ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و وجود ژن CTX-M در اشرشیا کلی مولد ESBL به روش PCR از نمونه های ادراری بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شهید یحیی نژاد بابل

فاطمه زابلی[1*]، سیدمجتبی مهدی پور میر[2]

۱. استادیارگروه میکروبیولوژی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.
۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی،گروه زیست شناسی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: اشرشیاکلی یکی از شایع ترین باکتری هایی است که باعث عفونت دستگاه ادراری می شود. این باکتری به علت اکتساب پلاسمیدهایی که کد کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) هستند، به آنتی بیوتیک های بتالاکتام مقاوم شده است. لذا با توجه به عدم مطالعه نسبت به شناسایی ژن CTX-M (Cefotaxsim-M) در این بیمارستان و منطقه، ژن مذکور از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی بررسی گردید.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی تحلیلی به صورت مقطعی به مدت ۶ ماه از تیر ماه لغایت آذرماه سال ۱۳۹۳ از تمام افراد مراجعه کننده به مرکز آموزشی درمانی شهید یحیی نژاد بابل بر روی ۱۸۴۲ نمونه انجام شد و مقاومت باکتری ها نسبت به دیسک های سفوتاکسیم، مروپنم، آمیکاسین، جنتامایسین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون، نیتروفورانتوئین، نالیدیگسیک اسید، به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. ایزوله های مقاوم به آنتی بیوتیک های فوق به وسیله تست تأییدی دیسک های ترکیبی سفوتاکسیم-کلاولانیک و سفتازیدیم–کلاولانیک اسید بررسی شدند. سپس در سویه های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف وجود ژن CTXM با روش Real Time-PCR بررسی شد. نتایج به دست آمده با برنامه نرم افزاری SPSS Version 20 و آزمون آماری کای دو تحلیل شد.

یافته ها: از تعداد کل نمونه بیماران، ۸۴ ایزوله اشرشیاکلی جدا شد. بیشترین حساسیت مربوط به مروپنم (۹۶/۴۳ درصد)، آمپی سیلین سولباکتام (۹۵/۲۴ درصد)، پیپراسیلین تازوباکتام (۹۴/۵ درصد)، آمیکاسین (۹۱/۶۷ درصد) و بیشترین مقاومت به ترتیب به نالیدیکسیک اسید (۸۳ درصد)، داکسی سالیکلین (۷۰ درصد)، سیپروفلوکساسین (۵۱/۲ درصد) و سفتریاکسون (۴۶/۶۳ درصد) بود. ۲۹ ایزوله (۳۴/۵ درصد) مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند. فراوانی ژن بتالاکتاماز CTX-M فنوتیپ مثبت ۶۹ درصد در اشرشیاکلی به دست آمد. بین وجود ژن CTX-M و ESBL رابطه معنی دار آماری مشاهده شد ($P<0/03$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج مطالعه حاضر، حضور ژن های مولد بتالاکتاماز (CTX-M) در سویه اشرشیا کلی از نمونه های بیمارستان شهید یحیی نژاد بابل، درصد بالایی را به خود اختصاص داده است (۶۹ درصد). لذا کنترل و پایش مصرف آنتی بیوتیک ها و همچنین مطالعات فنوتیپی و ژنوتیپی بیشتری در باکتری های پاتوژن این منطقه لازم به نظر می رسد.

کلمات کلیدی: اشرشیاکلی، الگوی مقاومت، مقاومت آنتی بیوتیکی، بتالاکتاماز طیف گسترده (ESBL)، ژن CTX-M، Real Time-PCR

نویسنده مسئول: فاطمه زابلی
آدرس: ایران، آمل، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی
ایمیل: m.zaboli1379@yahoo.com

مقدمه

اشرشیاکلی از پاتوژن های فرصت طلب بیمارستانی می باشد و به علت اکتساب پلاسمیدهایی که کد کننده بتا لاکتامازهای وسیع الطیف، به آنتی بیوتیک های بتا لاکتام از جمله سفالوسپورین های وسیع الطیف مقاوم شده است (۱) .ظهور مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام به سال های اولیه کشف مقاوت نسبت به اولین آنتی بیوتیک (پنی سیلین) بر می گردد و اولین بتالاکتاماز در باکتری اشرشیاکلی مشاهده شد (۲). آنتی بیوتیک های بتالاکتام شامل پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها می باشند که با اتصال به پروتئین باند شونده به پنی سیلین (PBPs) که در دیواره سلولی باکتری می باشد باعث مهار ترانس پپتیدوگلیکان و در نتیجه دیواره سلول و به دنبال آن، باکتری از بین می رود (۳). مکانیسم های مختلفی توسط باکتری ها به کار گرفته می شود تا از اثرات زیان بار آنتی بیوتیک ها مصون بماند. یکی از مهم ترین این مکانیسم ها که در باکتری های گرم منفی علیه آنتی بیوتیک های بتا لاکتام به کار گرفته می شود، تولید آنزیم های بتالاکتامازی است (۴). بتالاکتاماز طیف گسترده Extended (ESBL) Spectrum beta lactamases به عنوان دفاع اصلی باکتری های گرم منفی در مقابل آنتی بیوتیک ها شناخته شده اند. ژن تولید کننده این آنزیم ها غالباً توسط پلاسمید های بزرگ (بالای 100 Kb) کد شده و قادرند از یک سویه باکتری به سویه دیگر، از یک انسان به انسان دیگر و حتی از یک کشور به کشور دیگر منتقل شوند (۵).

