مقـــاله تحقیقی

# بررسی فراوانی بتالاکتامازهای تیپ VEB1 و CTX–M9 در سویه های E.coli جدا شده از نمونه های بالینی به روش PCR

مهدی رشدی ملکی[1*]، محمد فتحی[2]، جاوید تقی نژاد[2]، آیدا غفارزاده[3]

[1] استادیار میکروبیولوژی، واحد ملکان، دانشگاه آزاد اسلامی، ملکان، ایران.

[2] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، واحد ملکان، دانشگاه آزاد اسلامی، ملکان، ایران.

[3] کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

* نشانی نویسنده مسئول:

استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد ملکان، دانشگاه آزاد اسلامی، ملکان، ایران.

نشانی الکترونیک:
mehdiroshdi@gmail.com

## چکیده

**زمینه:** باکتری E.coli از جمله باکتری های تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز می‌باشد. این باکتری از خانواده انتروباکتریاسه بوده که سبب عفونت‌های مجاری ادراری، بیمارستانی و منتژیت نوزادان می شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی ژن‌های CTX-M9 و VEB1 مولد بتالاکتاماز در نمونه های ادراری می باشد.

**روش کار:** در این مطالعه تعداد ۱۸۰ سویه E.coli از نمونه های ادرار بیمارستان های شهر میاندوآب جداسازی شدند و با استفاده از تست آنتی بیوگرام حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی آنها مورد بررسی قرار گرفت. سویه های تولید کننده ESBL با استفاده از دیسک های ترکیبی مورد شناسایی قرار گرفتند و برای بررسی بتالاکتامازهای CTX-M9 و VEB1 از روش مولکولی PCR استفاده شد.

**یافته ها:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ۹۱ سویه (۵۱ درصد) از نظر تولید ESBL مثبت بودند. میزان مقاومت سویه های جداسازی شده‌ی E.coli نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید و کوتریموکسازول به ترتیب ۵۶ و ۴۷ درصد بود. همچنین میزان حساسیت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین ۶۳ درصد مشاهده شد. ژن bla VEB-1 با میزان ۵۱ درصد در سویه های تولید کننده ESBL به عنوان بیشترین ژن گزارش گردید.

**نتیجه گیری:** bla VEB-1 و bla CTX-M-9 در جدایه های ESBL به ترتیب شایع ترین بودند و این آنزیم ها نقش مهمی در مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام ایفا می‌کنند.

**واژه‌گان کلیدی:** ESBL، E.coli، bla VEB-1، bla CTX-M-9، روش مولکولی PCR

## مقدمه

عفونت‌های ادراری یکی از شایع ترین بیماری‌های عفونی در سراسر جهان است. E.coli به عنوان عامل بسیاری از عفونت های بیمارستانی از قبیل گاستروانتریت، منتژیت نوزادی، سپسیس و عفونت‌های ادراری شناخته شده است (۱ , ۲). اگر چه اکثر بیماری های باکتریایی با اقدامات پیشگیرانه مانند واکسیناسیون از بین رفته اند ولی عفونت های مجاری ادراری (Urinary Tract Infections) به عنوان شایع ترین عفونت های باکتریایی در بزرگسالان و کودکان به یک مشکل بزرگ بهداشتی در سراسر جهان تبدیل شده است. عامل بیش از ۸۰ درصد از عفونت‌های ادراری سویه های E .coli می‌باشد (۵-۳). اشریشیا کلی از خانواده انتروباکتریاسه از بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین باسیل‌های گرم منفی را شامل می‌شود. این باکتری شایع‌ترین عامل عفونت های ادراری و بیمارستانی می‌باشد و مهمترین اهمیت باکتری کسب مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌باشد (۶).

در حال حاضر مقاومت‌های ضد میکروبی در میان باکتری‌ها، یک تهدید جدید برای مدیریت بیماری‌های عفونی در سطح جهان است. افزایش شیوع مقاومت در بسیاری از عوامل بیماری‌زا در طول سال ها در مناطق مختلف جهان از جمله کشورهای در حال توسعه گزارش شده است. این افزایش مقاومت، سبب تغییر ویژگی‌های نسبت داده شده در محیط‌های انتخابی و استفاده از عوامل ضد میکروبی و همچنین تغییر محیط‌های اجتماعی و تکنولوژیکی موجب افزایش و انتقال مقاومت در برابر داروها خواهند شد که اگر چه مقاومت ضد میکروبی یک پدیده بیولوژیکی طبیعی است، اغلب به عنوان یک نتیجه از سازگاری عوامل عفونی به افزایش در معرض قرار گرفتن آنتی بیوتیک ها می باشد. اکنون پذیرفته شده که استفاده از داروهای ضد میکروبی تنها عامل مهم مسئول افزایش مقاومت ضد میکروبی است (۷ , ۸).

