Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.39; No.1; 2015

Distribution of blaCTX-M, blaTEM genes among ESBL producing Proteus species isolated from urinary tract infections (UTI) in Ilam

Khadijeh Fattahi[1], Arman Rostamzad[2],*

1. Department of Biology, Faculty of Science, Ilam University, Ilam, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ilam University, Ilam, Iran

(Received: 2015/4/6 Accept:2015/10/12)

Abstract

Background: *The ESBL enzymes producing, is the most important resistance factor against ß-lactam antibiotics among gram-negative bacteria family. The aim of this study was the evaluation of antimicrobial susceptibility pattern of proteus species isolated from UTI in Ilam, and detection of blaCTX-M and blaTEM genes in these species.*

Materials and Methods: *Out of 200 urine samples, those were culture positive, were collected from medical centers in Ilam city. All samples were determined using routine biochemical and microbiological diagnosis tests. Proteus isolates were selected for determining of antibiogram profiles, MIC and also persistent (frequency) of blaCTX-M and blaTEM genes by PCR method.*

Results: *Total of 200 urine samples, 120 samples (60%) were collected from women and 80 samples (40%) were collected from men. Among samples tested 25 samples (12.5%) were found to be proteus species. The highest rate of contamination was related to age ranges of 21-30 years old (40%). proteus species was subjected for determining of MIC and antibiogram profile and then using phonotyping method 12 isolates (48%) were found to be ESBL producing, those 12 species (48%) were resistant to Ceftazidime, 10 species (40%) were resistant to Cefotaxime and 8 species (32%) were resistant to Ciprofloxacin. Using double disc synergy test (DDST), totally 10 species (40%) were found as ESBL, and molecular detection of species using PCR showed that 10 species (40%) have had blaTEM gene and 8 species (32%) were containing of blaCTX-M gene.*

Conclusion: *In regard to high percentage of resistance to 3rd generation of cephalosporins, performance of exact antibiogram test, to detect ESBL producing species in infection caused by these organisms before antibiotic therapy is necessary.*

Keywords: *Proteus, Urinary tract infections, Antibiotic resistance, ESBL.*

• *Corrosponding author: Arman Rostamzad*
Department of Biology, Faculty of Science, Ilam University, Ilam, Iran

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور۳۹، شماره۱، ۱۳۹٤، صفحات ٤١ تا ٤٧

بررسی میزان توزیع ژن های blaCTX-M و blaTEM در سویه های پروتئوس مولد ESBL جدا شده از عفونت های مجاری ادراری در ایلام

خدیجه فتاحی[۱]،آرمان رستم‌زاد*[۲]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
۲- استادیار، دکترای میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه ایلام،ایلام،ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱/۱۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۷/۲۰

چکیده

مقدمه: تولید آنزیم¬هاي بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، مهم‌ترین عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک¬هاي بتالاکتام در میان باکتري‌هاي گرم منفی است.هدف از این تحقیق، تعیین الگوي حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های پروتئوس جدا شده از عفونت‌های مجاری ادراری در ایلام و بررسی وجود ژن‌هاي *blaTEM* ,*blaCTX-M* در آن‌ها بود.

