

## بررسی فراوانی ژن بتا لاکتاماز *TEM* در ایزوله‌های عفونت ادراری بیماران در شهرستان

### بناب

رضا معصومی جهاندیزی<sup>۱\*</sup>، سید منصور آل‌طه<sup>۲</sup> و میر کامیار موسوی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> ایران، مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

<sup>۲</sup> ایران، شیراز، دانشگاه شیراز، گروه بیوتکنولوژی پزشکی

<sup>۳</sup> ایران، بناب، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب، گروه میکروبیولوژی

تاریخ پذیرش: ۹۸/۵/۱۲

تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۷



### چکیده

ژن بتا لاکتاماز *TEM* یکی از مهمترین ژن‌های بتا لاکتاماز پلاسمیدی در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه است که عامل بیش از ۹۰٪ مقاومت سویه‌های *E. coli* به داروهای بتا لاکتام بوده و از علل مهم بروز مقاومت‌های چندگانه دارویی در عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران سرپایی و تعیین شیوع ژن *TEM* در سویه‌های بتا لاکتاماز وسیع الطیف می‌باشد. در این مطالعه تعداد ۲۶۶ نمونه بالینی *E. coli* یورپاتوزن از آزمایشگاه‌های شهرستان بناب جمع‌آوری و تأیید شد. آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن (تست کیربای-بویر) و تست تأییدی به روش دیسک ترکیبی برای شناسایی سویه‌های مولد بتا لاکتاماز وسیع الطیف انجام شد. DNA ایزوله‌های مولد بتا لاکتاماز وسیع الطیف استخراج گردید و روش واکنش زنجیره ای پلی مرایی (PCR) برای بررسی بیان ژن *TEM* انجام شد. بیشترین میزان مقاومت سوش‌ها در برابر آمپی‌سیلین (۶۷/۳٪) و بیشترین میزان حساسیت آنها در برابر ایمی‌پنم (۹۲/۵٪) دیده شد. در این مطالعه فراوانی جدایه‌های مقاوم به چند دارو زیاد بود که ۴۵٪ از جدایه‌ها به سه یا بیشتر از سه آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. همچنین از ۱۵۴ سویه *E. coli* تحت بررسی ۵۸ سویه (۳۷/۷٪) تولیدکننده بتا لاکتاماز وسیع الطیف بودند. ۶۵/۵۱٪ از سویه‌ها حاوی ژن *bla TEM* بودند. بر اساس نتایج این مطالعه ژن بتا لاکتاماز *TEM* بیش از ۵۰٪ بتا لاکتامازهای وسیع الطیف را در *E. coli* کد می‌نماید. بنابراین توصیه می‌شود شناسایی این ژن در سویه‌های بیمارستانی این باکتری‌ها در مجموعه آزمایشات روتین آزمایش‌های میکروبیولوژی قرار گیرد. این اقدام می‌تواند باعث تسریع در روند تشخیص و درمان بیماران گردد.

واژه‌های کلیدی: *E. coli*، ESBL، ژن بتا لاکتاماز *TEM*، شهرستان بناب

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۶۷۲۱۷۹۰، پست الکترونیکی: Masoomi\_r@modares.ac.ir

### مقدمه

صورت جهانی در حال افزایش است. با توجه به افزایش روز افزون تیپ‌های مختلف آنزیم‌های ESBL، بویژه *bla TEM* و تأثیر متفاوت آنها بر روی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، تعیین دقیق تیپ‌های مختلف آنزیم‌های ESBL با روش‌های مولکولی مانند PCR از نظر شناخت مقاومت‌های منطقه‌ای بسیار مهم است. راهکارهای مختلفی توسط باکتری‌ها برای مصونیت از اثرات زیان‌بار آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد. یکی از مهم‌ترین این

عفونت مجاری ادراری، (UTI) Urinary Tract Infections، یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی است. در این میان *E. coli* ارگانیسمی است که در حدود ۷۵-۹۰٪ از موارد جدا شده را تشکیل می‌دهد. مقاومت *E. coli* به آنتی‌بیوتیک‌های گوناگون در مناطق مختلف متفاوت بوده، و عامل مهمی برای درمان این بیماران است. وقوع عفونت مجاری ادراری در جامعه ناشی از سویه‌های *E. coli* مولد بتا لاکتاماز با طیف گسترده، به

درمانی شهرستان بناب به‌عنوان *E.coli* تشخیص داده شده بودند، جمع‌آوری و جهت انجام آزمایشات تأییدی بر روی آنها به آزمایشگاه تحقیقات میکروبی‌شناسی منتقل شدند. به همراه نمونه‌ها، برخی از مشخصات بیماران مانند نام و نام خانوادگی، جنسیت، عدم مصرف آنتی‌بیوتیک و تاریخ نمونه‌گیری نیز ثبت گردید.

**محیط‌های کشت:** برای انجام کارهای آزمایشگاهی و کشت باکتریها از محیط‌های کشت مختلف زیر استفاده شد.

اثوزین متیلن بلو آگار؛ یک محیط افتراقی برای باکتری‌های گرم منفی و خصوصاً *E.coli* است. محیط تریپل شوگر آبرون آگار (TSI)، محیط سیمون سترات آگار، محیط MR/VP براث (محیط حاوی گلوکز و فسفات بوده و بسته به نوع باکتری یکی از دو واکنش تخمیر اسیدی مخلوط و تخمیر بوتیلن گلیکول در آن صورت می‌گیرد) پس از تلقیح باکتری در این محیط، ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ انکوبه شدند و سپس معرف‌های مربوطه اضافه شدند. محیط کشت SIM آگار؛ از این محیط به منظور بررسی حرکت باکتری، تولید ایندول و تولید سولفید هیدروژن استفاده شد. محیط مولر هینتون براث و محیط مولر هینتون آگار برای تست آنتی بیوگرام استفاده شدند. از محیط پایه تریپتون سویا براث (TSB Tryptone Soy Broth) جهت فریز کردن استفاده شد.

**معرف‌ها:** در این تحقیق از معرف کوکس، معرف MR، معرف VP استفاده شد. این محلول‌ها در یخچال و ظروف شیشه‌ای قهوه‌ای نگهداری شدند.

**محلول‌های بیوشیمیایی:** استاندارد نیم مک فارلند: این محلول در لوله‌های درب دار در حرارت اتاق و در جای تاریک نگهداری شد. محلول کدورتی معادل با  $1/5 \times 10^8$  باکتری در هر میلی‌لیتر را نشان داد. بافر الکتروفورز (10x) TBE؛ برای استفاده در تانک الکتروفورز یا ساخت ژل، به شکل  $10 \times$  تهیه شد. محلول اتیدیوم بروماید ( $1000 \times$ )؛ به عنوان محلول تانک رنگ‌آمیزی استفاده شد.

**ژل الکتروفورز:** با توجه به محصول DNA و نیز محصول PCR دو غلظت متفاوت  $0/8\%$  و  $2/5\%$  آگارز در بافر 1X TBE تهیه شد.

