

بررسی فراوانی ژن بتالاکتاماز TEM در اشرشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری بیماران سرپایی در کرمانشاه

دکتر علیشا اکیا^۱، مهرداد خدادوست^۲، عصمت رشیدی تبار^۳

نویسنده‌ی مسوول: کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده‌ی پزشکی، گروه میکروبی‌شناسی akya359@yahoo.com

دریافت: ۹۱/۱۲/۲۷ پذیرش: ۹۲/۵/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: عفونت مجاری ادراری (UTI) یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی می‌باشد و اشرشیاکلی (*E. coli*) شایع‌ترین عامل عفونت ادراری است. از طرفی وقوع UTI کسب شده از جامعه ناشی از سویه‌های *E. coli* مولد بتالاکتاماز با طیف گسترده (ESBL) به صورت جهانی در حال افزایش است. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن TEM در اشرشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری بیماران سرپایی بود. روش بررسی: ۱۴۰ جدایه اشرشیاکلی از نمونه‌های میانه‌ی ادرار (Midstream) بیماران سرپایی به دست آمد. تست تعیین حساسیت نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک منتخب به روش دیسک دیفیوژن انجام گرفت و سپس با استفاده از آزمون دیسک ترکیبی سویه‌های تولید کننده ESBL شناسایی گردیدند. در نهایت با استفاده از روش PCR، ژن blaTEM در سویه‌های تولید کننده ESBL تعیین شد.

یافته‌ها: از ۱۴۰ جدایه، ۳۴ (۲۴/۲۸ درصد) جدایه ESBL مثبت بودند و PCR بر روی جدایه‌های مولد ESBL، ژن blaTEM را در ۱۸ (۵۳ درصد) جدایه مشخص نمود. با انجام تست حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها، ۸۱/۴۳ درصد از جدایه‌ها به آمپی‌سیلین مقاوم بودند در حالی که همه جدایه‌ها به ایمپنم حساس بودند.

نتیجه‌گیری: تولید ESBL در باکتری‌های پاتوژن، به‌خصوص در بیماران سرپایی، یک نگرانی جدی برای مصرف آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتام مختلف از جمله سفالوسپورین‌های نسل سوم است. با توجه به وجود ژن بتالاکتاماز TEM در درصد بالایی از جدایه‌ها، مطالعات بیشتر مولکولی و اپیدمیولوژی روی باکتری‌های پاتوژن گرم منفی توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: اشرشیاکلی، blaTEM، عفونت ادراری

مقدمه

عفونت مجاری ادراری (Urinary Tract Infection)

شایع‌ترین بیماری ادراری - تناسلی می‌باشد (۱). در اکثر مقالات و کتب مرجع اشرشیاکلی (*E. coli*) به‌عنوان شایع‌ترین علت عفونت ادراری در سطح جامعه معرفی شده

است (۲). با کشف آنتی‌بیوتیک‌ها و رواج استفاده از آن‌ها در درمان بیماری‌های عفونی باکتریایی، مقاومت‌های باکتریایی در برابر این داروها به وجود آمد (۳). برای تجویز یک آنتی‌بیوتیک مناسب در درمان عفونت ادراری آشنایی با انواع

۱- دکترای تخصصی میکروبی‌شناسی، استادیار مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات اراک، دانشگاه آزاد اسلامی
۳- کارشناس میکروبی‌شناسی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

الطفیف رخ می‌دهد (۱۵). ژن‌های ESBL معمولاً بر روی پلاسمیدهای قابل انتقال قرار دارند که اغلب آن‌ها ژن‌های مقاومت به سایر گروه‌های آنتی‌بیوتیکی را نیز با خود حمل می‌کنند، لذا در انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش مهمی دارند (۱۶). اولین بتالاکتاماز پلاسمیدی موجود در باکتری‌های گرم منفی یعنی TEM-۱ در اوایل سال‌های ۱۹۶۰ مشخص گردید، آنزیم TEM-۱ ابتدا در اشرشیاکلی جدا شده از کشت خون یک بیمار اهل یونان به نام Temoniera یافت گردید و از این رو TEM نامیده شد (۱۷). این آنزیم سبب مقاومت به پنی‌سیلین و سفالوسپورین‌های نسل اول نظیر سفالوتین و سفالوریدین می‌گردد (۱۸). با جایگزینی اسیدهای آمینه در جایگاه فعال انواع مختلفی از بتالاکتاماز TEM پدید آمده به طوری که تاکنون بیشتر از ۱۳۰ نوع TEM مورد شناسایی قرار گرفته‌اند (۱۹). شیوع برخی از این آنزیم‌ها در نواحی مختلف دنیا متفاوت گزارش شده است. برای مثال TEM-۱۰، TEM-۱۲، TEM-۲۶ و TEM-۲۷ شایع‌ترین انواع این آنزیم‌ها در آمریکای شمالی محسوب می‌شوند (۲۰). امروزه تعداد ارگانسیم‌های مولد آنزیم‌های TEM در حال افزایش بوده، این مساله به‌عنوان یکی از بحران‌های موجود در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها مطرح است (۲۱). لذا هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن TEM در میان ایزوله‌های اشرشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری بیماران سرپایی بود.