روش بررسی: در این پژوهش تعداد ۲۰۰ نمونه ادرار از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری که کشت آنها مثبت بود از مراکز درمانی ایلام جمع‌آوری وبه وسیله آزمایش‌های روتین بیوشیمیایی و میکروبیولوژی شناسایی شدند. سپس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و میزان *CIM* سویه‌های پروتئوس جدا شده تعیین و از نظر وجود (فراوانی) ژن‌های *blaCTX-M* و *blaTEM* مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از ۲۰۰ نمونه مورد مطالعه، میزان ۶۰ درصد از خانم¬ها و ۴۰ درصداز آقایان جدا شد. در این بررسی تعداد ۲۵ سویه (۱۲/۵ درصد) آلوده به پروتئوس بودند که بیش¬ترین میزان آلودگی مربوط به محدوده سنی ۲۱ تا ۳۰ سال(۴۰ درصد) بود. از ۲۵ سویه پروتئوس جدا شده ۱۸ سویه(۷۲ درصد) پروتئوس میرابیلیس، ۶ سویه(۲۴ درصد) پروتئوس ولگاریس و یک سویه (۴درصد) پروتئوس رتگری تشخیص داده شد. پس از تعیین *MIC* و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، با روش فنوتیپی ۱۲ سویه(۴۸ درصد) مولد *LBSE* شناخته شدند که ۱۲ سویه(۴۸ درصد) به سفتازیدیم، ۱۰ سویه(۴۰ درصد) به سفوتاکسیم و ۸ سویه(۲۳درصد) به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند، با روش تایید دیسک ترکیبی ۰۱ سویه مولد *ESBL* بودند. نتایج بررسی مولکولی نشان داد که ۱۰ سویه (۴۰ درصد) دارای ژن *blaTEM* و ۸ سویه (۳۲ درصد) حاوی ژن *blaCTX-M* بودند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد میزان مقاومت به سفالوسپورین‌هاي نسل سوم در این سویه‌ها زیاد وجای نگرانی دارد و انجام دقیق آزمایش‌هاي آنتی بیوگرام قبل از تجویز آنتی بیوتیک در عفونت‌هاي ناشی از ارگانیسم‌هاي تولیدکننده *ESBL* یک ضرورت اجتناب ناپذیر است.

واژگان کلیدی: پروتئوس، عفونت مجاری ادراری ، مقاومت آنتی بیوتیکی، *ESBL*،

مقدمه

استراتژیهای مختلفی توسط باکتریها به کار گرفته می‌شود تا ازآثار زیانبار آنتی‌بیوتیکها مصون بمانند. یکی از مهمترین این مکانیسم‌ها که در باکتری-های گرم منفی علیه آنتی بیوتیکهای بتالاکتام به کار گرفته می شود، تولید آنزیمهای بتالاکتامازی است.(۱) استفاده روز افزون از سفالوسپورینهای وسیع‌الطیف، در درمان بیماریهای عفونی باکتریال، به بروز دسته جدیدی از این آنزیمها به نام بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف منجرشده است.(۲) سویه‌های پروتئوس جزو باکتری‌های گرام منفی است که از عوامل عفونت مجاری ادراری به حساب آمده و بخصوص با تولید اوره آز، یکی از عوامل اصلی تشکیل سنگ کلیه در این بیماران به حساب می‌آیند. تاکنون بیش از ۱۴۰ نوع آنزیم بتالاکتاماز شناسایی شده است که انتقال این آنزیمها در بین سویه های مختلف باکتریایی به وسیله ژن‌های مستقر روی کروموزوم، پلاسمید و ترانسپوزون انجام می‌شود.(۲) وجود ارگانیسم‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در یک عفونت بالینی می‌تواند به شکست درمان منجر شود.(۳) آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با اتصال به پروتئین متصل شونده به پنی سیلین (PBP)[1] که در غشاء سلول باکتری وجود دارد، باعث مهار ترانس پپتیدازها و تخریب پپتیدوگلیکان و در نتیجه تخریب دیواره سلولی و مرگ باکتری می‌شوند. این آنزیمها آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را قبل از اینکه به PBPs در غشاء سیتوپلاسمی برسند هیدرولیز و غیرفعال می‌کنند. بتالاکتامازها براساس ساختار اولیه به چهار کلاس مولکولی A تا D تقسیم می‌شوند.(۳) کلاس‌های A و C و D بتالاکتامازهای سرینی وکلاس B شامل تیپ‌های حاوی روی (Zn) هستند.(۴) کلاس A

نویسنده مسئول: آرمان رستم‌زاد، ایلام، دانشگاه ایلام، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
تلفن: ۰۸۴۳۲۲۲۷۰۲۲
email:arostamzad381@yahoo.com

1- Penicilin Binding Protein.

