

## Relationship between presence of genes encoding ESBLs and antimicrobial susceptibility pattern in *Escherichia coli* clinical isolates

Mohsen Mirzaee<sup>1</sup>, Roohangiz Eftekhari<sup>2</sup>, Neda Taghizadeh<sup>3</sup>, Mohammad Reza Mehrabi<sup>1</sup>

1. Department of Laboratory Sciences, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran

2. Microbiology ward, Emmam khomeni Hospital. Boroujerd, Iran

3. Department of Microbiology, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2014/11/14

Accepted: 2015/02/19

Available online: 2016/03/10

#### Article Subject:

Antibiotic Resistance

IJMM 1395; 10(1): 8-15

#### Corresponding author at:

Dr. Mohsen Mirzaee

Dept. of Laboratory Sciences,  
Boroujerd Branch, Islamic  
Azad University, Boroujerd,  
Iran.

#### Tel:

+98 66 42513054

#### Email:

Mohsen1439@yahoo.com

### Abstract

**Background and Aim:** *Escherichia coli* harboring extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLs) are significantly resistant to other antibiotics and caused several health problems. The present study was carried out to characterize the ESBL types and to determine their pattern of resistance to four antimicrobial agents in clinical isolates of *E. coli*.

**Materials and Methods:** During April 2012 to May 2013, 500 clinical isolates of *E. coli* were collected from two hospitals in Boroujerd. Phenotypic screening and confirmation tests for ESBL detection and antibiotic susceptibility testing were performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Minimum inhibitory concentration of imipenem, meropenem, amikacin and ceftriaxone was determined by the E-test method. All ESBLs producing isolates were examined for presence of the TEM, SHV and CTX-M genes by PCR method.

**Results:** All of the studied isolates were susceptible to imipenem and meropenem. Additionally, among ESBLs producer isolates good susceptibility to amikacin and ceftriaxone ( $P$ -value  $< 0.05$ ) was observed. The prevalence of the TEM, SHV and CTX-M genes among 190 ESBLs producing isolates was as follows: TEM positive: 61 (32.1%), SHV positive: 60 (31.6%) and CTX-M: 62 (32.6%). TEM, SHV and CTX-M genes occurred together in 25 (13.1%) of the isolates.

**Conclusions:** The high prevalence of *E. coli* producing ESBL in Boroujerd hospitals reported. More than one ESBL was produced by many isolates, and this was correlated with increased resistance levels. Carbapenems continue to show good in vitro activity agent ESBLs producing organism.

**Key Words:** *Escherichia coli*, Beta-lactamases, Carbapenems

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Mirzaee M, Eftekhari R, Taghizadeh N, Mehrabi M R. Relationship between presence of genes encoding ESBLs and antimicrobial susceptibility pattern in *Escherichia coli* clinical isolates. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (1) :8-15.

## ارتباط بین حضور ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف و الگوی حساسیت ضد میکروبی در جدایه‌های بالینی اشریشیاکلی

محسن میرزایی<sup>۱</sup>، روح انگیز افتخاری<sup>۲</sup>، ندا تقی زاده<sup>۳</sup>، محمدرضا مهربایی<sup>۱</sup>

۱. گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

۲. بخش میکروبی شناسی، بیمارستان امام خمینی، بروجرد، ایران

۳. گروه میکروبی شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و هدف:** اشریشیاکلی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) به دلیل مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مشکلات درمانی فراوانی را ایجاد نموده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی حضور انواع ژن‌های مولد ESBLs در جدایه‌های بالینی اشریشیاکلی و تعیین الگوی مقاومت آنها در برابر آمیکاسین، سفتریاکسون، ایمپنم و مروپنم می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** ۵۰۰ جدایه بالینی اشریشیاکلی طی فروردین ۱۳۹۱ تا اردیبهشت ۱۳۹۲ از دو بیمارستان شهرستان بروجرد جمع‌آوری شدند. آزمایش‌های غربالگری، تائید تولید ESBLs و حساسیت ضد میکروبی طبق دستورالعمل‌های CLSI انجام گرفت. حداقل غلظت مهارکننده (MICs) ایمپنم، مروپنم، سفتریاکسون و آمیکاسین توسط روش E-test تعیین گردید. تمامی جدایه‌های مولد ESBLs، با روش PCR از نظر حضور ژن‌های TEM، SHV و CTX-M بررسی شدند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان‌دهنده تمام جدایه‌های مورد بررسی نسبت به ایمپنم و مروپنم حساس بودند. علاوه بر این در بین جدایه‌های مولد ESBLs حساسیت مناسبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین و سیپروفلوکساسین ( $P\text{-value} < 0/05$ ) مشاهده گردید. در ۱۹۰ جدایه مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف، فراوانی ژن‌های ESBLs به ترتیب: ۶۲ جدایه (۳۲/۶٪) واجد ژن CTX-M، ۶۱ جدایه (۳۲/۱٪) واجد ژن TEM و ۶۰ جدایه (۳۱/۶٪) واجد ژن SHV بودند. ۲۵ جدایه (۱۳/۱٪) حامل ژن‌های TEM، SHV و CTX-M بودند.