روش بررسی

در این مطالعه، نمونه‌های ادراری ۳۲۰۰ بیمار طی مدت ۶ ماه از آذرماه ۱۳۹۰ تا اردیبهشت ماه ۱۳۹۱ از کلینیک ویژه دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه جمع‌آوری شدند. ابتدا به بیماران آموزش داده شد که چگونه نمونه‌های ادرار میانی (Midstream) را جمع‌آوری کنند. برای این کار از ظروف پلاستیکی استریل با درب گشاد استفاده شد. عفونت ادراری

ارگانسیم‌های شایع عامل عفونت ادراری و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها ضروری است (۴). از آنجایی که درمان آنتی‌بیوتیکی به صورت تجربی در عفونت‌های ادراری باید بر روی اپیدمیولوژی و الگوی مقاومت پاتوژن‌های شایع دستگاه ادراری استوار باشد، تعیین الگوی مقاومت بسیار مهم است (۵). نوع آنتی‌بیوتیک انتخابی برای درمان تجربی عفونت ادراری در حال حاضر مورد بحث است، چون هم اکنون ۲۰ تا ۵۰ درصد از جدایه‌های *E. coli* حتی در کشورهای توسعه یافته به آنتی‌بیوتیک‌های خط اول درمان مقاوم شده‌اند (۶). آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکام به دلیل طیف اثر گسترده و سمیت انتخابی علیه باکتری‌ها، جایگاه ویژه‌ای در درمان عفونت‌ها دارند (۷ و ۸). از طرفی وقوع عفونت ادراری کسب شده از جامعه ناشی از سویه‌های اشرشیاکلی مولد بتالاکتاماز طیف گسترده [ESBL Extended-Spectrum Beta-Lactamase] به طور جهانی در حال افزایش است (۹). سویه‌های تولیدکننده ESBL به طور فزاینده‌ای به داروهای ضد میکروبی بتالاکتام مقاوم شده‌اند که باعث ایجاد مشکل در درمان بیماران سرپایی می‌شود (۱۰). در واقع بروز موتاسیون‌های نقطه‌ای در سکانس اسید آمینه ژن‌های اولیه بتالاکتاماز نظیر TEM-۱، SHV-۱، TEM-۲ باعث اشتقاق و پیدایش آنزیم‌های جدید و با طیف گسترده شد که اکنون آن‌ها را بنام ESBL می‌شناسند (۱۱). طی سال‌های گذشته شیوع سویه‌های مولد بتالاکتاماز طیف گسترده که اکسی‌ایمینوسفالوسپورین‌ها را هیدرولیز می‌نمایند، در بین جدایه‌های کلینیکی رو به افزایش بوده، منجر به محدودیت در انتخاب آنتی‌بیوتیک برای درمان عفونت‌ها شده است (۱۲ و ۱۳). یکی از عواملی که باعث شیوع سویه‌های تولیدکننده ESBL شده است، مصرف بیش از حد و طولانی مدت سفالوسپورین‌های طیف گسترده می‌باشد (۱۴). مثلاً مقاومت اشرشیاکلی به اکسی‌مینوسفالوسپورین‌ها از قبیل سفنازیدیم و سفوتاکسیم در اثر تولید بتالاکتامازهای وسیع

به صورت وجود تعداد 10^6 یا بیشتر باکتری اشرشیا کلی در هر میلی‌لیتر حجم ادرار در افراد مشکوک از نظر عفونت در نظر گرفته شد (۲۲). از طرفی اطلاعات بیماران از طریق پرس کردن پرسشنامه و مصاحبه با بیمار یا خانواده وی از نظر جنس، سن، سابقه‌ی عفونت ادراری، سابقه‌ی مصرف آنتی‌بیوتیک، بیماری زمینه و سابقه‌ی بستری در بیمارستان در ۳ ماه گذشته بررسی شد. پس از جمع‌آوری نمونه‌های ادراری و آزمایش آن‌ها، تعداد ۱۴۰ جدایه *E. coli* براساس روش استاندارد و با استفاده از واکنش گرم، ریخت شناسی، خصوصیات کشت و تست‌های تکمیلی بیوشیمیایی متداول (اکسیداز، سیمون سترات، اوره آز، فنیل آلانین دامیناز، لیزین دکربوکسیلاز، SIM, TSI, MRVP) جداسازی و شناسایی شدند (۱۱). سپس جدایه‌های *E. coli* را در دمای 70°C درجه‌ی سانتی‌گراد و در محیط نگهدارنده که شامل Trypticase Soy Broth و گلیسرول (Merck, Germany) بود در فریزر نگهداری شدند.

بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش Disk Diffusion طبق دستورالعمل (Clinical and Laboratory Standards Institute) با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شرکت CLSI MAST (England, Merseyside) شامل سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، جنتامیسین (۱۰ میکروگرم)، توبرامیسین (۱۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم) و سیپروفلوکساسین (۳۰ میکروگرم) انجام شد (۲۳). برای انجام Disk Diffusion ابتدا سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند از کلنی‌های ۱۸ ساعته تهیه و سپس با سواب استریل روی سطح محیط مولر هیتتون آگار (Merck, Germany) کشت داده شد و بعد از گذشت ۱۵ دقیقه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی را روی سطح محیط قرار دادیم. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، پلیت‌ها در دمای 35°C تا 37°C

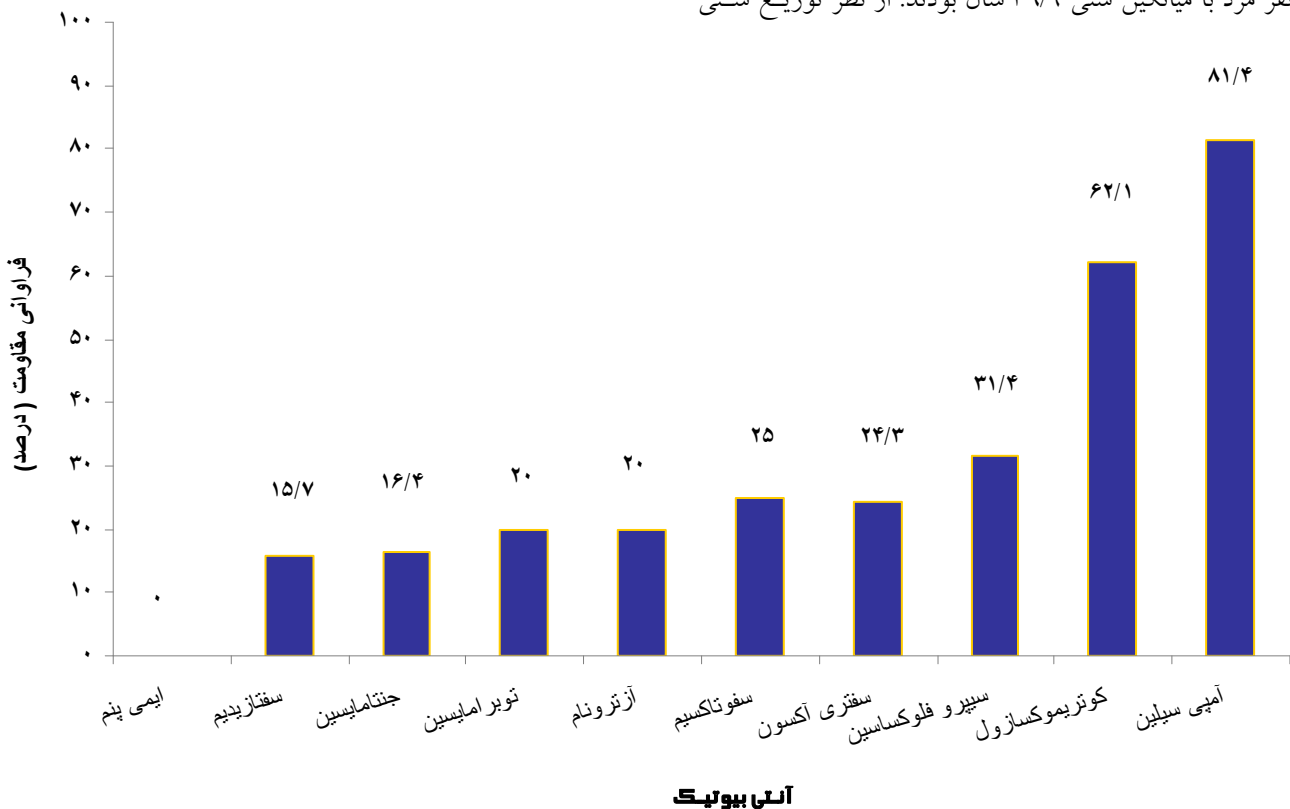
درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوبه گردیدند. قطر هاله‌ی عدم رشد اندازه‌گیری و تفسیر آن با توجه به جداول استاندارد CLSI تعیین شد (۲۳). در ضمن از سویه‌ی استاندارد *E. coli* ATCC ۲۵۹۲۲ به منظور کنترل کیفی استفاده شد. جدایه‌هایی که قطر هاله‌ی عدم رشد آن‌ها حداقل برای یکی از آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و آزترونام به ترتیب ۲۲، ۲۷، ۲۵ و ۲۷ میلی‌متر و یا کمتر بود، از نظر وجود ESBL بررسی شدند (۲۳). برای تایید تولید ESBL در ارگانسیم‌های کاندید از تست فنوتیپی تاییدی (Phenotypic Confirmatory Tests) برابر دستور CLSI استفاده شد. در این روش از دیسک‌های ترکیبی شامل سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم) + کلولانیک اسید (۱۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) + کلولانیک اسید (۱۰ میکروگرم) (MAST (England, Merseyside)) محیط مولر هیتتون آگار استفاده شد. در صورتی که قطر هاله‌ی عدم رشد کلونی باکتری اطراف دیسک ترکیبی، حداقل ۵ میلی‌متر یا بیشتر از قطر هاله‌ی عدم رشد دیسک منفرد همان آنتی‌بیوتیک بود، به عنوان جدایه مولد ESBL قلمداد گردید (۲۳). از سویه‌ی استاندارد *E. coli* ATCC ۳۵۲۱۸ به منظور کنترل کیفی جدایه‌های مولد ESBL استفاده شد. برای انجام واکنش زنجیره پلیمرز (Polymerase Chain Reaction = PCR) ابتدا DNA جدایه‌ها به روش جوشانیدن (Boiling) استخراج و از یک جفت پرایمر (شرکت سینا کلون، ایران) برای تعیین حضور ژن بتالاکتامازی TEM با توالی زیر استفاده شد (۲۴):