بتالاکتامازها به دوصورت مولکولی (Ambler) و عملکردی طبقه بندی می شوند. بتالاکتامازها براساس ساختار اولیه به چهار کلاس مولکولی A تا D تقسیم می شوند. گروه A در باکتری های گرم منفی می باشد که بتالاکتاماز های وسیع الطیف (ESBL) را در بر می گیرد،کلاس B در سودوموناس آئروژینوزا یافت می شود. کلاس تیپ C، سفالوسپورین ها را هیدرولیز می کند و به مهارکننده های بتالاکتامی معروفند. کلاس D، اگزاسیلن ها می باشند و با کلاونیک اسید مهار نمی شوند. طبقه بندی بتا لاکتاماز از لحاظ عملکردی به ۲ گروه تقسیم می شوند: گروه اول سفالوسپورینازهایی که به خوبی توسط کلاولانیک اسید مهار نمی شوند و به کلاس C مولکولار تعلق دارند. گروه دوم: شامل پنی سلیناز و سفالوسپوریناز یا هر دو که بطور کلی توسط مهار کننده های بتالاکتاماز مهار می شوند و متعلق به کلاس مولکولی A و D هستند. بتالاکتامازهای این گروه شامل (SHV,TEM,CTX-M) همواره در حال افزایش هستند (۶). بتالاکتامازهای تیپ CTX-M به طور گسترده از طریق پلاسمید حامل ESBL می باشند، منتشر گردیده و برای اولین بار در اواخر دهه ۱۹۸۰ در آلمان گزارش شد که CTX شامل سفوتاکسم و M، اولین بار در مونیخ آلمان کشف شده است که این آنزیم غالباً در اشرشیاکلی و کلبسیلا گزارش شده است (۷). سویه ای از اشرشیاکلی را که مقاوم به سفوتاکسیم بوده و خصوصیات TEM و یا SHV را که مشاهده نشد، تحت عنوان CTX-M نام گذاری کرده که فعالیت هیدرولیتیک بر علیه سفوتاکسیم دارد (۸). اولین آندمی های CTX-M در آمریکای لاتین و اروپای شرقی گزارش شد اما پس از سال ۲۰۰۰ گزارش فراوانی از گسترش این ژن به کشورهای اروپای غربی همچون یونان، فرانسه، انگلستان و اسپانیا و حتی از مغولستان گزارش شد (۹). طی بررسی های انجام گرفته اخیراً در ایران، بتا لاکتامازهای وسیع الطیف نوع CTX-M افزایش پیدا کرده که بیشترین شیوع مربوط به CTX-M-1 می باشد (۱۰). روش های اختصاصی پیشنهاد شده توسط National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) برای شناسائی باکتری های مولد بتالاکتاماز شامل آزمون های

غربالگری و آزمون های تأییدی به روش PCR می باشد (۱۱).

با استفاده از تکنیک Real-time PCR امکان پایش لحظه به لحظه ی واکنش فراهم آمده و در هر سیکل امکان بررسی فرآنید تکثیر وجود دارد. عدم نیاز به الکتروفورز برای بررسی نتیجه ی واکنش علاوه بر صرفه جویی در وقت، باعث جلوگیری از احتمال پراکندگی DNA در محیط آزمایشگاه نیز می شود (۳۴و۳۳و۱۲).

با توجه به افزایش روز افزون مصرف آنتی بیوتیک و متعاقب آن افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی ها مطالعه حاضر به منظور بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی فراوانی ESBL و ژن CTX-M در میان سویه های اشرشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری بیماران بستری و سرپایی در سه ماهه دوم و سوم سال ۱۳۹۳ از بیماران مراجعه کننده به مرکز آموزشی درمانی شهید یحیی نژاد بابل انجام گرفت، تا با بهره گیری از این نتایج علاوه بر کمک به درمان صحیح بیماران، موجب کاهش هزینه های درمانی آنان گردد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی تحلیلی در سه ماهه دوم و سوم سال ۱۳۹۳به مدت ۶ ماه بر روی ۱۸۴۲ نمونه بالینی ادرار افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان شهید یحیی نژاد بابل با توجه به رضایت بیماران انجام گرفت. نمونه های ادرار به روش مید استریم (قسمت میانی ادرار) در ظرف استریل جمع آوری گردید و با استفاده از لوپ بر روی محیط بلاد آگار و EMB کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد، کلونی ها شمارش شدند و نمونه هایی که تعداد کلونی رشد کرده آن ها برابر یا بیش از ۱۰۵ بود، از نظر عفونت ادراری مثبت تلقی و تست های بیوشیمیایی (اکسیداز، TSI، حرکت، اندول، اوره آز، احیای نیترات، MR، VP، H2S و سیمون سیترات) جهت تشخیص باکتری اشرشیاکلی انجام گردید. لاکتوز را در ۳۷ درجه و هم در ۴۴ درجه تخمیر می کنند و اسید و گاز به وجود می آورند. اندول، MR مثبت، VP و سیترات منفی هستند. گاز هیدروژن سولفوره تولید نمی کند. اوره را تجزیه نمی کند. برای بررسی تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله مورد مطالعه به روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) انجام گردید که برای این کار ابتدا از کلونی جدا شده، یک سوسپانسیون بر اساس استاندارد نیم مک فارلند تهیه و با سوآپ استریل در کنار شعله از سوسپانسیون باکتری برداشت کرده و بر سطح محیط کشت مولرهینتون آگار کشت متراکم انجام داده و سپس دیسک های

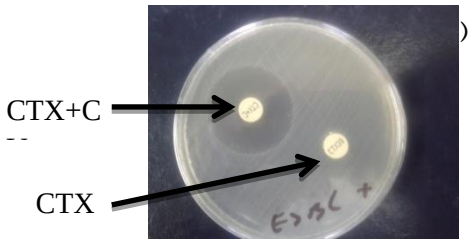
Cefixime- Gentamycin- Doxycyclin- Cefotaxime- Nalidicxic Acid- Nitrofurantion- Meropenem- Cphtriacson Ampicilin solbactam- Pipracilin Tazobactam- Amikacin Ciprofloxacin

(تهیه شده از شرکت Mast disk) بر روی سطح پلیت قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه، تشکیل یا عدم تشکیل منطقه رشد بر اساس جدول استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی CLSI (Clinical and laboratory standard institute) نتایج تفسیر شد (۱۳). همچنین از سویه استاندارد اشرشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

Combination disk method or Phenotype confirmatory Test:

سوسپانسیون میکروبی استانداری مطابق با غلظت نیم مک فارلند، از باکتری تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار پخش گردید. ۱۵ دقیقه بعد دیسک آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفوتاکسیم کلاولانیک اسید را به فاصله حداقل ۲/۵ سانتی متر از یکدیگر، روی محیط قرار داده شد. پس از ۲۴-۱۸ ساعت انکوباسیون، در ۳۷درجه سانتی گراد، با استفاده از خط کش، هاله عدم رشد اطراف دیسک های

حاوی کلاولانیک اسید نسبت به بدون کلاولانیک اسید سنجیده شد. به طوری که اگر هاله عدم رشد اطراف دیسک سفوتاکسیم کلاولانیک اسید بزرگتر یا مساوی ۵ میلی متر نسبت به سفوتاکسیم به تنهایی باشد سویه مورد نظر را می توان بر طبق ضابطه (CSLI) به عنوان مولد ESBL در نظر گرفت (



شکل ۱- تست فنوتیپی تائیدی برای بررسی ژن های ESBL (دیسک سمت چپ سفوتاکسیم کلاولانیک اسید با هاله عدم رشد به عنوان ESBL مثبت در نظر گرفته شد).

