فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۱- شماره ۲- تابستان ۱۳۹۵

مقاله تحقیقی

فراوانی ژن های *bla- shv,bla-tem* و *ctx -M* دربین ایزوله های *اشریشیاکلی یوروپاتوژن* مولد آنزیم های بتالاکتاماز با طیف اثر وسیع

علیرضا اقبالی، سحر هنرمند جهرمی*، فاطمه نوربخش

۱. گروه میکروبیولوژی. دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا

* **مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: sahar_hj2@yahoo.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۳

چکیده

عفونت دستگاه ادراری ناشی از باکتری های مولد آنزیم های (ESBL) بتالاکتاماز با طیف اثر وسیع یک مشکل مهم در سراسر جهان است. انواع مختلفی از ESBL در باکتری اشریشیا کلی شناسایی شده است که توسط ژنهای مختلفی کد می شوند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی شیوع جدایه های *اشریشیا کلی یوروپاتوژن* مولد ESBL و بررسی فراوانی ژن های *bla-shv*، *bla-tem* و *ctx-M* است.۱۰۰ جدایه اشریشیاکلی پس از انجام تست های بیوشیمیایی از نمونه های ادراری بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان میلاد تهران مورد شناسائی قرارگرفت و تست حساسیت ضد میکروبی جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیک های سفالوسپورین نسل سوم با استفاده از متد انتشار در دیسک تعیین شد. آزمون تأییدی برای تشخیص تولید ESBL توسط تست دیسک ترکیبی و بر اساس دستورالعمل CLSI انجام شد. جهت تکثیر ژن های *bla-shv*، *bla-tem* و*ctx-M* از Multiplex PCR استفاده شد. آنالیز آماری داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون مربع کای انجام گرفت. فراوانی سویه های *اشریشیا کلی یوروپاتوژن* مولد ESBL ۴۰د٧صد بود. فراوانی ژنهای *bla-tem* ۸۳ درصد، *ctx-M*٥٧ درصد و *shv* ۲۳ درصد بود. بیشترین فراوانی ترکیبات ژنی مربوط به ترکیب *ctx-tem* (۳۸ درصد) و کمترین فراوانی مربوط به ترکیب *shv-tem* (۴ درصد) بود. در این مطالعه شیوع آنزیم های ESBL در جدایه های اشریشیا کلی بالا بود. بین فراوانی ژن *tem* و ESBL بودن سویه ها ارتباط معنی داری مشاهده شد. وجود ژن های کد کننده انزیم های بتالاکتاماز در بین جدایه های باکتریایی می تواند نقش مهمی در گسترش مقاومت ضد میکروبی داشته باشد.

واژگان کلیدی: اشرشیاکلی یوروپاتوژن, بتالاکتامازهای با طیف اثر وسیع، ژن های *bla-tem*، *bla-shv*، *ctx-M*

مقدمه

آنتی بیوتیک های بتالاکتام در میان داروهای ضدمیکروبی در جهان رایج ترین انتی بیوتیک ها هستند. با این حال شیوع مقاومت نسبت به بتالاکتام ها به ویژه توسط آنزیم های بتالاکتاماز در بین پاتوژن های مهم از نظر پزشکی افزایش یافته و مصرف آنها را محدود کرده است (۱۰). بتالاکتاماز ها آنزیم هایی هستند که حلقه بتالاکتام پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها را باز کرده و فعالیت ضد میکروبی آنها را از بین می برند (۱۱). شیوع بالای موتانت های مقاوم آنتی بیوتیکی مولد بتالاکتاماز های با طیف