TEMF: 5'- AGTGCTGCCATAACCATGAGTG -3'

TEMR: 5'- CTGACTCCCC GTCGTGTAGATA -3'

واکنش PCR در حجم نهایی $25\ \mu\text{l}$ ($12.5\ \mu\text{l}$ ماستر میکس شرکت سینا کلون، $2\ \mu\text{l}$ از هر پرایمر و $2\ \mu\text{l}$ DNA باکتری و بقیه آب مقطر استریل) در طی ۳۰ سیکل، شامل: مرحله‌ی اولیه باز شدن دو رشته DNA به مدت ۵ دقیقه در

بیماران، در گروه سنی ۲۰ سال و کمتر، ۳۱ (۲۲/۲ درصد) نفر، ۲۱-۴۰ سال، ۵۱ (۳۶/۴ درصد) نفر، ۴۱-۶۰ سال، ۳۴ (۲۴/۳ درصد) نفر و ۶۰ سال و بالاتر، ۲۴ (۱۷/۲ درصد) نفر بودند. از ۱۴۰ بیمار، ۷۴ (۵۳ درصد) نفر سابقه قبلی ابتلا به عفونت ادراری را داشتند، ۳۸ (۲۷/۱ درصد) نفر دارای درد پهلو، ۳۶ (۲۵/۷ درصد) نفر سوزش ادرار و ۳۴ (۲۴/۲ درصد) نفر دارای تکرر ادرار بودند. همچنین در این مطالعه ۲۴ (۱۷ درصد) نفر در طی یک ماه قبل از انجام آزمایش سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک داشتند و ۴۴ (۳۱/۵ درصد) نفر نیز برای کنترل به آزمایشگاه مراجعه کرده بودند و بدون علامت بالینی بودند. در آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها، بیشترین مقاومت به آمپی‌سیلین با ۸۱/۴ درصد و کمترین مقاومت به ایمی‌پنم با صفر درصد بود (نمودار ۱).

