مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲٤، شماره٦، بهمن و اسفند ۱۳۹۸(شماره پی در پی ۱۳۷)

فراوانی ژن CTX-M-1 درایزوله‌های *Escherichia coli* مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در نمونه های بالینی با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR در یاسوج

زهرا خویشوند[۱]، مهری حسینی[۲]، سید سجادخرم روز[۱]، اصغر شریفی[۱]، سیده مرضیه طباطبایی[۳]، سید عبدالمجید خسروانی[۱*]

[۱]مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [۲]کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [۳]گروه زنان، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۶/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در میان ایزوله‌های بالینی، در اکثر مواقع ناشی از تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است. تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز با طیف وسیع(ESBLs) در میان ایزوله‌های بالینی به ویژه باکتری *E. coli* شیوع فراوانی یافته و از آنجا که این بتالاکتامازها شامل چندین زیر خانواده می‌باشند، طراحی و استفاده از پرایمرهای جهانی به منظور شناسایی کامل این زیر خانواده‌ها می‌تواند مفید واقع شود، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی فراوانی ژن CTX-M-1 در ایزوله‌های *Escherichia coli* مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در عفونت‌های ادراری بالینی با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR بود.

روش بررسی : در این مطالعه تجربی که در سال۱۳۹۵ انجام شد، نمونه‌های ادراری از آزمایشگاه‌های شهر یاسوج جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی انتقال داده شد، حساسیت باکتری‌های جدا شده نسبت به ۱۳ آنتی‌بیوتیک با روش انتشار دیسک بر اساس دستورالعمل CLSI تعیین و سویه‌ها با روش سینرژی دو دیسک از نظر وجود آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده بررسی شدند.سپس فراوانی ژن CTX-M1، در نمونه‌های ESBL با استفاده از روش PCR تعیین شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون آماری آنوا تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: بررسی حضور ژن CTX-M-1 بر روی ۲۰۰ ایزوله جداسازی شده *E.coli* با استفاده از روش PCR انجام گرفت. از ۲۰۰ سویه مورد بررسی ٦۲ (۳۱ درصد)، سویه مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بوده، پس از پروسه PCR از٦۲ سویه بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مثبت ۴۳ ایزوله (۶۹/۴ درصد) حاوی ژن CTX-M-1 بوده است. همچنین، در بررسی حساسیت انتی بیوتیکی، بیشترین درصد مقاومت ایزوله ها به .آنتی بیوتیک کوتریموکسازول(۵۰ درصد) و کمترین درصد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ایمیپنم(صفر درصد) مشاهده گردید.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده درصد بالای مقاومت بتالاکتامازی در بین سویه‌های *E.coli* می‌باشد. این مسئله یک خطر عمومی‌جدی را خاطر نشان می‌سازد که باید همه اقدامات برای جلوگیری از این خطر صورت گیرد. با توجه به حساسیت ایزوله های مقاوم به بتالاکتام مورد مطالعه و ایزوله های جداسازی شده در ایران، نسبت به ایمی پنم، برای درمان عفونت های بیمارستانی ناشی از این سویه ها استفاده از یک کارباپنم همراه با یک آنتی بیوتیک غیر بتالاکتام پیشنهاد می گردد

واژه‌های کلیدی: *E. coli*، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، CTX-M-1، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