شامل پنی سیلینازهای کروموزومی در باکتری‌های گرام منفی است که بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL)[2] را نیز در بر می‌گیرد.کلاس B شامل متالوبتالاکتامازهااست که بتالاکتامازهای حاوی روی هستند و در پسودوموناس آئروژینوزا و باکتروئیدز فراژیلیس یافت می‌شوند. کلاس C تیپ AmpC را در بر می‌گیرد که سفالوسپورین‌ها را هیدرولیز کرده و به مهارکننده‌های بتالاکتامی مقاومند.(۵) کلاس D شامل اگزاسیلینازها (OXA) هستند که منشاء پلاسمیدی دارند و با کلاولانیک اسید مهار نمی‌شوند.(۵) مطالعه‌های جدید بتالاکتامازها را به چهار گروه تقسیم می کند: ۱- بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف ۲- مشتقات بتالاکتامازهای کلاس A مقاوم به مهارکننده‌ها ۳- بتالاکتامازهای AMPC مرتبط با پلاسمید ۴- بتالاکتامازهای هیدرولیزکننده کاربانپم‌ها.(۵) بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) دسته‌ای از آنزیم‌های بتالاکتاماز هستند که اهمیت ویژه‌ای در درمان ضد میکروبی داشته و قادر به هیدرولیز کامل حلقه اکسی ایمینو بتالاکتام‌ها که در ساختمان نسل سوم سفالوسپورین‌ها وجود دارد ،هستند. این آنزیم‌ها بیشتر از نوع SHV و TEM بوده که در نتیجه جهش‌های نقطه‌ای، در آنزیم‌های اصلی فاقد فعالیت وسیع‌الطیفی ایجاد شده‌اند(۵). خانواده CTX-M جزئی از ESBL هاست که اغلب در اشریشیا کلی و کلبسیلا گزارش شده است، اما در سایر اعضای خانواده انتروباکتریاسه نیز دیده شده‌اند. آنزیم‌های CTX-M سفالوتین وسفالوریدین بهتر از بنزیل پنی سیلین هیدرولیز می نمایند. اعتقاد بر این است که حضور یک اسید آمینه سرین در موقعیت ۲۳۷ در تمامی آنزیم‌های CTX-M، نقش اساسی را در طیف گسترده بتالاکتامازی این آنزیم‌ها بر عهده دارد. (۵) آنزیم بتالاکتاماز TEM یکی از مهم‌ترین بتالاکتامازهای پلاسمیدی در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه و از علل مهم بروز مقاومت‌های چند دارویی در عفونت‌های بیمارستانی است.(۵) حساسیت باکتری‌هایی که دارای این ژن‌ها هستند، نسبت به سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم و یا آزترونام[3] کاهش می‌یابد. بعد از انجام آزمایش‌های تاییدی فنوتایپی که با نمایش اثر سینرژیستی مابین یک سفالوسپورین اندیکاتور و یک مهارکننده بتالاکتاماز (به طور معمول کلاولانیک اسید) مشخص می‌شود، با هدف غربالگری از روش MIC نیز می‌توان استفاده کرد که مقاومت نسبت به غلظت 2mg/ml < آن، به عنوان معیار تولید ESBL بر اساس توصیه NCCLS[4] ارائه شده است. در این بررسی حضور برخی از ژن های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، از جمله blaCTX-M-IV,blaTEM در سویه‌های پروتئوس جدا شده از عفونت مجاری ادراری در نمونه‌های بالینی شهر ایلام به روش فنوتیپی و PCR ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه توصیفی که در سال ۱۳۹۳ و طی یک دوره یک ساله انجام شد، تعداد ۲۰۰ نمونه از بیماران مبتلا به عفونت ادراری که کشت اولیه آن‌ها مثبت بود، از مراکز مختلف درمانی شهر ایلام جمع‌آوری و در حداقل زمان ممکن برای بررسی به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه ایلام منتقل شده و آزمایش شدند. برای جداسازی و تشخیص باکتری‌ها، هر نمونه ادراری روی دو محیط کشت مک کانکی‌گار و بلاداگار کشت داده شد. بعد از گرمخانه گذاری، در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، محیط مک کانکی‌آگار از نظر باکتریهای گرم منفی و بلاداگار از نظر باکتریهای گرم مثبت بررسی شدند. در ادامه پس از رنگ‌آمیزی گرام، کوکسی‌های گرام مثبت برای تشخیص تحت رنگ‌آمیزی گرام و آزمایش‌های اکسیداز، کاتالاز، تخمیر مانیتول و تحمل نمک با کشت روی محیط مانیتول سالت‌آگار، تست کواگولاز و DNase قرار گرفتند و کلنی باکتری‌های گرام منفی تحت آزمایش‌های کشت در محیط TSI، سیمون سیترات‌آگار، IMViC ، تولید H2S، اوره تلقیح شدند. پرگنه‌هایی که دارای واکنش متیل رد، گلوکز، اوره، H_2S و ژلاتین مثبت بودند و واکنش لاکتوز، VP و اکسیداز منفی بودند به عنوان سویه‌های پروتئوس انتخاب شدند. (۶ و ۵)