در بین مقاومت‌های دارویی، مقاومت به داروهای ضد میکروبی بتالاکتام (β-lactam) نگرانی اصلی برای درمان عفونت‌های میکروبی می‌باشد. مکانیسم اصلی مقاومت باکتریایی در برابر آنتی بیوتیک های بتالاکتام، تولید آنزیم های بتالاکتاماز می‌باشد. این آنزیم‌ها آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام را قبل از این که به پروتئین‌های باند شونده به پنی سیلین (PBP: Penicillin binding proteins) در غشای سیتوپلاسمی برسند، هیدرولیز و غیر فعال می‌کنند. بتالاکتاماز های وسیع‌الطیف دسته ای از آنزیم های بتالاکتاماز هستند که اهمیت ویژه‌ای در درمان ضد میکروبی دارند (۹).

این آنزیم ها قادر به هیدرولیز کامل اکسی مینو- بتالاکتام ها از قبیل نسل سوم سفالوسپورین‌ها می‌باشند. میزان تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) در میان انتروباکتریاسه در سراسر جهان متفاوت می‌باشد. در یک مطالعه که اخیراً توسط بانک اطلاعاتی منتشر شده، بیشترین میزان تولید ESBL به ترتیب توسط K. pneumoniae و E.coli صورت می‌گیرد. عفونت‌های ادراری توسط باکتری‌های E.coli تولید کننده ESBL در سراسر جهان همواره رو به افزایش است (۱۳-۱۰).

بتالاکتامازها ممکن است در سایر باکتری‌های گرم منفی مانند سودوموناس آئروژینوزا و سایر انتروباکتریاسه نیز حضور داشته باشند. این ارگانیسم‌ها به دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی خصوصاً بصورت چند دارویی مشکلات بسیاری را برای درمان عفونت‌های ناشی از آن ها ایجاد کرده است و تهدیدی جدی محسوب می شوند. بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در تمام نقاط جهان پراکنده اند، اما فراوانی باکتری‌های مولد آنها در نقاط مختلف متفاوت است. باکتری های مولد ESBL علاوه بر ایجاد عفونت های بیمارستانی به راحتی در جامعه انتشار یافته و یکی از مشکلات دنیای امروزی محسوب می‌شود (۱۴).

مطالعه حاضر تحت عنوان بررسی فراوانی بتالاکتامازهای تیپ VEB1 و CTX-M9 در باکتری های E.coli جدا شده از نمونه‌های ادراری به روش PCR انجام گرفت.

## روش کار

این مطالعه توصیفی-تحلیلی مقطعی در یک بازه زمانی ۸ ماهه از اردیبهشت ۱۳۹۹ تا آذر ۱۳۹۹ در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ملکان در استان آذربایجان شرقی انجام شد. این مطالعه حاصل پایان‌نامه دانشجویی مقطع کارشناسی‌ارشد به کد ۲۸۰۲۹۵۰۷۰۱۸۱۶۵۳۱۶۲۳۰۶۲۵۲ است که در سامانه پژوهشیار دانشگاه آزاد اسلامی به ثبت رسیده است. مطالعه حاضر بر روی تعداد ۳۴۷ خانم که با علائم مشکوک به عفونت ادراری به آزمایشگاه های بیمارستان‌های شهر میاندوآب در استان آذربایجان غربی مراجعه کرده بودند، انجام گرفت. نمونه‌های ادرار میانی در محیط های کشت EMB و Blood Agar کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. بر روی کشت‌های مثبت ($>10^5$CFU/ml) آزمون‌های بیوشیمیایی (IMVIC) انجام گرفت تا گونه های E.coli شناسایی شوند. از کشت‌های مثبت E.coli سوسپانسیون ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد. حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار دیسک یا کربی بائر (Kirby-Bauer) و بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار انجام گرفت. آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این مطالعه شامل جنتامایسین (۱۰µgr)، کوتریموکسازول (۱/۲۵µgr)، نالیدیکسیک اسید (۳۰µgr)، سیپروفلوکساسین (۵µgr)، سفپیم (۳۰µgr)، سفوتاکسیم (۳۰µgr)، ایمی‌پنم (۱۰µgr)، سفتازیدیم (۳۰µgr)، آموکسی سیلین (۳۰µgr) بودند که از شرکت پادتن طب تهیه شد.

میزان حساسیت یا مقاومت به آنتی بیوتیک ها بر اساس روش جدول استاندارد CLSI گزارش شد.

به منظور جداسازی سویه های مولد بتالاکتاماز های وسیع‌الطیف از روش دیسک ترکیبی (Combined disc) استفاده شد. برای این منظور سویه های جداسازی شده روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند و دیسک سفوتاکسیم (۳۰µgr) در مقابل دیسک ترکیبی سفوتاکسیم– کلاولانیک اسید (۳۰µgr/۱۰µgr)، دیسک سفتازیدیم (۳۰µgr) در مقابل ترکیب سفتازیدیم–کلاولانیک اسید (۳۰µgr/۱۰µgr)، همچنین دیسک سفپیم (۳۰µgr) در مقابل ترکیب سفپیم – کلاولانیک اسید (۳۰µgr/۱۰µgr) (شرکت Mast) و به فاصله ۳۰ میلی متر از همدیگر بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار قرار داده شدند. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از طریق اندازه گیری قطر هاله عدم رشد به اندازهٔ ۵ میلی متر و یا بیشتر در اطراف دیسک های ترکیبی (آنتی بیوتیک همراه با کلاولانیک اسید) نسبت به دیسک های حاوی آنتی بیوتیک به تنهایی مشخص گردید (۱۱).