***نویسنده مسئول: سید عبدالمجید خسروانی**، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، گروه میکروبیولوژی

Email: khosravani2us@yahoo.com

مقدمه

عفونت‌های مجاری ادراری یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین عفونت‌هایی است که در سنین مختلف روی می‌دهد و درمان نادرست آن می‌تواند منجر به بروز عوارض خطرناکی مانند اختلالات دستگاه ادراری، فشارخون و اورمی می‌شود. عفونت ممکن است در هر قسمتی از مجاری ادراری بروز نماید و باعث التهاب مثانه، مجرای پیشابراه، پروستات و کلیه گردد و درصد قابل توجهی از عفونت‌های ادراری فاقد علایم بالینی هستند(۱). در آمریکا پس از عفونت‌های مجاری تنفسی فوقانی، عفونت‌های ادراری در مقام دوم قرار داشته که بسیاری از زنان و مردان در طول زندگی به آن مبتلا می‌شوند. سالیانه بیش از ۸ میلیون مورد از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری به پزشکان آمریکا مراجعه می‌کنند که درصد قابل توجهی از آنها فاقد علایم بالینی هستند(۲). حدود ۱۵۰ میلیون نفر سالانه در سراسر جهان به این عفونت مبتلا می‌شوند که این امر بیش از ٦ بیلیون دلار هزینه به دنبال دارد. باکتری *E. coli* از باکتری‌های گرم منفی از خانواده *نتروباکتریاسه* است و عامل ۷۵ـ۷۰ درصد موارد عفونت دستگاه ادراری می‌باشد(۳). اساس درمان مناسب در عفونت‌های ادراری، انتخاب یک آنتی‌بیوتیک با کارایی خوب و ارزان می‌باشد و مشکل اصلی در درمان عفونت‌های ادراری ناشی از *Escherichia coli* مقاوم بودن باکتری نسبت به تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌باشد. از طرف دیگر گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی تقریباً همیشه باافزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها همراه بوده است. ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم باکتریایی اغلب به خاطر ویژگی‌های ژنتیکی باکتری‌ها، افزایش جمعیت، مسافرت و همچنین مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد(۵ و ٤). استراتژی های مختلفی به وسیله 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 Beta-lactamase-enzymes است(٦). تا به امروز حدود ۲۰۰ نوع Extended Spectrum Bete-Lactamase در دنیا کشف شده که اکثر آنها در خانواده *انتروباکتریاسه* دیده می‌شوند. این مسئله یکی از بحران‌های موجود در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌هاست، انتقال و انتشار سریع ارگانیسم‌هایی که قادر به تولید آنزیم‌های مذکور هستند، باعث بالا رفتن میزان عفونت‌های بیمارستانی مربوط در سراسر دنیا شده است(۷). بتالاکتامازها بر اساس نوع سوبسترا، وزن مولوکولی و خصوصیات فیزیکی به چهارگروه A، B، C و D تقسیم می‌شوند. بر اساس این طبقه‌بندی، آنزیم‌های وسیع‌الطیف در گروه A قرار گرفته و شامل مشتقات آنزیم‌های موتاسیون یافته TEM، SHV می‌باشند. بتالاکتامازهای تیپ CTX-M به طور گسترده از طریق پلاسمیدهای حامل ESBL که فاقد SHV، TEM می‌باشند منتشر گردید و برای اولین بار در اواخر دهه ۱۹۸۰ در اروپا گزارش شد. مقاومت باکتری گرم منفی به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام

وسیع‌الطیف در دو دهه گذشته به سرعت گسترش یافت به طوری که این مقاومت به طور گسترده به پلاسمیدهای حاوی ESBLs نسبت داده شدند(۹ و۸). CTX-M بیشترین شیوع را در بین بتالاکتامازها دارد که اولین بار در سال ۱۹۸٦ در ژاپن تعریف شد و در اکثر *انتروباکتریاسه*ها وجود دارد و از لحاظ فیلوژنی این آنزیم‌ها در پنج گروه اصلی (CTX-M-1 ،CTX-M-2 ،CTX-M-25، CTX-M-8 ،CTX-M-9) بر اساس شباهت اسید آمینه طبقه‌بندی شده‌اند. *E. coli* یکی از باکتری‌هایی است که قادر به تولید آنزیم‌های ESBL می‌باشد. این باکتری عضو اصلی خانواده *انتروباکتریاسه* و عامل بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی از قبیل؛ سپسیس، گاسترو انتریت، مننژیت نوزادی و بالاخص عفونت ادراری می‌باشد، لذا بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تحقیق پیرامون ژن‌های بتالاکتامازی در نمونه‌های اداری *E. coli* به عنوان اهداف این تحقیق لحاظ شده است(٦). مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در انسان و حیوان باعث از بین رفتن سویه‌های حساس و انتخاب سویه‌های مقاوم می‌شود. مقاومت سویه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها از مهم‌ترین مسایلی است که دنیای پزشکی با آن مواجه است،.لذا لزوم انجام آزمایش‌های حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در درمان این عفونت بیش از پیش احساس می‌گردد. شناخت ایزوله‌های باکتریایی مقاوم در یک منطقه و انتخاب داروی مناسب به پزشک معالج جهت درمان کمک خواهد کرد که این امر موجب کوتاه تر شدن مسیر درمان و کاهش عوارض جانبی مصرف داروهای مختلف خواهد شد(۱۰). بررسی ملکولی (ژنوتایپنگ) مقاومت های دارویی منجر به شناسایی، مکانیسم مقاومت موجود و میزان شیوع آن در منطقه می‌گردد که می‌توان با بررسی و گزارش نتایج به پزشکان منطقه همچنین شرکت‌های داروسازی جهت ساخت داروهای جدیدتر از پیشرفت مقاومت باکتریایی جلوگیری نمود و به الگوی درمانی مناسب دست یافت(۱۱ و۱۰). خانواده CTX-M از ESBLها در سال۱۹۸۹ برای اولین بار از آلمان گزارش شد و پس از آن در نقاط مختلف دنیا گسترش یافت. این آنزیم غالباً در *E.coli* و *کلبسیلا* گزارش شده است در صورتی که در سایر *انتروباکتریاسه* نیز دیده شده است. با توجه به این که بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به صورت روز افزون در میان باکتری‌های مختلف، به یک معضل بزرگ در رابطه با سلامت همگانی تبدیل شده است، بنابراین تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های بیماری‌زای شایع حایز اهمیت می‌باشد. به همین منظور این مطالعه با هدف تعیین و بررسی مقاومت ضد میکروبی در اشریشیا کولی جدا شده از عفونت‌های ادراری مولد CTX-M-1 با استفاده از PCR بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی در یک دوره ۶ ماهه از اول مهرماه تا اخر اسفند ۱۳۹۴ ایزوله‌های *E. coli* جدا شده از نمونه‌های ادراری از آزمایشگاه‌های شهر یاسوج جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه میکروبیولوژی

