View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۳، شماره ۳/ مرداد و شهریور ۱۳۹۰/ ۱۷-۹

مقاله پژوهشی

بررسی فراوانی شیوع ژن CTX-M در باکتری های روده ای تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف به روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)

رضا ترشیزی*[۱]، دکتر بهنام زمان زاد[۲]، کبری مختاریان[۳]، دکتر علی کریمی[۳]

[۱] مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی – دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران، [۲] گروه میکروب شناسی-دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران، [۳] مرکز تحقیقات گیاهان دارویی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت:۸۹/۵/۳۱ اصلاح نهایی: ۸۹/۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۲۰

چکیده:

زمینه و هدف: بتالاکتاماز وسیع الطیف گروه CTX-M در سراسر جهان به عنوان یک مکانیسم مهم مقاومت در مقابل سفالوسپورین در پاتوژن های گرم منفی شناخته شده و به سرعت در حال افزایش اند. هدف از این مطالعه تعیین ژن CTX-M در سویه های انتروباکتریاسه مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف ایزوله شده از بیمارستان های آموزشی شهرکرد به روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی تحلیلی، ۳۲۵ ایزوله انتروباکتریاسه از نمونه های ادرار، خون و زخم جداسازی و با آزمون های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. مقاومت باکتری ها نسبت به دیسک های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون و آزترونام به روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. ایزوله های مقاوم به آنتی بیوتیک های فوق بوسیله تست تاییدی دیسک های ترکیبی سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید و سفتازیدیم-کلاولانیک اسید بررسی شدند. سپس در سویه های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف، وجود ژن CTX-M با روش PCR بررسی شد.

یافته ها: در تست فنوتیپی تاییدی ۲۸٪ ایزوله ها بتالاکتامازهای وسیع الطیف تولید می کردند و فراوانی ژن بتالاکتاماز CTX-M در کل انتروباکتریاسه های فنوتیپ مثبت ۵۰/۵٪ در ایزوله های اشرشیاکلی، انتروباکتر و کلبسیلاپنومونیه به ترتیب ۱۹/۷٪، ۱۵/٤٪ و ٤٪ بدست آمد (P<۰/۰۵). سویه های پروتئوس فاقد ژنوتیپ مزبور بودند.

نتیجه گیری: ژن بتالاکتاماز CTX-M شیوع بالایی در ایزوله های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف دارد و این آنزیم نقش مهمی در مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام بازی می کند.

واژه های کلیدی: انتروباکتریاسه، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، ژن CTX-M، واکنش زنجیره ای پلی مراز.

مقدمه:

امروزه شیوع پاتوژن های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs= Extended Spectrum Beta Lactamases) نگرانی های بالینی را افزایش داده است به طوری که عفونت به این ارگانسیم ها با میزان مرگ و میر بیشتر، افزایش شیوع بیماری ها و افزایش هزینه های درمانی مرتبط است. اگرچه بتالاکتامازهای وسیع الطیف به طور غالبی در گونه های اشرشیاکلی و کلبسیلاپنومونیه مشاهده می شوند اما این آنزیم ها در دیگر جنس های انتروباکتریاسه مانند انتروباکتر، سیتروباکتر، سراشیا، پروتئوس و سالمونلا هم بدست آمده است (۱).

در طول دهه گذشته بتالاکتاماز های نوع CTX-M از بتالاکتامازهای وسیع الطیف در خیلی از کشورهای جهان گسترش یافتند. اولین ارگانیسم های مولد این نوع بتالاکتامازها در ایزوله هایی به صورت اپیدمیک یا اسپورادیک در مناطقی دور از هم (آلمان، فرانسه و آرژانتین) در اوایل ۱۹۹۰ تشخیص داده شدند (۲).