سپس تمام سویه های تولید کنندهٔ ESBL به منظور بررسی حضور ژن‌های bla VEB1 و bla CTXM9 با استفاده از واکنش های زنجیره ای پلیمر از (PCR) مورد آزمایش قرار گرفتند.

## استخراج DNA و انجام PCR

استخراج DNA به روش جوشاندن (Boiling) انجام گرفت. برای این منظور یک لوپ از کلنی باکتری به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل حاوی ۳۰۰ میکرولیتر از بافر TE (1X) استریل انتقال داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجهٔ سلسیوس جوشانده شد. سپس با دور 13000×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و از محلول رویی جهت انجام واکنش های زنجیره ای پلیمر از (PCR) به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد.

واکنش های PCR برای هر نمونه در حجم های ۲۵ میکرو لیتری و با استفاده از ترمال سایکلر با گرادیان دمایی (اپندورف آلمان) انجام شد. سرانجام، حضور ژن‌های bla VEB1 و bla CTXM9 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که توالی آنها در جدول ۱ آمده است، با استفاده از واکنشهای زنجیره ای پلیمراز مورد بررسی قرار گرفت. پرایمرها از شرکت تکاپو زیست سفارش داده شدند. محلول های استوک و کار پرایمرها به ترتیب در غلظت های ۱۰۰ pmol و ۱۰ pmol تهیه شدند و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شدند. ترکیبات مورد استفاده برای انجام واکنش های PCR به همراه مقادیر آنها در جدول ۲ نشان داده شده است. برنامه زمانی و سیکل دمایی PCR برای تکثیر ژن های VEB-1و 9 CTX-M- مطابق جدول۳ انجام گرفت.

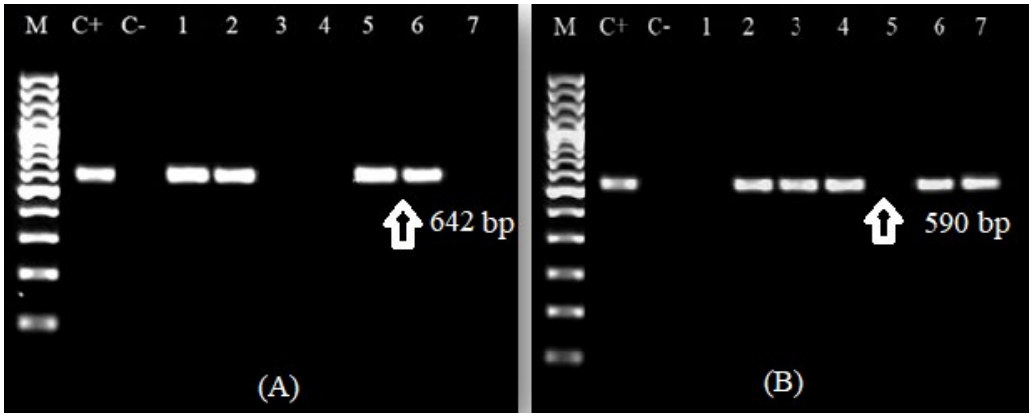
جدول۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن های VEB-1و CTX-M9

| منبع | اندازه محصول PCR | توالی پرایمر (۵` به ۳`) | ژن هدف |
|---|---|---|---|
| ۹ | ۶۴۲ جفت باز | (F)5`- CGA CTT CCA TTT CCC GAT GC-3`<br>(R)5`- GGA CTC TGC AAC AAA TAC GC-3` | VEB-1 |
| ۸ | ۵۹۰ جفت باز | (F) 5′-CGCTTTGCGATGTGCAG-3′<br>(R)5`- TCC TTC AAC TCA GCA AAA GT-3` | CTX-M-9 |

جدول ۲. ترکیبات مورد استفاده و مقادیر آنها برای تکثیر ژن های VEB-1 و CTX-M-9

| نام ترکیب | حجم بر حسب میکرو لیتر (µl) | غلظت نهایی |
|---|---|---|
| Taq DNA Polymerase 2x Master Mix<br>$MgCl_2$ 4 mM | 12.5 µl | 1X<br>$MgCl_2$ 2 mM |
| Template DNA | variable | <1.000 ng |
| Forward Primer (10 pmol) | 0.5 µl | 0.2 pmol |
| Reverse Primer (10 pmol) | 0.5 µl | 0.2 pmol |
| Nuclease-free water | 10.5 µl | - |
| Total Volume | 25 µl | - |

برای ارزیابی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. برای این‌کار مقدار ۳ میکرولیتر از هر کدام از محصولات PCR الکتروفورز شدند. برای رنگامیزی از GelRed™ DNA stains استفاده شد. جهت بررسی باندهای DNA، ژل ها در درون دستگاه ژل داک (ATP Co) قرار داده شدند و از آنها عکس تهیه شد (شکل۱).