**نتیجه‌گیری:** شیوع بالای تولید ESBLs در اشریشیاکلی جدا شده از بیمارستان‌های شهر گزارش می‌شود. این پدیده با افزایش میزان مقاومت جدایه‌های حاوی چند ژن در ارتباط می‌باشد. نتایج بدست آمده نشان داد، کاربامپنم‌ها همچنان از تأثیر مناسبی روی جدایه‌های مولد ESBLs برخوردار هستند.

**کلمات کلیدی:** اشریشیاکلی، بتالاکتامازها، کاربامپنم‌ها

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران محفوظ است.

### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۲۳

پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۹

انتشار آنلاین: ۱۳۹۴/۱۲/۲۱

### موضوع:

مقاومت پادزیستی

IJMM 1395; 10(1): 8-15

### نویسنده مسئول:

دکتر محسن میرزایی

گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد،  
دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

تلفن: ۰۶۶۴۲۵۱۳۰۵۴

### پست الکترونیکی:

Mohsen1439@yahoo.com

### مقدمه

بتالاکتامازها مانند اسید کلاولانیک مهار می‌شوند (۲). بتالاکتامازهای وسیع الطیف اغلب توسط پلاسمیدها منتقل می‌شوند و در اثر ایجاد جهش در ژن‌های TEM و SHV کلاسیک و باواسطه جایگزینی اسیدهای آمینه در جایگاه فعال این آنزیم‌ها توسعه می‌یابند (۳). اولین ارگانسیم تولیدکننده ESBLs از اعضای خانواده انتروباکتریاسه در سال ۱۹۸۳ در آلمان شناسایی گردید، از آن زمان به بعد افزایش روزافزون این سویه‌ها در سراسر جهان گزارش گردیده است (۴). بخشی از جدایه‌های تولیدکننده TEM و SHV هم‌زمان آنزیم‌های CTX-M را نیز تولید می‌نمایند (۵). بتالاکتامازهای CTX-M فعالیت بسیار بالایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌هایی از قبیل سفتریاکسون و سفوتاکسیم در مقایسه

روش‌های مختلفی توسط باکتری‌ها به کار گرفته می‌شود تا از اثرات زیان‌بار آنتی‌بیوتیک‌ها مصون بمانند یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها که در باکتری‌های گرم منفی علیه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به کار گرفته می‌شود تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی است (۱). بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs: Extended-Spectrum Beta-Lactamases) گروه بزرگ و در حال رشدی از آنزیم‌های بتالاکتاماز هستند که توسط باکتری‌های گرم منفی تولید می‌شوند. این آنزیم‌ها توانایی هیدرولیز تمامی سفالوسپورین‌ها و آزترونام را داشته و توسط مهارکننده‌های

جدول ۱: ترادف پرایمرهای مورد استفاده و برنامه PCR به منظور تکثیر ژنهای SHV، TEM و CTX-M

منبع	شرایط PCR	اندازه محصول (جفت باز)	توالی پرایمرها	ژنهای هدف
۳	94 °C for 3 min 35×{94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C 1 min, 72 °C for 10 min}	۷۵۰	AGATCAGTTGGGTGCACGAG TGC TTAATCAGTGAG GCACC	TEM
۱۴	94 °C for 3 min 35×{94 °C for 1 min, 52 °C for 30 sec, 72 °C 1 min, 72 °C for 7 min}	۴۷۱	TCAGCGAAAAACACCTTG CCCGCAGATAAATCACCA	SHV
۲	94 °C for 3 min 25×{94 °C for 30 sec, 55 °C for 30 sec, 72 °C 1 min, 72 °C for 7 min}	۴۹۹	GACGAT GTC ACT GGC TGAGC AGC CGCCGACGCTAATACA	CTX-M

سفتزیاکسون، ایمی پنم و مروپنم می‌باشد.

### روش بررسی

در یک مطالعه توصیفی-تحلیلی ۵۰۰ جدایه بالینی اشریشیاکلی طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۲ از دو بیمارستان در شهرستان بروجرد جمع‌آوری شدند. این جدایه‌ها بعد از انتقال از بیمارستان به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد بروجرد با انجام تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل چگونگی تخمیر قندها در محیط TSI، بررسی تولید اندول و حرکت در محیط SIM و واکنش در محیط VP و MR و رشد در محیط سیمون سترات و اوره آگار و در نهایت بررسی نتایج با استفاده از جداول استاندارد تعیین هویت گردیدند (۱۱).

### آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی

#### آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مورد بررسی نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک سفتزیدیم (۳۰ μg)، سفتریاکسون (۳۰ μg)، آمیکاسین (۳۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg)، پیراسیلین (۱۰۰ μg)، تراسایکلین (۳۰ μg)، کوتریموکسازول (۲۳/۷۵+۱/۲۵ μg)، سفپیم (۳۰ μg)، ایمی پنم (۱۰ μg) و آزترنونام (۳۰ μg) (Mast. UK) با استفاده از روش Kirby-Bauer، طبق دستورالعمل انستیتو استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) انجام شد (۱۲). در این روش، سوسپانسیونی از باکتری با کدورتی معادل استاندارد نیم مک فارلند در محیط مولر هینتون برات تهیه کرده، سپس با استفاده از سواب استریل روی سطح محیط مولر هینتون آگار تلقیح و دیسک‌ها بافاصله مناسب روی سطح محیط قرار داده شدند. هاله عدم رشد هر یک از دیسک‌ها بعد از گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شدند.

با سفتزیدیم نشان می‌دهند، ولی جهش‌های نقطه‌ای می‌تواند باعث افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در برابر سفتزیدیم نیز شود (۶). عفونت‌های ناشی از ارگانیزم‌های مولد ESBLs، ممکن است با کاربپنم‌ها، آمینوگلیکوزیدها، سولفونامیدها و فلوروکینولونها درمان شوند. با این حال، پلاسمیدهای حاوی ژن‌های کدکننده ESBLs اغلب می‌توانند حاوی ژن‌های کدکننده مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها، سولفونامیدها و فلوروکینولون‌ها نیز باشند؛ بنابراین، این داروها ممکن است در برابر سویه‌های مولد ESBLs کمتر مؤثر باشند. با این حال، گزارشات نشان می‌دهد که چنانچه این در آزمایش‌های تعیین حساسیت ضد میکروبی، حساس باشند. این داروها می‌توانند گزینه‌های درمانی مناسب برای درمان عفونت‌های ناشی از ارگانیزم‌های تولیدکننده ESBLs در نظر گرفته شوند (۸، ۷). کاربپنم‌ها از قبیل ایمی پنم و مروپنم داروهای انتخابی هستند که به منظور درمان عفونت‌های ناشی از ارگانیزم‌های مولد ESBLs بکار برده می‌شوند (۹). متأسفانه در سال ۱۹۹۷ برای نخستین بار سویه‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده ESBL که به ایمی پنم نیز مقاومت داشتند، جدا شدند. این سویه‌ها حاوی بتالاکتامازهای نوع AmpC بودند (۱۰). بدین ترتیب، درمان عفونت‌های اعضای خانواده انتروباکتریاسه، خصوصاً عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف یک مشکل جدی محسوب می‌شود. شناسایی ژن‌های شایع مولد ESBLs از قبیل TEM، SHV و CTX-M با استفاده از روش‌های مولکولی در باکتری‌های تولیدکننده ESBLs و بررسی الگوی مقاومت دارویی آن‌ها می‌تواند اطلاعات مفیدی در خصوص اپیدمیولوژی و درمان ضد میکروبی منطقی در برابر ارگانیزم‌های مولد ESBLs فراهم نماید (۳).

هدف از مطالعه حاضر بررسی حضور انواع ژن‌های مولد ESBLs در جدایه‌های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران و تعیین الگوی مقاومت آن‌ها در برابر چهار آنتی‌بیوتیک آمیکاسین،

## تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MICs)

حداقل غلظت مهارکننده (MICs) آنتی‌بیوتیک‌های ایمی پنم، مروپنم، سفتریاکسون و آمیکاسین با استفاده از روش (AB Biodisk, E-test (Solna, Sweden طبق دستورالعمل شرکت سازنده تعیین گردید. معیارهای تفسیری مورد استفاده شامل دستورالعمل شرکت سازنده نوارهای E-test و انستیتو استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) بود. در این مطالعه از اشريشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲، کلبسیلا پنومونیه ATCC ۷۰۰۶۰۳ و سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ به عنوان سویه‌های کنترل به منظور کنترل صحت و دقت آزمایش‌های تعیین MIC استفاده گردید.