انجام تست حساسیت ضد میکروبی:

از روش انتشار دیسک و با استفاده از الگوی Kirby Bauer استفاده شد، به این ترتیب که پس از تهیه استاندارد ۰/۵مک فارلند (Mac farland) از سویه‌های باکتریایی روی محیط مولر هینتون‌آگار کشت گسترده داده شدند، تا سطح محیط به طور کامل از باکتری پوشانده شود، سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک را با پنس استریل برداشته و با رعایت شرایط استریل، دیسکها را به فواصل ۲/۴سانتی‌متر از یکدیگر و ۱/۵سانتی‌متر از لبه پلیت قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده عبارت بودند از: آمپی سیلین(۱۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم)، تمامی دیسک‌ها ازشرکت Hi media India خریداری شدند. پس از پایان دوره انکوباسیون با اندازه‌گیری قطر هالههای عدم رشد ایجاد شده و مقایسه با جدول CLSI مقاوم یا حساس بودن میکروارگانیسم مشخص شد.(۶)

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشدبه روش)ADM متد رقت در آگار):

از سویه‌های باکتریایی، استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه وسپس محلول آنتی بیوتیک با رقت‌های مختلف تهیه شد و برای رقت‌سازی ابتدا 10^{-2} × ۰/۱۲۸گرم را در ۱۰میلی لیتر آب مقطر حل کرده و یک میلی‌لیتر از این رقت به عنوان محلول ذخیره یک در نظر گرفته شد و به ترتیب رقت‌های۰/۰۳تا۳۲-۶۴-۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد، در ادامه یک میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه شده را به ۱۰۰میلی‌لیتر محیط مولر هینتون آگار، زمانی که دمای آن پس از استریل کردن به ۴۵ درجه سانتی‌گراد رسید، اضافه و به داخل پلیت‌ها منتقل شدند. بعد از ساخت محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک با رقت مشخص، ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک تلقیح و بعد از ۲۴ ساعت نتایج قرائت شد. به این صورت که از بیشترین غلظت به کم‌ترین غلظت هر جا که باکتری رشد کرده بود یک غلظت ماقبل به عنوان MIC گزارش شد و میزان حساسیت و مقاومت پروتئوس بر اساس توصیه‌های CLSI بررسی شد.(۷)

تعیین فنوتیپی سویه‌های مولد ESBL:

پس از تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند از باکتری‌های جدا شده و کشت آن‌ها روی محیط کشت مولر- هینتون آگار،حساسیت این سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نسل سوم سفالوسپورین‌ها شامل سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم) به روش انتشار دیسک و بر اساس توصیه CLSI بررسی شد. اگر قطر هاله عدم رشد ۲۲ ≥ میلی‌متر برای سفتازیدیم و ۲۷ ≥ میلی‌متر برای سفوتاکسیم و ۲۵≥ میلی متر برای سفتریاکسون بود این سویه‌ها به عنوان سویه‌های تولیدکننده ESBL انتخاب شدند. به عبارت دیگر فقط سویه‌هایی که مقاوم به یکی از این سه آنتی‌بیوتیک بودند به عنوان سویه‌های تولیدکننده ESBL انتخاب شدند (۸).