شکل ۱: نتایج ژل الکتروفورز محصولات PCR. تصویر راست (A) مربوط به ژنbla VEB-1 و تصویر چپ (B) مربوط به ژن bla CTX–M9
M: مارکر (۱۰۰ bp)، C+: کنترل مثبت، C– : کنترل منفی.

جدول ۳: برنامه زمانی و سیکل دمایی PCR برای تکثیر ژن های bla VEB-1 و bla CTX-M9

| تعداد سیکل ها | زمان | دما بر حسب سلسیوس | مراحل سیکل |
|---|---|---|---|
| ۱ سیکل | ۵ دقیقه | ۹۵ درجه سلسیوس | دناتوراسیون اولیه |
| ۳۰ سیکل | ۳۰ ثانیه | ۹۴ درجه سلسیوس | دناتوراسیون |
| | ۳۰ ثانیه | ۵۶ درجه سلسیوس | اتصال پرایمر ها |
| | ۶۰ ثانیه | ۷۲ درجه سلسیوس | تکثیر |
| ۱ سیکل | ۱۰ دقیقه | ۷۲ درجه سلسیوس | تکثیر نهایی |
| | | ۴ درجه سلسیوس | نگهداری |

جدول ۴: نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های E.coli جدا شده از نمونه های ادراری. (S:sensitive, I:intermediate, R:resistant).

| نام دارو | حساس (S) | | نیمه حساس (I) | | مقاوم (R) | | کل |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | تعداد | درصد | تعداد | درصد | تعداد | درصد | |
| جنتامایسین | ۹۲ | ۵۱ | ۴۳ | ۲۴ | ۴۵ | ۲۵ | ۱۸۰ (٪۱۰۰) |
| کوتریموکسازول | ۸۱ | ۴۵ | ۱۴ | ۸ | ۸۵ | ۴۷ | ۱۸۰ (٪۱۰۰) |
| نالیدیکسیک اسید | ۵۷ | ۳۲ | ۲۳ | ۱۳ | ۱۰۰ | ۵۶ | ۱۸۰ (٪۱۰۰) |
| سیپروفلوکساسین | ۱۱۳ | ۶۳ | ۵۱ | ۲۸ | ۱۶ | ۹ | ۱۸۰ (٪۱۰۰) |
| سفوتاکسیم | ۷۹ | ۴۴ | ۴۷ | ۲۶ | ۵۴ | ۳۰ | ۱۸۰ (٪۱۰۰) |
| ایمی پنم | ۸۳ | ۴۶ | ۴۳ | ۲۴ | ۵۴ | ۳۰ | ۱۸۰ (٪۱۰۰) |
| سفتازیدیم | ۹۹ | ۵۵ | ۶۱ | ۳۴ | ۲۰ | ۱۱ | ۱۸۰ (٪۱۰۰) |
| آموکسی سیلین | ۷۴ | ۴۱ | ۴۶ | ۲۶ | ۶۰ | ۳۳ | ۱۸۰ (٪۱۰۰) |
| سفیپیم | ۸۷ | ۴۸ | ۵۴ | ۳۰ | ۳۹ | ۲۲ | ۱۸۰ (٪۱۰۰) |

جدول ۵: نتایج فراوانی سویه های مولد ESBL و ژنهای bla VEB-1 و bla CTX–M9 بر اساس PCR

| تعداد کل نمونه ها | تعداد E. coli جداسازی شده | تعداد سویه های ESBL + | | | تعداد سویه های ESBL - |
|---|---|---|---|---|---|
| ۳۴۷ | ۱۸۰ | ۹۱ (٪۵۱) | | | ۸۹ (٪۴۹) |
| | | ژنوتیپ | | | |
| | | bla VEB1 | bla CTX-M9 | bla VEB1 + bla CTX-M9 | |
| | | ۴۶ (٪۵۱) | ۳۵ (٪۳۸) | ۱۰ (٪۱۱) | |

## نتایج

نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی

نتایج ارزیابی آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های E.coli جدا شده از نمونه های بالینی در جدول ۴ ارائه شده است. در آزمایش آنتی بیوگرام که با استفاده از روش انتشار دیسک انجام گرفت، از ۱۸۰ جدایه E.coli، بیشترین مقاومت در برابر نالیدیکسیک اسید و کوتریموکسازول مشاهده شد. همچنین، نشان داده شد که اکثر سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم و جنتامایسین حساس هستند.

در روش دیسک ترکیبی، از ۱۸۰ سویه E.coli سویه (۵۱درصد) از نظر تولید ESBL مثبت و ۸۹ سویه (۴۹درصد) از نظر تولید ESBL منفی بودند. در این روش، اگر قطر ZOI در اطراف دیسک های حاوی آنتی بیوتیک‌های مهار کننده بتالاکتاماز (کلاولانیک اسید) ۵ میلی متر یا بیشتر از دیسک حاوی آنتی بیوتیک بدون کلاوولانیک اسید بود، ESBL مثبت در نظر گرفته شد.