*نویسنده مسئول: شهرکرد- رحمتیه- دانشکده پزشکی - مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی، تلفن: ۰۳۸۱-۳۳٤٦٦۹۲، E-mail:r_torshizi61@yahoo.com

آنزیم های CTX-M در کلاس مولکولی A بتالاکتامازها قرار می گیرند. گسترش افقی (Horizontal) ژن های این بتالاکتاماز در میان سویه های مشابه یا متفاوت اعضای انتروباکتریاسه توسط پلاسمیدها صورت می گیرد (۳). بر خلاف TEM-type beta-lactamase و SHV-type beta-lactamase، بتالاکتامازهای CTX-M، اثر تخریبی بیشتری بر آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفتریاکسون نسبت به سفتازیدیم دارند (۴).

شیوع ژن CTX-M بر روی نمونه های باکتری های روده ای در کلمبیا ۴۷/۹ درصد (۵) و در فرانسه ۲۵ درصد (۶) گزارش شد. در استرالیا ۳۳ درصد از سویه های انتروباکتریاسه های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف دارای ژن CTX-M شناسایی گردیدند (۷).

در بعضی از مطالعات شیوع ژن مزبور در ۹۲ درصد سویه های انتروباکتریاسه مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف گزارش شده است که افزایش قابل ملاحظه ای را نشان می دهد (۸)، همچنین مطالعات داخلی نشان می دهد که شیوع ژن مزبور از ۱۴/۲۸درصد تا ۲۲/۵ درصد در کل سویه های اشرشیاکلی و کلبسیلاپنومونیه متفاوت است (۱۰،۹،۲).

امروزه تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف تهدید بزرگی برای مصرف سفالوسپورین های وسیع الطیف شده است. از طرف دیگر ژن های این آنزیم ها با ایجاد مقاومت های چندگانه به دیگر آنتی بیوتیک ها ارتباط دارند. بطوری که بروز و انتشار ژن های مختلف این آنزیم ها می تواند مقاومت های چندگانه ایجاد کند و استفاده از داروهای ضد میکروبی مفید و مناسب را کاهش دهد. برای کنترل انتشار بیشتر اینگونه مقاومت ها در سویه های انتروباکتریاسه و درمان سریع و مناسب عفونت هایی که مشکوک به ارگانیسم های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف هستند و همچنین جهت کسب آگاهی بیشتر از میزان شیوع ژن های مختلف این آنزیم ها در هر منطقه باید بررسی های مولکولی صورت گیرد به همین منظور در مطالعه حاضر وجود ژن بتالاکتاماز CTX-M در ایزوله های اشرشیا، کلبسیلا، انتروباکتر و پروتئوس تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف در شهر شهرکرد مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی:

این مطالعه یک مطالعه توصیفی-تحلیلی بوده و جامعه مورد بررسی شامل ایزوله های انتروباکتریاسه جدا شده از نمونه های ارسال شده به بخش میکروب شناسی آزمایشگاه بیمارستان های آموزشی شهرکرد (هاجر و کاشانی) می باشد. ۳۲۵ نمونه کلینیکی شامل ادرار، خون و زخم در ۶ ماه اول سال ۱۳۸۷ جمع آوری شدند و به آزمایشگاه گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی شهرکرد انتقال داده شدند و سپس بر اساس تست های افتراقی و با استفاده از روش های استاندارد تشخیصی و بیوشیمیایی تعیین هویت شدند.

به منظور شناسایی باکتری های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف در ابتدا آزمون غربالگری با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون و آزترونام انجام شد. در این تست از روش دیسک دیفیوژن (Kirby Baur) استفاده شد. از ایزوله های مورد بررسی سوسپانسیونی برابر غلظت نیم مک فارلند تهیه شد و در محیط مولر هینتون آگار (Merck، آلمان) به صورت گسترده کشت داده شد و سپس دیسک های مورد بررسی با فاصله حداقل ۲/۵ سانتیمتر از هم روی پلیت قرار داده شد سپس به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. بعد از بررسی هاله عدم رشد، سویه های مقاوم به حداقل یکی از این آنتی بیوتیک ها به عنوان اسکرین مثبت تلقی شده و در مرحله بعد تحت آزمون فنوتیپی تاییدی قرار گرفتند (۱۱). در این تست از سویه اشرشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲ جهت کنترل کیفی تست استفاده شد. برای تایید تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف در ارگانیسم های اسکرین مثبت از آزمون