گسترده (ESBL[1]) در میان باکتریهای گرم منفی انتروباکتریاسه گزارش شده است (۱۲). ESBL گروهی از آنزیم های منتقله به وسیله پلاسمید ها هستند که توانایی هیدرولیز سفالوسپورین های نسل سوم و مونوباکتام ها را دارند و کلاولنیک اسید مهارکننده مناسب این خانواده می باشد (۱۳). در سال های اخیر اهمیت عفونت های ناشی از سویه های ESBL به دلیل نقص درمان آنها رو به افزایش است (۱۴). طی سال های ۲۰۰۶ و۲۰۰۷ میزان شیوع سویه های کلبسیلا *پنومونیه* و *اشریشیا کلی* مولد آنزیم های بتالاکتاماز با طیف اثر گسترده در سراسر جهان به ترتیب ۵۰ درصد و ۱۵درصد گزارش شد (۱۵،۱۶). این ارگانیسم ها عامل تعدادی ازعفونت ها شامل عفونت مجاری ادراری (UTI[2])، سپتی سمی، پنومونی اکتسابی از بیمارستان، آبسه های داخلی، آبسه های مغذی و عفونت های مرتبط با ابزار پزشکی هستند (۱۷). آنتروباکتریاسه معمول ترین پاتوژن های گرم منفی جدا شده از عفونت های بیمارستانی به ویژه عفونت های دستگاه ادراری (UTI) هستند (۱۸). عفونت‌های ادراری از شایع ترین عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند و از نظر شیوع دومین نوع عفونت باکتریال پس از عفونت های مجاری تنفسی محسوب می شوند (۱۹). سویه‌های *اشریشیاکلی یوروپاتوژن* (UPEC[3]) به عنوان یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده UTI و مسئول ۹۰ درصد از کل موارد عفونت مجاری ادراری باکتریال اکتسابی ازجامعه می باشند (۲۰). باکتری های مولد ESBL می توانند مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها مانند کینولون ها، تتراسایکلین ها، کوتریموکسازول و آمینوگلیکوزید ها را نیز کسب کنند و ابشن های درمانی را محدودتر کنند (۲۱). مطالعات نشان داده اغلب آنزیم های بتالاکتاماز با طیف گسترده ، موتانت های تمونیرا (TEM) و آنزیم های متغیر سولفیدریل (SHV) و لاکتاماز های نوع سفوتاکسیم (CTX-M)هستند. بیش از ۳۰۰ واریانت مختلف ESBL وجود دارد که بر اساس توالی اسید های آمینه به ۹ خانواده تقسیم می شوند. TEM وSHV مهمترین انواع آنها هستند و نوع CTX-M در برخی از کشورها شایع است (۲۲،۲۳). تعیین ژن های بتالاکتامازی با استفاده از روش های مولکولی مثل PCR و بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتریهای مولد ESBL می تواند اطلاعات مفیدی درباره اپیدمیولوژی و فاکتورهای خطر مرتبط با عفونت های وابسته به آنها ارائه بدهد. هدف ازانجام این تحقیق جدا سازی و شناسایی سویه های *اشریشیا کلی یوروپاتوژن* مولد ESBL و تشخیص مولکولی انواع ژنهای کد کننده آنزیم های بتالاکتاماز با طیف گسترده در بین این جدایه ها است.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

این مطالعه مقطعی- توصیفی بر روی ۱۰۰ ایزوله اشرشیا کلی جدا شده از نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری که به مدت ۶ ماه در سال ۱۳۹۵ به بیمارستان میلاد تهران مراجعه کرده بودند، انجام شد. بیماران بر اساس جنسیت به دوگروه زنان و مردان تقسیم شدند. بر اساس سن بیماران نیز به گروه‌های سنی کمتر از ۲۰، ۲۰ تا ۴۰، ۴۰ تا ۶۰ و بالای ۶۰ سال تقسیم شدند. ادرار میانی بیماران در ظروف استریل جمع آوری شد. نمونه های ادراری حاوی باکتریوری (بیش از 10^5CFU/ml) به عنوان عفونت ادراری در نظر گرفته شدند. نمونه های ادراری در پلیت های حاوی محیط مک کانکی آگار و EMB آگار کشت داده شدند و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. شناسایی جدایه های *اشریشیا کلی* بر اساس انجام تست های بیوشیمیایی مانند کشت در محیط TSI آگار، SIM ، سیمون سیترات و محیط مایع MRVP (Merck, Germany) انجام گرفت.

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های اشریشیاکلی یوروپاتوژن

حساسیت آنتی بیوتیکی ۱۰۰ جدایه باکتریایی با انجام تست آنتی بیوگرام به روش انتشار دیسک بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck, Germany) بر اساس متد کربی بائر و استاندارد CLSI 2015 تعیین شد. دیسک‌های آنتی بیوتیکی تهیه شده از شرکت پادتن طب که در این

[1] Extended Spectrum Beta-Lactamase
[2] Urinary tract infection
[3] uropathogenic *Eschrrichia coli*

تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند، عبارت بودند از سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، و آزترونام (۳۰ میکروگرم) . نتایج به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم با توجه به قطر هاله عدم رشد و هاله رشد اطراف هر یک از دیسک های آنتی بیوتیکی مشخص شد. *Escherichia coli* ATCC25922 به منظور کنترل کیفی مورد استفاده قرار گرفت.

تایید فنوتیپی بتالاکتاماز با طیف گسترده به روش دیسک ترکیبی

جهت تایید فنوتیپی از روش دیسک ترکیبی سفتازیدیم ۳۰ میکروگرم-کلاولانیک اسید ۳۰/۱۰ میکروگرم و سفوتاکسیم ۳۰ میکروگرم- کلاولانیک اسید ۳۰/۱۰ میکروگرم (پادتن طب) بر اساس استاندارد CLSI 2015 استفاده شد. اگر افزایش قطر هاله مربوط به کلاولانیک نسبت به هر یک از آنتی بیوتیک ها در مقایسه با قطر هاله انها به تنهایی به میزان حداقل ۵ میلی متر بود تایید کننده وجود ESBL است. سویه *Escherichia coli* ATCC 25922 به عنوان کنترل مثبت انتخاب شدند.

