● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ نوزدهم، شمارهٔ ۴، ص ۳۸۳-۳۷۵، ۱۳۹۱

مقالهٔ پژوهشی

حساسیت آنتی‌بیوتیکی و مقاومت چند دارویی در باکتری‌های اشریشیاکلی مولد بتالاکتاماز تیپ CTX-M و TEM در شهر مشهد

محبوبه نخعی مقدم*[1]، محمد مهدی فرقانی‌فرد[2]

خلاصه

مقدمه: یکی از شایع‌ترین علل مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است. هدف این تحقیق، مقایسه‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های ادراری اشریشیاکلی مولد بتالاکتاماز تیپ CTX-M و TEM و تعیین سویه‌های دارای مقاومت هم‌زمان به چند آنتی‌بیوتیک بود.

روش: در این تحقیق، باکتری‌های اشریشیاکلی از نمونه‌های ادراری بیماران بستری در دو بیمارستان دانشگاهی مشهد، در سال ۱۳۸۹ جدا و با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی افتراقی شناسایی و با کیت میکروژن تأیید شدند. پس از انجام آنتی‌بیوگرام با روش انتشار در آگار، جدایه‌های مولد بتالاکتاماز با آزمایشات احتمالی و تأییدی شناسایی گردیدند. برای شناسایی باکتری‌های مولد بتالاکتاماز تیپ CTX-M و TEM، پس از استخراج پلاسمید از واکنش زنجیره‌ی پلیمراز استفاده شد.

یافته‌ها: درصد باکتری‌های دارای ژن bla_{CTX-M} بیشتر از bla_{TEM} بود (۹۷/۲ درصد در مقابل ۵۸/۳ درصد). از میان ۳۶ باکتری مولد ESBL (Extended-spectrum beta-lactamase)، ۲۰ جدایه دارای هر دو ژن بودند. در بین جدایه‌ها، مقاومت نسبت به سفوتاکسیم بیشتر از سفتازیدیم بود. درصد بیشتری از جدایه‌های دارای bla_{CTX-M} در مقایسه با جدایه‌های کدکننده‌ی هر دو ژن $bla_{TEM, CTX}$ به آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتالاکتام، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و نیتروفورانتوئین، مقاوم یا بینابینی بودند که اختلاف برای جنتامایسین معنی‌دار بود ($P<0/05$). ۱۶ جدایه از ۳۶ (۴۴/۴ درصد) باکتری مولد ESBL در این تحقیق مقاومت هم‌زمان نسبت به سه آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، اسید نالیدیکسیک و کوتریموکسازول داشتند که از میان آن‌ها ۹ سویه تنها ژن bla_{CTX} و ۸ سویه هر دو ژن $bla_{TEM, CTX}$ را کد می‌کردند.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق نشان داد که شیوع ژن bla_{CTX-M} نسبت به bla_{TEM} در جامعه‌ی مورد مطالعه بیشتر بود و باکتری‌های دارای ژن bla_{CTX} مقاومت بیشتری نسبت به جنتامایسین داشتند ($P<0/05$) که احتمال دارد ژن مقاومت به این آنتی‌بیوتیک همراه ژن bla_{CTX} منتقل می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی، بتالاکتاماز، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، CTX-M، TEM، PCR

۱- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست‌شناسی، مشهد، ایران ۲- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه زیست‌شناسی، دامغان، ایران

* **نویسنده مسؤول،** ● **آدرس پست الکترونیک:** m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۵/۱۸ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۰/۱۰/۲۲ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۰/۱۱/۲۶