دیسک های ترکیبی (Combination Disk Method) استفاده شد. در این روش از دیسک های ۳۰ میکروگرمی سفوتاکسیم و سفتازیدیم در مجاورت دیسک مرکب آنها با ۱۰ میکروگرم کلاولانیک اسید (شرکت MAST انگلستان) در محیط مولر هینتون آگار (Merck، آلمان) بر اساس روش دیسک دیفیوژن مانند آزمون غربالگری صورت گرفت. در صورتی که قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف دیسک ترکیبی حداقل ۵ میلیمتر بیشتر از قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک منفرد همان آنتی بیوتیک باشد به عنوان سویه مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف قلمداد گردید (۱۲). در این تست از سویه اشرشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲ و سویه کلبسیلاپنومونیه ATCC ۷۰۰۶۰۳ ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد. سپس در مرحله بعد تست ژنوتیپی برای ایزوله های فنوتیپ مثبت (مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف) صورت گرفت.

جهت استخراج DNA ایزوله های مورد بررسی، از کیت استخراج DNA، (DNPTM سینا ژن) استفاده شد. چند کلنی از باکتری را در ml ۱۰ محیط TSB، (Tryptic Soy Broth مرک آلمان) کشت داده بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷–۳۵ درجه سانتیگراد (طبق دستورالعمل کیت) استخراج DNA صورت گرفت. جهت بررسی فراوانی ژن های بتالاکتاماز CTX-M تست PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت (۱۳،۴) (جدول شماره ۱). برای هر PCR، ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده به PCR Master mix با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (هر ویال محتوی ۲/۵ میلی مول MgCl2، ۱ میلی مول deoxynucleoside triphosphate (dNTPs)، ۱ میلی مول از پرایمرهای ژن CTX-M و ۰/۵ میلی مول از پرایمر های ژن 16SrRNA، ۰/۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، ۲/۵ میلی مول Tris-HCl، 9 pH) اضافه گردید. برنامه دستگاه ترموسایکلر شامل: مرحله واسرشته شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، که با ۳۵ سیکل ادامه می یابد مرحله واسرشته شدن (Denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه، مرحله اتصال (Annealing) در دمای ۵۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن (Elongation) در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، در ضمن مرحله طویل شدن نهایی هم در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه ادامه می یابد. در تحقیق حاضر به منظور اطمینان از انجام چرخه PCR در نمونه هایی که از نظر ژن بتالاکتاماز CTX-M منفی بوده و در الکتروفورز نهایی فاقد باند می باشند، از پرایمرهای قطعه 16SrRNA (۴۷۹ base pair) که در تمامی باکتری ها یکسان است به عنوان کنترل داخلی، به همراه پرایمرهای اختصاصی ژن بتالاکتاماز CTX-M در یک واکنش PCR استفاده شد. در تست PCR جهت کنترل کیفی تست از E.coli سویه J53-pMG267 به عنوان کنترل مثبت و از E.coli سویه DH10B به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل نتایج از نرم افزار SPSS (Version 11/5) و آزمون کای دو استفاده شد.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

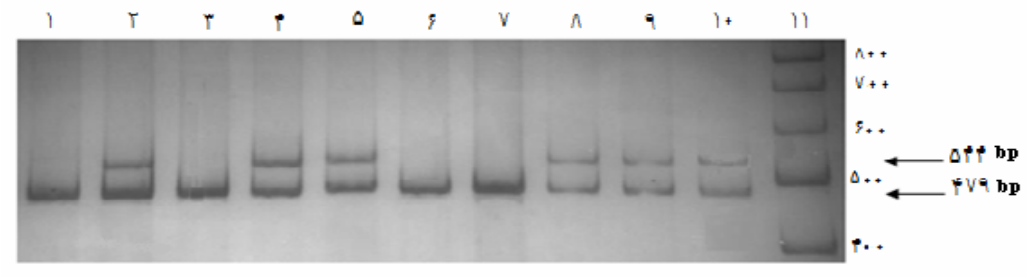
ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول bp	رفرانس
CTX-M	F: 5′-TTT GCG ATG TGC AGT ACC AGT AA-3′ R: 5′-CGA TAT CGT TGG TGG TGC CAT A-3′	٥٤٤	٤
16SrRNA	F: 5′-GGA ATT CAA ATG AAT GGG C-3′ R: 5′-CGGG GAT CCC AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC -3′	٤٧٩	١٣