مکانیسم‌ها، که در باکتری‌های گرم منفی علیه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به کار گرفته می‌شود تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است (۲۴). بتا لاکتاماز وسیع الطیف، توانایی بتالاکتامازی را به باکتری‌های گرم منفی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها اعطا می‌کند. این مساله موجب مقاومت این میکروارگانیسم‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتام می‌گردد. نتایج تحقیقات مونتراورز و همکارانش نشان دهنده تاثیر بهتر ترکیبات مهار کننده بتالاکتاماز برای خنثی کردن اثر مقاومتی ESBL می‌باشد (۲۹). ژنهای متعددی مثل *CTX-M-65* (۹) و *CTX-M-14* و *CTX-M-1* (۳۳) در بتالاکتامازی وسیع الطیف ایفای نقش می‌کنند.

بر اساس برخی تحقیقات مقاومت باکتریایی در برابر بعضی آنتی‌بیوتیک‌ها مثل سفالوسپورین‌ها و کوتریموکسازول‌ها در حال افزایش است (۶). معرفی و بکارگیری آنتی‌بیوتیک‌های جدید و وسیع الطیف در درمان عفونت‌های باکتریایی، مقاومت‌های چندگانه دارویی به داروهای بتالاکتام و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها لازم و ضروری می‌باشد. به واسطه اهمیت *E.coli* در بروز عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه و امکان انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از این باکتری به باکتری‌های دیگر مطالعاتی در ارتباط با میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری در نقاط مختلف ایران انجام شده است (۳).

شناسایی عوامل بیماری‌زای مهم و شایع بیمارستانی و تعیین الگوی دقیق مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جهت کنترل شیوع این‌گونه عوامل لازم بنظر می‌رسد. *E.coli* عامل طیف وسیعی از بیماری‌ها مثل عفونت‌های گوارشی، اسهال، کولیت خونریزی دهنده، سندرم اورمی همولیتیک، عفونت مجاری ادراری و مثانه، مننژیت نوزادان و سپتی سمی می‌باشد. در مطالعه ملزر و همکاران  $60/1\%$  باکتری‌های منجر به مرگ، ناشی از *E.coli* تولید کننده ESBL بوده است (۲۶). هدف از این مطالعه بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران سرپایی و تعیین میزان شیوع ژن *TEM* در سویه‌های بتا لاکتاماز وسیع الطیف می‌باشد. علاوه بر این تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر روی *E.coli* نیز بررسی شد و حساسیت آنها مورد سنجش قرار گرفت.

## مواد و روشها

**نمونه‌گیری:** ۲۶۶ نمونه باکتری که توسط آزمایشگاه‌ها و مراکز

**تشخیص دقیق باکتری *E.coli* در تمامی ایزوله‌ها:****بررسی مورفولوژی کلنی در محیط ائوزین متیلن بلو**

**آگار:** تمامی نمونه‌هایی که در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، به عنوان *E.coli* شناسایی شده بودند به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبی‌شناسی انتقال داده شدند و سپس بر روی محیط ائوزین متیلن بلو آگار کشت داده و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از این مرحله سویه‌هایی که شکل کلنی آنها به کلنی *E.coli* شباهت داشت در محیط‌های افتراقی، TSI، سیمون سیترات آگار، MR/VP، SIM، کشت داده شدند و پس از ۱۸-۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**کشت واکنش‌های محیط TSI : یک کلنی منفرد از باکتری**

توسط آنس به صورت عمودی در لوله حاوی محیط TSI تلقیح شد و سپس در همان راستا خارج شد. قسمت شیب‌دار لوله بصورت زیگزاگ کشت داده شد. در ادامه لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تخمیر لاکتوز توسط اشرشیا کلی موجب تولید اسید شده و سطح شیب‌دار محیط به شکل زرد-رنگ دیده شد. در اثر تولید گاز توسط برخی سویه‌ها، حباب‌هایی در لوله نمایان شد. در اثر احیای تیوسولفات توسط باکتری سولفید هیدروژن ( $H_2S$ ) تولید شده که با یون فریک یا فرو ترکیب شده و یک رسوب سیاه‌رنگ در عمق محیط کشت تولید می‌شود.

**کشت در محیط سیمون سیترات آگار: همزمان با کشت در**

محیط تریپل شوگر آپرون آگار، با آنس یک کلنی از باکتری برداشته شد و در محیط سیمون سیترات آگار کشت داده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت رنگ محیط تغییر نکرد. و واکنش سیترات در *E.coli* منفی شد.

**کشت در محیط SIM : محیط SIM یک محیط نیمه جامد**

بوده و کشت باکتری در آن بصورت عمودی و عمقی انجام شد. برای بررسی تولید  $H_2S$ ، ایندول و حرکت باکتری از آن استفاده شد. تولید سولفید هیدروژن در *E.coli* منفی اما تولید ایندول و حرکت مثبت شد.

**کشت در محیط MR/VP : این محیط به حالت برات (مایع)**

است. پس از آماده‌سازی، و پنبه‌گذاری، لوله‌ها اتوکلاو شدند.

سپس باکتری در آن کشت داده شد. با استفاده از یک لوپ استریل یک تا ۲ کلنی در محیط تلقیح، و ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. محیط MR/VP کشت داده شده به دو قسمت مساوی تقسیم شد. در مرحله آخر معرف‌های مربوطه اضافه شد. در یک لوله ۳ قطره معرف MR (به ازاء هر میلی لیتر یک قطره) و در لوله دیگر (VP) چند قطره آلفا نفتول و هیدروکسید پتاسیم ۱۰٪ اضافه گردید (۳ قطره آلفا نفتول و ۲ قطره KOH به ازاء هر میلی لیتر از محیط کشت) لوله حاوی معرف MR پس از ۱۵ دقیقه اگر قرمز رنگ شد، نشانه مثبت بودن تست است.

لوله حاوی معرف VP به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۵ درجه قرار داده شد. محصول قرمز رنگ نشانه تست مثبت VP است، تست MR و VP در *E.coli* به ترتیب مثبت و منفی شد.

**تعیین حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها****تست غربالگری سویه‌های مقاوم نسبت به سفالوسپورین-****های منتخب و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها به روش دیسک**

**دیفیوژن:** ابتدا از سویه‌های ذخیره شده در فریزر ۷۰- یک کشت تازه بر روی محیط بلاد آگار تهیه شد و سپس یک تا سه کلنی از کشت خالص باکتری در محیط مولر هیتون برات (۵-۴ میلی لیتر) تلقیح گردید و به مدت یک ساعت انکوبه شد. سپس کدورت سوسپانسیون میکروبی را با محلول نیم مک فارلند استاندارد کرده و با استفاده از سوپ پنبه‌ای استریل آغشته در سوسپانسیون، بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت گسترده، داده شد و پس از ۱۵-۱۰ دقیقه دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی منتخب به فاصله ۳-۲ سانتی‌متر (مرکز به مرکز) از هم قرار داده شدند. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شدند. قطر هاله‌های ممانعت از رشد توسط خط کش اندازه گیری شد. با استفاده از جداول شرکت Rosco که منطبق با CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) بود، باکتری‌ها به سه گروه حساس، حساسیت متوسط و مقاوم تقسیم شدند و نتایج هرکدام از ایزوله‌ها برای تمام دیسک‌های استفاده شده ثبت شد.