مقدمه

افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین باکتری‌های بیماری‌زای شایع، تهدید جدی برای کنترل بیماری‌های عفونی است (۱). مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و انتشار جهانی سویه‌های مقاوم یکی از مشکلات علم پزشکی است. در بین آنتی‌بیوتیک‌ها، بتالاکتام‌ها فراوان‌ترین و متنوع‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده هستند (۲). آنزیم‌های بتالاکتاماز حلقه‌ی بتالاکتام را می‌شکنند و آن را به صورت خطی درمی‌آورند. یکی از شایع‌ترین علل مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام تولید این آنزیم‌ها است (۵-۳). این آنزیم‌ها در تعداد زیادی از باسیل‌های گرم منفی شناسایی شده‌اند. بیشتر سویه‌هایی که این آنزیم‌ها را بیان می‌کنند، متعلق به خانواده‌ی آنتروباکتریاسه، به ویژه اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه هستند (۵-۳). از آن جایی که ژن‌های مولد این آنزیم‌ها از طریق پلاسمید به آسانی بین اعضای خانواده‌ی آنتروباکتریاسه منتقل می‌شوند (۵)، می‌توانند باعث سهولت انتشار مقاومت نه تنها به بتالاکتام‌ها بلکه سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مثل کینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها شوند (۶).

عفونت‌های ادراری یکی از عفونت‌های شایع در جوامع انسانی هستند و اشریشیاکلی علت شایع عفونت مجرای ادراری در افراد جامعه و یا در بیمارستان‌ها محسوب می‌شود (۷). مصرف گسترده‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در این باکتری شده است (۸). امروزه گزارش‌های زیادی مبنی بر شیوع روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی ناشی از تولید بتالاکتامازها در نقاط مختلف دنیا به چشم می‌خورد که نشان‌دهنده‌ی جهانی بودن این مشکل است (۵). مطالعات مشابهی نیز در بعضی از شهرهای ایران به چشم می‌خورد که شیوع باکتری‌های مولد ESBL را از نظر فنوتیپی و مولکولی بررسی نموده‌اند (۱۰-۹)، اما مطالعات مشابه در مشهد کمتر انجام شده است. بررسی و کنترل این نوع مقاومت‌ها اهمیت زیادی دارد، به ویژه که مقاومت‌های چند دارویی را به همراه دارند (۱۱) و انتقال ژن‌های مولد آن‌ها از طریق پلاسمید در بخش‌های مراقبت‌های ویژه با مشکلات فراوانی همراه است که می تواند به عفونت‌های بیمارستانی غیر قابل کنترل منجر شود. هدف از انجام این تحقیق، تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های ادراری اشریشیاکلی مولد بتالاکتاماز پلاسمیدی تیپ CTX-M و TEM در مشهد، مقایسه‌ی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها و شناسایی سویه‌های دارای مقاومت هم‌زمان به چند آنتی‌بیوتیک بود.

روش بررسی

باکتری‌های اشریشیاکلی از ۱۱۹ نمونه‌ی ادراری بیماران در دو بیمارستان دانشگاهی مشهد، بیمارستان قائم و بیمارستان هفده شهریور، در اوایل سال ۱۳۸۹ جدا شدند. نمونه‌ها مربوط به بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها بودند که با توجه به تشخیص احتمالی عفونت توسط پزشک و به منظور کشت به آزمایشگاه‌های بیمارستان‌ها ارسال شده بودند. جدایه‌ها با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی افتراقی معمول شناسایی شدند و سپس با استفاده از آزمایشات افتراقی کیت میکروژن (Bioproducts ID-GNA-UK) و نرم‌افزار مربوط تأیید شدند.

آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار در آگار در محیط مولر هینتون آگار (Merck) و متد Kirby-bauyer مطابق دستورالعمل مؤسسه‌ی استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (Clinical and Laboratory Standards Institute یا CLSI) (۱۳-۱۲) انجام و میانگین قطر هاله‌های عدم رشد پس از سه بار تکرار ثبت شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (Liofilichem-Italy) عبارت بودند از: اسید نالیدیکسیک (NA) ۳۰ میکروگرم، ایمی پنم (I) ۱۰ میکروگرم، کوتریموکسازول (SXT) ۲۵ میکروگرم، سیپروفلوکساسین (Cip) ۵ میکروگرم، جنتامایسین (G) ۱۰ میکروگرم،

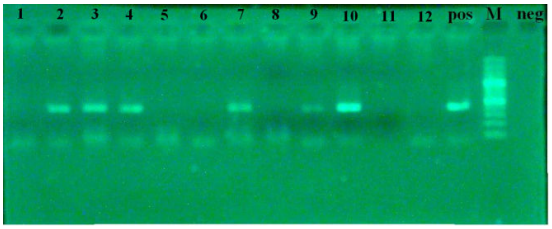
آمیکاسین (AK) ۳۰ میکروگرم، نیتروفورانتوئین (F) ۳۰ میکروگرم، سفتازیدیم (CAZ) ۳۰ میکروگرم و سفوتاکسیم (Ce) ۳۰ میکروگرم.