یافته ها:

در مطالعه حاضر از ۳۲۵ نمونه انتروباکتریاسه جدا شده از نمونه های کلینیکی، ۱۹۳ ایزوله (۵۹/۴٪) را جنس اشرشیا، ۹۹ ایزوله (۳۰/۴٪) را جنس کلبسیلا، ۲۶ ایزوله (۸٪) را جنس انتروباکتر و ۷ ایزوله (۲/۲٪) را جنس پروتئوس تشکیل می دادند.

از کل ۳۲۵ باکتری های روده ای تحت بررسی در این مطالعه ۹۱ ایزوله، (۲۸٪) مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند، این ایزوله ها شامل ۶۲ ایزوله (۳۲/۱٪) اشرشیا، ۲۰ ایزوله (۲۰/۲٪) کلبسیلا و ۹ ایزوله (۳۴/۶٪) انتروباکتر بودند و جنس پروتئوس فاقد فنوتیپ مزبور بود (P<۰/۰۵).

در تست PCR، ۴۶ ایزوله (۵۰/۵٪) از ۹۱ سویه انتروباکتریاسه فنوتیپ مثبت واجد ژن CTX-M بودند که در مجموع از ۳۲۵ ایزوله انتروباکتریاسه اخذ شده ۱۴/۱۵ درصد ایزوله واجد ژن CTX-M بودند (تصویر شماره ۱). بیشترین فراوانی ژنوتیپ مزبور در ایزوله هـــای اشرشیا ۱۹/۷ درصد، بعد از آن در ایزوله های انتروباکتر و کلبسیلا به ترتیب ۱۵/۴ درصد و ۴ درصد بدست آمد (P<۰/۰۵) (جدول شماره ۲)، ضمنـاً در ایزوله های پروتئوس مورد مثبتی مشاهده نشد.



تصویر شماره ۱: الگوی الکتروفورز محصولات PCR ژن های CTX-M و 16SrRNA سویه های انتروباکتریاسه ژنوتیپ مثبت و منفی.

باند ۵٤٤ bp مربوط به قطعه ژن CTX-M و باند ٤٧٩ bp مربوط به قطعه ژن 16SrRNA، الگوی های شماره ۱ و ۲ به ترتیب سویه کنترل منفی (E.coli DH10B) و سویه کنترل مثبت (E.coli J53-pMG267)، الگوهای شماره ۳، ٦ و ۷ سویه ای ژنوتیپ منفی و الگوهای شماره ٤، ۵، ۸ تا ۱۰ سویه های ژنوتیپ مثبت الگوهای شماره ۱۱ مارکر اندازه ۱۰۰ bp.

جدول شماره ۲: فراوانی ژن بتالاکتاماز CTX-M به تفکیک نوع باکتری مورد بررسی

فراوانی / نوع باکتری	مثبت		منفی		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
اشرشیا	۳۸	۱۹/۷	۱۵۵	۸۰/۳	۱۹۳	۱۰۰
کلبسیلا	٤	٤	۹۵	۹٦	۹۹	۱۰۰
انتروباکتر	٤	۱۵/٤	۲۲	۸٤/٦	۲٦	۱۰۰
جمع	٤٦	۱٤/۵	۲۷۲	۸۵/۵	۳۱۸	۱۰۰

P=۰/۰۰۸ بین فراوانی ژن CTX-M و نوع باکتری.

در این مطالعه از مجموع ۶۶ سویه فنوتیپ مثبت جدا شده از عفونت های کسب شده از جامعه ۳۱ سویه واجد ژن CTX-M بودند در حالی که از ۲۵ سویه فنوتیپ مثبت جدا شده از عفونت های بیمارستانی ۱۵ مورد ژنوتیپ مزبور را داشتند (P>۰/۰۵)، از دیدگاه فنوتیپی این ارتباط برای فنوتیپ ESBL و منبع عفونت معنی دار بود (P<۰/۰۵)، بطوری که فراوانی ایزوله های فنوتیپ مثبت در عفونت های بیمارستانی بیشتر از عفونت های کسب شده از جامعه بود (جدول شماره ۳).