## شناسایی و تأیید تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف

به منظور شناسایی باکتری‌های تولیدکننده ESBLs در ابتدا آزمون غربالگری طبق دستورالعمل CLSI با استفاده از دیسک آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و سفنازیدیم انجام گردید. برای انجام این کار از سری دیسک‌های سفنازیدیم  $30 \mu\text{g}$  و سفنازیدیم-کلاوولانیک اسید  $30/10 \mu\text{g}$ ، سفوتاکسیم  $30 \mu\text{g}$  و سفوتاکسیم-کلاوولانیک اسید  $30/10 \mu\text{g}$  و روش انتشار از دیسک استفاده شد. سپس پلیت‌ها در انکوباتور  $37^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و قطر هاله عدم رشد اطراف هر عامل به تنهایی و در ترکیب با اسید کلاوولانیک سنجیده شد. افزایش  $5 \text{ mm} \leq$  قطر هاله دیسک‌های ترکیبی با کلاوولانیک اسید نسبت به دیسک‌های فاقد کلاوولانیک اسید نشان‌دهنده این بود باکتری مولد ESBLs در نظر گرفتیم. در این روش از اشريشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲، کلبسیلا پنومونیه ATCC ۷۰۰۶۰۳ به عنوان سویه‌های کنترل به منظور کنترل صحت و دقت آزمایش استفاده گردید.

## شناسایی ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف

واکنش PCR برای شناسایی ژن‌های SHV، TEM و CTX-M در ۱۹۰ جدایه اشريشیاکلی (به عنوان تولید کننده ESBLs در

روش فوتیپی مورد شناسایی قرار گرفت) انجام شد. DNA الگو با استفاده از روشی که در ادامه می‌آید، جداسازی شدند: کشت تازه از ارگانسیم‌های مورد بررسی و سویه‌های کنترل را در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به حالت سوسپانسیون در آورده و در دمای  $95^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند، سپس به منظور برداشتن بقایای سلولی از سانتی‌فیوژ در دور ۸۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه استفاده گردید و از مایع رویی باقی مانده به عنوان منبع DNA الگو استفاده گردید (۲). مخلوط اصلی مورد استفاده برای واکنش PCR شامل:  $2/5$  میکرولیتر بافر PCR،  $2/5$  میکرولیتر از  $25 \text{ mM MgCl}_2$ ،  $2/5$  میکرولیتر از  $2 \text{ mM dNTPs}$  و  $0/3$  میکرولیتر آنزیم Taq پلی مراز،  $10/2$  میکرولیتر آب مقطر و  $1$  میکرولیتر از هر یک از پرایمرها مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت بعد ساخته شدن مخلوط اصلی در لوله‌های تکنی مجزا  $5$  میکرولیتر از DNA استخراج شده به هر یک از لوله‌ها اضافه شده و حجم نهایی معادل  $25$  میکرولیتر ایجاد می‌شود. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندرف (Master cycler® gradient) انجام گرفت. لیست پرایمرهای مورد استفاده و شرایط PCR برای هر یک از ژن‌های مورد بررسی در جدول ۱ آورده شده است (۱۴، ۳، ۲). برای مشاهده محصولات PCR، از ژل آگارز  $1/5\%$  با استفاده از بافر  $0/5 \times$  TBE بکار برده شد. برای تعیین اندازه محصولات PCR از مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Qiagen) استفاده شد.

## آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها و نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و نرم افزار Excel ۲۰۱۰ انجام گرفت و  $P\text{-value} < 0/05$  از نظر آماری با اهمیت و معنی دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

### حساسیت ضد میکروبی

جدول ۲: انتشار  $MIC_{50}$  و  $MIC_{90}$  آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بین جدایه‌های اشريشیاکلی مورد بررسی

آنتی‌بیوتیک	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	درصد جدایه‌های غیر حساس	P-value *
ایمی پنم	۱-۰/۵	۰/۰۴	۰/۰۵	۰	۰
مروپنم	۰/۴-۰/۰۰۴	۰/۲	۰/۴	۰	۰
آمیکاسین	> ۲۵۶ - ۰/۰۴	۴	۱۶	۲۲	۰/۰۰۳۳
سفتریاکسون	> ۲۵۶ - ۰/۰۰۸	> ۲۵۶	۲۵۶	۴۴	۰/۹۱۲

\* (P value > ۰/۰۵) نشان دهنده تفاوت معنی دار می‌باشد.