تائید فنوتیپی سویه‌های مولد ESBL به روش دیسک ترکیبی:

پس از تهیه ۰/۵ مک فارلند، از سویه‌هایی که دارای مقاومت به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون بودند، و کشت آن‌ها روی محیط مولر هینتون آگار، اثر هم افزایی دیسک‌های سفتازیدیم۳۰ میکروگرم به تنهایی و در ترکیب با کلاو لانیک اسید [سفتازیدیم/ کلاولانیک اسید (۳۰ میکروگرم/۱۰ میکروگرم)] و

2- Extended Spectrum beta Lactamase
3- Aztreonam
4- .National Committee for Clinical laboratory standard

سفوتاکسیم- کلاولانیک اسید(۳۰ میکروگرم/۱۰ میکروگرم)، به فاصله ۲۰ میلی‌متر ازمرکز به مرکز دیسک‌ها ارزیابی شد و پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، سویه‌هایی که در آن‌ها افزایش قطر هاله عدم رشد در دیسک ترکیبی بیش از پنج میلی‌متر، در مقایسه با دیسک سفتازیدیم به تنهایی بود، به عنوان سویه‌های تولیدکننده ESBL در نظر گرفته شدواین سویه‌ها برای بررسی مولکولی انتخاب شدند.

استخراج DNA :

استخراج DNA تمامی سویه‌ها با استفاده از کیت یکتا تجهیز آزما (Lot:BDC20114113 ,Cat:YT9001) بر اساس دستوالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد.

طراحی پرایمر و انجام PCR:

برای بررسی وجود ژن‌های bla TEM و bla CTX-M در سویه‌های باکتریایی پرایمرهای زیر طراحی و از سوی شرکت ژن فراوران ساخته شد که سکانس پرایمرهای مورد استفاده برای وجود باندهای اختصاصی با اندازه‌های۸۳۲bp و ۵۵۴bp به صورت زیر بود (۸):

جدول۱ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR

Gene primer	Gene sequence	Length of product
blaTEM forward	5’→ATGAGTATTCAACTTTCCG→3’	832bp
blaTEM reverse	5’→CCAATGCTTAATCAGTGAGC→3’	
blaCTX-M forward	5’→GGTTAAAAATCACTGCGTC→3’	554bp
blaCTX-M reverse	5’→TTGGTGACGATTTTAGCCGC→3’	

شرایط PCR برای بررسی وجود ژن‌های bla_{TEM} و bla_{CTX-M} به صورت زیر بود:برای انجام PCR مخلوط نهایی واکنش با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۱ میلی‌مول از هر آغازگر ، ۲/۵ میکرولیتربافر PCR 1X، میزان ۱/۵ میلی‌مول MgCl2، ۰/۲ میلی‌مول dNTPs، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (Cinna Gen) بود که حجم نهایی با آب دیونیزه استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه دستگاه ترموسایکلر(Master cycler,Ependrof Germany) نیز به این صورت تنظیم شد که: واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای پنج دقیقه و بعد از آن ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی در ۹۵ درجه سانتی گرادبرای دو دقیقه، اتصال در۵۵ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه. در این بررسی از سویه E.coli ATCC2955 به عنوان سویه کنترل منفی و از سویه K.PneumoniaATCC700603 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.(۸)

ژل الکتروفورز:

محصولات PCR توسط الکتروفورز، با استفاده از ژل ۱/۵ درصد آگارز[وزن به حجمW/V]حاوی ۰/۵ میکرولیتر در میلی لیتر اتیدیوم بروماید، از یکدیگر جدا شدند و سپس در زیر نور ماوراء بنفش(UV) در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه Transilluminator مشاهده شدند. برای تعیین اندازه محصولات از یک نشانگرمولکولی (DNA ladder) ۱۰۰ جفت بازی (Gene Ruler™,

(Fermentaz استفاده شد.(۹)