استخراج ژنوم: جهت استخراج ژن از کیت Blood /Tissue DNA Extraction Mini Kit DynaBio™ با شماره کاتالوک ۱۹۳۰۷۵ و با تاریخ انقضاء (آپریل ۲۰۱۶) با شناسه (ک ج ۰۰۱۵) از شرکت تکاپوزیست استفاده شد.

استخراج DNA باکتری از روش ستونی (Binding Colum) انجام شد. در این روش بافر رها سازی در دمای 56 C° قرار داده شد. به هر تیوب ۱/۵ میلی لیتری ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه گردید. سپس به تیوب به ترتیب۲۰۰ میکرولیتر از نمونه باکتری و بافر اتصال اضافه گردید. تیوب ها ورتکس و به مدت ۱۰ دقیقه در 56 C° قرار گرفت. سپس به هر تیوب ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق اضافه گردید. بعد در هر تیوب یک ستون اتصال قرار داده شد و ستون ها یک دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰۰ به ترتیب میکرولیتر بافر شستشوی ۱و۲ به ستون اضافه شد. ستون ها ۳ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. ۱۰۰ میکرولیتر بافر رها سازی را داخل ستون اضافه گردید. ستون ها ۱ دقیقه در۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب OD محلول زیر ستون حاوی (DNA) ژنومی در طول موج nm 280 با روش اسپکتروفتومتری و با غلظت ۵۰ng/µl برابر ۱ تخلیص شد. سپس از نمونه های DNA جهت آزمایش Real- time PCR استفاده گردید.

الکتروفورز با ژل آگارز (Agarose Gel Electrophorsis)

ابتدا ژل آگارز ۱ درصد (یک گرم) از پودر آگارز در ۱۰۰ میلی لیتر بافر (tris-borate-EDTA 0/5X) مخلوط با رنگ اتیدیم بروماید تهیه گردید، سپس محصولات تکثیری هر ژن در واکنش Real-time PCR، در ژل آگارز بارگذاری و الکتروفورز انجام شد. این مرحله جهت تأیید تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیر اختصاصی و جفت شدن پرایمرها (پرایمر دایمر) انجام گردید.

تکنیک PCR: در این مطالعه از تکنیک Real-time PCR جهت تکثیر ژن CTX-M باکتری اشرشیاکلی و پرایمرهای اختصاصی تهیه شده از شرکت Bioneer کره با رشته های Forward، Reveres به ترتیب بطول ۲۱ و۱۷ نوکلئوتید مطابق جدول ۱ استفاده شد (۱۵).

جدول۱: مشخصات پرایمر مورد استفاده (۱۵)

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	Product Size(bp)
-F-۱ CTX-M bla	۳-AAAACTTGCCGAATTAGAGCG-۵	۱۵۳
-R-۱ CTX-M bla	۳-TTCTTCAGCACCGCGGC-۵	۱۵۳

برنامه Real- time PCR با استفاده روش سایبرگرین برای شناسایی CTX-M:

در این مطالعه از دستگاه Real- time PCR مدل ۹۶ Exicyclerاستفاده شد.

برنامه زمانی–گرمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد. مرحله اول که منجر به دناتوره شدن مولکول های DNA و

فعال شدن آنزیم پلیمراز می گردد، به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه برای ۳۵ سیکل متوالی و مرحله نهایی جهت ترسیم منحنی تفکیک (Dissociation Curve) یا منحنی ذوب به صورت ۹۴ در جه سانتی گراد به مدت ۱ ثانیه انجام شد.

مخلوط واکنش شامل: ۲۵ میکرولیترMaster Mix، یک میکرولیتر (۱۰ پیکومول) از پرایمرهای (Forward) و (Reverse) اختصاصی ژن، ۱۰ میکرولیتر DNA ژنومی (۴۰ نانوگرم) و بقیه با آب مقطر افزوده شد تا به حجم نهائی ۵۰ میکرولیتر رسید.

در فاز اولیه مرحله تصاعدی مقدار فلورسنت افزایش می یابد تا به آستانه ای می رسد که به مقدار مشخصی از سطح background بالاتر است، این مرحله شروع نسخه برداری از قالب است که در محاسبات نتایج آزمایش استفاده می شود (۱۶).

در این مطالعه۵۰ میکرولیتر از محصول PCR تهیه شده مطابق جدول ۲ داخل میکروتیوب های ویژه سنجش نوری PCR ریخته شد. سپس میکروتیوب های آماده شده در داخل دستگاه Exicycler قرداده شد و دستورات مطابق دستورالعمل در بخش Experiment in formation در باکس Master نام کیت Bioneer و در قسمت پروتکل نام ژن CTX-M-ESBL و در قسمت پلیت تاریخ انجام تست وارد شد.

از سویه استاندارد PTCC ۱۲۹۰ به عنوان کنترل مثبت حاوی ژن CTX-M مورد استفاده قرارگرفت. (تهیه شده از بانک کلکسیون قارچ های صنعتی ایران) سویه استاندارد بصورت لیوفلیزه ارائه می گردد که عملیات احیای آن با کشت جداگانه بر روی محیط کشت نیوترنت براث و گرما گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انجام گردید. داده ها بر اساس اهداف، جمع آوری و به وسیله نرم افزار آماری SPSS۲۰ و استفاده از آزمون آماری کای-دو تجزیه و تحلیل شد.