نتایج حاصل از انجام PCR

نتایج مطالعه حاضر به روش PCR مطابق آنچه که در جدول ۵ نشان داده شده است، مشخص کرد که حضور ژن bla VEB-1 در مقایسه با ژن bla CTX-M9 در میان سویه های جدا شده E.coli بیشتر بود. (۵۱ درصد در مقابل ۳۸ درصد). همچنین تعداد ۱۰ سویه (۱۱ درصد)، هر دو ژن bla VEB-1 و bla CTX-M9 را دارا بودند. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR در شکل ۱ نشان داده شده است.

## بحث

طی سال های اخیر تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) توسط باکتری های متعدد از جمله E.coli بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. طوری که به یک مشکل جدید و جدی در درمان بیماری های عفونی تبدیل شده و جوامع پزشکی را با نگرانی هایی همراه کرده است. بتالاکتامازهای وسیع الطیف با تخریب حلقهٔ بتالاکتام آنتی بیوتیک های بتالاکتام (پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها، منوباکتام ها و کارباپنم ها) باعث مقاومت باکتری ها در برابر این دسته از آنتی بیوتیک‌ها می‌شود. به طور معمول در اکثر آزمایشگاه های ایران تشخیص سویه های مولد ESBL انجام نمی‌شود. به همین دلیل، راه‌اندازی غربالگری ESBL در ایزوله‌های بالینی برای جلوگیری از انتشار سویه‌های مقاوم در مراکز آزمایشگاهی و بیمارستان ها بسیار حائز اهمیت بوده و بایستی مورد توجه جدی قرار بگیرد. شیوع سویه های مولد ESBL توسط باکتری های مختلف از جمله E.coli در مراکز بهداشتی و درمانی بالا بوده و مسئول بسیاری از عفونت های بیمارستانی هستند. لذا شناسایی سویه های مولد ESBL از اهمیت خاصی برخوردار بوده و با درمان صحیح و اصولی عفونت های ناشی از آنها می توان تا حدودی از انتشار این سویه ها جلوگیری کرد. شیوع سویه های مولد بتالاکتامازهای تیپ bla VEB-1 و bla CTX-M9 هشدار دهنده بوده و نتایج مطالعات قبلی و همینطور نتایج پژوهش حاضر این مطلب را تایید می‌کند.

در مطالعه حاضر از مجموع ۱۸۰ نمونه ادراری، ۹۱ سویه (۵۱ درصد) از نظر تولید ESBL مثبت و ۸۹ سویه (۴۹ درصد) منفی بودند. با انجام آزمایش PCR به منظور بررسی حضور ژن‌های مولد بتالاکتامازهای تیپ bla VEB-1 و bla CTX-M9 در سویه های E.coli، مشخص شد که ۵۱ درصد سویه‌ها مولد ژن bla VEB-1 و ۳۸ درصد مولد ژن bla CTX-M9 بودند. اگر چه این درصد در مطالعات مختلف متفاوت است. در خصوص نتایج آنتی بیوگرام، بیشترین میزان مقاومت دارویی در برابر نالیدیکسیک اسید (۱۰۰ سویه، ٪۵۶) و کوتریموکسازول (۸۵ سویه، ٪۴۷) مشاهده شد. مطالعات مشابهی در اقصی نقاط جهان و داخل ایران به منظور بررسی سویه‌های مولد ESBL انجام گرفته است. که نتایج آنها باهم متفاوت هستند.

مطالعه El bouamri و همکاران (۱۰) در مراکش نشان داد که نسبت مقاومت دارویی جدایه های E.coli مولد ESBL به ترتیب برابر بود با آموکسی سیلین/کلاولانیک اسید (٪۱۰۰)، تری متوپریم/سولفامتوکسازول (٪۷۶)، جنتامایسین (٪۶۶)، سیپروفلوکساسین

(۸۲٪) و آمیکاسین (۵۶٪)، که نتایج مطالعه آنها با نتایج مطالعه حاضر کاملا مغایرت دارد. در مطالعه حاضر که سیپروفلوکساسین مؤثرترین دارو بود، در مطالعه آنها میزان مقاومت سویه‌های مولد ESBL در برابر سیپروفاوکساسین به میزان ۸۲٪ بود. همچنین در مطالعهٔ آنها میزان تولید بتالاکتاماز CTX-M برابر با ۷۰٪ بود که در مقایسه با مطالعه حاضر ۳۸ درصد بالا بود.

بر عکس، مطالعه Gautam و همکاران (۱۵) در کشور هند نشان داد که میزان بتالاکتاماز تیپ CTXM در سویه های E. coli و K. pneumonia جدا شده از نمونه های بالینی تنها به میزان ۶٪ است. در مطالعه Perez-Lopez و همکاران (۵)، که در کشور قطر انجام گرفت ESBL های نوع CTX-M در همه جدایه ها به جز تنها یک ایزوله یافت شد. در مطالعهٔ آنها بتالاکتاماز تیپ CTX-M-15 به میزان ۸۷/۷٪ گزارش شد. با مقایسه نتایج مطالعات مختلف می توان چنین استنباط کرد که میزان شیوع و درصد سویه های مولد ESBL در نقاط مختلف جهان باهم متفاوت هست و این تفاوت شاید به دلیل تفاوت در استراتژی های درمانی در کشورهای مختلف است.