**تست حساسیت ضد میکروبی نسبت به دیسک‌های**

**ترکیبی برای تأیید سویه‌های مولد بتالاکتاماز وسیع**

۲۶۰ نانومتر بیانگر غلظت DNA در نمونه و OD در طول موج ۲۸۰ نانومتر نشان دهنده غلظت پروتئین در نمونه می باشد. در

صورتی که نسبت  $\frac{OD260}{OD280}$  بین ۱/۸ تا ۲ باشد DNA در کیفیت خوبی جهت انجام PCR قرار دارد. پس از خواندن جذب نوری نمونه ها، با استفاده از فرمول زیر غلظت DNA تعیین شد.

فاکتور رقت =  $OD \times 260 \times 50 \text{ (ng/}\mu\text{l)}$  = غلظت DNA

**واکنش زنجیره ای پلیمرازی (PCR):** DNA ایزوله هایی که تست فنوتیپی تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف در آنها مثبت شده بود، استخراج شد. سپس وارد مرحله PCR شدند. بدین منظور با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (۱۲) قطعات ژنی تکثیر شدند.

5'- AGTGCTGCCATAACCATGAGTG -3' TEM - F

5'- CTGACTCCCC GTCGTGTAGATA -3' TEM - R

شکل ۱- توالی پرایمرهای پیشرو و معکوس

نمونه های DNA و مواد مورد نیاز را از فریزر و یخچال خارج نموده و اجازه داده شد تا ذوب شده و به دمای اتاق برسند. به تعداد نمونه ها و نیز کنترل مثبت و کنترل منفی، میکروتیوب های مخصوص PCR به ترتیب شماره گذاری شده و در جا لوله ای قرار داده شدند. با هر سری آزمایش PCR، یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی در نظر گرفته شد.

**کنترل منفی:** این کنترل جهت بررسی وجود آلودگی نمونه ها با DNA به کار می رود و در صورت وجود DNA آلوده کننده، از آن به عنوان الگو کپی برداری شده و در نهایت بر روی ژل آگارز لکه ناشی از تکثیر آن مشاهده می گردد. محتویات آن شامل تمام مواد مورد نیاز در یک واکنش PCR بجز DNA الگو می باشد.

برای انجام آزمایش PCR از حجم نهایی واکنش، یعنی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix IX (حاوی  $5\text{MgCl}_2$  / میلی مول)، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۲ میکرولیتر از هر کدام از جفت پرایمرها و ۶/۵ میکرولیتر هم آب مقطر دو بار تقطیر استریل استفاده شد. برنامه زمانی و دمای PCR در جدول

**الطیف به روش انتشار دیسک:** سویه هایی که نسبت به سفالوسپورین های منتخب یا آزترونام مقاومت داشتند انتخاب و بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شدند. بر روی پلیت ها علاوه بر دیسک های سفنازیدیم، سفوتاکسیم و سفپیم تکی (با غلظتهای ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، دیسک های ترکیبی (سفنازیدیم + کلاوولانیک اسید، سفوتاکسیم + کلاوولانیک اسید و سفپیم + کلاوولانیک اسید) نیز قرار داده شدند. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. در پایان قطر هاله اطراف دیسک های ترکیبی نسبت به دیسک های تکی بر مقیاس میلیمتر مقایسه گردید. تفاوت ۵ میلی متری قطر هاله دیسک ترکیبی نسبت به دیسک تکی، نشان دهنده مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف بودن ایزوله است.

برای تأیید سویه های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف از تست انتشار دیسک و بر اساس استاندارد CLSI استفاده شد. در تست های آنتی بیوگرام و تأیید تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف از سویه کنترل منفی *ATCC 25922 E.coli* و کلبسیلا پنومونیه *ATCC 7881* بعنوان کنترل مثبت استفاده شد.

## آزمایش های مولکولی

**استخراج DNA ژنومی از باکتری:** برای بدست آوردن اسید نوکلئیک خالص، چربی ها و پروتئین ها به روش جوشانیدن از نمونه ها حذف شدند. نمونه ها در پلیت های حاوی محیط کشت مغزی بلاد آگار کشت داده شدند و در دمای ۳۷-۳۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. تعدادی از کلنی های رشد یافته را به لوله اپندرف ۱/۵ میلی لیتر حاوی ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر استریل انتقال داده و سپس این سوسپانسیون میکروبی به مدت ۵ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شد. در مرحله بعد نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت چرخش 1400 دور بر دقیقه سانتریفوژ گردید و فاز رویی حاوی DNA برداشته شد و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شد.

**روش تعیین غلظت و خلوص DNA:** برای تعیین غلظت DNA، استوک تهیه شده ۱:۱۰۰ رقیق شد. میزان جذب نوری در طول موج های ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد. نسبت میزان جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نشانگر کیفیت DNA نمونه است. جذب نوری (OD) در طول موج

۱ آورده شده است.

جدول ۱ - برنامه زمانی و دمای PCR ژن TEM

برنامه	پدیده	دما	زمان	دور (سیکل)
برنامه ۱	واسرشتگی اولیه	۹۴ C <sup>0</sup>	۵ دقیقه	۱
برنامه ۲	واسرشتگی (Denaturation)	۹۴ C <sup>0</sup>	۶۰ ثانیه	۳۰
	برگشت (Annealing)	۶۱	۶۰ ثانیه	۳۰
	توسعه (Extension)	۷۲ C <sup>0</sup>	۶۰ ثانیه	۳۰
برنامه ۳	توسعه نهایی (Final Extension)	۷۲ C <sup>0</sup>	۵ دقیقه	۱

سیترات آگار، SIM و MR/VP انجام شد و از بین نمونه ها، ۲۶۶ ایزوله که از نظر مورفولوژی کلنی ها، رنگ آمیزی گرم، مشخصات بیوشیمیایی مانند اسید-اسید بودن در لوله TSI، منفی شدن تست سیترات، تولید ایندول، متحرک بودن و تولید H<sub>2</sub>S تأیید شدند.

**توزیع سنی بیماران:** همه ۲۶۶ جدایه *E. coli* مورد بررسی، از بیماران سرپایی جمع آوری شدند. از مجموع مراجعین ۲۴۹ نفر زن (۹۳/۳٪) و ۱۷ نفر (۶/۴٪) مرد بودند. سن بیماران در محدوده ۴۲ تا ۱۵ سال، با میانگین ۲۶ سال بود.

توزیع سنی بیماران مورد مطالعه در جدول شماره ۲ آورده شده است. لازم به ذکر می باشد که تمام نمونه های جدا شده از جنس مذکر در گروه سنی ۳۵-۲۶ قرار داشتند.

جدول ۲ - توزیع فراوانی افراد بر اساس گروه های سنی

گروه های سنی (سال)	۲۵-۱۵	۳۵-۲۶	۴۵-۳۶
تعداد	۱۱۱	۱۳۱	۲۴
درصد	۴۱/۷٪	۴۹/۲٪	۹٪

**نتایج تست آنتی بیوگرام:** مقاومت و حساسیت به آنتی بیوتیک های انتخاب شده بر روی محیط کشت مولر هینتون توسط دیسک ها انجام گرفت (شکل- ۲) و خلاصه آنها در جدول- ۳ نمایش داده شده است.