جدول شماره۳ : فراوانی ایزوله های فنوتیپ مثبت و منفی بتالاکتاماز به تفکیک نوع عفونت

فراوانی / نوع عفونت	مثبت		منفی		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
عفونت بیمارستانی	۲۵	۳۷/۹	٤۱	٦۲/۱	٦٦	۱۰۰
عفونت کسب شده از جامعه	٦٦	۲۵/۵	۱۹۳	۷٤/۵	۲۵۹	۱۰۰
جمع	۹۱	۲۸	۲۳٤	۷۲	۳۲۵	۱۰۰

P=۰/۰٤ بین فنوتیپ و منبع عفونت.

بحث:

نتایج حاصل از تست فنوتیپی در این مطالعه از مجموع ۳۲۵ ایزوله اخذ شده، شیوع سویه های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف را در خانواده انتروباکتریاسه ۲۸ درصد نشان داد بنحوی که ایزوله های انتروباکتر (۳۴/۶٪) بیشترین فراوانی و سپس اشرشیا و کلبسیلا (۳۲/۱٪ و ۲۰/۲٪) قرار دارند.

مطالعاتی که در کره (۶) و در شمال هند (۱۴) صورت گرفت به ترتیب ۲۷ درصد و ۲۶/۶ درصد ایزوله های انتروباکتریاسه را به عنوان مولد آنزیم های بتالاکتامازهای وسیع الطیف گزارش کردند که نتایج مطالعات آنها با مطالعه حاضر همخوانی دارد. Nasehi و همکاران در سال ۱۳۸۶ و میرزایی و همکاران در سال ۱۳۸۵ در تهران به ترتیب ۳۸ درصد سویه های کلبسیلا و ۵۳/۷۵ درصد سویه ها اشرشیاکلی را مولد ESBL تشخیص دادند (۱۰،۲). این نتایج نسبت به نتایج مطالعه حاضر از فراوانی بیشتری برخوردار هستند این آمار بالا به نظر می رسد بدلیل ظهور کلون های باکتری مقاوم غالب و مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف در منطقه و الگوی درمانی وابسته به سفالوسپورین ها بخصوص سفالوسپورین های وسیع الطیف در مواجهه با بیماری های عفونی باشد، که منجر به افزایش باکتری های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف گردیده است. همچنین شیوع نسبتاً بالای ارگانیسم های مولد این آنزیم ها در مناطق مختلف بستگی به میزان شیوع این ارگانیسم ها در حیوانات و حاملین مدفوعی انسانی دارد که می توانند به عنوان مخازن این ارگانیسم ها باشند و این ارگانیسم ها می توانند از طریق تماس با این مخازن و یا زنجیره های غذایی از طریق حیوانات به دیگر انسان ها منتقل شوند (۱۶،۱۵).

در مطالعه حاضر ۵۰/۵ درصد انتروباکتریاسه های فنوتیپ مثبت دارای ژن CTX-M تشخیص داده شدند که در مجموع ۱۴/۱۵ درصد از کل باکتری های مجزا شده از نمونه های کلینیکی را تشکیل دادند. فراوان ترین ایزوله های واجد این ژنوتیپ، سویه های اشرشیا (۱۹/۷٪)، انتروباکتر (۱۵/۴٪) و کلبسیلا (۴٪)