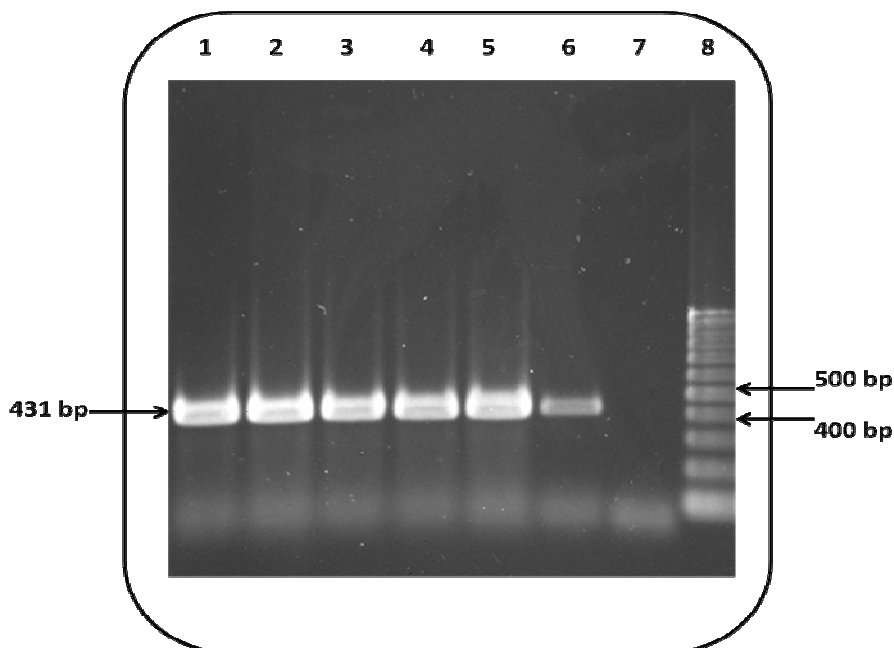


نمودار ۱: مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های اشرشیاکلی

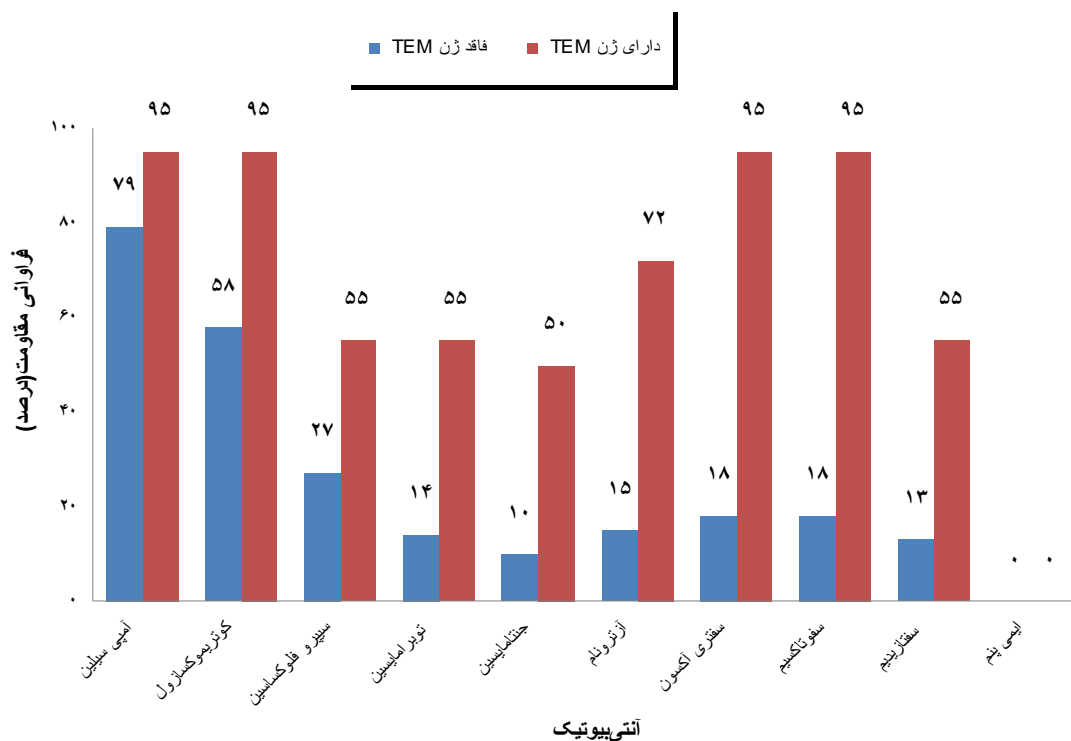
دمای 94°C ، مرحله باز شدن دو رشته به مدت ۶۰ ثانیه در 94°C ، مرحله اتصال پرایمرها به مدت ۶۰ ثانیه در دمای 61°C ، مرحله طولیل شدن رشته هدف به مدت ۶۰ ثانیه در دمای 72°C و مرحله‌ی طولیل شدن نهایی به مدت ۳ دقیقه در دمای 72°C انجام شد. محصول PCR (۴۳۱ bp) بعد از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد، مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس محصول PCR تعیین توالی (Applied Biosystem ABI ۳۱۳۰, USA) شد و نتیجه‌ی آن با استفاده از نرم افزار BLAST آنالیز گردید. در پایان داده‌های جمع‌آوری شده به وسیله شاخص‌های آماری تحلیل شد.

یافته‌ها

بیماران، ۱۲۵ (۸۹/۳ درصد) نفر زن و ۱۵ (۱۰/۷ درصد) نفر مرد با میانگین سنی ۳۶/۹ سال بودند. از نظر توزیع سنی



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR برای ژن TEM. ردیف ۱ تا ۵: نمونه‌های PCR مثبت ژن TEM و ردیف ۶: کنترل مثبت ژن TEM، ردیف ۷: کنترل منفی و ردیف ۸: مارکر (100 bp DNA ladder).



نمودار ۲: مقایسه‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های اشرشیاکلی مولد ESBL و فاقد ESBL

منفی روده‌ای منتقل می‌شوند (۲۷). در این مطالعه درصد بالایی از جدایه‌های مولد ESBL، حامل TEM بودند. مطالعات مختلفی در ایران و سایر نقاط جهان بر روی جدایه‌های *E. coli* ادراری بیماران سرپایی و بستری انجام شده و نتایج مختلف گزارش شده است. به‌طوری‌که در پژوهش شاهچراغی (تهران، ۱۳۸۶) ۲۴ درصد از کل جدایه‌ها در بیماران بستری حاوی ژن TEM بودند (۲۸). همچنین در مطالعه‌ی پرنور (تبریز، ۱۳۸۹) شیوع ۸۷ درصدی ژن TEM در کل جدایه‌های بیماران بستری گزارش شد (۱۶). در مطالعه‌ی میر صالحیان (تهران، ۱۳۸۵) بتالاکتاماز TEM با شیوع ۵۵/۵ درصد در جدایه‌های مولد BESL بیماران بستری و سرپایی برآورد شد (۲۹). در مطالعه‌ی سلطان دلال و همکاران (تهران، ۱۳۸۹) که بر روی ۲۰۰ جدایه اشرشیاکلی انجام شد، در جدایه‌های مولد ESBL بیماران بستری سرپایی ژن TEM ۵۷/۸ درصد گزارش شد (۳۰). مزیانی (تهران، ۱۳۸۶)، از میان ۷۶ جدایه بالینی اشرشیاکلی ۴۷ جدایه (۶۰ درصد) حاوی ژن TEM بودند (۳۱). مسجیدیان نشان داد که از میان ۱۴۸ سویه *E. coli*، ۸۶/۴ درصد از جدایه‌های مولد ESBL ژن TEM را دربر داشتند (۳۲). در مطالعه‌ی انجام شده توسط Burcu Bali نشان داده شد در میان جدایه‌های مولد ESBL، ۷۲ درصد دارای ژن TEM بودند (۳۳). در مطالعه‌ی که در سال ۲۰۰۸ در مالزی توسط زامبری و همکاران انجام گرفت، ۷۵ درصد کل نمونه‌های اشرشیاکلی دارای ژن TEM بودند (۳۴). همچنین در مطالعه‌ی دیگر که در کره جنوبی (۲۰۰۵) انجام گرفت، ۷۸ درصد نمونه‌های اشرشیا کلی دارای ژن TEM بودند (۳۵). تحقیقی در اسپانیا بین سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۳ به بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *E. coli* ناشی از عفونت ادراری پرداخت که در سویه‌های مولد ESBL فراوانی ژن TEM، ۶۰ درصد بود (۳۶). در یک مطالعه در ۹ کشور اروپایی بین سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۶ انجام شد، در میان جدایه‌های *E. coli* مولد ESBL،