دانشگاه علوم پزشکی انتقال داده شد. تست‌های باکتریولوژی و بیوشیمیایی برای افتراق باکتری انجام گرفت. سپس نمونه‌ها بر روی محیط کشت انتخابی ائوزین متیلن بلو(EMB) کشت داده شدند. سپس برای شناسایی باکتری تست‌های بیوشیمیایی از قبیل؛ MRVP، سیمون سیترات، SIM، TSI روی کلنی‌ها صورت گرفت. کلنی‌های مربوط به ایزوله‌های مثبت *Escherichia coli* در ۷۰ـ درجه در محیط تریپتس سوی براث نگهداری شدند تا در مراحل بعدی از این ایزوله‌ها استفاده شود. به منظور تعیین حساسیت یا مقاومت ایزوله های *E. coli* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، ایمی‌پنم، نالیدیکسیک اسید، سفپیم، مروپنم، امیکاسین، سفتر یاکسون، سفوتاکسیم کلاولانیک اسید، سفتازیدیم کلاولانیک اسید، سفپیم کلاولانیک اسید، تست آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن انجام گردید و نتایج آن بر اساس استاندارد CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) M100-A20 (2010) تفسیر شدند. در ادامه سویه‌های مقاوم به بتالاکتامازها جداسازی شد(۱۲). در نهایت سویه‌هایی که از نظر فنوتیپی به بتالاکتامازها مقاوم بوده‌اند، از نظر وجود در ژن‌های CTX-M-1 مورد بررسی قرار گرفتند. به همین منظور DNA باکتری به روش boiling استخراج گردید و با استفاده از پرایمر ژن‌های مربوطه PCR انجام شد و محصول روی ژل آگارز تحت الکتروفورز قرار گرفت(۱۴و۱۳). پرایمرهای مورد استفاده برای انجام آزمایش در جدول ۱ آورده شده است.

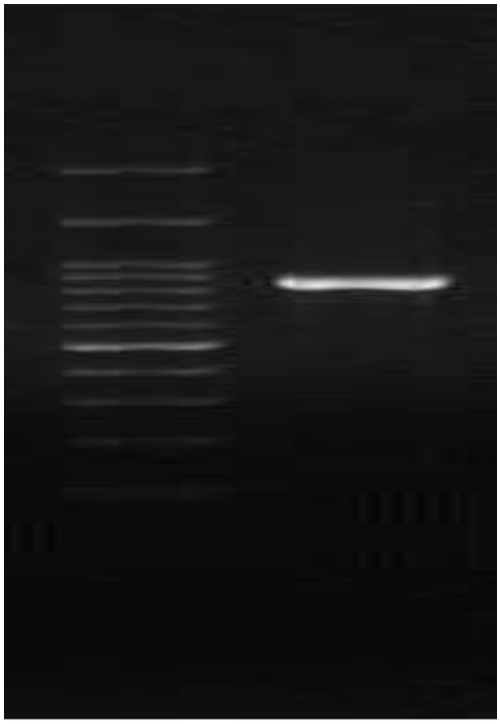
داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SPSS و با استفاده از آمار توصیفی؛ نظیر فراوانی، میانگین، انحراف معیار، نمودار و آمار استنباطی نظیر؛ آزمون مجذور خی، آزمون دقیق فیشر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