تکثیر ژن های *bla-SHV* ، *bla-TEM* و *ctx-M* با روش Multiplex PCR

به منظور استخراج DNA همه جدایه های *اشریشیا کلی* از کیت استخراج DNA باکتری گرم منفی شرکت سینا ژن استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت. به جهت تکثیر و بررسی فراوانی ژن های *bla-SHV* ، *bla-TEM* و *CTX-M* با روش *Multiplex PCR* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که توالی آنها در جدول ۱ ارائه شده است واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱X بافر PCR (۱۰×) (شرکت سیناکلون)، ۲ میلی مولار MgCl2 ، ۰/۳ میلی مولار dNTP (شرکت سینا کلون)، ۱/۵واحد آنزیم TagDNA polymerase (شرکت سینا کلون) ، ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمر ها و ۱۰۰ نانوگرم DNA باکتریایی انجام گرفت. برنامه دمایی و زمانی PCR شامل مرحله واسرشت اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشت ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه، مرحله اتصال ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه، مرحله بسط ۷۲درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه در ۳۲ سیکل ومرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. جهت بررسی محصولات PCR نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱ در صد انتقال داده شده و بعد از رنگ آمیزی در دستگاه ژل داک مورد بررسی قرارگرفت.

جدول ۱ - توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای ژن های bla-SHV، bla-TEM و ctx-M.

Primer name	Sequence direction	Amplicon(bp)	References
BIa-SHV.SE	5'-ATGCGTTATATTCGCCTGTG-3'	747	(۲۴)
BIa-SHV.SE	5'-TGCTTTGTTCGGGCCAA-3'	747	(۲۴)
TEM-164.SE	5'-TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATG-3'	445	(۲۴)
TEM-165.AS	5'-ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT-3'	445	(۲۴)
CTX-M-U1	5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC-3'	593	(۲۴)
CTX-M-U2	5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCG-3'	593	(۲۴)

آنالیز آماری

آنالیز اماری داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و با استفاده از آزمون آماری توصیفی تست مربع کای(X^2) برای بررسی ارتباط فراوانی جدایه های ESBL *اشرشیا کلی* و فراوانی ژن های *bla-SHV* ، *bla-TEM* و *CTX-M* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنا داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

فراوانی نمونه ها

از ۱۰۰جدایه *اشرشیاکلی* مورد مطالعه، ۸۶ جدایه مربوط به نمونه زنان و ۱۴ جدایه مربوط به نمونه مردان بود. فراوانی سویه‌های *اشرشیا کلی* در زنان تقریباً ۶ برابر بیشتر از مردان بود. ارتباط معنا داری بین فراوانی *اشریشیا کلی* و نمونه ادراری زنان مشاهده شد ($p<0.001$). از بین ۸۶ سویه *اشریشیا کلی* ایزوله شده از زنان ۴۹ (۵۷ درصد) بالای ۴۰ سال و ۳۷ (۴۳ درصد) پایین ۴۰ سال بودند و از ۱۴ سویه ایزوله شده از مردان ۱۰ (۷۱ درصد) بالای ۴۰ سال و ۴ (۲۹ درصد) پایین ۴۰ سال بودند. اختلاف معنا داری بین سن زنان و فراوانی سویه های *اشرشیا کلی* مشاهده نشد.

نتایج تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های اشریشیا کلی

سویه هایی که به یکی از آنتی بیوتیک های نسل سوم مقاومت نشان دادند در غربال گری اولیه ESBL انتخاب شدند .میزان مقاومت بدست آمده برای آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم (۶۹ درصد)، سفتازیدیم (۴۸ درصد)، آزترونام (۴۵ درصد)، سفتریاکسون (۴۷ درصد) در باکتری اشرشیاکلی بدست آمد.

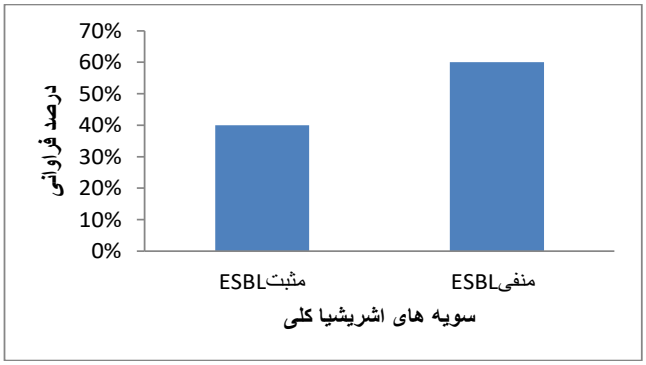
نتایج تعیین فراوانی جدایه های اشریشیا کلی دارای بتالاکتاماز با محدوده اثر وسیع

از بین سویه های *اشریشیا کلی* با روش دیسک ترکیبی، ۴۰درصد سویه ها ESBL مثبت و ۶۰ درصد ESBL منفی گزارش شدند (نمودار ۱).