از ۱۴۰ جدایه، ۳۴ (۲۴/۳ درصد) جدایه‌ی تولید کننده‌ی ESBL بودند که از این تعداد ۱۲ (۳۵/۳ درصد) مورد سابقه‌ی مصرف آنتی‌بیوتیک داشتند. در آزمایش PCR، ۱۸ (۵۳ درصد) جدایه‌ی مولد ESBL که ۱۲/۸ درصد کل جدایه‌های اشرشیاکلی را شامل می‌شد، حاوی ژن TEM بودند که از این تعداد ۵ (۲۷/۷ درصد) سابقه‌ی مصرف آنتی‌بیوتیک داشتند (شکل ۱). توزیع TEM از نظر جنسیت بیماران، ۱۵ (۸۳ درصد) نفر در بیماران مونث و ۳ (۱۷ درصد) نفر در بیماران مذکر یافت شد. در نهایت محصول PCR ژن TEM تعیین توالی شد و توالی حاصل در نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گرفت که دارای هومولوژی کامل با توالی ژن مورد نظر بود و نتایج PCR را تایید کرد. همچنین در نمودار (۲) مقایسه‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین جدایه‌های مولد ESBL و فاقد ESBL انجام شده که در این نمودار بیشترین تفاوت بین سویه‌های مقاوم به سفالوسپورین مشاهده شد.

بحث

تولید آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز در اشرشیاکلی یکی از عوامل اصلی ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز از جمله سفالوسپورین‌های طیف گسترده است. ارگانسیم‌هایی که ژن‌های کد کننده این آنتی‌بیوتیک‌ها را با خود حمل می‌کنند، باعث افزایش بیماری‌زایی و مرگ و میر در بین افراد می‌شوند، لذا روند رو به رشد در ایجاد مقاومت‌هایی از این دسته، بیماران را با خطر جدی روبرو خواهد کرد. بنابراین تشخیص درست آزمایشگاهی برای جلوگیری از شکست درمان ناشی از انتخاب نامناسب آنتی‌بیوتیک بسیار مهم است (۲۶ و ۲۵). این دسته از ژن‌ها اغلب توسط پلاسمید منتقل می‌شوند و این پلاسمیدها علاوه بر ژن‌های ESBL، ژن‌های مقاومت به سایر کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی را نیز با خود حمل می‌کنند و به سهولت بین سویه‌ها و نیز گونه‌های مختلف از باسیل‌های گرم

سفوتاکسیم (۹۵ درصد) و سفتریاکسون (۹۷ درصد) بسیار بالاتر بود. این موضوع تاثیر بالینی این داروهای رایج را در درمان عفونت ادراری به خطر می اندازد. همچنین جدایه های مولد ESBL دارای ژن های مقاومت به سایر گروه های آنتی بیوتیکی از جمله آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون ها نیز هستند و موجب افزایش مقاومت به این گروه های آنتی بیوتیکی نیز می شوند که با نتایج اکثر مطالعات گذشته تطابق دارد (۱۶).

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف بخصوص به بتالاکتامها در اشرشیاکلی کسب شده از اجتماع یک مشکل درمانی مهم است و داشتن ژن TEM در این نوع جدایه ها تهدیدی بزرگ برای مصرف سفالوسپورین طیف گسترده به شمار می رود. بنابراین برای درمان عفونت های که مشکوک به ارگانیزم های تولید کننده ESBL هستند، باید آنتی بیوتیک مناسب بر اساس نتایج آزمایش آنتی بیوگرام انتخاب شود. همچنین در این مطالعه ژن TEM در بیش از نیمی از سویه های مولد ESBL شناسایی گردید، این یافته ها از یک طرف ضرورت تصمیم گیری درست در مورد تجویز منطقی داروها و از طرف دیگر اهمیت استفاده از روش های تشخیصی جدید و روش های مولکولی برای شناسایی جدایه های تولید کننده ESBL در آزمایشگاه های میکروب شناسی را نشان می دهد.