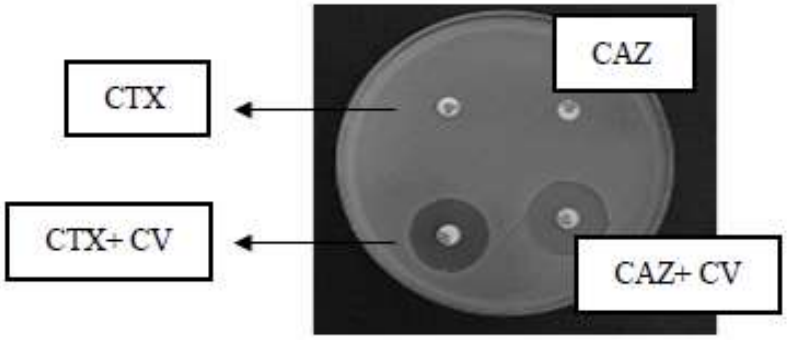
از ۲۰۰ نمونه مورد بررسی ۱۴۱(۷۰/۵ درصد) نمونه ادرار ، ۳۲ نمونه(۱۶ درصد) مدفوع ، ۱۵نمونه (۷/۵ درصد) نمونه خون، ۱۲(۶ درصد) از سایر نمونه‌ها بوده که پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی ۲۰۰ ایزوله *E. coli* جداسازی شده که از آن‌ها برای تست انتشار دیسک استفاده گردید. نتایج حاصل از مقاومت دارویی به ۱۰ آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در روش انتشار دیسک در نمودار(۱) بیان شده است. نتایج حاصله از آزمایش Combined disk شکل۱ نشان داد که از میان ۲۰۰ ایزوله *E. coli* ۶۲(۳۱ درصد) نمونه مولد بتا لاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌باشد. قابل توجه است که بیشترین مولّدین آنزیم‌های بتالاکتامازی متعلق به نمونه‌های ادراری بوده است. تشخیص ژن CTX-M-1 مشخص شد که ۴۳(۶۹/۹ درصد) ایزوله *E. coli* مولد ESBLs حاوی ژن مورد نظر بودند(شکل۲).

جدول ۱: پرایمرهای ژن CTXM-1.

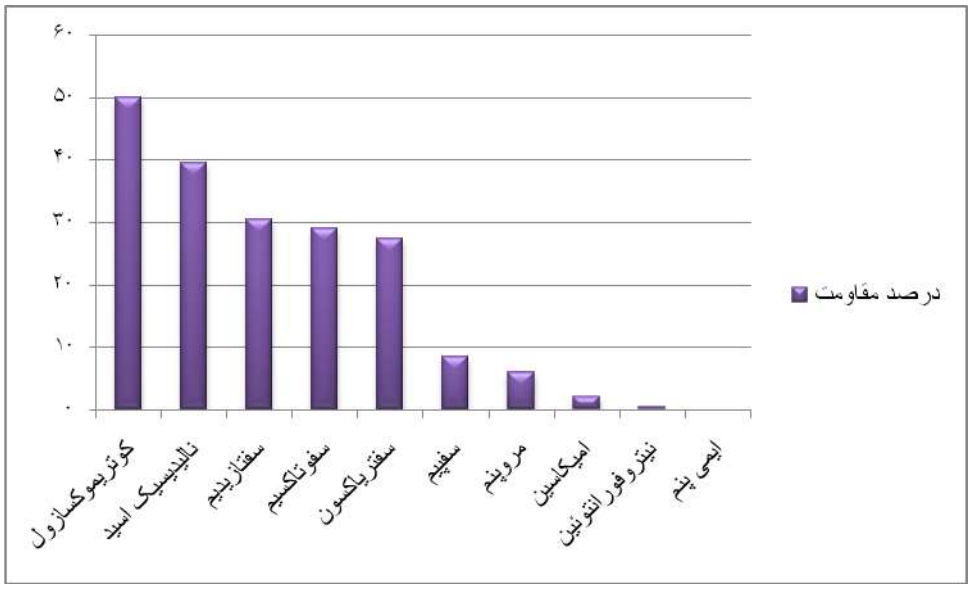
نام ژن	توالی پرایمر ۵ به ۳	اندازه محصول
CTXM-1	F: 5GGTTAAAAAATCACTGCGTC' 3 R: 5TTGGTGACGATTTTAGCCGC' 3	850bp



