فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز طیف گسترده در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از بیماران سرپایی مبتلا به عفونت ادراری در استان گیلان

نور امیرمظفری*[۲،۱]، زهرا بابائی کسمائی[۳]، محدثه محسن پور[۴]

۱- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

۲- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۳- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، رشت، ایران.

۴- مربی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

یافته / دوره نوزدهم / شماره ۵ / زمستان ۹۶ / مسلسل ۷۴

چکیده

دریافت مقاله: ۹۶/۸/۱۳ پذیرش مقاله: ۹۶/۱۰/۱۰

مقدمه: اشریشیاکلی رایج‌ترین عامل عفونت ادراری می‌باشد. مقاومت به سفالوسپورین‌ها به دلیل تولید بتالاکتامازهای طیف گسترده (ESBLs) اخیراً افزایش یافته است. هدف از انجام این مطالعه بررسی فراوانی ژن‌های CTX-M، SHV، TEM، OXA-1، PER-2 و VEB-1 در اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های ادراری بیماران سرپایی مبتلا به عفونت ادراری در گیلان بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۲۲۶۷ نمونه ادرار در طول شش ماه از آزمایشگاه‌های منتخب گیلان از بیماران سرپایی جمع‌آوری شد. ابتدا با تست‌های بیوشیمیایی و افتراقی مثل MRVP و دکربوکسیلاسیون لیزین در محیط LIA، هیدرولیز اوره و TSI، تولید اوره و سیمون‌سیترات، ایزوله‌های اشریشیاکلی شناسایی شدند. جهت تعیین مقاومت‌دارویی از انتشار دیسک و برای تولید ESBL، از دیسک دوتایی با استفاده از دیسک سفتریاکسون، آموکسی‌کلاو و سفتازیدیم-کلاولونات استفاده شد. بررسی ژن‌های مورد مطالعه در ایزوله‌ها با PCR و پرایمرهای اختصاصی هر ژن انجام گرفت.

یافته‌ها: از ۲۲۶۷ نمونه، تعداد ۱۶۷ ایزوله اشریشیاکلی شناسایی گردیدند. بر اساس روش دیسک دوتایی، ۳۸/۹٪ ESBL مثبت بودند. بررسی مولکولی نمونه‌ها نشان داد که میزان ۷۰/۳۲٪ ژن CTX-M، ۹/۶۴٪ ژن TEM، ۴/۸۸٪ ژن SHV، ۵۷/۰۲٪ ژن OXA-1 و ۱۲/۰۱٪ ژن PER-2 را دارا هستند، اما VEB-1 یافت نشد. تعدادی از ایزوله‌ها نیز دارای چندین ژن مقاومت به‌طور همزمان بودند. از نظر آماری بین جنس و سن با این بیماری و همچنین بین توانایی تولید ESBL و وجود ژن‌های مورد بررسی رابطه مستقیم وجود دارد (P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر بیش از نیمی از ایزوله‌های اشریشیاکلی مولد ESBL بودند. با توجه به اینکه عوامل مقاومت روی عناصر ژنتیکی متحرک قرار دارند، شناسایی سریع این سویه‌ها می‌تواند نقش مهمی در جلوگیری از گسترش آن‌ها داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: ESBL، اشریشیاکلی، عفونت‌های ادراری.

*آدرس مکاتبه: لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی.

پست الکترونیک: amirmozafari@yahoo.com

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-11-25]