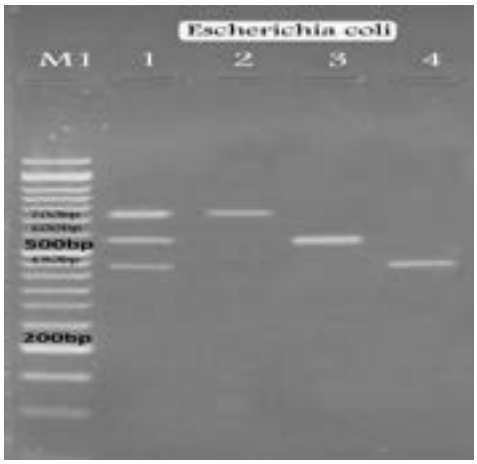
نتایج تکثیر ژن های *bla-SHV* ، *bla-TEM* و *ctx-M* در جدایه های اشریشیا کلی

پس از تکثیر ژن های *bla-shv*، *bla-tem* و*bla-ctx* برای همه سویه های *اشریشیا کلی*، محصول PCR به صورت باندهایی به طول bp۷۴۷، bp۴۴۵ و bp۵۹۳ مشخص و بر روی ژل آگاروز ۱ درصد مشاهده شد (شکل ۱).

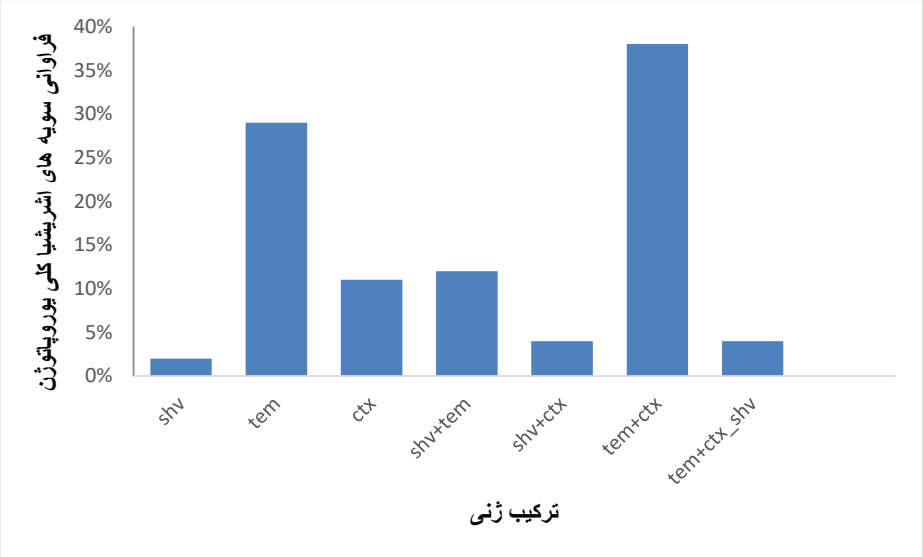
در بین جدایه های *اشریشیا کلی*، ژن *tem* با ۸۳ درصد بیشترین فراوانی، فراوانی ژن *ctx* ۵۷ درصد و *shv* با ۲۲ درصد کمترین فراوانی را داشت. آنالیز آماری ارتباط معنا داری بین فراوانی ژن *tem* و سویه های ESBL نشان داد (۰/۰۰۲ =p). بین فراوانی ژن های *shv* و *ctx* با سویه های ESBL ارتباط معنا داری مشاهده نشد. در این مطالعه برخی سویه ها به طور همزمان دارای دو یا سه ژن بودند. در جدایه های *اشریشیا کلی* بشترین فراوانی ژنها به صورت تکی مربوط به ژن *tem* (۲۹ درصد) وکمترین فراوانی مربوط به ژن *shv* (۲ درصد) بود. بیشترین ترکیب دو تایی مربوط به ترکیب ژنهای *ctx-tem* (۳۸ درصد)، سپس ترکیب *shv-tem* (۱۲ درصد) و کمترین فراوانی مربوط به ترکیب ژن های *shv-ctx* (۴ درصد) بود. فراوانی ترکیب سه تایی ژن ها (*ctx-tem-shv*) ۴ درصد بود (نمودار ۲).



نمودار ۱ - میزان فراوانی جدایه های ESBLمثبت ومنفی *اشریشیا کلی یوروپاتوژن*.



شکل ۱ - تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR تکثیر ژنهای *bla-shv*، *bla-tem* و *ctx -m* برای جدایه های اشریشیا کلی : چاهک شماره ۱ سویه کنترل مثبت، چاهک شماره۲ باند مربوط به *bla-shv* با اندازه bp۷۴۷، چاهک شماره ۳ باند مربوط به *ctx-m* با اندازه bp۵۹۳ و چاهک شماره ۴ باند مربوط به *bla-tem* با اندازه bp۴۴۵. M1 سایز مارکر ۵۰ bp.