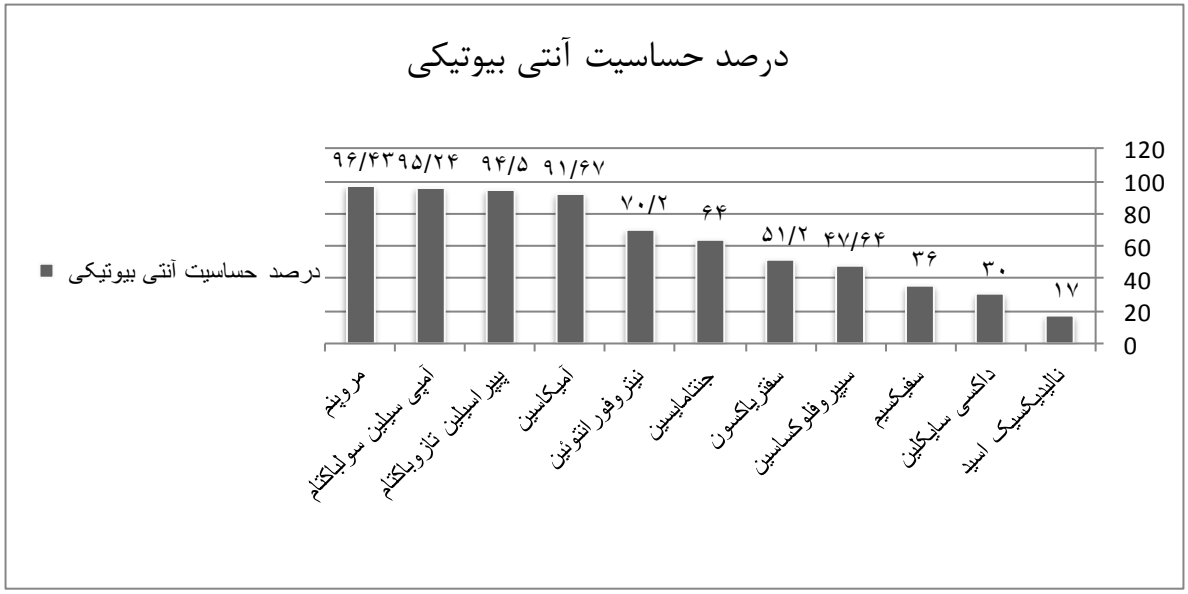
یافته ها

الگوی حساسیت به ۱۱ آنتی بیوتیک برای ۸۴ ایزوله اشرشیاکلی در جدول ۲ نشان داده شد. بر اساس نتایج مطالعه بیشترین حساسیت به ترتیب مربوط به مروپنم (۹۶/۴۳ درصد)، آمپی سیلین سولباکتام (۹۵/۲۴ درصد)، پیپراسیلین تازوباکتام (۹۴/۵ درصد)، آمیکاسین(۹۱/۶۷ درصد) و بیشترین مقاومت به ترتیب به نالیدیکسیک اسید (۸۳ درصد)، داکسی سالیکلین (۷۰ درصد)، سیپروفلوکساسین (۵۱/۲ درصد) و سفتریاکسون (۴۶/۶۳ درصد) گزارش شده است.

پس از انجام آنتی بیوگرام برای دیسک های انتخابی، ۸۴ ایزوله که حداقل به یکی از آنتی بیوتیک های بتالاکتام نیمه حساس یا مقاوم بودند جهت تأیید ایزوله های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف با استفاده از دیسک های ترکیبی ترکیبی سفوتاکسیم+ کلاوولانیک اسید، سفتازیدیم+ کلاوولانیک اسید مورد آزمایش قرار گرفتند. (۳۴/۵ درصد) ۲۹ ایزوله به کمک این روش تولید کننده ESBL شناسائی شد. با استفاده از دیسک های ترکیبی دیسک های ترکیبی سفوتاکسیم/ کلاوولانیک اسید، سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید به ترتیب (۹۰ درصد) و (۸۹ درصد) ایزوله به عنوان ایزوله های مولد بتالاکتاماز شناسایی شدند.

فراوانی ژن های مولد بتا لاکتاماز ژن CTX-M در سویه های اشرشیاکلی از بیمارستان شهید یحیی نژاد بابل (۶۹ درصد) می باشد. همچنین ارتباط معنی دار آماری بین ژن CTX-M و ESBL مشاهده گردید ($P<۰/۰۳$). از نظر فاکتورهای دموگرافیک، وجود بیماری های زمینه ای ارتباط معنی دار آماری با ژن CTX-M نشان داد ($P<۰/۰۳$). ژن CTX-M رابطه معنی داری با سایر آنتی بیوتیک ها نداشته و به عبارت دیگر وجود این ژن در نمونه های اندازه

گیری شده باعث افزایش مقاومت باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک ها نشده است. بین مقاومت به آنتی بیوتیک ها و جنس و سن ارتباط معنی دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



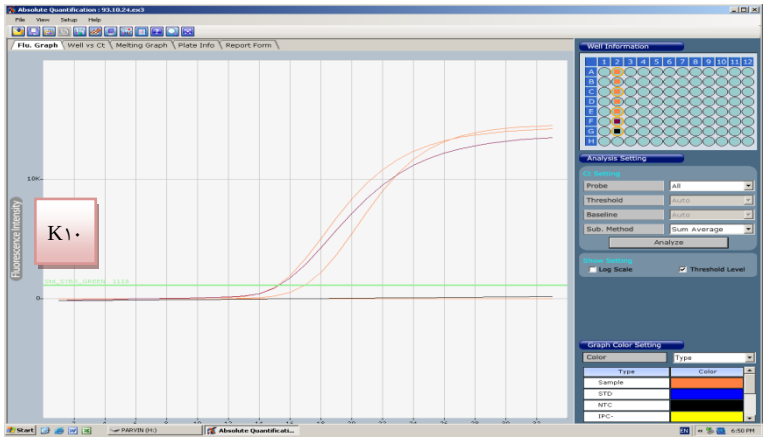
نمودار ۱-حساسیت آنتی بیوتیکی اشرشیاکلی واجد ژن CTX-M به آنتی بیوتیک ها

جدول۲: میزان حساسیت و مقاومت سویه های جداسازی شده به آنتی بیوتیک های مختلف با روش دیسک دیفیوژن

نام آنتی بیوتیک	علامت اختصاری	میزان حساسیت تعداد (درصد) Sensitive	میزان مقاومت تعداد (درصد) Resistance	میزان حساسیت نسبی تعداد (درصد) Intermediate
نیتروفورانتوئین	FM	۵۹(٪۷۰/۲۵)	۲۵(٪۲۹/۸)	-
مروپنم	MEM	۸۱(٪۹۶/۴۳)	۳(٪۳/۵۷)	-
آمیکاسین	AK	۷۷(٪۹۱/۶۷)	۷(٪۸/۳۳)	-
پیپراسیلین تازوباکتام	PTZ	۷۹(٪۹۴/۵)	۲(٪۲/۳۸)	۳(٪۳/۵۷)
آمپی سیلین سولباکتام	SAM	۸۰(٪۹۵/۲۴)	۴(٪۴/۷۶)	-
جنتامایسین	GN	۵۴(٪۶۴)	۳۰(٪۳۶)	-
سیپروفلوکساسین	CP	۴۰(٪۴۷/۶۲)	۴۳(٪۵۱/۱۹)	۱(٪۱/۱۹)
داکسی سایکلین	D	۲۵(٪۳۰)	۵۹(٪۷۰)	-
سفتریاکسون	CRO	۴۳(٪۵۱/۲)	۳۹(٪۴۶/۴۳)	۲(٪۲/۳۷)
نالیدیکسیک اسید	NA	(٪۱۷)۱۴	۷۰(٪۸۳)	-
سفیکسیم	CFM	۳۰(٪۳۶)	**۵۴(٪۶۴)**	-
سفوتاکسیم	CTX	۳۱(٪۳۷)	۴۴(٪۵۲/۴)	۹(٪۱۰/۶)
سفتازیدیم	CAZ	۲۳(٪۳۶/۱)	**۵۰(٪۵۶/۳)**	۱۱(٪۷/۶)