شناسایی جدایه‌های مولد بتالاکتاماز از نظر فنوتیپی با آزمایش احتمالی هم‌افزایی دو دیسک و سپس آزمایش تأییدی CLSI انجام شد. در آزمایش احتمالی از دیسک‌های آگمنتین (۱۰ + ۲۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم و سفتازیدیم و در آزمایش تأییدی از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفتازیدیم و دیسک ترکیبی سفتازیدیم/ کلاوولانات (۳۰ + ۱۰ میکروگرم) استفاده شد (۱۵-۱۴). برای شناسایی مولکولی باکتری‌های مولد ESBL، پس از کشت جدایه‌های مولد بتالاکتاماز در محیط لوریا برتانی و استخراج پلاسمید با کیت Perfect prep spin mini kit-5 prime (USA)، واکنش زنجیره‌ی پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) با استفاده از پرایمر اختصاصی برای هر یک از ژن‌های bla_{CTX-M} (F-5'-ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT-3' و R-5'-TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA-3') و bla_{TEM} (F-5'- ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG-3' و R-5'-AGC GTT GCC AGT GCT CGA TG-3') انجام گرفت (۱۷-۱۶). برای استخراج پلاسمید مطابق دستورالعمل کیت، ابتدا با بافر حاوی RNase، اسید ریبونوکلئیک حذف و سپس با بافر حاوی NaOH و SDS، سلول‌ها متلاشی شدند. در مرحله‌ی بعدی با کمک بافر، پروتئین‌ها و DNA کروموزومی رسوب داده شد و محلول حاوی پلاسمید با کمک ستون جدا گردید. شرایط PCR عبارت بود از: مرحله‌ی شروع ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، تکثیر شامل مراحل واسرشت (۹۴ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه)، اتصال (۵۰ درجه‌ی سانتی گراد برای ژن bla_{CTX_M} و ۵۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ژن bla_{TEM}) و طویل شدن (۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) که با ۳۰ چرخه ادامه یافت. بعد از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد، محصولات نهایی تکثیر از نظر حضور قطعاتی با وزن مولکولی ۵۹۳ و ۴۲۱ جفت باز به ترتیب برای ژن‌های bla_{CTX-M} و bla_{TEM} مورد ارزیابی قرار گرفت. از اشریشیاکلی دارای ژن bla_{CTX_M} و bla_{TEM} که از انستیتو پاستور ایران دریافت شده بود، به عنوان باکتری شاهد مثبت استفاده شد (۱۷-۱۶).

برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) و برای آنالیز میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین جدایه‌های مولد بتالاکتاماز که دارای ژن‌های bla_{CTX-M} و $bla_{CTX/TEM}$ بودند، از آزمون χ^2 استفاده شد.

نتایج

از میان ۳۶ باکتری اشریشیاکلی مولد بتالاکتاماز شناسایی شده در این تحقیق، ۳۵ باکتری (۹۷/۲ درصد) از نظر ژن bla_{CTX-M} و ۲۱ باکتری (۵۸/۳ درصد) از نظر ژن bla_{TEM} مثبت بودند. شکل ۱ محصولات PCR را برای ژن bla_{TEM} برای تعدادی از نمونه‌ها نشان می‌دهد. ۱۵جدایه فقط ژن bla_{CTX-M} و ۲۰ جدایه (۵۵/۶ درصد) از نظر هر دو ژن مثبت بودند و یک جدایه فقط دارای ژن bla_{TEM} بود. جدول ۱ نتایج مربوط به آزمایش مولکولی ژن بتالاکتاماز و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده را پس از سه بار آزمایش نشان می‌دهد.