شکل ۲: نتیجه PCR ژن مورد بررسی: CTX-M-1 توضیح شکل کامل‌تر شود



شکل۱: تشخیص فنوتیپی مولدینESBLs مثبت توضیح شکل کامل‌تر شود



نمودار۱: نمودار درصد مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها. بیشترین درصد مقاومت ایزوله ها به آنتی بیوتیک کوتریموکسازول(۵۰ درصد) و کمترین درصد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ایمیپنم(صفر درصد) مشاهده گردید.

بحث

اعضای خانواده Enterobacteriaceae عفونت‌های گوناگونی مانند عفونت دستگاه گوارش ، مجاری ادراری و سپتی سمی ایجاد می کنند(۱۵) امروزه، تولید Enterobacteriaceae ESBL به عنوان یک مشکل اساسی در پزشکی مطرح شده است، زیرا درمان آنها بسیار دشوار است و همچنین کنترل عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این میکرواورگانیسم‌ها با مشکلاتی در بیمارستان‌ها و مراکز بهداشتی ـ درمانی روبرو می‌شود، لذا با توجه به این موضوع ، شیوع عفونت‌ها به دلیل تولید بتالاکتاماز در کل دنیا و ایران رو به افزایش است (۱۷ـ۱۶). لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی مقاومت ضد میکروبی در اشریشیا کولی جدا شده از عفونت‌های ادراری مولد CTX-M-1 با استفاده از PCR بود.

تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف یکی از خطرهای جدی در درمان عفونت‌های دارای مقاومت چندگانه می‌باشد که از زمان کشف آن‌ها در سال ۱۹۸۰ به سرعت در سطح جهان گسترش یافته‌اند و به عنوان یکی از معضلات بهداشت عمومی خود را نمایان ساخته است. مهم‌ترین دلیل آن می‌تواند مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتا می‌باشد، تا اواخر سال ۱۹۹۹ اغلب ESBLهای جدا شده از بیماران شامل SHV و TEM بود(۱۸)، اما در پژوهش‌های اخیر، CTX-M بتالاکتاماز وسیع‌الطیف غالب جدا شده از بیماران می‌باشد و در سرتاسر جهان اعضاء *انتروباکتریاسه* حاوی ژن *bla*CTX-M جداسازی می‌شود(۱۹). ارایه