بودنـد. در چنـدین مطالعـه کـه در تهـران در سـال هـای ۱۳۸۵ و ۱۳۸۸ صورت گرفت بـین ۱۴/۲۸ درصـد تـا ۵۶ درصد سویه های کلبسیلا واجد ژن بتالاکتاماز CTX-M بودنـد کـه نتـایج ایـن مطالعـات از فراوانـی بیـشتری در مقایسه با مطالعه حاضر در سویه های کلبسیلا برخـوردار هستند (۱۹،۱۸،۱۷). در مطالعه ای در هند در سال ۲۰۰۸ از ۶۰۰ ایزولـه انتروباکتریاسـه بـا فنوتیـپ مثبـت، ۱۵/۸ درصد واجد ژن مورد نظر بودند (۲۰) که با نتایج مطالعه حاضر مشابه می باشد. از جملـه مطالعـات داخلـی مـشابه کـه در سـال ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ در تهـران صـورت گرفـت ایزولـه هـای اشرشـیاکلی را دارای ژنوتیـپ CTX-M گزارش کرد (۲۱،۲). بـه نظـر مـی رسـد انتـشار کلونـال سویه های حامل ژن بتالاکتاماز CTX-M، الگـوی مـصرف سفالوسپورین ها در درمان عفونـت هـا و از طـرف دیگـر انتقال و حرکت پلاسمیدها بین سویه های مختلف نقـش مهمی را در شیوع بـالای منطقـه ای ژن هـای بتالاکتامـاز CTX-M در سویه های انتروباکتریاسه بازی می کنـد، از طرفی قابلیت انتقال این ژن از مخـازن حیـوانی (ماکیـان) آن به انسان ها به عنوان دیگر عوامل شیوع این ژن حـائز اهمیت هـستند (۲۲). از آنجـایی کـه ژن هـای CTX-M همیشه با توالی های الحاقی ISEcp1 مـرتبط هـستند کـه در بالادست ژن بتالاکتاماز CTX-M واقـع شـده کـه بـه عنوان مسئول بیان و حرکت این ژن شـناخته شـده اسـت به همین دلیل توانایی توالی های الحـاقی ISEcp1 بـرای حرکت و تحریک بیان ژن های CTX-M ممکـن اسـت شیوع گسترده این ژن ها را توضیح دهد (۲۳).

از دیـدگاه محـل جداسـازی نمونـه هـا در مطالعـه حاضر ۲۵/۵ درصد سویه های جدا شده از عفونت هـای کسب شده از جامعه و ۳۷/۹ درصد سویه های جدا شده از عفونت های بیمارستانی دارای فنوتیپ مثبت بودند که با نتایج مطالعات مختلف در پاکستان، هندوستان، اسـپانیا و انگلـستان همخـوانی دارد (۲۷-۲۴)، بنظـر مـی رسـد مصرف بالای آنتی بیوتیک های متعـدد در بیمارسـتان و پتانسیل انتقال بیمار به بیمار یا انتقال با واسطه دست هـای آلوده پرسـنل بیمارسـتان، شـیوع ایـن سـویه هـای مولـد ESBLs را در بیمارستان نـسبت بـه جامعـه افـزایش داده است (۲۸،۲۵).

نتیجه گیری:

با توجه به نتایج مطالعه حاضر ژن های مولد بتالاکتاماز CTX-M که تنها جزیی از خانواده بزرگ بتالاکتامازهای وسیع الطیف می باشد در سویه های اشرشیا، کلبسیلا و انتروباکتر این منطقه گزارش گردید که می تواند بیانگر وجود کلون های مختلف باکتری های مولد دیگر ژن های بتالاکتامازهای وسیع الطیف در منطقه باشد بنابراین جهت کسب آگاهی بیشتر از میزان شیوع دیگر ژن های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف در گونه های مختلف باکتری ها در این منطقه به بررسی های مولکولی و اپیدمیولوژیکی بیشتری نیاز است.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از همکاری و مساعدت کلیه همکاران در گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و همچنین معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که هزینه این طرح را تصویب و تقبل نموده اند سپاسگزاری می نمایم.

منابع:

1. Al-Zarouni M, Senok A, Rashid F, Al-Jesmi SM, Panigrahi D. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum beta lactamase producing *enterobacteriaceae* in the United Arab Emirates. Med Princ Pract. 2008; 17(1): 32-6.

2. 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*. Iran J Pub Health. 2009; 38(1): 10-17.

3. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β-lactamases: the CTX-M Enzymes. Antimicrob Agents Chemothr. 2004 Jan; 48(1): 1-14.

4. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum ß-lactamase-producing *Escherichia coli*. and *Klebsiella pneumoniae* in russian hospitals. J Antimicrob Agents Chemother. 2003 Dec; 47(12): 3724-32.

5. Valenzuela de Silva EM, Mantilla Anaya JR, Reguero MT, Gonzalez Mejia EB, Pulido Manrique IY, Dario Llerena I, et al. Detection of CTX-M-15 and CTX-M-2 in clinical isolates of *Enterobactericeae* in Bogota, Colombia. J Clin Microbiol. 2006 May; 44(5): 1919-20.

6.Kim J, Lim YM, Jeong YS, Seol SY. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14 and CTX-M-9 extended-spectrum- ß-lactamase in enterobacteriaceae clinical isolates in Korea. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Apr; 49(4): 1572-5.

7. Eisner A, Fagan EJ, Feierl G, Kessler HH, Marth E, Livermore DM, et al. Emergence of enterobacteriaceae isolates producing CTX-M extended-spectrum- ß-lactamase in Austria. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Feb; 50(2): 785-7.

8. Naas T, Oxacelay C, Nordmann P. Identification of CTX-M-type extended-spectrum- ß-lactamase genes using real-time PCR and pyrosequencing. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Jan; 51(1): 223-30.

9. Behzadian Nejad Q, Abdollahi A, Najar Peerayeh SH, Forouhesh Tehrani H. Evaluation of bla-ctx-m-type gene in multi drug resistance *Klebsiella pneumonia* species isolated from clinical samples. J Med Sci Iran. 2008; 60,61(15): 37-45.

10. Nasehi L, Shahcheraghi F, Sadat Nikbin V, Nematzadeh SH. PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Tehran, Iran. Iran J Basic Med Sci. 2010 Summer; 13(3): 111-18.

11. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 20th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institue. 2010 Jan; 30(1): 40-52.

12. Livermore DM, Woodford N. Guidance to diagnostic laboratories: laboratory detection and reporting of bacteria with extended spectrum β-lactamases. London: Health Protection Agency Colindale; 2004 June. p: 1-14.

13. Geha DJ, Uhl JR, Gustaferro CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicilin-reesistant staphylococci in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 1994 July; 32(7): 1768-72.

14. Khurana S, Taneja N, Sharma M. Extended spectrum β-lactamase mediated resistance in urinary tract isolateds of family Enterobacteriaceae. Indian J Med Res. 2002; 116: 145-9.

15. Riano I, Moreno MA, Teshager T, Senz Y, Domnguez L, Torres C. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. J Antimicrob Chemother. 2006; 58(4): 844-7.

16. Valverde A, Coque TM, Sgnchez-Moreno MP, Rollgn A, Baquero F, Cantń R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. J Clin Microbiol. 2004; 42(10): 4769-75.

17. Mirsalehian A, Nakhjavani F, Peymani A, JabalAmeli F, Mirafshar SM, Hamidian M. [Frequency of extended spectrum β-lactamase producing Enterobacteriaceae in intensive care units. Tehran Univ of Med Sci J. 2008; 65(1): 33-8.]Persian

18. Nematzadeh Sh, Shahcheraghi F, Feizabadi MM. Determination of bla CTX-M-2 gene in *Klebsiella pneumonia* isolated from clinical specimens. Proceeding of the Third Iranian Congress of Clin Microbiol Shiraz. 2009 Oct; p: 146.

19. Karimi A, Malekan M, Fallah F, Maham S, Navidinia M, Jahromi M, et al. Detection of integron elements and gene group encoding ESBLs and their prevalence in *E. coli* and *Klebsiella isolated* from urine and stool samples of patients referred to Mofeed children hospital in Tehran by PCR method. Proceeding of the Third Iranian Congress of Clin Microbiol Shiraz. 2009 Oct; p: 28.

20. Jemima SA, Verghese S. Molecular characterization of nosocomial CTX-M type β-lactamase producing Enterobacteriaceae from a tertiary care hospital in south India. Indian J Med Microbiol. 2008; 26(4): 365-8.