با توجه به جدول، بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به آمپی سیلین با ۶۷/۳٪ و کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی به ایمی پیم ۵/۳٪ مشاهده شد و بیشترین حساسیت آنتی بیوتیکی مربوط به ایمی پیم با ۹۲/۵٪ مشاهده گردید. قابل ذکر می باشد

## آشکار سازی محصولات PCR با روش الکتروفورز ژل آگارز

**روش انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز:** برای بررسی نتیجه آزمایشات مختلف، از جمله استخراج DNA و PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد. با برقراری میدان الکتریکی مناسب بر روی ژل آگارز، قطعات DNA در حضور محلول بافر مناسب، بر اساس بار الکتریکی، اندازه و شکل خود به طرف الکتروود آند حرکت می کنند. با این روش قطعات DNA براساس طول خود از همدیگر جدا می گردند.

۲ میکرولیتر لودینگ بافر با ۵ میکرولیتر محصول PCR مخلوط و به داخل چاهک های ژل هدایت شد و در یکی از چاهک ها نیز ۲ میکرولیتر مارکر قرار داده شد. برای رنگ آمیزی، ژل های آگارز به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید (۱ mg/l) (۰/۵-۱) قرار داده شدند. ژل ها پس از آبکشی، در دستگاه Gel Documentation (BioRad) مورد بررسی قرار گرفتند.

**آزمون آماری داده ها:** برای بررسی وجود ارتباط بین داده های به دست آمده در مراحل مختلف این تحقیق، اطلاعات مربوط به داده ها وارد نرم افزار آماری SPSS شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نمودار ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و نرم افزار prism نسخه ۶ رسم شدند.

## نتایج

**کشت مجدد و تأیید نمونه ها:** پس از دریافت نمونه ها؛ جهت تأیید ایزوله ها، کشت باکتری بر روی محیط انوزین متیلن بلو آگار، محیط های تریپل شوگر آیرون آگار (TSI)، سیمون

تولید کننده‌های ESBL مشاهده شدند. در ضمن همه ۵۸ سویه‌ی مولد ESBL در دسته‌ای که طبق معیارهای CLSI انتخاب شده بودند، قرار داشتند. همه بیماران مونث بودند. گروه سنی ۲۶-۳۵ بیشترین موارد ESBL مثبت (۵۸/۶٪) را نشان داد (شکل-۴). از ۱۵۴ گروه باکتری *E. coli* که برای ESBL مورد ارزیابی قرار گرفته بودند، هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این مطالعه نسبت به مولد بودن ESBL سنجش شده و نتیجه در جدول ۴- گزارش گردید. در کل بیشترین میزان مولد ESBL در نمونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۹۴/۸٪) و کمترین مقدار در نمونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ایمپینم (۶/۹٪) مشاهده شد.

**نتایج شناسایی ژن TEM:** ژن *TEM* یکی از ژن‌های مولد ESBL می‌باشد. پس از استخراج DNA وجود ژن *TEM* به کمک روش PCR بررسی شد. از ۲۶۶ نمونه *E. coli* مورد بررسی ۴۰ نمونه (۱۵/۰۳٪) دارای ژن *TEM* بودند، و از ۵۸ نمونه ESBL مثبت، ۳۸ نمونه (۶۵/۵۱٪) *TEM* مثبت بودند، که همه نمونه‌ها مربوط به خانم‌ها بود. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود ژن *TEM* در منطقه ۴۳۱ bp مشاهده می‌شود. در بعضی از جدایه‌هایی که فاقد ESBL بودند نیز ژن *TEM* نیز شناسایی شد.

که ۴۵٪ از سویه‌های جدا شده از *E. coli* به بیش از سه آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان داد که این نشان دهنده مقاومت چند دارویی در این جدایه‌ها می‌باشد. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گروه سنی ۲۶-۳۵ سال مشاهده شد (شکل ۳- سمت راست).

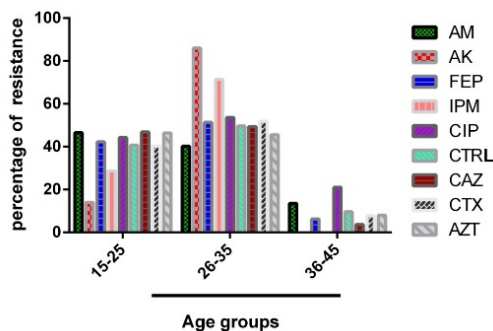
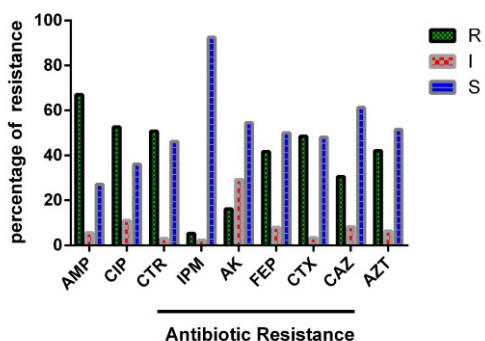


شکل ۲- آنتی‌بیوگرام به روش انتشار دیسک برای تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی (غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر).

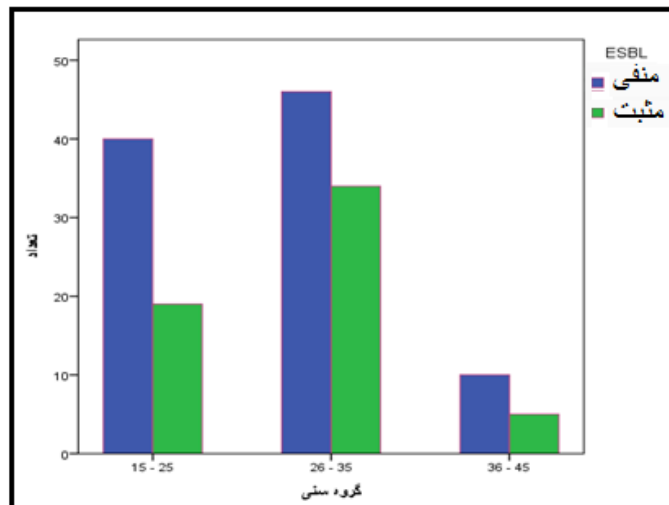
**نتایج شناسایی باکتری‌های تولیدکننده ESBL:** برای شناسایی باکتری‌های تولیدکننده ESBL، آزمون غربالگری برای ۲۶۶ نمونه باکتری انجام شد. ۱۵۴ (۵۷/۹٪) نمونه باکتری وارد مطالعه شدند، که ۱۱۲ باکتری بر طبق معیارهای CLSI و ۴۲ باکتری دیگر با توجه به مقاومت به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی انتخاب شدند. در آزمون نهایی (دیسک ترکیبی) ۵۸ سویه *E. coli* (۳۷/۷٪) از ۱۵۴ سویه به عنوان باکتری‌های

جدول ۳- تست آنتی‌بیوگرام، آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با سه درجه مقاوم، متوسط و حساس