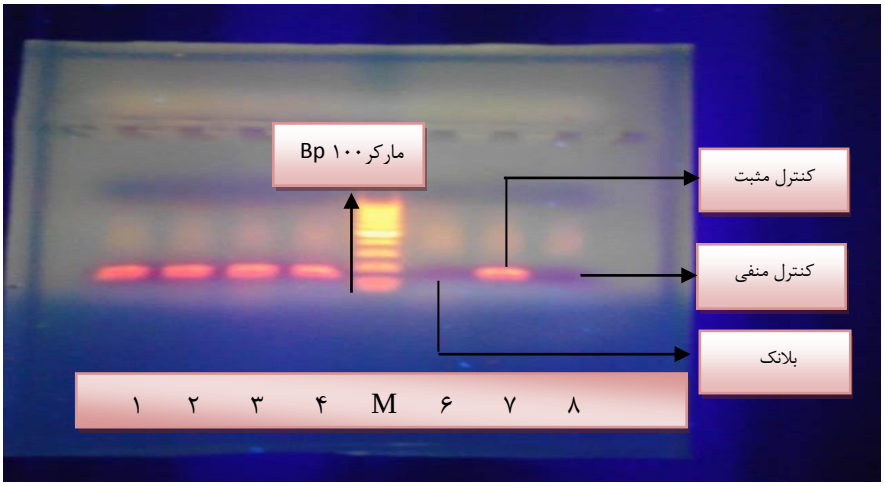
نتایج این مطالعه نشان می دهد که بیشترین مقاومت به نالیدیکسیک اسید (۸۳ درصد) داکسی سالیکلین (۷۰ درصد) می باشد.

غلظت DNA کروموزومی به دست آمده از باکتری اشرشیاکلی با غلظت ۵۰ ng/µl در طول موج 280 nm برابر ۱ تخلیص شد. اندازه قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با مارکر حدود ۱۵۳ جفت باز بود (شکل ۲و۳).



شکل ۲-میزان تکثیر DNA سویه های اشرشیاکلی با روش (Real time-PCR). نتایج آزمایش پنج بیمار به همراه یک نمونه کنترل مثبت و یک نمونه کنترل منفی، منحنی هایی که از حد آستانه ۱۰K بالاتر آمده اند مربوط به نمونه های است که Real time-PCR برای آن ها مثبت محسوب می شود.

علاوه بر این محصولات PCR هر ژن در ژل الکتروفورز بارگذاری شد که شکل ژل الکتروفورز، باند های مربوط به تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر را تأیید نمود (شکل ۳).



شکل ۳- الکتروفورز محصولات تکثیری ژن CTX-M روی ژل آگارز یک درصد. باند چاهک های ۱و۲و۳و۴ محصولات تکثیری ژن CTX-M را نشان می دهد. چاهک M مارکر نشانگر (Size Marker) با اندازه ۱۰۰ جفت بازی را نشان می دهد. چاهک ۶، نمونه بلانک را نشان می دهد. باند چاهک ۷، کنترل مثبت را نشان می دهد. چاهک ۸، کنترل منفی را نشان می دهد.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، مقاومت به نالیدیکسیک اسید، داکسی سایکلین، سفیکسیم، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین، بالای (۵۰ درصد) است. در واقع در تمام دنیا هنوز اشرشیاکلی میکروارگانیسم غالب در عفونت های ادراری است که ۸۰ تا ۹۰ درصد موارد عفونت های ادراری را ایجاد می کند (۱۷).

این باکتری ها مانند سایر عفونت های بیمارستانی از طریق دست های آلوده پرسنل بیمارستان و تجهیزات آلوده پزشکی از جمله کاتترهای ادراری، عروقی و شریانی نیز انتقال می یابند. در مطالعه حاضر شیوع آنزیم های ESBL در اشریشیاکلی برای CTX-M (۶۹ درصد) می باشد. در مطالعه Mirsalehian بر روی نمونه های جدا شده از بیماران بستری در ICU (۶۰ درصد) از اشریشیاکلی های جدا شده تولید کننده آنزیم ESBL بودند (۱۸).

باکتری اشرشیا کلی یکی از پاتوژن های مهمی است که سبب افزایش مقاومت نسبت به اغلب آنتی بیوتیک ها شده است. گونه های مقاوم اشرشیاکلی روز به روز بیشتر شده است و مشکل از جایی شروع می شود که بیمار دوره درمان را کامل نکرده است و باکتری های زنده شروع به مقاومت می نمایند که معضلی برای پزشکان محسوب می شود. در اکثر موارد به علت استفاده بی رویه و خودسرانه آنتی بیوتیک ها، شاهد موارد زیادی از مقاومت های داروئی نسبت به آنتی بیوتیک ها در مناطق مختلف ایران و جهان به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه های ایجاد کننده و تفاوت در میزان مصرف آنتی بیوتیک ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی بیوتیک ها متفاوت می باشند. مقاومت باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک ها به صورت وراثتی و اکتسابی می باشد. در مقاومت وراثتی (کروموزومی یا پلاسمیدی)، صفات ذاتی و ارثی سلول، عامل ممانعت از اثر و عمل آنتی بیوتیک است و سویه های مقاوم از میان توده باکتری های حساس پس از قرار گرفتن در معرض آنتی بیوتیک ظاهر می شوند (۱۹). بررسی صورت گرفته نشان می دهد که اشرشیاکلی جدا شده از انسان، مهم ترین پاتوژنی است که افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به اغلب داروهای ضد میکروبی را نشان می دهد (۲۰).