نمودار ۲ - فراوانی ژن های tem،shv و ctx به صورت تکی و ترکیبی در جدایه های *اشریشیا کلی یوروپاتوژن*.

بحث

گسترش تولید آنزیم های بتالاکتاماز با طیف اثر گسترده یکی از خطرهای جدی در درمان عفونت های دارای مقاومت چندگانه می باشد که از زمان کشف آن ها در سال ۱۹۸۰ به سرعت در سطح جهان گسترش یافته اند و به عنوان یکی از معضلات بهداشت عمومی خود را نمایان ساخته است (۲۵). از طرفی یکی از علل مهم شکست درمان با سفالوسپورین‌ها، میکروارگانیسم های تولید کننده بتالاکتاماز با طیف اثر گسترده می باشند (۲۶). باکتری های دارای بتالاکتامازهای با طیف اثر گسترده قادر هستند سایر ژن های مقاومت را بدست آورند و در نتیجه مقاومت اضافی به کینولون ها, تتراسایکلین, کوتریموکسازول, تری متوپریم و آمینوگلیکوزید ها پدید می آید و این امر منجر به ایجاد محدودیت های درمانی می شود (۲۷). یکی از مهمترین مشکلات ایجاد شده توسط سویه های ESBL مشارکت آنها در بروز بیماری های مختلفی از جمله عفونت مجاری ادراری و عدم درمان مناسب این عفونت ها با