مقدمه

عفونت ادراری یکی از شایع‌ترین بیماری‌های انسانی می‌باشد که نیاز مبرم به درمان آنتی‌بیوتیکی دارد. بیشترین عامل عفونت دستگاه ادراری، اشریشیاکلی و به مراتب کمتر سایر انتروباکتریاسه‌ها ازجمله کلبسیلا می‌باشند. افزایش مقاومت دارویی در عوامل ایجادکننده عفونت ادراری معضل بزرگی است که علت اصلی پیدایش آن، مصرف نامناسب و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (۱). غالباً جهت کنترل عفونت‌های ادراری، آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به‌کار برده می‌شود که با ظهور فزاینده‌ی آنزیم‌های بتالاکتاماز، کارایی این داروها کاهش یافته است. بتالاکتامازها طبق دسته‌بندی Ambler به چهار دسته مولکولی متمایز از نظر تکاملی A، B، C و D تقسیم‌بندی شده‌اند. در سال ۱۹۹۵ آخرین طبقه‌بندی برای این آنزیم‌ها توسط Bush- Jacoby- Medeiros صورت گرفته است که بر اساس این طبقه‌بندی آنزیم‌های بتالاکتامازی به چهار گروه ۱ تا ۴ و زیرگروه‌های a-f تقسیم‌بندی شده‌اند. انواعی از آنزیم‌های بتالاکتامازی در اشریشیاکلی وجود دارند که تحت عنوان بتالاکتاماز طیف گسترده (ESBL) خوانده می‌شوند. این گروه از بتالاکتامازها توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌های نسل سوم و منوباکتام‌ها را دارند و به طور کلی علت نام‌گذاری‌شان توانایی آن‌ها در هیدرولیز اکثر آنتی‌بیوتیک‌های دارای حلقه‌ی بتالاکتام است. اغلب ارگانیسم‌های حاوی این آنزیم‌ها، نسبت به کاربا‌پنم حساس باقی مانده‌اند درحالی‌که فعالیت آن‌ها نسبت به سیپروفلوکساسین و سفپیم و مهارکننده‌های بتالاکتاماز متغیر می‌باشد. ژن های این آنزیم‌ها اغلب بر روی پلاسمید و گاهی درون کروموزوم قرار گرفته‌اند. اکثر این آنزیم‌ها از مشتقات TEM-1 (یک بتالاکتاماز وابسته به پلاسمید از اشریشیاکلی) و یا SHV-1 (یک بتالاکتاماز کروموزومی از کلبسیلا پنومونیه) می‌باشند. این آنزیم‌ها با مهارکنندگان بتالاکتاماز مثل اسیدکلاولانیک و سالباکتام مهارشده و معمولاً سفامایسین‌ها (برای مثال سفوتیتان و سفوکسیتین) و یا ایمی‌پنم را هیدرولیز نمی‌کنند (۲). در سال ۱۹۸۳ اولین سویه تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتامازهای طیف گسترده در آلمان جداسازی شد. به دنبال آن گسترش سویه‌های مقاوم در دیگر نقاط جهان دیده شد. در سال‌های اخیر افزایش میزان جداسازی سویه‌های مولد این آنزیم‌ها از نقاط مختلف جهان گزارش شده است (۳). داشتن اطلاعات کافی از فاکتورهای اپیدمیولوژیک ارگانیسم‌های عامل عفونت و الگوی مقاومت آنها جهت بهبود دستورات دارویی مناسب در مراحل خاص ضروری می‌باشد. مشکل عمده در عفونت‌های ناشی از اشریشیاکلی، مقاومت آن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است. همچنین مقاومت نسبت به کاربا‌پنم‌ها که از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند روز به روز در حال افزایش است. به عنوان مثال مرکز مدیریت بیماری‌های آمریکا (CDC) اعلام نموده میزان مقاومت ۹٪ در بین نمونه‌های جدا شده در سال ۱۹۹۵، به میزان ۴۰٪ در سال ۲۰۰۴ رسیده که یک افزایش ۳۱ درصدی را نشان می‌دهد (۶-۴). در میان باکتری‌های گرم منفی، طیف وسیعی از مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی وجود دارد. برای نخستین بار این مقاومت که دلیل آن جهش در ژن‌های کروموزومی باکتری‌های اشریشیاکلی، سیتروباکتر فروندی، سراشیا مارسسنس و سودوموناس آئروژینوزا بود، به صورت بسیار محدود شناسایی و دلیل آن را تولید ژن‌هایی به نام ampC نامیدند. چند سال بعد مقاومت در باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه، گوه‌های سالمونلا و پروتئوس میرابیلیس ظاهر شد که ژنی غیر از ampC به نام‌های TEM و SHV که جزء ESBL بودند را تولید نمودند. اعضای خانواده انتروباکتریاسه به طور کلی آنزیم‌های بتالاکتامازی را تولید می‌کنند که شامل TEM-1، TEM-2، SHV-1 و ... می‌باشند. اولین شناسایی این آنزیم‌ها به

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-11-25]