با توجه به شیوع بالای ESBL ها (۶۴ درصد) در تهران نسبت به کشورهای مختلف جهان، یکی از مهم ترین دلایل این قضیه، مصرف خودسرانه و بیش از حد آنتی بیوتیک های بتالاکتام در ایران می باشد. با توجه به شیوع ۳۴/۵ درصدی آنزیم های ESBL در این مطالعه و شیوع ۶۴ درصدی که از تهران گزارش شده است، شیوع این نوع از آنزیم ها در بابل نسبت به تهران کمتر می باشد اما شیوع ۶۹ درصدی گروه CTX-M قابل توجه می باشد (۲۱). میزان ESBL در سویه های ایزوله شده از کشورهای مختلف و همچنین در یک کشور از یک بیمارستان با بیمارستان دیگر متفاوت می باشد که این مسئله بستگی به سیستم کنترل عفونت و رژیم درمانی دارد. ۶۹ درصد از نمونه های فنوتیپ مثبت، واجد ژن CTX-M بودند. منصوری و همکاران در مطالعه ای دریافتند که از ۲۰۰ ایزوله اشرشیاکلی مورد بررسی میزان مقاومت سیپروفلوکساسین (۴۱ درصد) است که در مقایسه با مطالعه حاضر پایین تر می باشد. در این مطالعه (۶۳ درصد) از ایزوله های اشرشیا کلی مولد آنزیم ESBL تشخیص داده

شد که در این مورد بیش از مطالعه ما می باشد (۲۲). شایانفر و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۱۰ در تهران به این نتیجه رسیدند که (۲۸/۶ درصد) از ایزوله های اشرشیا کلی مولد ESBL هستند که نتیجه بسیار نزدیک به نتیجه مطالعه ما (۳۴/۵ درصد) می باشد (۲۳). در مطالعه ای که توسط براتی و همکاران انجام شد، حساسیت نسبت به جنتامایسین، نیتروفورانتوئین، نالیدیکسیک اسید را به ترتیب (۴۰/۳ درصد)، (۷۲/۵ درصد)، (۵۵/۳ درصد)، گزارش نمودند که این نتایج با نتایج مطالعه حاضر که (۶۴ درصد)، (۷۰/۲ درصد)، (۱۷ درصد) گزارش شد، نشان دهنده این است که فقط حساسیت به نیتروفورانتوئین مطابقت دارد (۲۴).

در بررسی محمدی مهر و همکاران در سال ۱۳۸۶ در تهران انجام شد، مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، نیتروفورانتوئین، در باکتری اشرشیاکلی به ترتیب (۵۸/۳۳ درصد)، (۲۷/۷۷ درصد)، (۱۳/۸۸ درصد) گزارش شد. نتایج به دست آمده از این مطالعه میزان مقاومت به آنتی بیوتیک ها را (۵۱/۱۹ درصد)، (۳۶ درصد)، (۲۹/۸ درصد) نشان داد. مقایسه نتایج به دست آمده نشان دهنده این است که در دو مورد اول با مطالعه ما مطابقت دارد و در مورد نیتروفورانتوئین مقاومت مطالعه ما بالاتر می باشد (۲۵). در تحقیقی که توسط محمدی و همکاران در شهر فلاورجان صورت گرفت، میزان مقاومت به آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید (۲۰/۱ درصد) گزارش شد، این نتایج با نتایج مطالعه حاضر که (۸۳ درصد) مشاهده شد، مطابقت ندارد و نشان دهنده این است که مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید در این منطقه بالاتر می باشد (۲۶). درتحقیقی که توسط مهاجری و همکاران برروی اشرشیاکلی های جداشده از عفونت های ادراری در سال ۱۳۸۸ در شهر کرمانشاه صورت گرفت، میزان حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک سفتریاکسون (۷۱ درصد) گزارش شد، این نتایج با نتایج مطالعه حاضر که (۵۱/۲ درصد) مشاهده شد، مطابقت ندارد. در بررسی دیگری که توسط مهاجری و همکاران، میزان حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک آمیکاسین را (۶۶/۴ درصد) گزارش نمود، این نتیجه با نتایج مطالعه حاضر که (۹۱/۶۷ درصد) گزارش شد، نشان دهنده درصد حساسیت بیشتر مطالعه حاضر می باشد. در طی همین بررسی میزان حساسیت به سفیکسیم را (۷۱/۲ درصد) گزارش نمود، این نتیجه با نتایج حاضر که ۳۶ درصد است، مطابقت ندارد (۲۷) که این اختلاف را می توان به منبع عفونت و نوع نمونه بررسی شده، سیستم کنترل عفونت، مدت زیاد بستری شدن بیماران، مصرف زیاد آنتی بیوتیک ها، استفاده از سوند های ادراری در بخش ها عنوان کرد. درمطالعه صورت گرفته توسط مدنی و همکاران در سال ۱۳۸۵ در شهر کرمانشاه، میزان حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون، و مروپنم به ترتیب (۶۶/۷ درصد)، (۶۲/۲ درصد)، (۸۸/۲ درصد) گزارش شد، این نتایج با نتایج مطالعه حاضر که به ترتیب (۴۷/۶۴ درصد)، (۵۱/۲ درصد)، (۹۶/۴۳ درصد) مشاهده شد، مطابقت دارد. همچنین مدنی و همکاران میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مروپنم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون را به ترتیب (۱۱/۸ درصد)، (۳۰/۴ درصد)، (۲۹/۸ درصد) گزارش شد، این نتایج با نتایج حاضر که به ترتیب (۳/۵۷ درصد)، (۷۰ درصد)، (۴۶/۴۳ درصد) مشاهده شد، که با نتایج ما مطابقت ندارد (۲۸).

مطالعات نشان می دهد که مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های جدا شده از عفونت های ادراری وجود دارد، لذا استفاده از آنتی بیوتیک ها در درمان باکتری اشریشیاکلی داروهای جدید مثل مروپنم که مقالات مختلف کارایی آن را بسیار مثبت ارزیابی کرده اند، توصیه می گردد (۲۹). درمطالعه حاضر افزایش حساسیت آنتی بیوتیکی مروپنم (۹۶/۴۳ درصد) مشاهده شد که با مطالعه فاضلی در سال

۸۶ مطابقت دارد (۳۰). در هندوستان CTX-M با شیوع (۸۵/۴ درصد) رایج ترین ESBL بوده، همه-CTX Mهای گزارش شده به گروه CTX-M-I تعلق داشته است که تقریباً با نتایج این مطالعه (۶۹ درصد) از گروه CTX-M-I به دست آمده، مطابقت دارد (۳۱). در مطالعه میرزائی و همکاران که بر روی ۱۶۰ ایزوله اشرشیاکلی که با روشPCR انجام شد (۳۵/۷ درصد) ایزوله دارای ژن CTX-M به دست آمد که با نتایج این مطالعه مطابقت ندارد (۱۰) علت این اختلاف احتمالاً مربوط به نوع روش مولکولی استفاده شده می باشد که در مطالعه ما به صورت Real time-PCR بوده در صورتی که در مطالعه فوق با روش PCR کار شده است. از طرفی سیستم کنترل عفونت بیمارستان، نحوه درمان بیماران نیز می تواند به عنوان دلیلی برای این عدم مطابقت باشد.

در مطالعه شهید و همکاران شیوع ژن CTX-M را در ۹۳ نمونه مورد بررسی قرار دادند و مشخص شد که از ۹۳ نمونه ۷۲ نمونه (۷۷/۴ درصد) به وسیله PCR، ژن-CTX M مثبت بودند.که با نتیجه مطالعه حاضر مطابقت دارد (۳۲).