سفتراکسین	ایمی‌پیم	آمی‌کاسین	سفیپیم	آزوترنام	سفتواکسیم	سفتازیدیم	
۵۰/۸	۵/۳	۱۶/۲	۴۱/۷	۴۲/۱	۴۸/۵	۳۰/۵	درصد مقاومت
۳	۲/۳	۲۹/۳	۸	۶/۴	۳/۴	۸/۳	درصد متوسط
۴۲/۲	۹۲/۵	۵۴/۵	۵۰	۵۱/۵	۴۸/۱	۶۱/۳	درصد حساسیت



شکل ۳- ارتباط مقاومت آنتی‌بیوتیکی با گروه‌های سنی (سمت راست)، مقاومت و حساسیت انواع آنتی‌بیوتیک‌ها (سمت چپ)

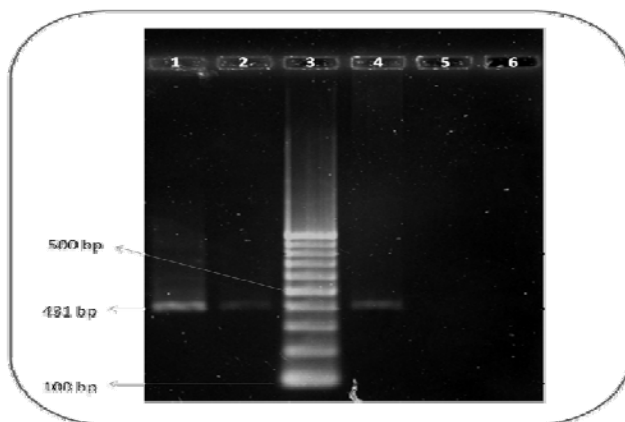


شکل ۴- نمودار ارتباط گروه های سنی با باکتری های مولد ESBL (گروه سنی ۲۶-۳۵ سال دارای بیشترین فراوانی ESBL می باشند).

جدول ۴- مقایسه مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *E.coli* مولد ESBL (آنتی بیوتیک های مورد استفاده نسبت به مولد بودن ESBL)

آنتی بیوتیک	نمونه های ESBL مثبت	تعداد	درصد
آمپی سیلین	مقاوم	۵۵	۹۴/۸٪
	حساس	۰	۰٪
	حساسیت متوسط	۳	۵/۲٪
	کل	۵۸	۱۰۰٪
آمیکاسین	مقاوم	۲۹	۵۰٪
	حساس	۲۱	۳۶/۲٪
	حساسیت متوسط	۸	۱۳/۸٪
	کل	۵۸	۱۰۰٪
سلفپیم	مقاوم	۴۵	۷۷/۶٪
	حساس	۹	۱۵/۵٪
	حساسیت متوسط	۴	۶/۹٪
	کل	۵۸	۱۰۰٪
ایمپینم	مقاوم	۴	۶/۹٪
	حساس	۵۴	۹۳/۱٪
	حساسیت متوسط	۰	۰٪
	کل	۵۸	۱۰۰٪
سیپروفلوکسازین	مقاوم	۳۷	۶۳/۸٪
	حساس	۱۴	۲۴/۱٪
	حساسیت متوسط	۷	۱۲/۱٪
	کل	۵۸	۱۰۰٪
سفترایکسون	مقاوم	۴۷	۸۱٪
	حساس	۹	۱۵/۵٪
	حساسیت متوسط	۲	۳/۴٪

کل	۵۸	۱۰۰٪
مقاوم	۴۰	۶۹/۱٪
حساس	۱۵	۲۵/۹٪
حساسیت متوسط	۳	۵/۲٪
کل	۵۸	۱۰۰٪
مقاوم	۵۰	۸۶/۲٪
حساس	۸	۱۳/۵٪
حساسیت متوسط	۰	۰٪
کل	۵۸	۱۰۰٪
مقاوم	۴۶	۷۹/۳٪
حساس	۹	۱۵/۵٪
حساسیت متوسط	۳	۵/۲٪
کل	۵۸	۱۰۰٪



شکل ۵ - الکتروفورز محصول PCR برای ژن TEM. ردیف ۱: نمونه PCR مثبت ژن TEM، ردیف ۲: نمونه PCR مثبت ژن TEM، ردیف ۳: مارکر (100bp DNA ladder)، ردیف ۴: کنترل مثبت ژن TEM، ردیف ۵: کنترل منفی، ردیف ۶: بلانک

## بحث

توسعه یافته مقاومت برای آمپی سیلین در مقایسه با سایر کشورها پایین تر است، مطالعه ای در کشور یونان نشان دهنده مقاومت ۵۰٪ نسبت به آمپی سیلین می باشد (۲۵).

در این مطالعه فراوانی مقاومت جدایه های *E.coli* نسبت به سفتری آکسون، سفوتاکسیم و سفنازیدیم بترتیب ۵۰/۸٪، ۴۸/۵٪ و ۳۰/۵٪ بود که با نتایج مهاجری و همکارانش که به ترتیب ۲۷/۵٪، ۲۷٪ و ۲۲/۵٪، مقاومت آنتی بیوتیکی را مشاهده کرده بودند، متفاوت می باشد (۳).

بالا بودن سطح بهداشت در کشورهای پیشرفته و برنامه ریزی خوب در آنها موجب کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی

در مطالعه ما در بین جدایه های مورد بررسی، مقاومت به آمپی سیلین بسیار بالا بود (۶۷/۳٪)، که با نتایج سایر مطالعات در ایران و دیگر نقاط جهان که میزان مقاوت بالایی را گزارش کرده بودند مطابقت دارد، به طوریکه در ایران در سال ۱۳۹۰ مهاجری و همکاران مقاومت ۷۷٪ی را برای آمپی سیلین گزارش کردند (۳) و میر صالحیان و همکاران مقاومت ۹۸/۵٪ی را در بین نمونه ها مشاهده کرده بودند (۲۷). در پژوهش لی و همکاران، مقاومت ۶۰٪ی، نسبت به آمپی سیلین مشاهده شد (۲۳). در کشور های



