia coli isolates from Iranian children. Am J Trop Med Hyg. 2001;65(1):13-4.
24. Mirsalehian A, Nakhjavani F, Peymani A, JabalAmeli F, Mirafshar M, Hamidian M. Frequency of extended spectrum β -Lactamase producing Enterobacteriaceae in intensive care units. Tehran Univ Med J. 2008;65(1):33-8. [In Persian]
25. Ma L, Chang FY, Fung CP, Chen TL, Lin JC, Lu PL, et al. Variety of TEM, SHV, and CTX-M-type lactamases present in recent clinical isolates of Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Enterobacter cloacae from Taiwan. Microb Drug Resist. 2005;11(1):31-9.
26. Günseren F, Mamikoglu L, Ozturk S, Yucesoy M, Biberoglu K, Yulug N, et al. A surveillance study of antimicrobial resistance of gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. J Antimicrob Chemother. 1999;43(3):373-8.
27. Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakagami E, Turner P, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. Braz J Infect Dis. 2005;9(3):216-24.
28. Ling TK, Xiong J, Yu Y, Lee CC, Ye H, Hawkey PM. Multicenter antimicrobial susceptibility survey of gram-negative bacteria isolated from patients with community-acquired infections in the People's Republic of China. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(1):374-8.
29. Duttaroy B, Mehta S. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. Indian J Pathol Microbiol. 2005;48(1):45-8.
30. Lavigne JP, Bouziges N, Chanal C, Mahamat A, Michaux-Charachon S, Sotto A. Molecular epidemiology of Enterobacteriaceae isolates producing extended-spectrum lactamases in a French hospital. J Clin Microbiol. 2004;42(8):3805-8.
31. Hirakata Y, Matsuda J, Miyazaki Y, Kamihira S, Kawakami S, Miyazawa Y, et al. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). Diagn Microbiol Infect Dis. 2005;52(4):323-9.
32. 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.
33. Tasli H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based Enterobacteriaceae in Turkey. Jpn J Infect Dis. 2005;58(3):162-7.
34. Villegas MV, Correa A, Perez F, Miranda MC, Zuluaga T, Quinn JP, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum lactamases in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli isolates from Colombian hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;49(3):217-22.
35. Kim J, Lim YM, Jeong YS, Seol SY. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14, and CTX-M-9 extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae clinical isolates in Korea. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(4):1572-5.
36. Kim J, Lim YM. Prevalence of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of enterobacteriaceae in Korea. J Bacteriol Virology. 2004; 34(4):303-10. Available at:

[http://koreamed.org/SearchBasic.php?RID=0079JBV%2F2004.34.4.303&DT=1&QY=%22J+Bacteriol+Virol%22+\[JTI\]++AND+2004+\[DPY\]+AND+Dec+\[DPM\]+AND+4+\[ISSU\]](http://koreamed.org/SearchBasic.php?RID=0079JBV%2F2004.34.4.303&DT=1&QY=%22J+Bacteriol+Virol%22+[JTI]++AND+2004+[DPY]+AND+Dec+[DPM]+AND+4+[ISSU])

37. Eisner A, Fagan EJ, Feierl G, Kessler HH, Marth E, Livermore D, et al. Emergence of enterobacteriaceae isolates producing CTX-M extended-spectrum β -lactamase in austria. *Antimicrob Agents CH*.2006;50(2):785-7.

38. Soltan Dallal M, Molla Aghamirzaei H, Fallah Mehrabadi J, Rastegari Lari A, Sabbaghi A, Eshraghian M, et al. Molecular detection of TEM and AMPC (Dha, mox)broad spectrum b-lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Tehran Uni Med J*. 2010;68(6):315-20.[In Persian]

39. Ho PL, Wong R, Chow KH, Yip K, Wong SS, Que TL. CTX-M type beta-lactamases among fecal *Escherichia coli* and *Klebsiellapneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults. *J Microbiol Immunol Infect*. 2008;41(5):428-32.