مطالعات صورت گرفته فراوانی نسبتاً بالای ژن های بتالاکتامازی CTX-M در سویه های اشرشیاکلی نسبت به سایر بیمارستان های کشور می باشد. بنابراین ضروری است که برای شناسائی این نوع از مقاومت از روش مولکولی در کنار روش فنوتیپی استفاده شود. بیمارانی که مبتلا به عوامل عفونت زا تولید کننده ESBL هستند علاوه بر عدم درمان با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف غالباً به سایر انواع آنتی بیوتیک ها نیز مقاومت نشان می دهند.

درمان تجربی عفونت های مقاوم در برابر دارو باعث افزایش هزینه‌ها، عوارض جانبی برای بیمار و به خطر افتادن جان بیمار می‌گردد. انتخاب آنتی‌بیوتیک باید براساس نوع پاتوژن، الگوهای حساسیت آنتی‌بیوتیکی، مکانیسم های مقاومت آنتی‌بیوتیک، مدل فارماکوینتیک دارو، میزان تحمل به دارو و ایمنی بیمار انجام گیرد. به همین دلیل تمامی مراکز درمانی باید دارای سیاست مدون و برنامه های مناسب جهت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها باشند که هدف از این کار اطمینان از تجویز مناسب، آنتی بیوتیک مؤثر و اقتصادی آنتی بیوتیک ها جهت پیشگیری از ایجاد میکرو ارگانیسم های مقاوم و کاهش انتشار آن ها باشد.

نتایج این مطالعه نشان می دهد که مروپنم، آمپی سیلین سولباکتام، پیپراسیلین تازوباکتام، آمیکاسین دارو هایی مناسب جهت شروع درمان تجربی اشرشیاکلی تولیدکننده ESBL تا قبل از آماده شدن جواب آنتی بیوگرام می‌باشد. لذا با توجه به نتایج مطالعه حاضر ژن های مولد بتالاکتاماز CTX-M که تنها جزئی از خانواده بزرگ بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌باشد، در سویه های اشرشیاکلی این منطقه گزارش گردید، می‌تواند بیانگر وجود کلون‌های مختلف باکتری های مولد دیگر ژن های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در منطقه باشد. بنابراین جهت کسب آگاهی بیشتر از میزان شیوع دیگر ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف در گونه های مختلف باکتری ها در این منطقه به بررسی های مولکولی و اپیدمیولوژیکی بیشتری نیاز است. جلوگیری از انتشار مقاومت های دارویی یکی از مسائل مهم درمان عفونت ها در جامعه محسوب می شود. با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها، تشخیص سریع و به موقع سویه های مقاوم، به منظور انتخاب گزینه های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت، امری ضروری به نظر می رسد.

پیشنهاد می شود، درمان عفونت های ادراری که از اهمیت خاصی برخوردار است، باتوجه به الگوی حساسیت و مقاومت منطقه صورت گیرد تا از ایجاد پدیده مقاومت

دارویی و شکست های درمانی که منجر به عارضه دار شدن عفونت می گردد، جلوگیری شود.

از طرف دیگر باکتری هـای تولیدکننده ESBL روز به روز در حال افزایش بوده، لذا بهره‌گیری از الگـوی صحیح مصرف آنتی‌بیوتیک ها، محدود سازی استفاده از داروهای بتالاکتام به ویژه سفالوسپورین‌ها، بکارگیری برنامه هـای چرخشـی مصـرف آنتـی‌بیوتیـک هـا و راه انـدازی روش‌هـای تشخیصی ایـن سـویه بـاکتری در آزمایشگاه های میکروبیولوژی پیشنهاد می‌گردد. بنابراین جهت شناسایی ژن مذکور از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی در این منطقه به مطالعات بیشتری نیاز است.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه تحت عنوان ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و وجود ژن CTX-M در جدایه های بالینی اشرشیا کلی مولد ESBL به روش PCR از نمونه های ادراری بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شهید یحیی نژاد بابل در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۹۳ و کد ۲۳۹۳۰۵۱۳۹۳۱۰۰۲ در دانشگاه علوم پزشکی بابل، بیمارستان شهید یحیی نژاد و آزمایشگاه پاتوبیولوژی پاستور بابل اجرا شده است.

References

1. Sanchez UM, Bello TH, Dominguez YM, Mella MS, Zemelman ZR, Gonzalez RG. [Transference of extended-spectrum beta-lactamases from nosocomial strains of Klebsiella pneumoniae to other species of Enterobacteriaceae]. Rev Med Chil. 2006;134(4):415-20.

2. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74(3):417–33.

3. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995;8(4):557-84.

4. 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.

5. Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver A, et al. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum beta-lactamase confirmation methods for Escherichia coli with isolates collected during Project ICARE. J Clin Microbiol. 2003;41(7):3142-6.

6. Medeiros A, Mayer KH, Opal S. Plasmid mediated beta-lactamases. The Antimicrobic Newsletter 1988;5(9):61-2.

7. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(3):969–76.

8. Bonnedahl J, Drobni M, Gauthier-Clerc M, Hernandez J, Granholm S, Kayser Y, et al. Dissemination of Escherichia coli with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. PLoS One. 2009;4(6):e5958.

9. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother. 2007;59(2):165-74.

10. Mirzaee m, Pourmand MR, Chitsaz M, Mansouri S. Antibiotic resistance to third generation cephalosporins due to CTX-M-Type extended-spectrum β-Lactamases in clinical isolates of escherichia coli. Iranian J PublHealth. 2009;38(1):10-7.

11. Kim YK, Pai H, Lee HJ, Park SE, Choi EH, Kim J, et al. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in children: epidemiology and clinical outcome. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002;46(5):1481-91.

12. Honarm H, Falah Ghavidel M, Nikokar I, Rahbar Taromsari M. Evaluation of a PCR assay to detect enterococcusfaecalis in blood and determine glycopeptides resistance genes: van a and van B. Iranian journal of medical sciences. 2012;37(3):194-9.

13. Sagh H, Soroshniya M. Comprehensive reference laboratory equipment and products Tehran: Cultural agency Mir 2003.

14. Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. The Journal of infection. 2003;47(4):273-95.

15. Calbo E, Freixas N, Xercavins M, Riera M, Nicolas C, Monistrol O, et al. Foodborne nosocomial outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae: epidemiology and control. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2011;52(6):743-9.

16. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twentyfive years of quantitative PCR for gene expression analysis.Biotechniques. 2008; 44(5): 619-626.