توجه به بروز مقاومت انتی بیوتیکی است و باکتری اشرشیاکلی نقش مهمی در ایجاد این نوع عفونت ها دارد (۲۸). در این مطالعه از ۱۰۰جدایه *اشرشیاکلی* از بیماران مبتلا به عفونت ادراری، ۸۶ جدایه ازنمونه ادرار زنان و ۱۴ جدایه ازنمونه ادراری مردان جدا شده بودند. در مطالعه ای که توسط زهرا بابایی و همکارانش در سال ۱۳۸۹ صورت گرفت، ۲۳ درصد و ۷۷ درصد سویه های *اشریشیا کلی* جدا شده از بیماران مربوط به نمونه مردان و زنان دارای عفونت ادراری بود (۱). طبق مطالعه معصومه اکبری و همکاران در سال ۱۳۹۳ از تعداد ۴۰۰ پاتوژن جدا شده از نمونه های ادراری، ۶۷ جدایه *اشریشیا کلی* بوده که در تقسیم بندی بر اساس جنسیت ۳۱۵ مورد(۷۹ درصد) مربوط به نمونه ادرار زنان و ۸۵ مورد(۲۱ درصد) مربوط به نمونه مردان بود (۲). مطالعات نشان داده که میزان شیوع سویه های مولد ESBL در نمونه های جدا شده از کشورهای مختلف و حتی از یک بیمارستان یک کشور با بیمارستان دیگر همان کشور می تواند تفاوت زیادی داشته باشد (۲۹). در مطالعه حاضر، شیوع سویه های *اشریشا کلی یوروپاتوژن* مولد آنزیم های ESBL ۴۰ درصد گزارش شد. در مطالعه صورت گرفته در ایران توسط کجباف در سال ۱۳۷۵ شیوع سویه های اشریشیا کلی مولد آنزیم های ESBL ۳۹/۶۱ درصد در اهواز (۳) و ۱۱/۵ درصد در خرم آباد توسط حسین زادگان در سال ۱۳۸۶ گزارش شده است (۴). در مطالعه ای توسط میرصالحیان و همکارانش در سال ۱۳۸۶ بر روی نمونه های جدا شده از بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه، ۶۰/۶۰ درصد جدایه های *اشرشیاکلی* تولید کننده آنزیم ESBL بودند (۵). مسجدیان و همکاران در سال ۱۳۸۶، ۵۱ درصد جدایه های *اشرشیاکلی* را تولید کننده ESBL گزارش دادند (۶). شیوع این آنزیم در کشورهای اروپایی برای *کلبسیلا* ۲۳-۲۵ درصد و برای *اشریشیاکلی* ۴/۵ درصد توسط Stobberingh در سال ۱۹۹۹ گزارش شده است (۳۰). این میزان در ژاپن بسیار پایین تر می باشد و برای *اشرشیاکلی* کمتر از ۰/۱ درصد توسط جارلیر در سال ۱۹۹۸ گزارش شده است (۳۱) در یک بررسی سراسری انجام شده در سال ۲۰۰۹ در ژاپن نرخ تشخیص تولید ESBL در سویه های *اشریشیا کلی* در بیماران بستری در حدود ۵ درصد بوده است (۳۲). در این مطالعه شیوع ژن های *tem, shv, ctx* در میان جدایه های *اشرشیاکلی یوروپاتوژن* تولید کننده آنزیم ESBL بترتیب ۸۳ درصد، ۳۰ درصد,۶۳ درصد گزارش شد. در مطالعه مشابهی که توسط Reynolds در سال ۲۰۰۶ انجام ،گرفت در بریتانیای کبیر و ایرلند به ترتیب ۸۳ درصد از *اشرشیاکلی* تولید کننده ESBL بواسطه *ctx*-m بوده و ۷۴ در صد *کلبسیلا* تولید کننده ESBL نیز بواسطه ctx-m بودند (۳۳). همچنین، در مطالعه ای که Pournaras در سال ۲۰۰۷ انجام داد ۷۱/۴۲ در صد *اشرشیاکلی* تولید کننده ESBL جدا شده در یونان حامل ژن *ctx*-m بودند (۳۴). Yazdi و همکاران در سال ۲۰۱۰ شیوع ژن *tem* را ۸۷/۱ در صد گزارش کردند (۳۵). Mobayen وهمکاران نیز در تبریز فراوانی ژن *tem* را ۸۷/۵ درصد گزارش کردند (۳۶). با توجه به مطالعه دیگری که توسط Bali و همکاران, در سال ۲۰۱۰ انجام شد بتالاکتاماز با طیف گسترده tem در ۷۲/۷۲ درصد ایزوله های *اشریشیا کلی* گزارش شد (۳۷). در حالی که فراوانی بسیار پایین ۹/۹ درصدی برای ژن *ctx* در همان مطالعه اعلام شد (۳۶). طی مطالعه Soltan Dalal و همکاران بر روی ایزوله های *اشرشیاکلی*، فراوانی ژن*tem* ۸/ ۵۷ درصد گزارش شد (۳۷). Shahcheraghi و همکاران فراوانی ژن *shv* را در ایزوله های *اشرشیاکلی* ۶ درصد گزارش دادند (۳۸). بشترین فراوانی ژنها در جدایه های *اشریشیا کلی* به صورت تکی مربوط به *tem* وکمترین فراوانی برای ژن *shv* بود. بیشترین ترکیب دو تایی مربوط به ژنهای *ctx-tem* (۳۸ درصد) سپس ترکیب *shv-tem* (۱۲ درصد) و کمترین فراوانی مربوط به ترکیب *shv-ctx* (۴ درصد) بود. در مطالعه رویا مرتضوی در سال ۱۳۹۳، ۲۲/۶۴درصد ایزوله های *اشریشیا کلی* دارای هر دو ژن *tem-shv* بودند (۷). توزیع فراوانی ژن ها در مطالعه قاسم میر اعلمی در سال ۱۳۹۰ در *اشرشیاکلی* برای ژن *tem* ۴۷/۲۷ درصد و برای ژن *ctx* ۷۴/۵۴ درصد وبرای ترکیب ژنی *tem-ctx* ۳۲/۷۲درصد گزارش شد (۸). در مطالعه حدادی وهمکاران سال ۱۳۹۶، فراوانی ترکیب ژنی *shv-tem* در سویه های *اشریشیا کلی*، ۹/۳۲ درصد بود (۹).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که شیوع جدایه های اشریشیا کلی یوروپاتوژن مولد ESBL در ایران بالا است.

از طرفی میزان فراوانی ژن *shv* همانند سایرمطالعات داخل و خارج از کشور نسبت به ژن های *tem* و *ctx* پایین تر می باشد.

نتیجه گیری کلی

میزان بالای مقاومت نسبت به سفالوسپورین های نسل سوم در ایزوله های باکتریایی گرم منفی به ویژه انتروباکتریاسه یک نگرانی جدی است. با ادامه استفاده از سفالوسپورین های نسل سوم شیوع جدایه های مولد آنزیم های بتالاکتاماز با طیف اثر گسترده منجر به سختی درمان بیماریهای ایجاد شده توسط این باکتری ها می شود. بنابراین بایستی در انتخاب آنتی بیوتیک مناسب برای درمان عفونت هایی که مشکوک به ارگانیسم های تولیدکننده بتالاکتاماز هستند دقت نمود. به علاوه شیوع ژن های کد کننده آنزیم های بتالاکتاماز بین جدایه های باکتری ها امکان انتقال این ژن ها و شیوع بیش از بیش ایزوله های ESBL را افزایش می دهد. در نتیجه ارائه گزارش های متفاوت از نواحی مختلف جغرافیایی بر نقش مطالعات منطقه ای و اختصاصی بروز مقاومت ها از جمله مقاومت وابسته به سویه های ESBL و شیوع آنزیم های بتالاکتامازی امری ضروری است.

تقدیر و تشکر

از همکاری صمیمانه جناب آقای امید حسینی کارشناس آزمایشگاه جامع تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی در انجام این تحقیق که پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین -پیشوا است، تشکر و قدردانی می شود.