جدول ۳: توزیع انواع ژن‌های مولد ESBLs و الگوی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی بر مبنای حضور ژن‌های مختلف در جدایه‌های اشریشیاکلی مورد بررسی

* P-value	TEM/SHV/CTX-M N= 25	SHV/CTX-M N= 32	TEM/CTX-M N= 35	TEM/SHV N= 35	CTX-M N= 62	SHV N= 60	TEM N= 61	ژن‌ها
	آنتی‌بیوتیک							
	تعداد جدایه‌ها و درصد مقاومت							
$P = 0/779$	٪۱۰۰ (۲۵)	٪۱۰۰ (۳۲)	٪۹۴/۲ (۳۳)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۸۹ (۵۵)	٪۱۰۰ (۶۰)	٪۹۳/۴ (۵۷)	سفتازیدیم
$P = 0/768$	٪۱۰۰ (۲۵)	٪۱۰۰ (۳۲)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۱۰۰ (۶۲)	٪۱۰۰ (۶۰)	٪۹۳/۴ (۵۷)	سفتریاکسون
$P = 0/345$	٪۲۸ (۷)	٪۱۲/۵ (۴)	٪۱۴/۲ (۵)	٪۱۴/۲ (۵)	٪۱۶/۱ (۱۰)	٪۱۸/۳ (۱۱)	٪۱۶/۳ (۱۰)	آمیکاسین
$P = 0/311$	٪۲۴ (۶)	٪۲۸/۱ (۹)	٪۲۰ (۷)	٪۲۰ (۷)	٪۱۷/۷ (۱۱)	٪۱۶/۶ (۱۰)	٪۱۳/۱ (۸)	سیپروفلوکساسین
$P = 0/754$	٪۱۰۰ (۲۵)	٪۱۰۰ (۳۲)	٪۹۴/۲ (۳۳)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۹۱/۹ (۵۷)	٪۱۰۰ (۶۰)	٪۹۵ (۵۸)	پیراسیلین
$P = 0/545$	٪۸۰ (۲۰)	٪۷۸ (۲۵)	٪۸۰ (۲۸)	٪۷۱/۴ (۲۵)	٪۸۲/۲ (۵۱)	٪۸۱/۶ (۴۹)	٪۷۸/۶ (۴۸)	تتراسایکلین
$P = 0/075$	٪۷۲ (۱۸)	٪۶۵/۶ (۲۱)	٪۵۴/۲ (۱۹)	٪۵۷/۱ (۲۰)	٪۳۵/۸ (۲۸)	٪۳۷/۵ (۲۷)	٪۳۳/۸ (۲۵)	کوتریماکسازول
$P = 0/812$	۱۰۰ (۲۵)	٪۱۰۰ (۳۲)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۱۰۰ (۶۲)	٪۱۰۰ (۶۰)	٪۱۰۰ (۶۱)	سفیتم
$P = 0$	٪۰	٪۰	٪۰	٪۰	٪۰	٪۰	٪۰	ایمی پنم
$P = 0/748$	۱۰۰ (۲۵)	٪۱۰۰ (۳۲)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۱۰۰ (۳۵)	٪۱۰۰ (۶۲)	٪۹۸/۳ (۵۹)	٪۹۶/۷ (۵۹)	آزترئونام

(-) نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار ( $P\text{-value} < 0/05$ ) می‌باشد.

مطابق نتایج حاصل از بررسی حساسیت ضد میکروبی، مروپنم، ایمی پنم، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین از تاثیر به مراتب بالاتری ( $P\text{-value} < 0/05$ ) در جدایه‌های مورد بررسی برخوردار بودند.

نتایج حاصل از آزمایش بررسی حساسیت ضد میکروبی نشان داد که ۱۹۰ جدایه (٪۳۸) مقاوم به سفتازیدیم، ۱۸۵ جدایه (٪۳۷) مقاوم به سفتریاکسون، ۱۱۰ جدایه (٪۲۲) مقاوم به آمیکاسین، ۱۰۵ جدایه (٪۲۱) مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۲۰۰ جدایه (٪۴۰) مقاوم به پیراسیلین، ۲۱۵ جدایه (٪۴۳) مقاوم به تتراسایکلین، ۳۲۰ جدایه (٪۶۴) مقاوم به کوتریماکسازول، ۱۷۵ جدایه (٪۳۵) مقاوم به آزترئونام و ۱۵۰ جدایه (٪۳۰) مقاوم به سفیتم و همه جدایه‌ها (٪۱۰۰) حساس به ایمی پنم بودند.

نتایج حاصل از واکنش PCR، فراوانی حضور ژن‌های TEM، SHV و CTX-M در ۱۹۰ جدایه مولد ESBLs مورد بررسی به ترتیب شامل ۶۲ جدایه (٪۳۲/۶) واجد ژن CTX-M، ۶۱ جدایه

از بین ۵۰۰ جدایه اشریشیاکلی مورد بررسی ۱۹۰ (٪۳۸) جدایه به عنوان ارگانیزم‌های تولید کننده ESBL مورد شناسایی قرار گرفتند. در جدول شماره ۲ توزیع مقادیر MIC<sub>۹۰</sub> و MIC<sub>۵۰</sub> آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی نشان داده شده است. نتایج حاصل از بررسی حساسیت ضد میکروبی در جدایه‌های مورد بررسی نشان داد که ٪۱۰۰ جدایه‌ها نسبت به ایمی پنم ٪۷۸، جدایه‌ها نسبت به آمیکاسین و ٪۵۶ نسبت به سفتریاکسون حساس بودند. علاوه بر این، جدایه‌های مولد ESBLs رنج مقاومت بالاتری را نسبت به چند آنتی‌بیوتیک در مقایسه با جدایه‌هایی که تولید کننده ESBL نبودند، نشان دادند.