شکل ۱. *محصولات PCR ژن bla_{TEM} برای تعدادی از نمونه‌ها.*

M: مارکر ۱۰۰جفت بازی، neg: شاهد منفی، pos: شاهد مثبت، ۱ تا ۱۲: نمونه‌ها

جدول ۱. الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده پس از سه بار آزمایش و نوع ژن بتالاکتاماز جدایه‌ها

جدایه	ژن بتالاکتاماز	CAZ	Ce	NA	CIP	G	SXT	AK	F	I
۱	CTX-M	S	I	R	R	S	R	S	S	S
۲	CTX/TEM	S	R	R	R	S	R	S	S	S
۳	CTX/TEM	R	R	R	R	S	R	S	S	S
۴	CTX/TEM	I	R	R	I	S	S	S	S	S
۵	CTX-M	I	R	S	S	R	S	R	R	S
۶	CTX-M	R	R	S	S	R	S	R	S	S
۷	CTX/TEM	S	I	S	S	S	R	S	S	S
۸	CTX-M	R	R	R	R	R	R	S	S	S
۹	CTX/TEM	I	R	S	S	S	S	S	S	S
۱۰	CTX/TEM	R	R	R	R	I	R	S	S	S
۱۱	CTX-M	S	S	S	S	S	S	S	S	S
۱۲	CTX-M	R	R	S	S	R	R	R	S	S
۱۳	CTX/TEM	R	R	R	S	S	R	S	S	S
۱۴	CTX/TEM	R	R	S	S	S	R	S	S	S
۱۵	CTX/TEM	I	R	R	S	R	R	S	S	S
۱۶	CTX/TEM	I	R	R	R	R	R	S	S	S
۱۷	CTX/TEM	I	R	R	S	S	R	S	S	S
۱۸	CTX-M	R	I	R	R	R	R	R	S	S
۱۹	CTX/TEM	R	R	R	S	S	R	S	S	S
۲۰	CTX/TEM	R	R	R	R	R	R	S	S	S
۲۱	CTX/TEM	S	I	S	S	S	R	S	S	S
۲۲	CTX-M	I	R	R	I	R	R	S	I	S
۲۳	CTX-M	R	R	R	S	R	R	S	S	S
۲۴	CTX-M	R	R	R	R	R	R	S	S	S
۲۵	CTX/TEM	R	R	R	R	R	R	S	S	S
۲۶	CTX-M	S	I	R	S	R	R	S	S	S
۲۷	CTX/TEM	I	I	R	I	R	R	S	S	S
۲۸	CTX-M	R	R	R	R	I	R	S	I	S
۲۹	CTX/TEM	R	R	S	S	S	R	R	S	S
۳۰	TEM	S	S	S	S	S	S	S	S	S
۳۱	CTX/TEM	R	R	I	S	S	R	S	S	S
۳۲	CTX-M	R	R	R	S	I	R	S	S	S
۳۳	CTX-M	S	R	R	S	I	I	S	S	S
۳۴	CTX/TEM	R	R	R	R	I	R	S	S	S
۳۵	CTX/TEM	I	R	S	S	S	R	S	S	S
۳۶	CTX-M	S	R	R	R	I	R	S	S	S

R: مقاوم، I: بینابینی، S: حساس، NA: اسید نالیدیکسیک، I: ایمی‌پنم، SXT: کوتریموکسازول، Cip: سیپروفلوکساسین، G: جنتامایسین، AK: آمیکاسین، F: نیتروفورانتوین، CAZ: سفتازیدیم، Ce: سفوتاکسیم

همان طور که در جدول ۱ مشخص است ۲۷ جدایه (۷۵ درصد) به سفتازیدیم مقاوم یا بینابینی بودند. مقاومت جدایه‌ها نسبت به سفوتاکسیم بیشتر از سفتازیدیم بود و از ۳۶ جدایه‌ی مولد بتالاکتاماز، ۳۵ مورد (۹۷/۲ درصد) نسبت به سفوتاکسیم مقاوم یا بینابینی بودند. ۹۳/۳۳ درصد جدایه‌های دارای ژن bla_{CTX-M} و ۱۰۰ درصد جدایه‌های دارای هر دو ژن bla_{TEM} و bla_{CTX-M} مقاوم به سفوتاکسیم و یا بینابینی بودند. همچنین ۶۶/۶۷ درصد جدایه‌های دارای ژن bla_{CTX-M} و ۸۵ درصد جدایه‌ها دارای هر دو ژن bla_{TEM} و bla_{CTX-M} مقاوم به سفتازیدیم و یا بینابینی بودند.

میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مولد بتالاکتاماز طیف وسیع بر اساس ژن‌های مورد آزمایش نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتالاکتام در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. *میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مولد بتالاکتاماز بر اساس ژن‌های bla_{CTX-M} و $bla_{TEM, CTX}$*

آنتی‌بیوتیک	تعداد جدایه‌های حساس/ تعداد کل جدایه‌های $ESBL^+$ (درصد)	تعداد جدایه‌های حساس/ تعداد کل جدایه‌های دارای bla_{CTX-M} (درصد)	تعداد جدایه‌های حساس/ تعداد کل جدایه‌های دارای هر دو ژن $bla_{TEM,CTX}$ (درصد)
اسید نالیدیکسیک	۳٦/۱۱ (٪۳۰/۵۵)	۱۵/٤ (٪۲٦/٦۷)	۲۰/٦ (٪۳۰)
کوتریموکسازول	۳٦/٦ (٪۱٦/٦۷)	۱۵/۳ (٪۲۰)	۲۰/۲ (٪۱۰)
جنتامایسین	۳٦/۱۸ (٪۵۰)	۱۵/٤ (٪۲٦/٦۷)	۲۰/۱۳ (٪٦۵)
سیپروفلوکساسین	۳٦/۱۸ (٪۵۰)	۱۵/٦ (٪٤۰)	۲۰/۱۱ (٪۵۵)
آمیکاسین	۳٦/۳۱ (٪۸٦/۱۱)	۱۵/۱۱ (٪۷۳/۳۳)	۲۰/۱۹ (٪۹۵)
نیتروفورانتوئین	۳٦/۳۳ (٪۹۱/٦۷)	۱۵/۱۲ (٪۸۰)	۲۰/۲۰ (٪۱۰۰)

درصد بیشتری از جدایه‌های دارای bla_{CTX-M} در مقایسه با جدایه‌های کد کننده‌ی هر دو ژن $bla_{TEM, CTX}$ به آنتی‌بیوتیک‌های اسید نالیدیکسیک، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین و نیتروفورانتوئین مقاوم یا بینابینی بودند که از میان آن‌ها اختلاف برای جنتامایسین معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$). در حالی که درصد جدایه‌های مقاوم یا بینابینی به کوتریموکسازول بین جدایه‌های دارای هر دو ژن bla_{TEM} و bla_{CTX-M} بیشتر از جدایه‌های دارای ژن bla_{CTX-M} بود و اختلاف معنی‌دار نبود ($P < ۰/۰۵$).

با توجه به نتایج به دست آمده ۲۲ جدایه (۵۹/۴۶ درصد) از باکتری‌های مولد بتالاکتاماز طیف وسیع به سه یا بیشتر از آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتالاکتام مورد آزمایش حساسیت نشان ندادند (مقاوم یا بینابینی). ۱۶ جدایه از ۳۶ (۴۴/۴ درصد) باکتری ESB+L در این تحقیق نسبت به سه آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، اسید نالیدیکسیک و کوتریموکسازول به طور هم‌زمان مقاوم بودند که ۶۰ درصد (۹ باکتری از ۱۵ باکتری) از باکتری‌های کد کننده‌ی ژن bla_{CTX-M} و ۳۵ درصد (۷ باکتری از ۲۰ باکتری) از باکتری‌های دارای هر دو ژن bla_{TEM} و bla_{CTX-M} مقاومت هم‌زمان به سه آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، اسید نالیدیکسیک و کوتریموکسازول نشان دادند.

بحث

در این تحقیق تعداد بیشتری از جدایه‌های بتالاکتاماز مثبت، ژن bla_{CTX-M} (۹۷/۲ درصد) را کد می‌کردند و شیوع این ژن بیشتر از ژن bla_{TEM} (۵۸/۳ درصد) بود.