در مطالعه سادات لسانی و همکاران (۱۶)، از ۲۰۰ سویه E.coli جداسازی شده از نمونه های بالینی، آمپی سیلین با ۹۶٪ و نیتروفورانتوئین با ۱۹/۵٪ به ترتیب بیشترین و کمترین مقاومت دارویی را نشان دادند. در مطالعه آنها، از مجموع ۱۵۶ سویه E.coli ،۷۸ درصد به عنوان مولد ESBLs شناسایی شدند. همچنین، ۷۶ سویه (۳۸ درصد) از سویه‌ها مولد بتالاکتاماز bla CTX-M9 بودند که این نتیجه با نتایج مطالعه حاضر کاملا همخوانی دارد.

در مطالعهٔ Ruppé و همکاران (۱۷) در کامبودیا، از مجموع ۸۶۱ نمونه ادراری، ۱۹۴ نمونه (۲۲/۵ درصد) از نظر عفونت ادراری مثبت بودند که از این تعداد، ۱۶۳ نمونه (۸۴ درصد) E.coli عامل عفونت ادراری تشخیص داده شد. در مطالعه آنها کوآموکسی کلاو و فلوروکینولون‌ها هر کدام به میزان ۹۴ درصد مقاوم‌ترین آنتی بیوتیک‌ها بودند. از ۱۶۳ نمونه مورد بررسی برای ۳۴ ESBL نمونه (۲۰ ٪) برای ژن bla CTX-M مثبت شناخته شدند که مغایر با نتایج تحقیق حاضر است. در مطالعه حاضر نالیدیکسیک اسید و کوتریماکسازول به عنوان آنتی بیوتیک های مقاوم مطرح شدند و به نظر میرسد آنتی بیوتیک های قابل اعتمادی در درمان عفونت های ادراری در این منطقه نباشند. از طرفی سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم گزینه های خوبی برای درمان عفونت های ادراری ناشی از E.coli شناخته شدند (حداقل در حال حاضر) زیرا اکثر سویه های جداسازی شده نسبت به داروها حساس بودند. اما پیش بینی می شود با مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک ها مقاومت نسبت به این داروها هم بیشتر شود.

گونه‌های بیماری‌زای E.coli تولید کننده ESBL تیپ CTX-M به تازگی در سرتاسر جهان شیوع پیدا کرده اند و درمان عفونت های بیمارستانی ناشی از آنها به چالشی جدید برای مراقبت های بهداشتی و درمانی تبدیل شده است (۲۰-۱۸).

در مطالعه مقنی و همکاران (۲۱) که در شهر قائن و بر روی ۲۲۳ سویه E.coli، انجام گرفت، ۳۰ درصد سویه‌ها از نظر تولید ESBL مثبت بودند که در مقایسه با مطالعه حاضر ۲۱ درصد کمتر بوده است (۳۰ درصد در مقابل ۵۱ درصد). شاید علت آن مصرف بی رویه و خارج از کنترل آنتی بیوتیک‌ها در منطقه مطالعه حاضر باشد. همچنین سویه‌های تولیدکنندهٔ بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، بیشترین مقاومت را به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفتریاکسون، سفکسیم، سفازولین و سفوتاکسیم و کمترین مقاومت را نسبت به نیتروفورانتوئین و آمیکاسین نشان دادند. در مطالعه آنها ۵۰ درصد سویه‌های E.coli تولیدکننده ESBL از بیماران بستری در بیمارستان‌ها و ۲۴/۴ درصد از بیماران سرپایی جداسازی شده بود و این امر بیانگر آنست که انتشار سویه های مولد ESBL و مقاوم به آنتی بیوتیک، در محیط بیمارستان بیشتر از محیط خارج بیمارستان می‌باشد. در مطالعه حاضر مقاومت نسبت به سفتریاکسون و سفتازیدیم به ترتیب ۹ و ۱۱ درصد بود. در مطالعه حاضر مقاومت نسبت به کوتریموکسازول و نالیدیکسیک اسید در بین جدایه های ما به طور قابل توجهی بالا بود، که این ترکیب را حداقل به عنوان درمان تجربی بی اثر می کند.

در مطالعه سلطان دلال و همکاران (۲۲) که در تبریز انجام گرفت، از مجموع ۱۸۸ نمونه E.coli جداسازی شده از بیماران بستری و سرپایی، تعداد ۸۴ سویه (۴۴/۷ درصد) به عنوان سویه های مولد ESBL شناسایی شدند که نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه آنها تا حدودی مشابهت دارد. در مطالعه آنها بعد از آزمون سینرژیسم دوبل، تعداد ۸۲ سویه (۴۳/۶ درصد) انتخاب نهایی شدند که با آزمایش PCR ۸۴/۱ درصد از سویه‌ها مولد ژن CTX-M-۱ بودند. در حالیکه در مطالعه حاضر تنها ۳۸ ٪ از سویه ها (۳۵ از ۹۱) مولد بتالاکتاماز تیپ bla CTX-M9 بودند.