از ۵۰۰ جدایه اشریشیاکلی ۳۶۰ (٪۷۲) جدایه از نمونه ادرار، ۵۰ (٪۱۰) جدایه از نمونه زخم، ۲۰ (٪۴) جدایه از نمونه تراشه، ۲۰ (٪۴) جدایه از نمونه خلط، ۲۵ (٪۵) جدایه از نمونه خون، ۱۰ (٪۲) جدایه از نمونه آبسه، ۱۰ (٪۲) جدایه از نمونه مایع مغزی و نخاعی، ۵ (٪۱) جدایه از نمونه بیوپسی جدا شدند.

(۳۲/۱٪) واجد ژن TEM و ۶۰ جدایه (۳۱/۶٪) واجد ژن SHV بودند و ۷ جدایه (۳/۷٪) مولد ESBL در روش فوتیوی واجد هیچ یک از ژن‌های مورد بررسی نبود. ۲۵ جدایه (۱۳/۱٪) واجد تمامی ژن‌های TEM، SHV و CTX-M بودند. به صورت کلی جدایه‌هایی که واجد هر سه ژن‌های TEM، SHV و CTX-M بودند، از مقاومت بالاتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها برخوردار بودند. نتایج حاصل از الگوی مقاومت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و حضور ژن‌های مختلف کد کننده بتالاکتامازها در جدول ۳ آورده شده است.

## بحث

امروزه افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های مختلف یک مشکل جدی در بحث درمان عفونت‌های ناشی از این میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. از این میان/شریشیاکلی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای ایجادکننده عفونت می‌باشد، به طوری که حدود ۶۰٪ باکتری‌های ناشی از/شریشیاکلی‌های مولد ESBLs منجر به مرگ می‌شود. به نظر می‌رسد یکی از عوامل مؤثر در انتشار و افزایش بروز این ارگانیسم‌ها مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله دسته بتالاکتام‌ها باشد (۱۵). قابل توجه است که همه ارگانیسم‌های مولد ESBLs به صورت قابل توجهی فقط به کاربامپنم‌ها حساس باقی مانده‌اند (۳). مطالعات و گزارش‌های متعددی در خصوص افزایش و شیوع رو به رشد ارگانیسم‌های مولد ESBLs از مناطق مختلف در کشور وجود دارد (۱۸-۱۶). به نحوی که افزایش شیوع ارگانیسم‌های مولد ESBLs باعث ایجاد نگرانی شده است. کاربامپنم‌ها به عنوان عوامل دارویی مناسب به منظور درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی دارای مقاومت چند دارویی مطرح می‌باشند (۱۹). خوشبختانه مقامت نسبت به کاربامپنم‌ها در کشور در بین اعضای خانواده اتروباکتریاسه در میزان پائینی قرار داشته و درمان موفق عفونت‌های مختلف با استفاده از این عوامل در بالین گزارش می‌گردد. گزارش‌های متعددی در خصوص الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی/شریشیاکلی جدا شده از مناطق جغرافیایی و بیمارستان‌های مختلف انتشار یافته است (۲۰)./شریشیاکلی‌های مولد ESBLs دیده شده که نسبت به تعداد زیادی از دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مقاوم می‌باشند. در مطالعه حاضر سطح بالایی از مقاومت نسبت به کوتریماکسازول و سطح متوسط از مقاومت نسبت به پیراسیلین و تتراسایکلین مشاهده شد، این در حالی است که حدود ۳۷٪ از جدایه‌های موجود در این مطالعه نسبت به سفنازیدیم و سفتریاکسون مقاوم بودند. همان‌طور که در مطالعه حاضر مشاهده می‌شود سفپیم و آزترئونام نیز دارای فعالیت ضد میکروبی تقریباً شبیه به سفنازیدیم و سفتریاکسون دارند.