بتالاکتامازهای طیف وسیع CTX-M در سه ناحیه‌ی جغرافیایی آمریکای جنوبی، شرق دور و اروپای شرقی با شیوع غالب گزارش شده‌اند. در سال‌های اخیر این آنزیم‌ها در اروپای غربی، آمریکای شمالی، چین، ژاپن و هند هم گزارش شده‌اند. بتالاکتامازهای نوع CTX-M ممکن است فراوان‌ترین نوع بتالاکتاماز طیف وسیع در سراسر دنیا باشند. طبق بسیاری از گزارش‌ها تعداد بتالاکتامازهای نوع CTX-M به سرعت رو به افزایش است (۱). در گزارش‌هایی از فرانسه (۱۸)، سوئد (۱۹) و هند (۲۰) نیز شیوع این بتالاکتاماز بیشتر از باکتری‌های کدکننده‌ی ژن blaTEM بود. در یک تحقیق از ۱۸۸ اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های ادراری بیماران بستری و سرپایی از بیمارستان‌های تبریز مشخص شد که ۸۴/۱ درصد جدایه‌ها دارای ژن بتالاکتاماز تیپ CTX-M-1 هستند (۱۰). مطابق گزارش‌ها، بتالاکتامازهای نوع CTX-M، سفوتاکسیم را بیش از سفتازیدیم هیدرولیز می نمایند (۵). ۹۷/۳ درصد از جدایه‌های مولد بتالاکتاماز نوع CTX-M شناسایی شده در جامعه‌ی مورد نظر نسبت به سفوتاکسیم مقاوم و یا بینابینی بودند، در حالی که عدم حساسیت به سفتازیدیم، ۸۱ درصد و کمتر بود. در گزارش ناظمی و همکاران ۵۵/۹ درصد باکتری‌های اشریشیاکلی جدا شده، هر دو ژن bla_{CTX-M} و bla_{TEM} را داشتند (۲۱) که نتیجه‌ی به دست آمده بسیار شبیه نتیجه‌ی تحقیق حاضر است و هر دو حاکی از شیوع رو به افزایش باکتری‌های مولد بتالاکتاماز در کشورمان است. در گزارش ناظمی و همکاران (۲۱) شیوع ژن bla_{CTX-M} بیشتر از ژن bla_{TEM} بود (۶۸/۸ درصد در مقابل ۸۷/۱ درصد)، اما در تحقیق حاضر بر خلاف گزارش آنان شیوع ژن bla_{CTX-M} کمتر از ژن bla_{TEM} بود (۹۷/۲ در مقابل ۵۸/۳ درصد)، که به نظر می‌رسد در حال حاضر شیوع ژن bla_{CTX-M} رو به افزایش است و بر خلاف گزارش‌های قبلی بیشترین شیوع را دارد.

در تحقیق حاضر میزان مقاومت جدایه‌های مولد بتالاکتاماز طیف وسیع نسبت به کوتریموکسازول، اسید نالیدیکسیک ، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین بالا بود. مشابه تحقیق حاضر، مقاومت سویه‌های مولد ESBL به همراه مقاومت نسبت به کوتریموکسازول و سیپروفلوکساسین در مطالعات زیر گزارش شده است. در گزارش شاهچراغی و همکاران ۶۲/۴ درصد باکتری‌های اشریشیاکلی مولد ESBL که از ۶ بیمارستان تهران از نمونه‌های مختلف جدا شده بودند، مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند (۹). جدایه‌های مولد ESBL در تانزانیا مقاومت بالایی را به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین نشان دادند (۲۲). مقاومت جدایه‌های مولد ESBL به آنتی‌بیوتیک‌های غیربتالاکتام در مطالعه‌ای در هند عبارت از ۹۳/۸ درصد نسبت به سیپروفلوکساسین، ۷۹/۱ درصد به سولفامتوکسازول و ۱۴/۷ درصد به آمیکاسین بود (۲۰). احتمال دارد که ژن‌های کدکننده‌ی مقاومت در برابر این آنتی‌بیوتیک‌ها همراه ژن‌های ESBL منتقل می‌شوند. در تحقیقی در آمریکا از ۲۰ باکتری جدا شده‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک که از بیماران بستری در بیمارستان و یا خانه‌ی سالمندان جدا شده بودند، ۱۷ باکتری حاوی پلاسمید ۵۴ کیلوبازی بودند که مقاومت به سفتازیدیم را از طریق ESBL TEM-10 کد می‌کردند. این پلاسمید واسطه‌ی مقاومت به کوتریموکسازول، جنتامیسین و توبرامایسین نیز بود (۲۳).