طور دقیق در سال ۱۹۸۳ در آلمان انجام شد. هم‌اکنون این ژن‌ها باعث شکست‌های گسترده در درمان‌های آنتی‌بیوتیکی می‌شوند (۹-۷). آنزیم‌های بتالاکتامازی مهم‌ترین عامل مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام در میان باکتری‌های گرم منفی می‌باشند و با توجه به شیوع بالای سویه‌های مولد این نوع آنزیم در اشریشیاکلی، در این مطالعه تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده (ESBL) در سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری در بیماران سرپایی مبتلا به عفونت ادراری استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۲۶۷ نمونه ادراری در طول شش ماه از آزمایشگاه‌های منتخب گیلان از بیماران سرپایی جمع‌آوری شدند. نمونه‌های ادرار بر روی محیط‌های بلاد آگار حاوی ۵٪ خون گوسفندی و مک‌کانکی آگار (ساخت شرکت مرک) به وسیله لوپ استاندارد کشت داده شدند. تعداد ۱۶۷ ایزوله اشریشیاکلی شناسایی شدند که با انجام تست‌های بیوشیمیایی افتراقی همانند تست MRVP، دکربوکسیلاسیون لیزین در محیط LIA، هیدرولیز اوره، TSI، تست اوره‌آز و آزمون سیمون‌سیترات تأیید شدند. حساسیت دارویی بر اساس دستورالعمل CLSI بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. به منظور غربالگری اولیه ایزوله‌های مولد آنزیم بتالاکتاماز، سوسپانسیون میکروبی مطابق با غلظت نیم مک فارلند (سولفات باریم که جذب نوری آن در طول موج ۶۲۵ nm، برابر ۰/۸ تا ۰/۱ باشد) تهیه شده و بر روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح گردید. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی Span Lab ساخت کشور آلمان بر روی پلیت‌ها قرار داده شدند. دیسک‌های مورد استفاده شامل آموکسی‌کلاو، تتراسیکلین، سفتریاکسون، سفالوتین، سفیکسیم، نالیدیکسیک اسید، آموکسی‌سیلین، تری متوپریم سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین، سفپیم، نیتروفورانتوئین، آمیکاسین، ایمی‌پنم، جنتامایسین، سفتازیدیم و سفوکسیتین بودند. پس از ۲۴ ساعت، با استفاده از خط‌کش منطقه عدم رشد اطراف هر دیسک مورد اندازه‌گیری قرار گرفته و با جدول استاندارد CLSI مقایسه و تفسیر گردید (۱۰). تولید بتالاکتامازهای طیف گسترده به روش دیسک دوتایی مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش در محیط مولرهینتون آگار، دیسک آموکسی‌کلاو در فاصله ۳۰mm از دیسک سفتریاکسون یا سفتازیدیم قرار داده شد و پس از آن در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. افزایش برابر یا بیش از ۵ میلی‌متر در قطر هاله عدم رشد سفتریاکسون یا سفتازیدیم در حضور آموکسی‌کلاو در مقایسه با وضعیت عدم وجود کلاولونات، به‌عنوان تأیید فنوتیپی تولید ESBL در نظر گرفته شد (۱۱).

استخراج DNA و انجام PCR

از نمونه‌های ESBL مثبت، استخراج ژنوم با استفاده از کیت (DNP^{TM} kit محصول شرکت سیناژن) انجام گردید. جهت اطمینان از DNA استخراج شده و عدم وجود ممانعت کننده‌های PCR، ابتدا PCR اولیه بر روی 16S rDNA باکتری انجام پذیرفت (Universal PCR). از آنجا که خانواده‌های بتالاکتامازی دارای زیرگروه‌های متعددی بوده، بنابراین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن، PCR بر روی تمامی نمونه‌ها انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش از منابع معتبر انتخاب شده و جهت سنتز به شرکت Metabion سفارش داده شدند (جدول ۱).

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی	نام پرایمر
bla CTX-M	5' TTGCGATGTGCAGTACCAGTAA 3'	CTX-M F
	5' CGATATCGTTGGTGGTGGTGGCATA 3'	CTX-M R
bla TEM	5' ATAAAATTCTTGAAGAGGAAA 3'	TEM F
	5' GACAGTTACCAATGCTTAATC 3'	TEM R
bla SHV	5' CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC 3'	SHV F
	5' TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA 3'	SHV R
bla OXA-1	5' CACAATACATATCAACTTCGC 3'	OXA-1 F
	5' AGTGTGTTTAGAATGGTGATC 3'	OXA-1 R
bla PER-2	5' ATGAATGTCATCACAAAATG 3'	PER-2 F
	5' TCAATCCGGACTCACT 3'	PER-2 R
bla VEB-1	5' CGACTTCCATTTCCCGATAC 3'	VEB-1 F
	5' GGACTCTGCAACAAATACGC 3'	VEB-1 R

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-11-25]

سپس PCR برای هر ژن طبق جدول ۲ انجام شد و محصول PCR بر روی ژل آگارز با غلظت ۱٪ الکتروفورز گردید (۱۲).