فراوانی ژن TEM، ۱۰ درصد بود (۳۷). هر چند بیشتر مطالعات فوق روی ایزوله های بیمارستانی انجام شده و نه روی ایزوله های بیماران سرپایی، با این وجود با نتایج مطالعه ما همخوانی دارند. اما تفاوت هایی هم دیده شد که به نظر می رسد به دلیل اختلاف در شیوع ژن های مولد مقاومت بتالاکتاماز در مناطق مختلف و نیز منشا متفاوت جدایه به خصوص جدایه های بیمارستانی باشد. مطالعات نشان می دهند که بیان فنوتیپ ESBLs و تولید بتالاکتامازهای طیف گسترده پلاسמידی، به وسیله ژن های متعددی از جمله TEM, SHV, CTX-M کد می شوند (۳۸)، لذا اختلاف در شیوع ژن TEM را باید در حضور سایر ژن های مولد مقاومت بتالاکتامازی جستجو کرد که در مناطق مختلف از فراوانی متفاوتی برخوردارند. همچنین این تنوع ژن های مقاومت علاوه بر E.coli در تمام باکتری های خانواده انتروباکتریاسه نیز صدق می کند و باعث تفاوت نتایج در سطح جدایه های مقاوم این باکتری ها می گردد (۳۹). مطالعات انجام شده نشان دهنده شیوع بالای ژن های بتالاکتامازی به خصوص تیپ TEM در سویه های اشرشیا کلی می باشد، بنابراین لازم است که برای شناسایی این نوع مقاومت ها از روش های مولکولی در کنار روش های فنوتیپی استفاده شود. مقایسه ی نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های مولد ESBL با جدایه های بدون ESBL نشان دهنده ی این واقعیت بود که مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام به خصوص سفالوسپارین های نسل سوم در جدایه های مولد ESBL در مقایسه با جدایه های فاقد ESBL به ویژه

References

1- Barratt M, Avner ED, Harmon WE. Pediatric nephrology. 4th ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2000, 158-167.
2- Sobel J, Kaye D. Urinary treat infections. In:

Mandell G, Bennet J, Dolin R. principles & practice of infectious diseases. 5th ed. Churchill-Livingstone. 2000; 777-800.
3- Murray PR, Drew WL, Kobayashi GS, Thompson JH: Medical Microbiology.

- International Student Edition. Pub. USA: Wolfe Publishing. 2010; 103-107.
- 4- Emamghoreishi F, Kohanteb J. Antibiotic resistance pattern of *E-coli* isolated from urinary tract infection. *J Jahrom Univ Med Sci.* 2007; 4: 1-9.
- 5- Haller M, Brandis M, Berner R. Antibiotics resistance of urinary tract pathogens and rational for empirical intravenous therapy. *Pediatr Nephrol.* 2004; 19: 982-6.
- 6- Kern MB, Klemmensen T, Fridmodt Moller N, Skirrow MB. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphanamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 50: 513-516.
- 7- Keith SK. Multidrug Resistant Bacteria: Mechanisms of resistance, epidemiology and prevention. Infection Control Education Institute. Virgo Publishing; 2005.
- 8- Hopley L, Schalkwyk JV. Mechanisms of resistance to antimicrobials. Available, from: URL: <http://anaesthetist.com/icu/infect/Findex.htm>.
- 9- Rodriguez-Bano J, Alcalá JC, Cisneros JM, et al. Community infections caused by extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med.* 2008; 168: 1897-1902.
- 10- Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* in non hospitalized patients. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 1089-94.
- 11- Washington C, Stephen A, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. USA: Lippincott williams & wilkins; 2006, 775-79.
- 12- Bradford PA. Extended-spectrum Beta lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 933-951.
- 13- Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum β -lactamases in urinary isolates of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae*- prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol.* 2004; 22: 172-4.
- 14- Duttaroy B, Mehta S. Extended spectrum beta lactamases (ESBL) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Indian J Pathol Microbiol.* 2005; 48: 45-8.
- 15- Sharifi Yazdi MK, Azarsa M, Shirazi MH, et al. The frequency of extended spectrum beta lactamase and CTX M-I of *Escherichia coli* isolated from the urine tract infection of patients by phenotypic and pcr methods in the city of khoy in iran. *J Zanjan Univ Med Sci.* 2011; 19: 53-61.
- 16- Pornour M, Nahaei M, Mobayen H, Mobasher A. Molecular study of TEM type extended spectrum beta lactamase genes in *Escherichia coli* and *Klebseilla pneumoniae* isolates. *J Tabriz Univ Med Sci.* 2010; 32: 2.
- 17- Medeiros AA. Beta lactamases. *Br Med Bull.* 1984; 40: 18-27.
- 18- Mlynarczyk G, Mlynarczyk A, Bilewska A,