در مطالعه اسلامی و نجار پیرایه (۲۳) که در تهران بر روی ۲۰۰ سویه E. coli جدا شده از نمونه های بالینی بیماران بستری در۵ بیمارستان تهران انجام گرفت، ۹۴ سویه (۴۷ درصد) تولید کننده ESBL بودند که نتایج آنها با نتایج مطالعه حاضر تا حدودی همخوانی دارد. در مطالعهٔ آنها بیشترین میزان مقاومت دارویی به آمپی سیلین با ۹۴/۵ درصد و اریترومایسین با ۹۳/۵ درصد گزارش شده است. در بررسی مولکولی ژن های bla VEB، bla TEM و bla PER تمام سویه ها فاقد ژن مولد بتالاکتامازهای تیپ VEB و PER بودند. در حالیکه ۴۴ درصد از سویه ها بتالاکتاماز تیپ blaTEM را تولید میکردند که تا حدودی با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

نتایج مطالعهUdomsantisuk و همکاران (۲۴)، در کشور تایلند که به بررسی خصوصیات مولکولی بتالاکتامازهای با طیف گسترده در جدایه های بالینی K. pneumoniae و E. coli پرداخته

بودند، نشان داد که بتالاکتامازهای تیپ bla TEM و bla VEB شیوع بالایی در این کشور دارند. میزان تولید ESBL در سویه های جدا شدهٔ K. pneumonia از نمونه های بالینی برابر ۳۴/۵٪ (از ۵۸ سویه ۲۰ سویه مولد ESBL بودند). همچنین میزان تولید این آنزیم در جدایه های E. coli برابر ۱۷٪ بود (از ۲۱۲ سویه E. coli، سویه تولید کنندهٔ ESBL بودند)، که در مقایسه با مطالعه حاضر ۳۶درصد کمتری از سویه ها بتالاکتاماز تولید میکردند.

تاکنون ۹۰ بتالاکتاماز مختلف CTX-M شناسایی و در پنج گروه فیلوژنتیک تقسیم شده اند. بتالاکتامازهای CTX-M در کلاس A طبقه بندی شده اند که باعث ایجاد مقاومت در سطح بالایی نسبت به سفتازیدیم، سفوتاکسیم و آزترئونام می شوند (۱۸, ۱۵). بطور خلاصه مطالعه حاضر نشان داد که بتالاکتامازهای تیپ bla CTX-M و bla VEB بطور گسترده ای در سویه های E. coli شایع هستند. همچنین این آنزیم ها در سرتاسر جهان ظهور کرده‌اند و درمان‌های محدودی در دسترس است که چالش جدیدی برای مراقبت‌های بهداشتی ایجاد می‌کند.

## نتیجه گیری

بتالاکتامازهای bla VEB-1 و blaCTX-M9 به ترتیب در جدایه های ESBL بسیار شایع بودند و این آنزیم ها نقش مهمی در مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام ایفا می کنند. مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مناطق مختلف ایران نشان داد که شیوع سویه های مقاوم به دارو و مولد ESBL در مناطق مختلف کشور متفاوت است. به طور کلی سیپروفلوکساسین در اکثر مطالعات به عنوان یک داروی موثر در درمان عفونت های ناشی از سویه های E.coli شناخته شده است.

## تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

## منابع


1. Fazeli h, Hoseini mm, Mohammadi Ghalaei p. Frequency and resistance pattern of extended spectrum beta lactamase producing Escherichia coli in clinical specimen of Alzahra hospital in Isfahan, Iran, 2007. Abbreviation 2009;10:58-64.

2. Habeeb MA, Sarwar Y, Ali A, Salman M, Haque A. Rapid emergence of ESBL producers in E. coli causing urinary and wound infections in Pakistan. Abbreviation 2013;29:540-4. doi: 10.12669/pjms.292.3144.

3. Behrouzi A, Rahbar M, Vand Yousefi J. The prevalence of Extended-Spectrum β-lactamase (ESBLs) producing Klebsiella pneumonia and Eschrrichia coli isolated in Milad hospital of Tehran in 2010. Abbreviation 2010;4:36-41.

4. Kao C-Y, Udval U, Huang Y-T, Wu H-M, Huang A-H, Bolormaa E, et al. Molecular characterization of extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella spp. isolates in Mongolia. Abbreviation 2016;49:692-700.

5. Perez-Lopez A, Sundararaju S, Al-Mana H, Tsui KM, Hasan MR, Suleiman M, et al. Molecular Characterization of Extended-Spectrum β-Lactamase–Producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae Among the Pediatric Population in Qatar. Abbreviation 2020;11. doi: 10.3389/fmicb.2020.581711.