بین جدایه‌های مولد بتالاکتاماز، انواع کدکننده‌ی ژن bla_{CTX} نسبت به جدایه‌های کدکننده‌ی هر دو ژن $bla_{TEM, CTX}$ مقاومت بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نشان دادند که احتمال دارد سویه‌های دارای ژن bla_{CTX-M} در مقایسه با سویه‌های دارای ژن bla_{TEM} شانس بیشتری را برای انتقال ژن مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در پلاسمید دارند که تأیید آن نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

حدود ۴۴ درصد جدایه‌های مولد بتالاکتاماز در این تحقیق، مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های غیر

بتالاکتام از نوع اسید نالیدیکسیک، سیپروفلوکساسین و کوتریموکسازول داشتند و درمان این عفونت‌ها با آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل ایمی‌پنم و نیتروفورانتوین توصیه می‌شود.

با توجه به درصد به نسبت بالای شیوع باکتری‌های مولد ESBL در عفونت‌های ادراری بیماران بستری، شناسایی این سویه‌ها در بین باکتری‌های اشریشیاکلی توصیه می‌شود. بدیهی است درمان عفونت این بیماران با کمک آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام توصیه نمی‌شود. همچنین احتمال دارد بسیاری از این باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتالاکتام مثل کوتریموکسازول، اسید نالیدیکسیک، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین مقاوم باشند که در این صورت درمان با آنتی بیوتیک‌هایی مثل ایمی‌پنم و نیتروفورانتوین توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد که بدین وسیله از مسؤولین و همکاران محترم این حوزه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Al-Jasser AM. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): a global problem. *Kuwait Medical Journal* 2006; 38(3): 171-85.
2. Bronson JJ, Barrett JF. Quinolone, everninomycin, glycylcycline, carbapenem, lipopeptide and cephem antibacterials in clinical development. *Curr Med Chem* 2001; 8(14): 1775-93.
3. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(9): 1697-704.
4. Kumar MS, Lakshmi V, Rajagopalan R. Occurrence of extended spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae spp. isolated at a tertiary care institute. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24(3): 208-11.
5. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 933-51, table.
6. Jacoby GA, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(1): 164-9.
7. Bean DC, Krahe D ,Wareham DW. Antimicrobial resistance in community and nosocomial Escherichia coli urinary tract isolates, London 2005-2006. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008; 7: 13.
8. Manges AR, Johnson JR, Foxman B, O'Bryan TT, Fullerton KE, Riley LW. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant Escherichia coli clonal group. *N Engl J Med* 2001; 345(14): 1007-13.
9. Shahcheraghi F, Nasiri S, Noveiri H. The survey of genes encoding beta-lactamases, in *Escherichia Coli* resistant to beta-lactam and non-beta-lactam antibiotics. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2009; 13(1): 230-7.
10. Soltan Dallal MM, Azarsa M, Shirazi MH, Rastegar Lari A, Owlia P, Mehrabadi JF, et al. The prevalence of extended-spectrum beta-lactamases and CTX-M-1 producing Escherichia coli in urine samples collected at Tabriz city Hospitals. *Tehran University*

Medical Journal (TUMJ) 2011; 69(5): 273-8.

11. Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Concurrent outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw hospital. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44(4): 489-99.
12. Cockerill FR, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement. 20th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
13. Schwaber MJ, Raney PM, Rasheed JK, Biddle JW, Williams P, McGowan JE, Jr., et al. Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum beta-lactamases in non-Escherichia coli and Non-Klebsiella spp. of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2004; 42(1): 294-8.
14. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 45(1): 1-11.
15. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289(1036): 321-31.
16. Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, et al. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol* 2003; 41(9): 4264-9.
17. Sundsfjord A, Simonsen GS, Haldorsen BC, Haaheim H, Hjelmevoll SO, Littauer P, et al. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *APMIS* 2004; 112(11-12): 815-37.
18. Lavigne JP, Marchandin H, Delmas J, Moreau J, Bouziges N, Lecaillon E, et al. CTX-M beta-lactamase-producing Escherichia coli in French hospitals: prevalence, molecular epidemiology ,and risk factors. *J Clin Microbiol* 2007; 45(2): 620-6.
19. Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among Escherichia coli isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol* 2008; 46(2): 707-12.
20. Goyal A, Prasad KN, Prasad A, Gupta S, Ghoshal U, Ayyagari A. Extended spectrum beta-lactamases in Escherichia coli & Klebsiella pneumoniae & associated risk factors. *Indian J Med Res* 2009; 129(6): 695-700.
21. Yazdi M, Nazemi A, Mir inargasi M, Khataminejad MR, Sharifi S, Babai kochkaksaraei M. Prevalence of SHV/CTX-M/TEM (ESBL) beta-lactamase resistance genes in *Escherichia Coli* isolated from urinary tract infections in Tehran, Iran. *Medical Laboratory Journal* 2010; 4(1): 48-54.
22. Ndugulile F, Jureen R, Harthug S, Urassa W, Langeland N. Extended spectrum beta-lactamases among Gram-negative bacteria of nosocomial origin from an intensive care unit of a tertiary health facility in Tanzania. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 86.
23. Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, Goering RV, Nathan C, Bush K, et al. Multiple antibiotic-resistant Klebsiella and Escherichia coli in nursing homes. *JAMA* 1999; 281(6): 517-23.

Antibiotic Susceptibility and Multi-drug Resistance of *Escherichia coli* Isolates Producing CTX-M and TEM Type Beta-lactamases in Mashhad, Iran, in 2010

Nakhaei Moghadam M., Ph.D.,[*1] Forghanifard M.M., Ph.D.[2]

1. Assistant Professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

2. Assistant Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

* Corresponding author; e-mail: m.nakhaei@,mshdiau.ac.ir

(Received: 8 August 2011 Accepted: 14 Feb. 2012)

Abstract

Background & Aims: One of the most common causes of bacterial resistance to beta-lactam antibiotics is beta-lactamase producing. The aim of this study was to compare the antibiotic resistance of urinary *Escherichia coli (E. coli)* isolates producing CTX-M and TEM type beta-lactamases, and to determine the strains with co-resistance to multiple antibiotics in Mashhad, Iran.

Methods: *E. coli* bacteria were isolated from urine samples of hospitalized patients referred to two selected hospitals in Mashhad, Iran, in 2010. The bacteria were identified by differential biochemical tests and confirmed using Microgene Kit tests. The antibiotic assay was performed by disk diffusion method. Double disk approximation and phenotypic confirmatory test were carried out for screening ESBLs. Plasmids of ESBL-producers were extracted. TEM and CTX-M type beta-lactamase-producing bacteria were identified using the polymerase chain reaction (PCR).

Results: The percentage of bacteria with $bla_{CTX\text{-}M}$ gene was more than bla_{TEM} (97.2% vs. 58.3%). Of the 36 bacteria producing ESBL, 20 isolates had both genes. Resistance to cefotaxime was more than ceftazidime among the isolates. A greater percentage of isolates with $bla_{CTX\text{-}M}$ gene were resistant or intermediate to non-lactam antibiotics; nalidixic acid, ciprofloxacin, nitrofurantoin, and gentamicin ($P<0.05$) in comparison with the isolates encode $bla_{TEM,CTX}$ genes. 16 of 36 ESBL-producers (44.4%) were co-resistant to ciprofloxacin, nalidixic acid and co-trimoxazole (nine isolates encode $bla_{CTX\text{-}M}$ and eight encode both genes, $bla_{TEM,CTX}$).

Conclusion: The results indicated that the prevalence of $bla_{CTX\text{-}M}$ gene was higher than bla_{TEM} in the studied population and the bacteria encoding $bla_{CTX\text{-}M}$ gene had a great resistance to gentamicin and likely the gene of resistance to gentamicin could be transmitted with $bla_{CTX\text{-}M}$ gene.

Keywords: *Escherichia coli*, Beta-lactamase, Antibiotic resistance, CTX-M, TEM, PCR

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2012; 19(4): 375-383