- et al. High effectiveness of the method with cefpirome in detection of extended-spectrum beta-lactamases in different species of gram-negative bacilli. *Med Dosw Mikrobiol.* 2006; 58: 59-65.
- 19- Zamanzad B, Daiham B, Nafisi MR, Karimi A, Farrokhi E. The frequency of TEM-1 gene in extended spectrum beta lactamases producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* strains isolated from hospital clinical samples using PCR. *Sci J Hamdan Univ Med Sci.* 2008; 14: 19-25.
- 20- Perilli M, Dellamico E, Segatore B, Rosaria M. Molecular characterization of ESBLs production by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from Italian Nationwide Survey. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 611- 614.
- 21- Haghi F, Zeighami H, Keramati N, Hemmati F, Hajiahmadi F. Frequency of TEM extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* in clinical specimens by phenotypic and molecular methods in Zanjan. *J Zanjan Univ Med Sci.* 2013; 21: 55-63.
- 22- Fauci S, Braunwald E, Kasper DL, et al. Harrison's principles of internal medicine. 17th ed. USA: McGraw-Hill; 2008.
- 23- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21th informational supplement. wayne, PA. 2011.
- 24- Kim J, Jeon S, Rhie H, Lee B, Park M, Lee H. Rapid detection of extended spectrum β -lactamase (ESBL) for enterobacteriaceae by use of a multiplex PCR-based method. *Infection and Chemotherapy.* 2009; 41: 181.
- 25- Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, A class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 2598-603.
- 26- Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, et al. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta- lactamase type. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 54-61.
- 27- Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control.* 2006; 119: 20.
- 28- Shahcheraghi F, Nasiri S, Naviri H. Evaluation of presence the blaSHV and blaTEM β -Lactamase genes in clinical isolates resistant *Escherichia coli* to antibiotics from Tehran hospital. *Iran J Med Microbiol.* 1386; 1: 1-8.
- 29- Mirsalehian A, Jabalameli F, Mirafshar SM, Bazarjani F, Gorjipor A, Goli HR. Determination of antimicrobial resistance patterns and extended spectrum β -lactamases in clinical isolates of *E. coli*. *Tehran Uni Med J.* 2008; 66: 373-378.
- 30- SoltanDallal MM, MollaAghamirzaei H, Fallah Mehrabadi J. Molecular detection of TEM and AmpC (Dha, mox) broad spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli*: PCR method. *Tehran Uni Med J.* 2010; 68: 872-7.
- 31- Hosseini-mazinani SM, Eftekhar F, Milani M. Characterization of β -lactamase from urinary isolated of *Escherichia coli* in Tehran. *Iran Biomed J.* 2007; 11: 95-99.
- 32- Masjedian GF, Valehi F, Talebi A, Rastegar

- LA. Molecular evaluation of resistance to expanded antibiotics in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Med Microbiol*. 2006; 1: 27-34.
- 33- Burcu B, Acik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended spectrum β -lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. *Afr J Microbiol Res*. 2010; 4: 650-654.
- 34- Zamberi S, Rusmah Y, Rusmah M. Extended spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* from a tertiary hospital in Malaysia: emergence of CTX-M-type beta-lactamases variation. *Research of Microbiology*. 2008; 125: 1-5.
- 35- Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, et al. 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. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56: 698-702.
- 36- Calbo E, Roman V, Xercavins M, et al. Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harboring extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57: 780-783.
- 37- Schito GC, Naber K, Botto H, et al. The ARESC study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 34: 407-13.
- 38- Ma L, Chang FY, Fung CP, et al. Variety of TEM, SHV and CTX types beta lactamase present in recent clinical isolated *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* from Taiwan. *Microb Drug Resist*. 2005; 11: 31-39.
- 39- Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W. Concurrent outbreaks of ESBL producing organism of the family enterobacteriaceae in a Warsaw Hospital. *J Antimicrobiol Chemother*. 1999; 44: 489-99.

Prevalence of blaTEM Gene in *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections of Outpatients in Kermanshah

Akya A¹, Khodadoost M², Rashiditabar E³

¹Nosocomial Infection Research Center, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

²Science and Research Branch, Islamic Azad university, Arak, Iran

³Faculty of Paramedical Sciences, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Corresponding Author: Akya A, Nosocomial Infection Research Center, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

Email: akya359@yahoo.com

Received: 17 Mar 2013 **Accepted:** 12 Aug 2013

Background and Objective: Urinary Tract Infection (UTI) is one of the most prevalent bacterial infections and *Escherichia coli* is the most common causative agent of UTI. However, the incidence of community acquired UTI caused by extended spectrum beta-lactamase producing *E. coli* is increasing worldwide. The aim of this study was to assess the frequency of blaTEM gene in *E. coli* isolated from UTI of outpatients in Kermanshah.

Materials and Methods: One hundred and forty *E. coli* strains were isolated from the midstream urinary samples of outpatients. The susceptibility of isolates to selected antibiotics was tested using disc diffusion method followed by confirmation for the ESBL producing strains using combined disc method. Finally, the blaTEM gene was determined among the ESBL producer isolates using PCR.

Results: Of 140 isolates, 34 (24.28%) were positive ESBL and PCR determined that 18(53%) of ESBL producing isolates contained blaTEM gene. When testing their susceptibility to antibiotics, 81.43% of the isolates were resistant to ampicillin while all isolates were sensitive to imipenem.

Conclusion: The production of ESBL by pathogenic bacteria, in particular in outpatients, is a serious concern for the use of various beta-lactam antibiotics including the third generation of cephalosporins. Due to the presence of blaTEM gene in the high proportion of the isolates, more molecular and epidemiological studies on pathogenic gram-negative bacteria are recommended.

Keywords: Urinary tract infection, *Escherichia coli*, blaTEM