در مطالعه حاضر، داروهایی از قبیل سیپروفلوکساسین و آمیکاسین

نشان داده شد که به صورت کاملاً معنی‌دار باعث مهار جدایه‌های مولد ESBLs می‌شوند. علاوه بر این، ایمی پنم و مروپنم آنتی‌بیوتیک بسیار مؤثر ( $P < 0/05$ ) در تمامی جدایه‌های مورد بررسی بود. نتایج مشابه نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر در خصوص حساسیت نسبت به فلوروکینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها در ارگانیسم‌های مولد ESBLs نیز گزارش گردیده است (۲۰، ۲). با توجه به مشاهده ما و سایر گزارش‌ها می‌توان پیشنهاد نمود که آنتی‌بیوتیک‌های از قبیل سیپروفلوکساسین و آمیکاسین نیز علاوه بر آنتی‌بیوتیک‌های دسته کاربامپنم‌ها می‌تواند در درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم‌ها در بالین مفید باشند. بتالاکتامازهای نوع CTX-M گروه بزرگی از بیش از ۳۰ ال ژنی هستند که در ۵ گروه فیلوژنیک قرار داده می‌شوند (۲۲). در بسیاری از کشورها گروه‌های مختلفی از آنزیم‌های CTX-M مشاهده می‌شود، با این حال با توجه به مطالعات متعددی که در ایران انجام گرفته CTX-M-۱۵ نوع غالب در ایران می‌باشد (۲۳). در مطالعه حاضر از ۱۹۰ جدایه مولد ESBLs مورد بررسی به ۶۲ جدایه (۳۲/۶٪) واجد ژن CTX-M بودند. فراوانی ژن‌های CTX-M در مطالعات مختلف صورت گرفته در کشور بسیار متفاوت می‌باشد که این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از انتشار کلونال ارگانیسم‌های مولد این آنزیم‌ها در مناطق و یا بیمارستان‌ها یا حتی بخش‌های مختلف باشد (۲). در مطالعه حاضر، فراوانی ژن‌های TEM و SHV در جدایه‌های مورد بررسی تقریباً به یک میزان بوده و ۳۵ جدایه (۱۸/۴٪) هم‌زمان حامل هر دو ژن TEM و SHV بودند و ۲۵ جدایه (۱۳/۱٪) واجد تمامی ژن‌های TEM، SHV و CTX-M بودند. نتایج بدست آمده از میزان MIC سفتریاکسون در جدایه‌هایی که حاوی هر سه ژن بودند  $\geq 128$  میکروگرم در میلی‌لیتر بود، حال آنکه این میزان در جدایه‌های حاوی یک ژن بین ۱۶-۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. از آنجا که پلاسمیدها غالباً می‌توانند ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و ژن‌های مولد ESBLs را هم‌زمان حمل نمایند، بین وجود مقاومت به این عوامل ممکن است رابطه معنی‌داری وجود داشته باشد. علاوه بر این، مقاومت کروموزومی نسبت به فلوروکینولونها در جدایه‌های مولد ESBLs در بین اعضای خانواده اتروباکتریاسه معمول می‌باشد (۲۴). همان‌طور که در مطالعه حاضر نیز مشخص گردید در جدایه‌هایی که تعداد ژن‌های بیشتری را داشتند مقاومت بیشتری نیز نسبت به آمیکاسین مشاهده می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط Ben-Ami و همکارانش انجام شد نیز مشابه مطالعه ما رنج مقاومت بالاتری نسبت به آمینوگلیکوزیدها در مقایسه با جدایه‌های غیر ESBLs مشاهده گردید (۲۵). در مطالعه‌ای که توسط Paterson و همکارانش انجام گرفته نیز مشابه مطالعه حاضر ارتباط زیادی بین مقاومت نسبت به فلوروکینولونها و تولید ESBLs مشاهده گردید (۲۶). حضور ژن‌های TEM، SHV

عفونت‌ها کمک نماید.

### تقدیر و تشکر

انجام این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد انجام گردیده است. بدین وسیله از زحمات این معاونت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

### تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

### Reference

1. Li Q, Lee JY, Castillo R, Hixon MS, Pujol C, Doppalapudi VR, et al. NB2001, a novel antibacterial agent with broad-spectrum activity and enhanced potency against  $\beta$ -lactamase-producing strains. *Antimicrob agents chemother.* 2002; 46(5):1262-8.
2. Mirzaee M, Owlia P, Mansouri S. Distribution of CTX-M  $\beta$ -lactamase genes among *Escherichia coli* strains isolated from patients in Iran. *Lab Med.* 2009; 40(12):724-7.
3. Geyer CN, Hanson ND. Rapid PCR amplification protocols decrease the turn-around time for detection of antibiotic resistance genes in Gram-negative pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;31;77(2):113-7.
4. Lina TT, Khajanchi BK, Azmi IJ, Islam MA, Mahmood B, Akter M, et al. Phenotypic and Molecular Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Bangladesh. *PloS one.* 2014;9(10):e108735.
5. Roschanski N, Fischer J, Guerra B, Roesler U. Development of a Multiplex Real-Time PCR for the Rapid Detection of the Predominant Beta-Lactamase Genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-Type AmpCs in Enterobacteriaceae. *PloS one.* 2014;9(7):e100956.
6. Pitout JD. Infections with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Drugs.* 2010;70(3):313-33.