نسبت به کشورهای جهان سوم شده است، به طوری که در مطالعه کيفر و همکاران در برزیل، نرخ سویه های مقاوم اشرشیاکلی به سفوتاکسیم و سفنازیدیم ۱۴/۶٪ گزارش شده است (۲۲). در مطالعه ماتناداکیس مقاومت نسبت به سفوتاکسیم ۳/۷٪ و سفنازیدیم ۴٪ بود. همچنین ۴۱/۷٪ از ایزوله ها نسبت به سفیم مقاومت داشتند که این می تواند بخاطر طیف اثر بیشتر سفالوسپورین های نسل چهارم بر باکتری های گرم منفی روده ای و دیگر اینکه مواجهه کمتر ایزوله ها با سفیم باشد (۲۵). این تفاوت می تواند بیانگر افزایش مقاومت به سفالوسپورین های وسیع الطیف در طی سال های اخیر باشد. این روند می تواند بعنوان یک هشدار در درمان عفونت های ناشی از این باکتری باشد و با توجه به اینکه *E.coli* بعنوان یکی از شایعترین باکتری های جدا شده از بیماران ادراری و حتی شایعترین عامل عفونت مجاری ادراری در محیط های بیمارستانی و جامعه می باشد، معمولاً درمان آن با سفالوسپورین ها موفقیت آمیز نبوده و اغلب به شکست درمانی منجر می شود و همین امر منجر به استفاده از داروهای وسیع الطیف مثل فلوروکینولون ها و کاربامپنم ها شده که سویه های مقاوم به این داروها نیز در حال افزایش است. این گروه از مقاومت های دارویی نه تنها در بناب بلکه در اکثر شهرهای ایران و دنیا گزارش شده و شیوع آن در حال افزایش است (۳۰). نتایج آزمایش حساسیت ضد میکروبی مطالعه حاضر نشان می دهند که بیشترین میزان مقاومت در بین سفالوسپورین های نسل سوم و چهارم به سفتریاکسون و سفوتاکسیم بوده و کمترین میزان به سفیم می باشد. و این منطبق بر این اصل کلی است که از نسل اول به نسل چهارم سفالوسپورین ها، فعالیت بر ضد باکتری های گرم منفی بیشتر می شود. از خانواده های آمینوگلیکوزیدها و منوباکتام ها دو آنتی بیوتیک به ترتیب آمیکاسین و آزترونام انتخاب شد و از فلوروکینولون ها یک آنتی بیوتیک با نام سیپروفلوکساسین به عنوان نماینده انتخاب شد که مقاومت نسبت به آزترونام، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین به ترتیب

۴۲/۱٪، ۱۶/۲٪ و ۵۲/۶٪ بود. مهاجری و همکارانش برای آزترونام مقاومت ۲۷٪ گزارش کردند (۳). در برخی مطالعات مقاومت ۸۹٪ی به آزترونام در *E.coli* جدا شده از عفونت ادراری گزارش شده است (۲۷). تحقیقی در ترکیه میزان مقاومت نسبت به آمیکاسین را ۱۱٪ گزارش کرده است که با مطالعه ما همخوانی دارد (۳۱). البته تعداد قابل توجهی از سویه ها نسبت به آمیکاسین حساسیت متوسطی داشتند که این می تواند مقاومت چند دارویی در سویه های مولد *TEM* نسبت به آمینوگلیکوزیدها را هشدار دهد. در بین جدایه های مورد بررسی در مطالعه ما نسبت به سیپروفلوکساسین ۵۲/۶٪ مقاومت مشاهده شد. در مطالعاتی دیگر، مقاومت آنتی بیوتیکی ۲۱٪ در بین سویه های اشرشیاکلی نسبت به سیپروفلوکساسین مشاهده شده است (۴). این مقاومت در مطالعه دازا و همکارانش ۳۵٪ گزارش شده است (۱۱). اختلافات مشاهده شده این نتایج با سایر شهرها و کشورها مربوط به تفاوت در الگوی مصرف آنتی بیوتیک، منطقه جغرافیایی، تفاوت در الگوی مقاومت در مناطق مختلف، روش های مختلف آنتی بیوگرام و مصرف بی رویه آنتی بیوتیک در کشور ما می باشد، همچنین بالا بودن میزان مقاومت سویه های مقاوم به بعضی از سیپروفلوکساسین مناسبترین دارو برای درمان عفونت های ادراری ناشی از *E.coli* ذکر شده است ولی نتایج محققان نشان می دهد که مقاومت نسبت به این دارو در حال افزایش است (۱۵).

کمترین مقاومت به آنتی بیوتیک در ایمی پنم (۵/۳٪) و بیشترین حساسیت نیز مربوط به این آنتی بیوتیک بود. که با نتایج سایر مطالعات در ایران و سایر نقاط جهان که میزان حساسیت بالایی را گزارش کرده بودند مطابقت دارد، به طوری که در مطالعه مهاجری و همکاران (۳)، ۱۰۰٪ حساسیت برای ایمی پنم در *E.coli* جدا شده از عفونت ادراری گزارش شده است. در مطالعات دیگری هم حساسیت به ایمی پنم بالا (۱۰۰٪) بوده است (۵،۲۵).

وجود داشته است (۲۱). که با نتایج کالبو و همکارانش در اسپانیا مطابقت دارد (۱۰). در مطالعه انجام شده توسط بالی و همکاران میزان این ژن در میان نمونه‌های *E. coli* کمی بیشتر بوده است (۷۲٪) (۷). در مطالعات ریو و همکاران نمونه‌های *E. coli* دارای ژن *TEM* از فراوانی بالایی برخوردار بودند (۳۴). مطالعات نشان می‌دهد که در کشورهای اروپایی فراوانی ژن *TEM* مربوط به سویه‌های *E. coli* مولد ESBL پایین می‌باشد (۱۰٪) (۳۶). فرهادی و همکارانش تاثیر برخی از ترکیبات فلز روی بر روی مقاومت وسیع الطیفی مربوط به ژن *CTX-M-15* در باکتری کلبسیلا پنومونیا را بررسی کردند. نتیجه مطالعات آنها نشان داد که حساسیت باکتری در برابر داروهای ترکیبی بالاتر می‌باشد (۱۳). داوری و همکارانش با استفاده از مدل‌سازی بیوانفورماتیکی ماده ای با کد DB01753 را به عنوان مهارکننده آنزیم بتالاکتاماز *CTX-M-9* مشخص کردند. این ماده با اسید آمینه‌های مختلف مانند، سرین ۲۳۷ و ۲۷۴، آسپاراژین ۱۰۴، گلوتامات ۱۶۶ و تیروزین ۱۰۵ پیوند هیدروژنی می‌دهد (۱).

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج، مقاومت به سفالوسپورین‌های وسیع الطیف و دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه، بالا می‌باشد علاوه بر این میزان شیوع ESBL و ژن *TEM* نیز از آمار بالایی برخوردار است. پیامد این مساله، طولانی شدن دوره بیماری و مدت بستری، افزایش هزینه‌های درمانی و تجویز آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف می‌باشد. بنابر این تجویز سفالوسپورین‌ها و فلوروکینولون‌ها باید با احتیاط بیشتری صورت گیرد. حساسیت اکثر جدایه‌های مورد مطالعه به ایمی‌پنم و ارزشمند بودن این دارو ما را به این نتیجه می‌رساند که در درمان عفونت باکتریال، با کمک متخصصین آزمایشگاه و به دنبال تعیین الگوی حساسیت دقیق، از یک بتالاکتام در ترکیب با یک بازدارنده بتالاکتاماز استفاده شود. با این روش از گسترش بتالاکتامازهای وسیع

در مطالعه حاضر، ۵۸ سویه *E. coli* از ۱۵۴ سویه (۳۷٪) به عنوان باکتری‌های تولیدکننده ESBL مشاهده شدند. آمار شیوع *E. coli* مولد ESBL در ایران متفاوت بوده، و بیشترین آمار (۶۸٪) از کرمان گزارش شده است (۲۰). در مطالعه ملزر و همکاران ۶۰٪ باکتری‌های منجر به مرگ، ناشی از *E. coli* تولیدکننده ESBL بوده است (۲۶).