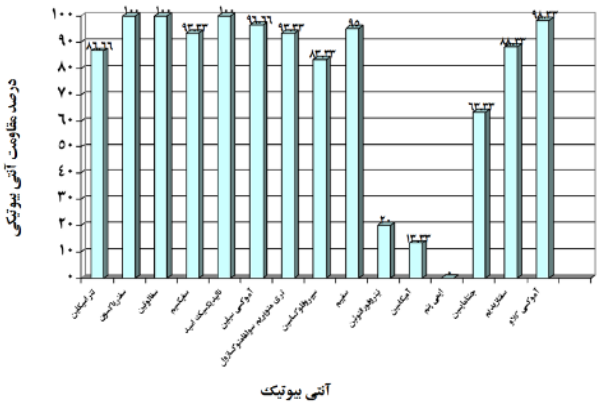
جدول ۲. برنامه PCR برای تکثیر ژن‌های CTX-M، OXA-1، SHV، TE، PER-2 و VEB-1

زمان	دما (°C)	مرحله	تعداد چرخه
۵′	۹۴	واسرشته شدن اولیه	۱
۳۰″	۹۴	واسرشته شدن	۳۵
۳۰″	۵۱	اتصال پرایمرها به الگو	
۳۰″	۷۲	تکثیر	
۷′	۷۲	تکثیر نهایی	۱

آنالیز آماری به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های خی‌دو و فیشر و T-test استفاده شد.

یافته‌ها

در میان ایزوله‌های اشریشیاکلی بدست آمده در این تحقیق، بیشترین میزان مقاومت به سفتریاکسون، سفالوتین و نالیدیکسیک اسید (۱۰۰٪) و کمترین میزان مقاومت به نیتروفورانتوئین (۲۰٪)، آمیکاسین (۱۳/۳۳٪) و ایمی‌پنم (۰٪) مشاهده شد (نمودار ۱).



نمودار ۱. درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های اشریشیاکلی

از ۱۶۷ ایزوله که به‌عنوان اشریشیاکلی شناسایی شدند، ۶۵ ایزوله پس از تست‌های فنوتیپی مولد ESBL شناسایی شدند. مشخصات دموگرافیک افراد آلوده به ایزوله‌های ESBL مثبت در جدول شماره ۳ آمده است.

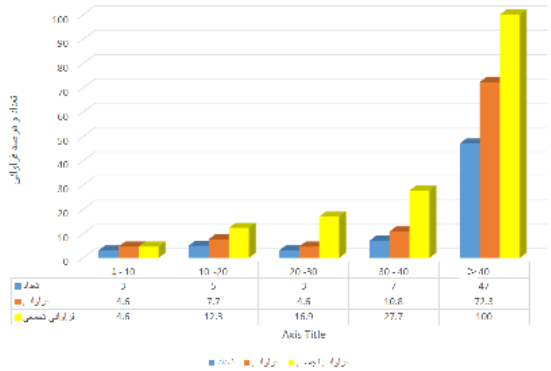
با توجه به نمودار ۲ اگرچه میزان بروز این بیماری در تمام سنین وجود دارد، اما نتایج نشان داد که میزان بروز این بیماری در افراد بالای ۴۰ سال شایع‌تر است.

جدول ۳. مشخصات دموگرافیک افراد آلوده به ایزوله‌های ESBL مثبت

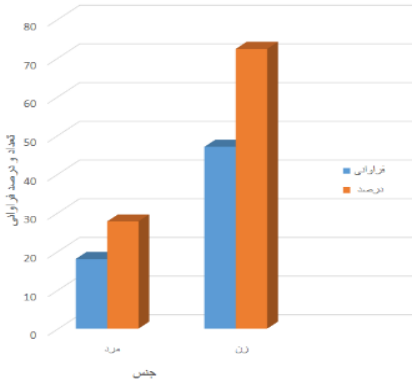
سال	سن: فراوانی	سن: درصد فراوانی	سن: فراوانی تجمعی	جنس: مرد	جنس: زن	دارای سابقه بیماری خاص: +	دارای سابقه بیماری خاص: _	عدم سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک در یک ماه گذشته	نداشتن سابقه بستری در بیمارستان بیمارستان
۱۰-۱	۳	۴/۶	۴/۶						
۲۰-۱۰	۵	۷/۷	۱۲/۳	۱۸	۴۷				
۳۰-۲۰	۳	۴/۶	۱۶/۹						
۴۰-۳۰	۷	۱۰/۸	۲۷/۷	درصد		۴	۶۱	۶۵	۶۵
> ۴۰	۴۷	۷۲/۳	۱۰۰	۲۷/۷	۷۲/۳				

جدول ۴. فراوانی و درصد فراوانی ژن‌های تکثیر شده از اشریشیاکلی

نام ژن	CTX-M	TEM	SHV	OXA-1	PER-2	VEB-1
فراوانی	۳۹	۵	۳	۲۹	۶	۰
درصد فراوانی	۷۰/۳۲	۹/۶۴	۴/۸۸	۵۷/۰۲	۱۲/۰۱	۰