گزارش‌های متفاوت از نـواحی مختلـف جغرافیـایی بـر نقـش پـژوهش‌هـای منطقـه‌ای و اختصاصـی بـروز مقاومت‌ها تأکید دارد.لـذا بـا بررسـی نمونـه‌هـایی از بیمارستان‌های شهر تهـران و تعیـین میـزان فراوانـی سویه‌های تولید کننده آنزیم ESBL و شناسایی میـزان نقـش آنـزیم CTX-M-1 در مقاومـت بـه نسـل سـوم سفالوسپوری آ نهـا از اولویـت‌هـای ایـن تحقیـق قـرار گرفـت. تیـپ CTX-M بـه طـور غالـب در سـه ناحیـه جغرافیایی(آمریکای جنوبی، خاور دور و شرق اروپـا) یافت می‌شوند. هر چنـد در سـال‌هـای اخیـر در غـرب اروپا، آمریکای شمالی، چین، ژاپـن، هنـد نیـز گـزارش شده است(۲۱و۲۰). بررسی حاضر نشان می‌دهد کـه از میان ایزوله *E. coli* ۶۲ نمونـه (۳۱ درصـد) ، نمونـه مولد ESBLs بوده که ۴۳ (۶۹/۹ درصد) از آنها حـاوی ژن CTX-M-1 مـــی‌باشـــد. بـــا مطالعـــه بـــر روی *انتروباکتریاسه*هـای دارای مقاومـت وسـیع‌الطیـف در جنوب فرانسه به بررسی *کلبسیلا پنومونیه* و *E.coli* در نمونه‌های بالینی پرداخت و با استفاده از نوارهـای MIC و نیز با انجام PCR و بـا بررسـی ژن‌هـای blaCTX-M ، blaTEM،blaSHV به این نتیجه رسید کـه ۴۷/۱ درصـد دارای مقاومت نسبت به یک یا چند آنتی‌بیوتیـک نظیـر؛ تتراسایکلین، آمپی سیلین و غیره داشته که از این میان ۹/۴ درصد آن‌ها مولد آنزیم‌هـای بتالاکتامـازبوده و ۶ درصـد از ایـن گـروه نیـز حامـل پلاسـمید CTX-M می‌باشند(۲۲). در مطالعه سـویه *E. coli* از نمونـه‌هـای بالینی مختلف مورد بررسی قرار گرفت که با اسـتفاده از تست‌های DAD و PCR ۵۲/۵ درصد دارای ژن ESBL بودند که ۲۴ درصد از سویه‌ها دارای ژن TEM بودنـد. 160ایـــزولـــه *E.coli* از نظـــر تـــولیـــد بتالاکتامازهای CTX-M را با روشPCR مورد بررسی قرار دادنـد کـه ۳۷/۸ درصـد نمونـه‌هـا مثبـت بودنـد. گروه CTX-M-1، ۳۵/۷۸ درصـد و گـروه CTX-M-5، ۲/۱ درصـــد را بـــه عنـــوان مـــوارد مثبـــت تشـــکیل دادند(۲٤ و۲۳). شایان ذکر است کـه گونـه‌هـا و زیـر گونه‌هـای آنـزیم‌هـای بتالاکتامـازی وسـیع‌الطیـف در شناسـایی نـوع آنتـی‌بیوتیـک‌هـای مـؤثر در درمـان عفونت‌های مقاوم و جلوگیری از گسترش مقاومت‌های مفید و ثمربخش می‌باشد، همچنین شناسایی کلنی‌های شایع باکتریایی می‌تواند در ارایه استراتژی‌های واحـد درمانی و مدیریت بیمارسـتانی بـر مقاومـت‌هـا مـؤثر باشـد. نـام CTX بیـانگر قـدرت هیـدرولیزی بـالای بتالاکتامـاز در برابـر سفوتاکسـیم اسـت. بـیش از ۴۰ آنزیم CTX-M در حال حاضر شـناخته شـده اسـت کـه آنهـا را در پـنج گـروه طبقـه‌بنـدی مـی‌کننـد. پیشـنهاد می‌گردد تعیین ژنوتایپینگ ایزولـه‌هـای اشریشـیاکلی دارای ژن‌های بتالاکتاماز SHV، TEM و آنزیم‌های دیگر در ارتباط با این ژن مانند CTX-M-3 به روش مولکـولی PCR نیز انجام گیرد.

با توجه به این که اکثریت سویه‌های مقاوم بـه بتالاکتام ها دراین مطالعه و در ایران نسـبت بـه ایمـی پـنم حسـاس مـی‌باشـند، بـرای درمـان عفونـت‌هـای بیمارسـتانی ناشـی از ایـن سـویه‌هـا اسـتفاده از یـک کارباپنم همراه با یـک آنتـی‌بیوتیـک غیـر بتالاکتـام یـا جهت جلوگیری از انتشـار سـویه‌هـای مقـاوم بـه ایـن