منابع مورد استفاده

۱. بابایی کسمائی،ز.، مظفری، ن. ا.، فوهش تهرانی،ه.، آرش کیا، آ.، مهوی، س.، بهرامی، آ.، ۱۳۹۱، تعیین حساسیت دارویی در اشریشیاکلی دارای مقاومت دارویی چندگانه در بیماران سرپایی مبتلا به عفونت ادراری در تهران. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، جلد ۶، شماره۳: ۳۷-۴۴.

۲. اکبری، م.، امیر مظفری، ن.، پیری دوگانه، ه.، ۱۳۹۳، بررسی فراوانی آنزیم ESBL در انتروباکتریاسه های جدا شده از عونت دستگاه ادراری از بیمارستان امام خمینی(ره)اردبیل مجله علوم پزشکی اردبیل، دوره۱۴، شماره۳: ۲۸۵-۲۹۱.

۳. کجباف، م. ج.، مشهدی زاده، م. ع.، ۱۳۷۵، بررسی وفور بتالاکتاماز در باکتری های گرم مثبت و گرم منفی در اهواز .مجله علوم پزشکی اهواز، شماره ۱۹:۲۱-۲۴.

۴. حسین زادگان، ح.، حسنی آ.، آزادپور، م.،۱۳۸۶، شناسایی باسیل های گرم منفی مولد بتالاکتاماز طیف وسیع از باکتری های جدا شده از موارد بالینی. مجله علوم آزمایشگاهی جلد۲۰، شماره۲: ۲۳-۲۵.

۵. میرصالحیان، ا.، اکبری نخجوانی، ا.،پیمانی، ا.، جبل عاملی، ف.، میر افشار، م.، حمیدیان، م.،۱۳۸۶، بررسی فراوانی انتروباکتریاسه تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف در بخش های مراقبت ویژه .مجله دانشکده پزشکی دانشگاه تهران جلد۶۵، شماره۱: ۳۳-۳۸.

۶. مسجدیان جزی،م.، والهی، ف.، طالبی، ا.، رستگار لاری، ع.، ۱۳۸۶، بررسی ملکولی مقاومت به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف در اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران.جلد۱، شماره۲: ۲۷-۳۴.

۷. مرتضوی،ر.، خسروانی،ع.م.، نقوی، ن.،۱۳۹۳، تعیین مولکولی فراوانی ژن های در سویه های اشرشیاکلی مقاوم به آنتی بیوتیک های بتالاکتام SHV و TEM،CTX-M جدا شده از عفونت های ادراری بیمترستان های شهر یاسوج جلد۱۹،شماره ۳: ۲۳۳-۲۴۱

۸. میر اعللمیف ق.، پرویز، م.، خلج زاده، س.،۱۳۹۴، بررسی ژنهای بتالاکتاماز طیف گسترده bla ctx-m , bla shv ,bla tem در سویه های اشرشیاکلی جدا شده از عفونتهای ادراری ومقاومت آنتی بیوتیکی آنها .مجله علوم پزشکی بابل. جلد ۱۷ شماره۸: ۱۹-۲۶

۹. حدادی ،ا.، یکه فلاح.،۱۳۹۶،بررسی فراوانی ژن‌های blaSHV و blaTEM در سویه‌های اشریشیاکلی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف جمع‌آوری‌شده از شهر کرج. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران. جلد ،۱۱ شماره ۲: ۷۵-۸۰.