نمودار ۲. تعداد و فراوانی نمونه‌های ESBL مثبت به دست آمده در سنین مختلف

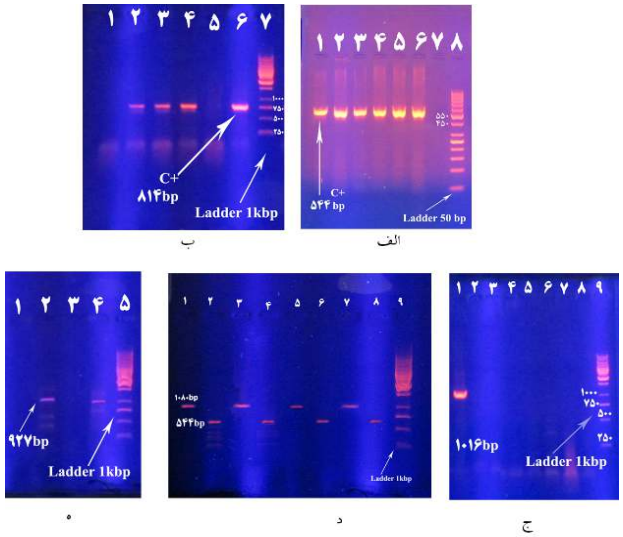


نمودار ۳. تعداد و فراوانی نمونه‌های ESBL مثبت به دست آمده بر اساس جنسیت افراد

همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود بررسی مولکولی PCR نیز نشان داد که به میزان ۷۰/۳۲٪ ایزوله‌ها دارای ژن CTX-M، ۹/۶۴٪ ژن TEM، ۴/۸۸٪

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-11-25]

ژن SHV، ۵۷/۰۲٪ ژن OXA-1 و ۱۲/۰۱٪ ژن PER-2 بودند؛ اما ژن VEB-1 یافت نشد.



شکل ۱. تصاویر الکتروفورز ژل آگارز. الف) ژن CTX-M (pb ۵۴۴)، ب) ژن OXA-1 (bp ۸۱۴)، ج) ژن SHV (bp ۱۰۱۶)، د) ژن TEM (bp ۱۰۸۰)، ه) ژن PER-2 (bp ۹۲۷)، باند مربوط به ژن VEB-1 (bp ۱۰۱۴) مشاهده نشد.

تعدادی از ایزوله‌ها نیز دارای چندین ژن مقاومت به‌صورت همزمان بودند. تعداد ۹ ایزوله دارای دو ژن CTX-M و OXA-1، ۱ ایزوله دارای دو ژن OXA-1 و PER-2، ۳ ایزوله دارای سه ژن CTX-M، OXA-1 و PER-2، ۱ نمونه دارای سه ژن CTX-M، OXA-1 و SHV و ۱ ایزوله دارای سه ژن CTX-M، TEM و OXA-1 بودند و این نمونه‌ها همان نمونه‌هایی بودند که در آزمایشات میکروبی به شدت تولید ESBL کرده بودند (جدول ۵).

جدول ۵. فراوانی چندین ژن مقاومت در یک ایزوله

متغیر	ژن‌ها	تعداد
حضور بیش از یک ژن	CTX-M, OXA-1	۹
	OXA-1, PER-2	۱
	CTX-M, OXA-1, PER-2	۳
	CTX-M, OXA-1, SHV	۱
	CTX-M, TEM, OXA-1	۱

از نظر آماری بین جنس و سن با این بیماری رابطه مستقیم وجود دارد (نمودارهای ۲ و ۳). همچنین بین توانایی تولید ESBL و وجود ژن‌های مورد بررسی نیز رابطه مستقیم وجود دارد (جدول ۴).

بحث و نتیجه‌گیری

مواجهه باکتری‌ها با انواع متنوعی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام منجر به افزایش تولید بتالاکتامازها و ایجاد جهش‌های منجر به تولید بتالاکتامازهای طیف گسترده گردیده است. با توجه به اهمیت این نوع از بتالاکتامازها، در این پژوهش بررسی فراوانی سویه‌های تولید کننده ESBL در باکتری اشریشیاکلی که شایع‌ترین عامل عفونت‌های ادراری است، در بیماران سرپایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که از میان ۱۶۷ ایزوله، ۳۸/۹٪ تولید کننده ESBL بودند. طبق گزارش‌های پیشین، شیوع سویه‌های اشریشیاکلی تولید کننده ESBL در نمونه‌های ادراری در بیمارستان میلاد تهران ۲۱٪ از میان ۶۲۰ ایزوله، در بیمارستان حضرت رسول تهران ۲۳/۵٪ از میان ۱۰۲ ایزوله و در شهر سمنان ۲۹٪ از میان ۲۲۶ ایزوله بوده است (۱،۳). در یک مطالعه در بیمارستان لقمان تهران، ۴۵/۲٪ نمونه‌های ادراری از میان ۱۶۴ ایزوله آلوده به اشریشیاکلی، ESBL مثبت گزارش گردیده‌اند که البته تولید بتالاکتامازهای طیف گسترده در این مطالعه بدون انجام تست دابل دیسک دیفیوژن و فقط بر مبنای مقاومت به سفتریاکسون یا سفتازیدیم یا سفتیزوکسیم تعریف شده است (۸). نکته قابل توجهی که در یکی از گزارش‌های قبلی وجود دارد، تفکیک درصد سویه‌های ESBL مثبت در بیماران بستری و سرپایی می‌باشد که فراوانی این سویه‌ها را در بیماران بستری، ۳۳٪ و در بیماران سرپایی، ۶۶٪ گزارش نموده است (۳). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، ۱/۵٪ سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری و ۴۵/۵۲٪ سویه‌های بیماران سرپایی، ESBL مثبت بوده‌اند (۲). این تفاوت می‌تواند تا حد زیادی مربوط به استفاده صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها و مصرف دوره کامل آنها در بیمارستان‌ها در مقایسه با بیماران سرپایی باشد.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-11-25]