6. Asghari Kalashani S, Sharifi Y, Talebi R. THE FREQUENCY OF TEM, SHV, AND OXA GENES AMONG EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE PRODUCING KLEBSIELLA PNEUMONIAE AND ESCHERICHIA COLI OBTAINED FROM KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS. Abbreviation 2020;31:549-58.

7. Shahcheraghi F, Noveiri H, Nasiri S. Detection of bla TEM and bla SHVgenes among clinical isolates of E. coli from Tehran hospitals. Abbreviation 2007;1:1-8.

8. TAGHINEJAD J, BARATI B, SADEGHI A. a study of the drug resistance pattern of Group B Streptococcus isolated from urinary samples in the city of Salmas during the year 2015. Abbreviation 2018;8:

9. Kumar D, Singh AK, Ali MR, Chander Y. Antimicrobial Susceptibility Profile of Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL) Producing Escherichia coli from Various Clinical Samples. Abbreviation 2014;7:1-8. doi: 10.4137/IDRT.S13820.

10. El bouamri MC, Arsalane L, Zerouali K, Katfy K, El kamouni Y, Zouhair S. Molecular characterization of extended spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli in a university hospital in Morocco, North Africa. Abbreviation 2015;21:161-6.

11. Hamamouchi J, Qasmaoui A, Halout K, Charof R, Ohmani F, editors. Antibiotic resistance in uropathogenic enterobacteria. E3S Web of Conferences; 2021 July 01, 2021.

12. Liu X, Liu H, Wang L, Peng Q, Li Y, Zhou H, et al. Molecular Characterization of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Multidrug Resistant Escherichia coli From Swine in Northwest China. Abbreviation 2018;9.

13. Roshdi Maleki M, Taghinejad J. Prevalence of Extended-spectrum Beta-lactamases (ESBL) Types blaTEM and blaSHV in Klebsiella pneumoniae Strains Isolated from Clinical Samples by PCR in Miandoab, West Azerbaijan. Abbreviation 2021;15:458-64.

14. Khanbeyki S, Ahani Azari A, Danesh A. Prevalence and Antibiotic Resistance Pattern of Extended Spectrum β-Lactamase-(ESBL-) Producing Gram Negative Bacilli isolated from Clinical Samples of hospitalized Patients in a hospital in Gorgan. Abbreviation 2020;8:47-56.

15. Gautam V, Thakur A, Sharma M, Singh A, Bansal S, Sharma A, et al. Molecular characterization of extended-spectrum β-lactamases among clinical isolates of Escherichia coli & Klebsiella pneumoniae: A multi-centric study from tertiary care hospitals in India. Abbreviation 2019;149:208-15. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_172_18 https://journals.lww.com/ijmr/Fulltext/2019/49020/Molecular_characterization_of_extended_spectrum.14.aspx

16. Lesani SS, SOLEIMANI M, SHAKIB P, ZOLFAGHARI MR. Prevalence of blaCTX-M, blaSHV, and blaTEM Genes in Escherichia coli Strains Isolated From Urinary Tract Infection Samples of Patients in the Intensive Care Unit in Qom, Iran. Abbreviation

2020;7:-.

17. Ruppé E, Hem S, Lath S, Gautier V, Ariey F, Sarthou JL, et al. CTX-M beta-lactamases in Escherichia coli from community-acquired urinary tract infections, Cambodia. Abbreviation 2009;15:741-8.

18. Amiri A, Firoozeh F, Moniri R, Zibaei M. Prevalence of CTX-M-Type and PER Extended-Spectrum β-Lactamases Among Klebsiella spp. Isolated From Clinical Specimens in the Teaching Hospital of Kashan, Iran. Abbreviation 2016;18:e22260-e.

19. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. Abbreviation 2017;72:2145-55. doi: 10.1093/jac/dkx146

20. Enke TN, Datta MS, Schwartzman J, Cermak N, Schmitz D, Barrere J, et al. Modular Assembly of Polysaccharide-Degrading Marine Microbial Communities. Abbreviation 2019;29:1528-35. e6. doi: 10.1016/j.cub.2019.03.047 .

21. Moghanni M, Dashtgard A, Barzegari-Esfeden Z. Prevalence of extended spectrum β-Lactamase producing Escherichia coli among hospitalized and outpatient children in Shohada Hospital in Qaen during 2017-2018. Abbreviation 2018;22:214-21.

22. MM SD, M A, MH S, A RL, P O, J FM, et al. The prevalence of extended-spectrum beta-lactamases and CTX-M-1 producing Escherichia coli in urine samples collected at Tabriz city Hospitals. Abbreviation 2011;69:273-8.

23. Eslami M, Najar Peerayeh S. Phenotypic and molecular detection of TEM, PER, and VEB beta-lactamases in clinical strains of Escherichia coli. Abbreviation 2012;15:1-9.

24. Udomsantisuk N, Nunthapisud P, Tirawatanapong T, Dansuputra M. Molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase among clinical isolates Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Abbreviation 2011;94:1504-12.