10. Samaha-Kfoury, J. N., Araj, G. F., 2003. Recent development in β-lactamase and extended spectrum β-lactamases. BMJ 327: 1209-13.
11. Gava, J., Switzerland, 2001. Word Health Organization. Who Global strategy for Contamination of Antimicrobial Resistance. WHO: 1-105.
12. Li, Q., Lee, J. Y., Castillo, R., Hixon, M. S., Pujol, C., Doppalapudi, V. R., 2002. A novel antibacterial agent with broad-spectrum activity and enhanced potency against beta-lactamasesproducing strains. Antimicrobial Agent Chemother 46 (5): 1262-8.
13. Nijssen, S., Florijn, A., Bonten, M. J., Schmitz, F. J., Verhoef, J., Fluit, A.C., 2004. Beta-lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European Enterobacteriaceae isolates. Int J Antimicrob Agents. 24: 585-91.
14. Rossi, F., Baquero, F., Hsueh, P. R., Paterson, D. L., Bochicchio, G. V., Snyder, T. A., Satishchandran, V., McCarroll, K., DiNubile, M. J., Chow, J. W., 2006. In vitro susceptibilities of aerobic and facultatively anaerobic Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends). J Antimicrob Chemother 58: 205–210.
15. Reinert, R. R., Low, D. E., Rossi, F., Zhang, X., Wattal, C., Dowzicky, M. J., 2007. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. J Antimicrob Chemother 60: 1018–1029.
16. Maina, D., Makau, P., Nyerere, N., Revathi, G., 2013. Antimicrobial resistance patterns in extended-spectrum. β-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in a private tertiary hospital, Kenya. Microbiology Discovery 2052-6180: 1-5
17. Foxman, B., 2002. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economiccosts. Am J Med 113 (1A): 5S-13S.
18. Stapleton, A. E., 2003. Urinary tract infections in healthy women. Curr Treat Opt Infect Dis 5: 43-51.
19. Agrawal, P., Ghosh, A. N., Kumar, S., 2008. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase among Escherichia coli and Klebsiella pneumoniaein isolates in a tertiary care hospital. Indian J Path Microbiol 51(1): 139142.
20. Bradford, P. A., 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 14: 933-51.
21. Bonnet, R., 2004. Growing group of extended-spectrum β-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48 (1): 1–14.
22. Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K. M., Bonomo, R. A., 2007. The continuing challenge of ESBLs. Current Opinion in Pharmacology 7 (5): 459–69.
23. Monstein, H. J., Ostholm-Balkhed, A., Nilsson, M. V., Nilsson, M., Dornbusch, K., Nilsson, L. E.,.2007. APMIS. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. APMIS 115(12): 1400-8.
24. Canton, R., Novais, A., Valverde, A., 2008. Prevalence and spread of extended spectrum b-lactamase producing Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect 14: 144-153.
25. Bradford, P. A., 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 14: 933-51.
26. Paterson, D. L., Bonomo, R. A., 2005. Extended-spectrum beta- lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 18: 657-86.
27. Daoud, Z., Afif, C., 2005. Escherichia coli isolated from urinary tract infections of lebanese patients between 2000-2005: Epidemiology and profile of resistance. Chemoterapy Research and Practice 11: 1-6.
28. Blomberg, B., Jureen, R., Manji, K. P., Tamim, B. S., Mwakagile, D. S. M., Urasa, W. K., 2005. High rate of fatal cases of pediatric septicemia Caused by gram-negative bacteria with extended-spectrum beta-lactamases in Dar al Salaam, Tanzania. J Clin Microbiol 43 (2): 745-9.
29. Stobberingh, E. E., Arends, J., Hoogkamp-korstanje, A. A., 1999. Occurrence of extended-spectrum b- lactamases in dutsch hospital. Infection 27: 348-354.
30. Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., 1988. Extended spectrum b- lactamases conferring transferable resistant resistance to newer b-lactam agents in Entrobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility pattern. Rev Infect Dis 10: 867-878.
31. Yamaguchi, K., Ishii, Y., Iwata, M., Watanabe, N., Shinagawa, M., Yasujima, M., Suwabe, A., Kuroda, M., Kaku, M., 2011. Nationwide surveillance of parenteral antibiotics containing meropenem activities against clinically isolated strains in 2009. Jpn J Antibiot 64: 53–95.
32. Reynolds, R., Hope, R., Livermore, D. M., 2006. Activity of Doripenem in the context of rising antimicrobial resistance in invasive Entrobacteriaceae in the UK and Ireland. C2-0065. 46th ICAAC, San Francisco.

33. Pournaras, S., 2007. CTX-M-type b-lactamases affect community Escherchia coli treatment, Greece, 6th international Congerece of infectious diseases: 1487.
34. Yazdi, M., Nazemi, A., Inargasi, M., Khataminejad, M. R., Sharifi, S. H., Babai Kochkaksaraei, M., 2010. Prevalence of SHV/CTX-M/TEM (ESBL) Beta-lactamase resistance genes in Escherichia coli isolated from urinary tract infections in Tehran, Iran. Med Lab J 4: 120-4.
35. Mobayyen, H., Nahaie, M. R., Pornour, M., Mobasher, A., Sadeggy, J., 2009. The Prevalence of TEM gene among extended-spectrum beta-lactamases producing Escherichia coli in Imam Reza Hospital in Tabriz, Iran. Iran J Med Microbiol 1: 33-9.
36. Bali, E. B., Sultan, N., 2010. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum-lactamase produced by Escherichia coli, Acinobacter baumannii and Klebsiella isolates in a Turkish hospital. African J Microbiol Res 4 (8): 650-54.
37. Soltan Dallal, M., Molla Aghamirzaei., H., Fallah Mehrabadi, J., Rastegari, L., Sabbaghi, A., Eshraghian, M., 2010. Molecular detection of TEM and AMPC (Dha, mox) broad spectrum b-lactamase in clinical isolates of Escherichia coli. Tehran Uni Med J 68(6): 315-20.
38. Shahcheraghi, F., Nikbin, V., Shorj, F., 2008. PCR detection of PER & VEB & SHV and TEM β-lactamases in multi-drug resistant P. aeruginoasa isolated from wound infections in two hospitals of Tehran. Iran J Med Microbiol 1(4): 21-7.