شیوع سویه‌های ESBL مثبت در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های ادراری در نقاط مختلف جهان متفاوت بوده است و طبق گزارشی از کشور هند، این میزان ۳۴/۴۲٪ و در عربستان سعودی، ۹/۶٪ بوده است (۱۵-۱۳). در پژوهش دیگری که در نپال و سال ۲۰۱۷ انجام شد، از مجموع ۴۵۱ نمونه عفونت ادراری، ۳۶۵ ایزوله اشریشیاکلی و ۱۷ ایزوله کلبسیلا پنومونیه و ۳ نمونه کلبسیلا اکسیتوکا جداسازی شد که از ۳۶۵ ایزوله اشریشیاکلی با روش دابل دیسک ۳۳ مورد ESBL مثبت بودند (۱۶). در پژوهشی در مالزی در سال ۲۰۱۶، ۱۸/۸٪ ایزوله‌های اشریشیاکلی (۲۸ مورد از ۱۴۹ ایزوله)، از نظر تولید ESBL مثبت بودند که بررسی مولکولی نشان دهنده حضور ژن CTX-M، در بین ۹۰٪ آنها بود، در حالی که SHV و TEM به ترتیب در ۵۶٪ و ۵۲٪ ایزوله‌ها یافت شد و ۲۸٪ از نمونه‌های ESBL مثبت، حاوی هر سه ژن و ۵۰٪ آنها حاوی دو ژن بودند (۱۷). در مطالعات دیگری که در ایران انجام شده است، مقادیر ۴۹٪، ۶۰/۶٪ و ۶۷/۲٪ از ایزوله‌های اشریشیاکلی به عنوان تولید کننده ESBL گزارش شده‌اند که این گزارش‌ها مربوط به نمونه‌های بالینی مختلف بوده و نمونه‌های ادرار به تفکیک بیان نشده‌اند (۱۸،۱۹).

در این مطالعه کمترین میزان مقاومت دارویی سویه‌های ESBL مثبت، به ایمی‌پنم بوده است (۰٪) و پس از آن آمیکاسین و نیتروفورانتوئین قرار دارند (به ترتیب ۱۳/۳٪ و ۲۰٪) که در مقایسه با یک گزارش دیگر در نمونه‌های ادراری در ایران، این مقادیر به ترتیب ۵۴٪ و ۲۰٪ گزارش شده است و مقاومت به ایمی‌پنم بررسی نشده است (۹). مقاومت صد درصدی سویه‌های مورد مطالعه در این پژوهش نسبت به سفالوتین، سفتریاکسون و نالیدیکسیک اسید و حساسیت تمام سویه‌ها به ایمی‌پنم روشن می‌سازد که آنزیم‌های بتالاکتامازی تولیدی توسط این باکتری‌ها از دسته A زیرگروه 2be می‌باشند، زیرا این گروه آنزیم‌ها قادر به غیرفعال‌سازی سفالوسپورین‌های نسل سوم و منوباکتام بوده درحالی‌که نسبت به کاربابنم‌ها حساس باقی می‌مانند (۲).

پژوهشی که در تهران بر روی بیماران سرپایی انجام یافته است، حاکی از وجود ژن‌های مقاومت در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت‌های ادراری به ترتیب ۵۱/۸٪ ژن CTX-M، ۷/۱٪ ژن TEM، ۳/۶٪ ژن SHV، ۴۲٪ ژن OXA-1، ۸/۹٪ ژن PER-2 بود و VEB-1 یافت نگردید (۲۰). درحالی‌که در مطالعه انجام یافته حاضر در استان گیلان میزان این ژن‌های مقاومت ۷۰/۳۲٪ ژن CTX-M، ۹/۶۴٪ ژن TEM، ۴/۸۸٪ ژن SHV، ۵۷/۰۲٪ ژن OXA-1، ۱۲/۰۱٪ ژن PER-2 بدست آمد، اما ژن VEB-1 یافت نشد (جدول ۴). تعدادی از ایزوله‌ها نیز دارای چندین ژن مقاومت به صورت همزمان بودند.