و CTX-M به همراه عدم نفوذپذیری مناسب دارو در اثر تغییر در غشاء باکتری، ممکن است باعث ایجاد مقاومت نسبت به کاباپنم‌ها نیز شود (۲۷). احتمال بروز این واقعه در کشور ما که میزان مقاومت با واسطه ESBLs بالاست می‌تواند بسیار نگران‌کننده باشد. این امر نشان‌دهنده اهمیت درمان آنتی‌بیوتیکی منطقی، جلوگیری از گسترش این سویه‌ها در بیمارستان‌ها و درک پیامدهای بالینی ناشی از عفونت با ارگانسیم‌های مولد ESBLs می‌باشد. بالا بودن میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ارگانسیم‌های ایجادکننده عفونت‌های بالینی پیشنهادکننده بررسی مکانسیم‌های دخیل در ایجاد مقاومت و بررسی فعالیت ضد میکروبی داروهای جدید در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند به روند درمان مؤثر این

7. Shen D, Winokur P, Jones RN. Characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from Beijing, China. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;18(2):185-8.
8. Essack SY. Treatment options for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producers. *FEMS microbiol lett.* 2000;190(2):181-4.
9. Kanj SS, Kanafani ZA, editors. Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacteriaceae, carbapenem-resistant enterobacteriaceae, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clinic Proceedings;* 2011; 86 (3): 250-259.
10. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob agents chemother.* 1997;41(3):563-9.
11. P. Bailey & Scott's. diagnostic microbiology. 13rd ed. Elsevier Health Sciences; 2013.
12. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne PM-S.
13. Hanson ND, Thomson KS, Moland ES, Sanders CC, Berthold G, Penn RG. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. *J Antimicrob Chemother.*

1999;44(3):377-80.

14. Zaniani FR, Meshkat Z, Nasab MN, 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.

15. 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.

16. Mansouri S, Neyestanaki DK, Shokoohi M, Halimi S, Beigverdi R, Rezagholezadeh F, et al. Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs types of  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* producing Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases in Kerman, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2014;7(2): 12-16.

17. Moghaddam MN, Beidokhti MH, Jamehdar SA, Ghahraman M. Genetic properties of blaCTX-M and blaPER  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae by polymerase chain reaction. *Iran J Basic Med Sci*. 2014;17(5):378.

18. Ghasemi Y, Archin T, Kargar M, Mohkam M. A simple multiplex PCR for assessing prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* in Intensive Care Units of a referral hospital in Shiraz, Iran. *Asian Pac J Trop Dis*. 2013;6(9):703-8.

19. Patel TS, Nagel J. Clinical Outcomes of Enterobacteriaceae Infections Stratified by Carbapenem Minimum Inhibitory Concentrations. *J clin microbiol*. 2014;JCM. 03057-14.

20. Kazemnia A, Ahmadi M, Dilmaghani M. Antibiotic Resistance Pattern of Different *Escherichia coli* Phylogenetic Groups Isolated from Human Urinary

Tract Infection and Avian Colibacillosis. *Iran Biomed J*. 2014;18(4):219-24.

21. Moayednia R, Shokri D, Mobasherizadeh S, Baradaran A, Fatemi SM, Merrikhi A. Frequency assessment of  $\beta$ -lactamase enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates in patients with urinary tract infection. *J Res Med Sci*. 2014:S41.

22. Mirzaee M, Pourmand M, Chitsaz M, Mansouri S. Antibiotic Resistance to Third Generation Cephalosporins Due to CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Clinical Isolates of *Escherichia coli*. *Iran J Public Health*. 2009;38(1):10-7.

23. Peerayeh SN, Rostami E, Siadat SD, Derakhshan S. High Rate of Aminoglycoside Resistance in CTX-M-15 Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Tehran, Iran. *Lab Med*. 2014;45(3):231-7.

24. Serefhanoglu K, Turan H, Timurkaynak FE, Arslan H. Bloodstream infections caused by ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*: risk factors for multidrug-resistance. *Braz J Infect Dis*. 2009;13(6):403-7.

25. Ben-Ami R, Schwaber M, Navon-Venezia S, Schwartz D, Giladi M, Chmelnitsky I, et al. Influx of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase—Producing Enterobacteriaceae into the Hospital. *Clin Infect Dis*. 2006;42(7):925-34.

26. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, Mohapatra S, Trenholme GM and et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2000; 30(3):473-8.

27. Livermore DM, Sefton AM, Scott GM. Properties and potential of ertapenem. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(3):331-44.