آنتی‌بیوتیک از یک بتالاکتام در ترکیب با یک بازدارنده بتالاکتاماز پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از مطالعات متعدد ومطالعه حاضر نشان می دهد که روش دیسک دیفیوژن روش مناسبی جهت تشخیص قطعی مقاومت آنزیمی بتا لاکتاماز نیست به طوری که گونه‌های ESBL مثبت بافنوتیپ حساس شایع می‌باشد. بنابراین مشاهده فنوتیپ حساس در آنتی‌بیوگرام دلیل قطعی بر مقاوم نبودن سویه مورد نظر از لحاظ تولیدESBL نبوده و تشخیص قطعی به انجام تست‌های پیشرفته می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل پایان نامه رشته باکتری شناسی پزشکی با کد اخلاق IR.YUMS.REC.139494 دانشگاه علوم‌پزشکی یاسوج می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد. بدین وسیله از همکاران حوزه معاونت پژوهشی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی و کلیه همکاران بخش و آزمایشاگاه میکروب‌شناسی تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1.Khalili M B, Sharifi Yazdi M K , Ebadi M, Sadeh M. Correlation between urine analysis and urine culture in the diagnosis of urinary tract infection in Yazd central laboratory. Tehran University Medical Journal TUMS Publications 2007; 65(9): 53-8.
2.Crude N, Tveten Y, Kristiansen BE. Urinary tract infections in Norway: bacterial etiology and susceptibility. A retrospective study of clinical isolates. Clinical Microbiology and Infection 2001; 7(10): 543-7.
3.Amjad A, Mirza IA, Abbasi SA, Farwa U, Sattar A, Qureshi ZA. Spectrum and antimicrobial susceptibility pattern of pathogens causing urinary tract infection-experience in a tertiary care setting. Infectious Disease Journal of Pakistan 2011; 20(2): 56.
4.Farrell D, Morrissey I, De Rubeis D, Robbins M, Felmingham D. A UK multicentre study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection. Journal of Infection 2003; 46(2): 94-100 .
5.Zilevica A, Paberza R. Etiological agents of nosocomial urinary tract infections. Proc of LU (LU Zinātniskie Raksti 2005; 3: 63 - 67
6.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 β-lactamase-producing strains. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002; 46(5): 1262-8.
7.Liu G, Ling BD, Zeng Y, Lin L, Xie YE, Lei J. Molecular characterization of extendedspectrum betalactamases produced by clinical isolates of Enterobacter cloacae from a teaching hospital in china. Jpn J Infect Dis 2008; 61(4): 286 .
8.Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1995; 39(6): 1211
9.Thomson K, Prevan A, Sanders C. Novel plasmid-mediated beta-lactamases in enterobacteriaceae: emerging problems for new beta-lactam antibiotics. Current Clinical Topics in Infectious Diseases 1996; 16:, 151 .
10..Shenoy S, Yadav T. The antibiotic susceptibility patterns of uropathogenic Escherichia coli, with special reference to the fluoroquinolones. Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR 2013; 7(6): 1027 .
11.Vellinga A, Tansey S, Hanahoe B, Bennett K, Murphy AW, Cormican M. Trimethoprim and ciprofloxacin resistance and prescribing in urinary tract infection associated with Escherichia coli: a multilevel model. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2012; 67(10):2523-30
12.Po-Ren H, Wen-Chien KO, JongWu J, JihLu J, DerWang FU. Consensus statement on the adherence to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines (CLSI-2010 and CLSI-2010-update) for Enterobacteriaceae in clinical microbiology laboratories in Taiwan. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 2010; 43(5): 452-5.
13.Fu Y, Zhang W, Wang H, Zhao S, Chen Y, Meng F, et al. Specific patterns of gyr A mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. BMC Infectious Diseases 2013; 13(1): 1.
14.Heisig P. Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in Escherichia coli. Antimicrobial Gents and Chemotherapy 1996: 40(4): 879-85.
15. Watts JL, Jeffrey L., RM(AAM) Thomas R. Shryock, Michael Apley, DVM, Donald J. Bade Steven D. Brown Jeffrey T. Gray, Henry Heine, Rob P. Hunter, MS, Dik J. Mevius, DVM, Mark G. Papich, DVM, Peter Silley, Gary E. Zurenko. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard—third edition. 2008
16 Park YJ, Yu JK, Park KG, Park YG, Lee S, Kim SY, Jeong SH. Prevalence and contributing factors of nonsusceptibility to imipenem or meropenem in extended-spectrum β-lactamase–producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. Diagnostic Microbiology and Iinfectious Disease 2011; 71(1): 87-9.
17.Paterson DL, BonomoRA. Extended-spectrum β-lactamases: a clinical update. Clinical Microbiology Reviews 2005; 18(4): 657-86.
18.Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, & Coque T. Prevalence and spread of extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. Clinical Microbiology and Infection 2008; 14(s1): 144-53 .