در مطالعه حاضر شیوع نسبتاً بالایی از تولید بتالاکتامازهای طیف گسترده و مقاومت دارویی چندگانه در سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های ادراری مشاهده گردید. با توجه به اینکه گزارش‌های موجود، از نمونه‌های ادراری جمع‌آوری شده بین سال‌های ۲۰۰۷ تا ۲۰۰۹ بدست آمده است و گزارش مستقلی از شیوع این سویه‌ها در بیماران سرپایی در گذشته در دست نیست، تعیین تغییر میزان شیوع این سویه‌ها در کشور به‌طور دقیق امکان‌پذیر نیست و نیاز به مطالعات بیشتر دارد. با توجه به اینکه اکثریت ایزوله‌های مورد مطالعه مقاوم به بتالاکتام‌ها می‌باشند، برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری استفاده از بتالاکتام‌ها توصیه نمی‌شود. ژن‌های مقاومت بر روی عناصر ژنتیکی قابل انتقال قرار دارند که می‌توانند از یک سویه مقاوم به دیگر سویه‌ها انتقال یابند و مقاومت را منتشر نمایند. لذا مدیریت صحیح مصرف آنتی‌بیوتیک و شناسایی سریع و ردیابی سویه‌های مولد این آنزیم‌ها می‌تواند گامی مهم در درمان عفونت‌های

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-11-25]

ناشی از آن‌ها و در جلوگیری از گسترش آن‌ها باشد. همچنین برای جلوگیری از شکست روند درمان، انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تولید ESBL برای عفونت‌های ادراری توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان که بر اساس یک طرح مصوب متقبل هزینه‌های این پژوهش شده‌اند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-11-25]

References

1. Eslami G, Seyedjavadi SS, Goudarzi H, Fallah F, Goudarzi M. Distribution of integrons among multidrug resistant E. coli and Klebsiella strains isolated from children with urinary tract infection. Res Med. 2010; 34(1): 61-65. (In Persian)
2. Mobaiyen H, Nahaei MR, Amirmozafari N, Sadeghie J, Rasuli M. Prevalence and Plasmid Profiles of Extended Spectrum Beta Lactamase producing Enterobacteriaceae in Intensive Care Unit of Children Hospital in Tabriz. J Univ Med Tabriz. 2006; 28(2): 95-101. (In Persian)
3. Behrouzi A, Rahbar M, YousefiVand J. The prevalence of Extended-Spectrum β-lactamase (ESBLs) producing Klebsiella pneumonia and Eschrrichia coli isolated in Milad hospital of Tehran in 2010. Iran J Med Microbiol. 2010; 4(2): 36-41. (In Persian)
4. Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard JL, Jarlier V, Robert J. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum beta-lactamase production by Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2011; 49(3): 1048-1057.
5. Behrooozi A, Rahbar M, YousefiVand J. Frequency of extended spectrum beta-lactamase (ESBLs) producing Escherichia coli and Klebseilla pneumonia isolated from urine in an Iranian 1000-bed tertiary care hospital. African J Microbiol Res. 2010; 4(9): 881-884.
6. Shayanfar N, Rezaei M, Ahmadi M, Ehsanipour F. Evaluation of Extended Spectrum Betalactamase (ESBL) Positive Strains of Klebsiella pneumonia and Escherichia coli in Bacterial Cultures. Iranian J Pathology. 2010; 5(1): 34-39.
7. Nasehi L, Shahcheraghi F, Nematzadeh S. PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in Clinical Isolates of Klebsiella pnumoniae Isolates from Tehran, Iran. Iranian J Clin Infect Dis. 2010; 10(13): 111-118.
8. Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant Escherichia coli clones in Israel. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 21(50): 3098-3101.
9. Nazik H, Ongen B, Erdon E, Ermis F. High prevalence of CTX-M-type beta-lactamase in Escherichia coli isolates producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and displaying antibiotic co-resistance. African J Microbiol Res. 2011; (5): 44-49.
10. Patel JB, Cockerill FR, Bradford PA, Eliopoulos GM, Hindler JA, Jenkins SG, et al. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, vol. 32, NCCLS, 2012. NCCLS approved standard M7-A9.
11. Irajian G, JazayeriMoghadas A. Frequency of extended-spectrum beta lactamase positive and multidrug resistance pattern in Gram-negative urinary isolates, Semnan, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2010; 3(3): 107-113.
12. Pagain L, Amico E, Migliavacca R, Andrea M, Giacobon E, Amicosante G, et al. Multiple CTX-M type extended-spectrum B-lactamases in nosocomonal isolates of