در تحقیقات متعددی، فراوانی‌هایی مانند ۶۰/۶٪، ۲۱٪، ۴۴/۳٪ شیوع ESBL نیز گزارش شده است (۸، ۲۷، ۲۸). در این مطالعه ۳۷٪ از ایزوله‌ها بعنوان مولد ESBL تأیید شدند که آمار قابل توجهی بنظر می‌رسد. بالا بودن میزان ESBL در نمونه‌های مورد مطالعه می‌تواند بدلیل استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف مثل سفالوسپورین‌های نسل سوم و فلوروکینولون‌ها و تعداد زیاد نمونه‌ها در این مطالعه نسبت به مطالعات دیگر باشد. بالی و همکاران در ترکیه فراوانی ESBL در ایزوله‌های *E. coli* را ۶۹/۱۴٪ گزارش کردند، که بالاتر از فراوانی ESBL در مطالعه حاضر می‌باشد (۷). فراوانی ESBL در جوامع مختلف متفاوت می‌باشد. در برخی از آنها میزان آن کمتر از نتایج این مطالعه می‌باشد (۱۲، ۱۹، ۳۵). در بعضی موارد نیز فراوانی آنها مشابه نتایج مطالعه حاضر می‌باشد (۱۴، ۱۷). در برخی تحقیقات هم ایزوله‌های مولد ESBL در حال افزایش می‌باشند (۳۲). نتیجه مطالعات جمیل و همکارانش نشان دهنده شیوع ۳۳٪ ی ESBL در باکتری‌های *E. coli* در افراد مبتلا به عفونت مجاری ادراری می‌باشد (۱۸).

در مطالعه‌ی میر صالحیان و همکاران بتالاکتاماز *TEM* با شیوع ۵۵/۵٪ به عنوان رایج‌ترین ESBL شناخته شد (۲۷). نتایج تحقیق سلطان دلال و همکاران نشان داد که جدایه‌های *E. coli*، ۵۷/۸٪ دارای ژن *TEM* بودند (۲). در مطالعه حسینی مزینانی و همکاران ۶۰٪ و استانگ و همکارانش ۶۷٪ جدایه‌های *E. coli* حاوی ژن *blaTEM* بودند (۱۶، ۳۷). و ژن *bla CTX-M* در ۵۵٪ نمونه‌ها

مشکوک به ارگانسیم‌های تولیدکننده ESBL اند، باید آنتی‌بیوتیکی مناسب و با دقت زیاد انتخاب شود. سویه‌هایی که حساسیت آن‌ها در برابر سفنازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون کاهش پیدا کرده است باید از نظر داشتن ژن‌های ESBL مورد بررسی قرار بگیرند.

الطیف در بین سویه‌های مختلف باکتریایی کاسته شده و از گسترش عفونت‌های مقاوم و نیز روزافزون شدن مرگ و میر در مراکز درمانی پیشگیری می‌شود. تولید ESBL تهدیدی بزرگ برای مصرف سفالوسپورین با طیف وسیع به شمار می‌رود، بنابراین برای درمان عفونت‌هایی که

## منابع

- ۱- داوری، ک، نوروزی، ج، حسینی، ف، اخوان سپه‌ی، ع، ساکو میزائی، س (۱۳۹۸). کشف مهارکننده علیه بتا لاکتاماز -CTX-M-9 باکتری E.coli با استفاده از مطالعات داکینگ ملکولی، MMB/PBSA و دینامیک ملکولی. دوره ۳۲، شماره ۱، ۳۳-۴۶.
- ۲- سلطان دلال، م، م، م، مصری گ، فلاح مهربادی ج، اشراقیان م. رستگار لاری ع. ملا آقامیرزایی ه. صباغی آ. آذر سا م (۱۳۹۰). شناسایی ژن مقاومت بتا لاکتاماز CTX-M-1 در اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های بالینی با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR). مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره ۶۹، شماره ۱، فروردین ۱۳۹۰، ۱۶-۲۱.
- Journal of Microbiology Research, 4(9): 881-884 .
9. Brown, A.C, Chen, J.C. Francois Watkins, L.K. Campbell, D., Folster, J.P. Tate, H., Wasilenko, J, Van Tubbergen, C, Friedman, C.R. 2018. CTX-M-65 extended-spectrum Beta-lactamase producing salmonella enterica serotype infantis, United States. Emerging Infectious Diseases. 24(12): 2284-2291.
10. Calbo, E., Romani, V., Xercavins, M., Gomez, L., Vidal, C. G ,Quintana, S. Vila J. Garau, J. 2006. Risk factors for community-onset urinary tract infections due to Escherichia coli harbouring extended-spectrum beta-lactamases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57(4): 780-783 .
11. Daza, R., Gutierrez, J., & Piedrola, G. 2001. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections. International journal of antimicrobial agents, 18(3): 211-215.
12. Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., Stratchounski, L. 2003. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Russian
- ۳- مهاجری، پ، ایزدی ب، رضایی، م، فلاحی، ب خادمی ح. رویا ابراهیمی، (۱۳۹۰) بررسی تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف در اشریشیاکلی‌های جدا شده از عفونتهای ادراری و الگوی مقاومت آنتیبیوتیکی در کرمانشاه. مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دوره اول شماره ۱۱، ۸۶-۹۴.
- ۴- نخعی مقدم م، مشرفی، ش (۱۳۹۱). تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های ادراری اشریشیاکلی و شیوع بتالاکتامازهای طیف وسیع در بین آنها. مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره شانزدهم، شماره ۴، ۲۲۳-۲۲۸.
5. Andrade, S. S., Sader, H. S., Jones, R. N., Pereira, A. S., Pignatari, A. C.C., & Gales, A. C . 2006. Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines? Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 101(7): 741-748 .
6. Balasubramanian, S., Kuppuswamy, D., Padmanabhan, S., Chandramohan, V., Amperayani, S. 2018. Extended-spectrum beta-lactamase-producing community-acquired urinary tract infections in children: Chart review of risk factors. Journal of Global Infectious Diseases .10(4): 222-225.
7. Bali, E. B., Acik, L., & 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 Journal of Microbiology Research, 4(8): 650-654.
8. Behroozzi, A., Rahbar, M., Vand Yousefi J. 2010. Frequency of extended spectrum beta-lactamase (ESBLs) producing Escherichia coli and klebsiella pneumonia isolated from urine in an Iranian 1000-bed tertiary care hospital. African

- hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(12): 3724-3732.
13. Farhadi, T., Fakharian, A., Ovchinnikov, R.S. 2018. Virtual Screening for Potential Inhibitors of CTX-M-15 Protein of *Klebsiella pneumoniae*. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 10(4): 694-703.
  14. Goyal, A., Prasad KN., Prasad A., Gupta S., Goshal U. Ayyagari A. 2009. Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* & associated risk factor. *Indian Journal of Medical Research*. 129(6): 695-700.
  15. Guest, J.F, Morris, A. 1997. Community-acquired pneumonia: the annual cost to the National Health Service in the UK. *European Respiratory Journal*, 10(7): 1530-1534 .
  16. Hosseini-Mazinani, S. M., Eftekhar, F., Milani, M., & Ghandili, S. 2007. Characterization of beta-Lactamases from Urinary Isolates of *Escherichia coli* in Tehran. *Iranian Biomedical Journal*, 11(2): 95-99.
  17. Hussain M, Hasan F., Shah A.A., Hameed A., Jung M., Rayamajhi N., Cha SB., Yoo HS. 2011. Prevalence of Class A and AmpC  $\beta$ -Lactamases in Clinical *Escherichia coli* Isolates from Pakistan Institute of Medical Science, Islamabad, Pakistan. *Japanese journal of infectious diseases*, 64(3): 249-252.
  18. Jamil, J., Haroon, M., Sultan, A., Khan, M.A., Gul, N. 2018. Prevalence, antibiotic sensitivity and phenotypic screening of *esbl/mbi* producer *E. coli* strains isolated from urine; district swabi, kp, pakistan. *Journal of the Pakistan medical association*. 68(11): 1704-1707.
  19. Jitsurong, S., & Yodsawat, J. 2006. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) produced in blood isolates of gram-negative bacteria in a teaching hospital in southern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.*, 37(1): 131-135 .
  20. Kalantar D, Mansouri Sh. 2010. Emergence of multiple  $\beta$ - lactamases produced by *Escherichia coli* clinical isolates from hospitalized patient in Kerman, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 3(4): 137-145 .
  21. Kharrat, M., Chebbi, Y., Ben Tanfous, F., Lakhali, A., Ladeb, S. Othmen, T.B., Achour, W. 2018. Extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* infections in hematopoietic stem cell transplant recipients: Epidemiology and molecular characterization. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(6): 886-892.
  22. Kiffer, C., Hsiung, A., Oplustil, C., Sampaio, J., Sakagami, E., Turner, P., & Mendes, C. 2005. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 9(3): 216-224.
  23. Lee, S.J., Lee, D. S., Choe, H. S., Shim, B. S., Kim, C. S., Kim, M. E., & Cho, Y.-H. 2011. Antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infections: results from the Korean Antimicrobial Resistance Monitoring System. *Journal of infection and chemotherapy*, 17(3): 440-446 .
  24. Li, Q., Lee, J. Y., Castillo, R., Hixon, M. S., Pujol, C., Doppalapudi, V. R. Chan, M. F. 2002. NB2001, a novel antibacterial agent with broad-spectrum activity and enhanced potency against  $\beta$ -lactamase-producing strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(5): 1262-1268.
  25. Mantadakis, E., Tsalkidis, A., Panopoulou, M., Pagkalis, S., Tripsianis, G., Falagas, M . Chatzimichael, A. 2011. Antimicrobial susceptibility of pediatric uropathogens in Thrace, Greece. *International urology and nephrology*, 43(2): 549-55.
  26. Melzer M, Petersen I. 2007. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *The Journal of infection*, 55(3): 254-259.
  27. Mirsalehian A, Akbari-Nakhjavani A., Peymani A., Kazemi B., JabalAmeli F., Mirafshar SM. 2008. Prevalence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase -producing *enterobacteriaceae* by phenotypic and Genotypic Methods in Intensive Care Units in Tehran, Iran. *Daru-Journal of Pharmaceutical Science*, 16(3): 169-173.
  28. Mirzaee, M., Owlia, P., & Mansouri, S. 2009. Distribution of CTX-M  $\beta$ -lactamase Genes Among *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients in Iran. *Laboratory Medicine*, 40(12): 724-727.
  29. Montravers, P. Bassetti, M. 2018. The ideal patient profile for new beta-lactam/beta-lactamase inhibitors. *Current opinion in infectious diseases*, 31(6): 587-593.
  30. Peirano, G., Richardson, D., Nigrin, J., McGeer, A., Loo, V., Tuye, B. Pitout, J. D. D. 2010. High

- prevalence of ST131 isolates producing CTX-M-15 and CTX-M-14 among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from Canada. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3): 1327-1330.
31. Pullukcu H., Aydemir S., Tasbakan I. M., Cilli F., Tunger A., Ulosoy S. 2008. Susceptibility of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Urine Isolates to Fosfomycin, Ciprofloxacin, Amikacin and Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 38(2): 175-180.
  32. Qi C., Pilla V., Yu J.H., Reed K. 2010. Changing prevalence of *Escherichia coli* with CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in outpatient urinary *E. coli* between 2003 and 2008. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 67(1): 87-91.
  33. RodrAguez-Revuelta, M.J., Lopez-Cerero, L., Serrano, L., Luna-Lagares, S., Pascual, A., RodrAguez -Baa, J. 2018. Incidence and Risk Factors for Acquisition of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Newborns in Seville, Spain: A Prospective Cohort Study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(6): 835-841
  34. Ryoo, N. H., Kim, E.C., Hong, S. G., Park, Y. J., Lee, K., Bae, I. K., song E.H., Jeong, S. H. 2005. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(4): 698-702.
  35. Saurina, G., Quale, J. M., Manikal, V. M., Oydna, E., & Landman, D. 2000. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(6): 895-898.
  36. Schito, G. C., Naber, K. G., Botto, H., Palou, J., Mazzei, T., Gualco, L., & Marchese, A. 2009. The ARESC study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *International journal of antimicrobial agents*, 34(5): 407-413.
  37. Stange, C., Yin, D., Xu, T., Guo, X., Schafer, C., Tieh, A. 2019. Distribution of clinically relevant antibiotic resistance genes in Lake Tai, China. *The Science of the total environment*, 655(10): 337-346.

## Evaluation of the Frequency of *TEM* beta-lactamase gene in patients with urinary tract infections in Bonab County

Masoomi Jahandizi R.<sup>1</sup>, Aletaha M.<sup>2</sup> and Musavi M.K.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran

<sup>2</sup> DEpt. of Medical Biotechnology, Medical Science University of Shiraz, Shiraz, I.R. of Iran

<sup>3</sup> Dept. of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Bonab, Bonab, I.R. of Iran

### Abstract

*TEM* beta lactamase gene is one of the important plasmid genes in *Enterobacteriaceae* which is the cause of over 90% of *Escherichia coli* isolates resistance to beta lactam antibiotics. The aim of this study was to detect the prevalence of antibiotic resistance and *TEM* gene. 266 clinical isolates of *E.coli* were collected from laboratories in Bonab County. Phenotypic screening and confirmation tests for extended spectrum beta lactamases (ESBLs) were carried out using disk diffusion (Kirby Bauer) method. All of the ESBL producing isolates were tested by PCR using specific primers. Our results showed that, the maximum resistance was seen for ampicillin (67.3 %) and the maximum sensitivity was seen for imipenem (92.5%). In this study 45 % isolates were multidrug resistance, which showed at least resistance for three antibiotics. Out of 154 isolates, 58 (37.7%) cases were ESBL producers which 65.51% of isolates contained *TEM* gene. This study showed that, *TEM* gene encodes over 50% of ESBLs in *E.coli*. Therefore, we recommend detection of this gene as a routine bacteriologic procedure in management of the nosocomial infections caused by enteric bacteria.

**Key words:** *Escherichia coli*, ESBLs, *TEM* beta lactamase gene, Bonab County