19.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 2007; 13(1): 230-7
20.Dallal M, Sabbaghi A, Fallah J, Aghamirzaei HM, Lari A, Eshraghian MR, et al. Evaluation of presence of the bla-SHV and bla-AmpC (CITM, FOX) β-lactamase genes in clinical isolates of Escherichia coli. Journal of Medical Council of Islamic Republic of Iran 2010; 28(3): Pe269-76.
21.Ho PL, Wong R, Chow KH, Yip K, Wong S, Que TL. CTX-M type beta-lactamases among fecal Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates in non-hospitalized children and adults. Journal of Microbiology 2008; 41(5): 428-32 .
22.Jonas Bonnedahl , Mirva Drobni , Michel Gauthier-Clerc, Jorge Hernandez, Susanne Granholm, Yves Kayser, Åsa Melhus, Gunnar Kahlmeter, Jonas Waldenström, Anders Johansson, Björn Olsen. 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):
23.Shahcheraghi F, Noveiri H, Nasiri S. Detection of bla TEM and bla SHVgenes among clinical isolates of E. coli from Tehran hospitals. Iranian Journal of Medical Microbiology 2007; 1(3): 1-8.
24.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 Journal of Public Health 2009; 38(1):10-17

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Frequency of *CTX-M-1* Gene in *Escherichia coli* Isolates of ESBL-Producing Enzyme in Clinical Samples by Polymerase Chain Reaction (PCR) in Yasuj

Khishvand Z[1], Hosseini M[2], Khoram Rooz SS[1], Sharifi A[1], Tabatabaei SM[3], Khosravani SAM[1]*

[1]Cellular and Molecular Research Center, yasuj University of Medical Sciences, yasuj, Iran, [2]Student Research Committee, yasuj University of Medical Sciences, yasuj, Iran, [3]Department of Genycology, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 03 Feb 2019 Accepted: 03 Des 2018

Abstract

Background & aim: Resistance to β-lactam antibiotics in the clinical isolates, in most cases is caused by β-lactamase enzymes. In recent years, The incidence of broad-spectrum β-lactamase enzymes (ESBLs) among clinical isolates especially *E.coli* is greatly increased, since the β-lactamase have several subfamilies, using universal primers designed to detect the following complete families could be useful. β-lactamase producing enzymes (ESBLs) of *E. coli* has created many problems for patients. β-lactamase CTX-M-1 gene is the cause of resistance. The aim of this study was to evaluate CTX-M-1gene in *E.coli*.

Methods: In this practical study, susceptibility of isolated bacteria to 13 antibiotics were indicated by disk diffusion method according to CLSI guidelines and strains were analyzed for the presence of widespread β-lactamase enzymes via two-disc synergy method. Thus، the prevalence of CTX-M1 ESBL gene samples were determined using PCR and the data were analyzed using ANOVA.

Results: A total of 200 isolates of *E.coli* were isolated. The presence of CTX-M-1 gene were also isolated using the PCR method. From 200 strains studied, 62 (31%), of strains produced ESBL. After PCR processing of 62 produced ESBL, 43 isolates (69.4%) were identified as CTX-M-1 genes. Also, antibiotic susceptibility test showed the highest percentage of resistance to Cotrimoxazole antibiotic (50%) and the lowest antibiotic resistance to imipenem (0%).

Conclusion: The results of this study showed the high percentage of β-lactamase resistance among of *E.coli* strains. This is a serious public hazard that should be pointed out to measures for preventing this hazard. Considering the sensitivity of the studied beta-lactam resistant isolates and isolates in Iran to imipenem, a carbapenem with a non-beta-lactam antibiotic is recommended for the treatment of nosocomial infections caused by these strains.

Keywords: *E.coli*, ESBL, PCR, *CTXM1*

***Corresponding author: Khosravani SAM,** Cellular and Molecular Research Center, yasuj University of Medical Sciences, yasuj, Iran
Email: khosravani2us@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Khishvand Z, Hosseini M, Khoram Rooz SS, Sharifi A, Tabatabaei SM, Khosravani SAM. Frequency of *CTX-M-1* Gene in *Escherichia Coli* Isolates of ESBL-Producing Enzyme in Clinical Samples by Polymerase Chain Reaction (PCR) in Yasuj. Armaghane-danesh 2020; 24(6): 1116-1126.