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-11-25]

Enterobacteriaceacea from hospital in North Italy. J Clin Microbial. 2003; 41: 4264-4269.
13. Akram M, Shahid M, Khan AU. Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in JNMC Hospital Aligarh, India. Annals Clin Microbiol Antimicrobials. 2007; 6: 4-8.
14. Kader AA, Kumar A. Prevalence and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum beta lactamase producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a general hospital. Annals Saudi Medicine. 2005; 25(3): 239-242.
15. Mehrgan H, Rahbar M. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Int J Antimicrobial Agents. 2008; 31(2): 147-151.
16. Shakya P, Shrestha D, Maharjan E, Sharma V, Paudyal R. ESBL Production Among E.coli and Klebsiella spp. Causing Urinary Tract Infection: A Hospital Based Study. Open Microbiol J. 2017; 11: 23-30.
17. Mohsen S. Hamzah H, Imad M, Al-Deen M, Baharudin R. Antimicrobial susceptibility of *klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* with extended-spectrum β-lactamase associated genes in hospital Tengku Ampuan Afzan, Kuantan, Pahang. Malays. J Med Sci. 2016; 23(2):14-20.
18. Shahcheraghi F, Nasiri S. Noviri H. Detection of extanded-spectrum B-lactamase (ESBLs) in Escherichia coli. Iranian J Clin Infect Dis. 2009; 4(2): 65-70.
19. Mirsalehian A, Nakhjavani F, Peymani A, JabalAmeli F, Mirafshar SM, Hamidian M. Frequency of extended spectrum β-Lactamase producing Enterobacteriaceae in intensive care units. Tehran Univ Med J. 2008; 65(1): 33-38. (In Persian)
20. BabaeiKasmaei Z, Amirmozafari N, Frouhesh Tehrani H, Arashkia A, Mahdavi S, Bahrami A. Antimicrobial susceptibility among multi-drug resistant E. coli in Iranian outpatients with urinary tract infection in Tehran. Iran J Med Microbiol. 2012; 6(9): 37-44. (In Persian)

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-11-25]

The Frequency of Beta Lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from outpatient suffering from urinary tract infections in Guilan province

***Amirmozafari N*[1, 2*], *BabaieKasmaie Z*[3], *Mohsenpour M*[4]**

1. Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran. amirmozafari@yahoo.com.

2. Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. PhD Student, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

4. Instructor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

Received: *4 Nov 2017* **Accepted:** *31 Dec 2017*

Abstract

Background: *Escherichia coli* is one of the most common causative agent of urinary tract infection. In recent years, resistance to cephalosporins has been considerably on the rise due to production of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs). This study was aimed to determine the survey of CTX-M, SHV, TEM, OXA-1, PER-2, and VEB-1 which are the most famous ESBL genes in *E. coli* isolated from outpatients with UTI in Guilan.

Materials and Methods: A total of 2267 urine samples were collected from outpatients suffering from UTIs. After primary biochemical and differential tests like MRVP, Lysin dacarboxilation in LIA medium, Urea hydrolysis test, TSI and Simon citrate test, samples containing *E. coli* were identified. Antibiotic susceptibilities were determined by disk diffusion. Double disk tests using Cephtriaxon, Amoxiclave and Cephtazidime-clavolonate were performed for phenotypic ESBL production assay. ESBL-producing genes were evaluated by PCR.

Results: Among the 2267 urine samples, 167 *E. coli* cells were isolated. From these *E. coli* isolates, 38.9% were shown to be ESBL producers by the Double disk method. Based on the molecular analysis, the frequency of ESBL-producing genes were, CTX-M (70.32%), TEM (9.64%), SHV (4.88%) OXA-1 (57.2%), and PER-2 (12.1%). VEB-1 was not detected in the analyzed samples. Also, some of the isolates had more than one ESBL-producing gene . Statistically, there was a direct correlation between gender and age with the infection.

Conclusion: In this study, more than half of the isolated bacteria were ESBL-producers. As the resistance-inducing genes are carried on mobile genetic elements, rapid detection of resistant species is of major importance to prevent their dissemination.

Keywords: ESBL, *E. coli*, UTI.

Citation: Amirmozafari N, BabaieKasmaie Z, Mohsenpour M. The Frequency of Beta Lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from outpatient suffering from urinary tract infections in Guilan province. Yafte. 2018; 19(5): 43-52.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-11-25]