17. Arbeloa A, Oates CV, Marches O, Hartland EL, Frankel G. Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli type III secretion effector EspV induces radical morphological changes in eukaryotic cells. Infection and immunity. 2011;79(3):1067-76.

18. Bouzari S, Jafari A, Azizi A, Oloomi M, Nataro JP. Short report: characterization of enteroaggregative Escherichia coli isolates from Iranian children. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2001;65(1):13-4.

19. Norouzi J, Kargar M, Pourshahin F, Kamali S. Study on the prevalence of urinary tract infection by escherichia coli antibiotic resistance and plasmid profile of isolated bacteria .in Jahrom city. J Army Uni Med Sci. 2006;4(13):745-9.

20. Novakova I, Kacaniova M, Hascik P, Pavlcova S, Hleba L. The resistance to antibiotics in strains of E. coli and enteenterococcus sp. Isolated from rectal swabs of lambs and calves. J

Lucraristiintificezootehniesibiotehno. 2009;42(2):322-6.

21. Soltan Dallal MM, Azarsa M, Shirazi MH, Rastegar Lari A, Owlia P, Fallah Mehrabadi J, 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 Univ Med J. 2011;69(5):273-8.

22. Mansouri S, Abbasi S. Prevalence of multiple drug resistant clinical isolates of extendedspectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae in southeast Iran. Iranian Journal of Medical Sciences. 2010;35(2):101-8.

23. Shayanfar N, Rezaei M, Ahmadi M, Ehsanipour F. Evaluation of extended spectrum beta lactamase (ESBL) positive strains of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in bacterial cultures. Iran J Pathol. 2010;5(1):34-9.

24. Barati L, Ghezelsofla F, Azarhoush R, Heidari F, Noura M. Antibiotic sensitivity of isolated E.coli from pregnant women urine. J Gorgan Uni Med Sci. 2011;13(3):101-7.

25. MohamadiMehr M, Faizabadi MM, Bahadori O. Antibiotic resistance patterns of gram-negative bacilli responsible for nosocomial infections in hospital intensive care department of family and Golestan Tehran 2007. J Army Uni Med Sci. 2010;8(4):283-90.

26. Mohamadi M. Survey Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from urinary tract infections. Islamic Azad Uni J Med Sci. 2006;16(2):95-9.

27. Mohajeri P, Izadi B, Rezai M, Falahi B, Khademi H, Ebrahimi R. Assessment of the frequency of Extended Spectrum Beta Lactamases Producing Escherichiacoli Isolated from Urinary Tract Infections and its Antibiotic Resistance Pattern in Kermanshah. J Ardabil Uni Med Sci. 2011;11(1):86-94.

28. Madani SH, Khazaee S, Kanani M, Shahi M. Antibiotic resistance pattern of E.coli isolated from urine culture in Imam Reza Hospital Kermanshah-2006. J Kermanshah Uni Med Sci. 2008;12(3):287-95.

29. Horcajada JP, Soto S, Gajewski A, Smithson A, Jimenez de Anta MT, Mensa J, et al. Quinolone-resistant uropathogenic Escherichia coli strains from phylogenetic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts. Journal of clinical microbiology. 2005;43(6):2962-4

30. Fazeli H, Hoseini M M, 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. J Shahrekord Univ Med Sci. 2009; 10 (4) :58-64

31. Goyal A, Prasad KN, Prasad A, Gupta S, Ghoshal U, Ayyagari A. Extended spectrum beta-lactamases in Escherichia coli & Klebsiella pneumoniae & associated risk factors. The Indian journal of medical research. 2009;129(6):695-700.

32. Shahid M, Singhal M, Malik A, Jain A, Mondal M. Prevalence & antimicrobial resistance pattern of extended spectrum β- lactamase producing Klebsiella spp isolated from cases of neonatal septicaemia. Indian J Med Res. 2007;125(1):89-94.

33. Zamani K, Emami A, Bazargani A, Moattari A. Phenotypic and molecular characterization of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates in Shiraz, Iran. Shiraz University of Medical Sciences. 2015; 48(4):479-482

34. Cankar K, Stebih D, Dreo T, Zel J, Gruden K. Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. BMC Biotechnol. 2006;6:37.

Evaluation of antibiotic resistance and CTX-M gene in ESBL-producing Escherichia coli by PCR among urine samples of patients reffering to Yahyanejad hospital of Babol city, Iran

Fatemeh Zaboli[1*], Seyed Mojtaba Mahdipour Mir[2]

1. Assistant Proffessor, Department of Microbiology, Science and Research Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
2. M.Sc. in Microbiology, Department of Biology, Science and Research Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

Abstract

Background & Objective: *Escherichia coli* (E.coli) is one of the most common bacteria causing urinary tract infections which has become resistant to beta-lactam antibiotics due to the acquisition of plasmids encoding *extended-spectrum beta-lactamases* (ESBL). Here, we investigated the phenotype and genotype of *Cefotaxsim-M* (CTX-M) gene among ESBL-producing Escherichia coli among urine samples of patients reffering to Yahyanejad hospital of Babol city.

Method: The present cross-sectional study was conducted among all 1842 patients referring to Yahyanejad hospital since June to December of 2015. Disc diffusion method was used to evaluate the bacterial resistance to cefotaxime, meropenem, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, ceftriaxone, nitrofurantoin and nalidixic acid. The resistant strains were also confirmed using a combination of cefotaxime-clavulanic acid and ceftazidime-clavulanic acid discs. The presence of CTX-M gene was evaluated among ESBL-producing strains by Real time PCR. SPSS 20 software and chi-square test were used to analyze data statistically.

Results: A total of 84 E.coli isolates were detected in all specimens. The most sensitivities were against amikacin (91.67%), meropenem (96.43%), ampicillin/sulbactam (95.24%) and piperacillin/tazobactam (94.5%). However, the highest resistancies were against nalidixic acid (83%) , doxycycline/ salicilin (70%), ceftriaxone (46.63 %) and ciprofloxacin (51.2%). Twenty-nine isolates (34.5%) produced ESBL. The CTX-M positive ESBL-producing E-coli was 69%. There was a significant relationship between the presence of CTX-M gene and ESBL (*P*-value = 0.03).

Conclusion: In the present study, the presence of beta-lactamase-producing genes (CTX-M) in E.coli strains were markedly high. Therefore, the consumption of antibiotics should be controled and further phenotypic and genotypic studies on bacterial pathogens should be conducted.

Key words: *Escherichia coli*, antibiotic resistance, *extended-spectrum beta-lactamases*, *Cefotaxsim-*

Corresponding Author: Fatemeh Zaboli

Address: Department of Microbiology, Science and Research Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

E-mail: m.zaboli1379@yahoo.com