21. Soltan Dallal MM, Mobasseri G, Fallah Mehrabadi J, Eshraghian MR, Rastegar Lari A, Molla Aghamirzaei H, et al. [Detection of CTX-M-1 beta lactamase gene in *Escherichia coli* isolated from clinical samples by Polymerase Chain Reaction (PCR). Tehran Univ Med J. 2011 April; 69(1): 16-21.]Persian

22. Bertrand S, Weill FX, Cloeckaert A, Vrints M, Mairiaux E, Praud K, et al. Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing Salmonella enterica serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). J Clin Microbiol. 2006; 44(8): 2897-903.

23. Poirel L, Decousser JW, Nordmann P. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a blaCTX-M beta-lactamase gene. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47: 2938-45.

24. Mumtaz S, Ahmad M, Aftab I, Akhtar N, Hassan M, Hamid A. Extended spectrum beta-lactamases in enteric gram-negative bacilli: related to age and gender. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2007 Oct-Dec; 19(4): 107-11.

25. Jain A, Mondalm. Prevalence & antimicrobial resistance pattern of extended spectrum β-lactamase producing *Klebsiella spp* isolated from cases of neonatal septicaemia. Indian J Med Res. 2007 Jan; 125(1): 89-94.

26. Romero L, Lopez L, guez-Bano JR, Herna´ndez R, Martınez LM, Pascual A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum b-lactamases. Clin Microbiol Infect. 2005; 11(8): 625-31.

27. Melzer M, Petersen I. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. J Infect. 2007 Sep; 55(3): 254-9.

28. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of enterobacteriaceae producing ESBLs the community. J Antimicrob Chemother. 2005 May; 56(1): 52-9.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2011 Aug, Sept; 13(3): 9-17. ***Original article***

Determination of CTX-M genes in enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase using PCR method

Torshizi R (MSc)*[1], Zamanzad B (MD)[2], Mokhtareyan K (MSc)[3], Karimi A (PhD)[3]
[1]Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran, [2]Microbiology Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran, [3]Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
Received: 22/Aug/2010 Revised: 21/Nov/2010 Accepted: 10/Jan/2011

Background and aims: Extended-spectrum beta-lactamase of CTX-M-type is considered as an important mechanism resistant to cephalosporin in the gram-negative patogene and is wildly growing. *Enterobacteriaceae* species are able to produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). The aim of this study was to detect the prevalence of CTX-M genes in ESBLs producing enteric bacteria isolated in Shahrekord educational hospitals using Polymerase Chain Reaction method.
Methods: In this analytical-descriptive study, antibacterial susceptibility patterns of 325 gram negative bacteria to Cefotaxim, Ceftazidim, Cefterixon and Azteronam tested using disk diffusion (Kirby-Buer) method. In addition, confirmatory tests for detecting ESBLs phenotypes were performed using Ceftazidim-clavulanic acid and Cefotaxim- clavulanic acid combination disks (MAST). The presence of CTX-M gene was assessed using PCR.
Results: Bacteria strains isolated in this study were *Escherichia coli* (59.4%), *Klebsiella pneumoniae* (30.4%), *Enterobacter spp*. (15.4%) and *Proteus spp*. (2.2%). Confirmatory phenotypic test showed that 28% of the strains were ESBL positive. The prevalence of CTX-M gene in isolated *Enterobacteriaceae* was 50.5 %.
Conclusion: High frequency of CTX-M gene in ESBL producing isolates indicates that this enzyme plays an important role in resistance to betalactam containing antibiotics.

Keywords: **CTX-M gens, Enterobacteriaceae, Extended-Spectrum β- Lactamases, Polymerase Chain Reaction.**

Cite this article as: Torshizi R, Zamanzad B, Mokhtareyan K, Karymi A. [Determination of CTX-M genes in enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase using PCR method. J Shahrekord Univ Med Sci 2011, Aug, Sept; 13(3): 9-17.]Persian

[*] ***Corresponding author:***
Cellular and Molecular Research Center, Medical faculty, Rahmateh, Shahrekord, Iran. Tel: 0098- 3813346692, E-mail:r_torshizi61@yahoo.com