تجزیه و تحلیل داده‌ها و نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۱/۵ برنامه ویندوز) و نرم‌افزار Excel ۲۰۰۷ (Microsoft Office) و آزمون آماری χ^2 انجام و P-value < ۰,۰۵ از نظر آماری با اهمیت و معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این بررسی تعداد ۱۲۰ سویه (۶۰درصد) از خانمها وتعداد ۸۰ سویه(۴۰ درصد) از آقایان جدا شد.از تعداد ۲۰۰ نمونه جمع‌آوری شده اشریشیاکلای بیشترین مقدار ۸۵ سویه(۴۲/۵ درصد)، پروتئوس ۲۵ سویه (۱۲/۵درصد) و کم‌ترین تعداد متعلق به جنس پرووِیدنسیا سه سویه (۱/۵ درصد) بود (جدول ۲).

نتایج تشخیص افتراقی سویه‌های پروتئوس:

نتایج آزمایش‌های افتراقی و بیوشیمیایی نشان داد که از ۲۵ سویه پروتئوس جدا شده ۱۸ سویه(۷۲درصد) پروتئوس میرابیلیس (P.mirabilis)، ۶ سویه(۲۴درصد) پروتئوس ولگاریس (P.vulgaris) و یک سویه (4%) پروتئوس رتگری (P.rettgeri) تشخیص داده شد.

جدول ۲-توزیع فراوانی نمونه های عفونت ادراری بر حسب نوع باکتری

نوع باکتری	تعداد	درصد
اشریشیاکلی	۸۵	۴۲/۵
پروتئوس	۲۵	۱۲/۵
پسودوموناس	۲۱	۱۰/۵
استافیلوکوکوس کواگولازمثبت	۱۲	۶
استافیلوکوکوس کواگولازمنفی	۵	۲/۵
کلبسیلا	۲۰	۱۰
سیتروباکتر	۱۸	۹
انتروباکتر	۱۱	۵/۵
پرویدنسیا	۳	۱/۵
جمع کل باکتری‌ها	۲۰۰	۱۰۰

نتایج آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن سویه‌های پروتئوس:

نتایج آنتی‌بیوگرام ۲۵ سویه پروتئوس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری نشان داد که بیشترین میزان مقاومت در این سویه‌ها نسبت به آمپی‌سیلین به میزان ۱۰۰درصد و کم‌ترین میزان مقاومت نسبت به آمیکاسین به میزان ۱۶درصد وجود داشت (جدول ۳).

جدول۲: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های پروتئوس جدا شده از عفونت مجاری ادراری در بیماران ایلام بر حسب درصد

آنتی بیوتیک	AMP	AMX	CAZ	CTX	TE	CIP	AK	GN	TOB	TS
سویه‌های پروتئوس	۱۰۰	۸۰	۴۸	۴۰	۸۰	۳۲	۱۶	۵۲	۴۸	۵۶

AMP= Ampicillin, AMX= Amoxicillin, CAZ= Ceftazidime, CTX= Cephotaxime, TE= Tetracycline, CIP= Ciprofloxacin ,

AK= Amikacin, GN= Gentamycin, TOB= Tobramycin, TS= Co-trimoxazole.

نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد MIC سویه‌های پروتئوس:

نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه برای سویه‌های پروتئوس در جدول ۵ آمده است.

جدول ۳: نتایج MIC آنتی بیوتیک‌های مختلف بر روی سویه‌های پروتئوس برحسب µg/ml

MICµg/ml باکتری	Amp	Amx	CAZ	CTX	TE	CIP	AK	GN	TOB	TS
پروتئوس	>64	>64	>32	32	>64	32	64	>32	64	>32

AMP= Ampicillin, AMX= Amoxicillin, CAZ= Ceftazidime, CTX= Cephotaxime, TE= Tetracycline, CIP= Ciprofloxacin , AK= Amikacin, GN= Gentamycin, TOB= Tobramycin, TS= Co-trimoxazole.

نتایج تایید فنوتیپی سویه‌های پروتئوس:

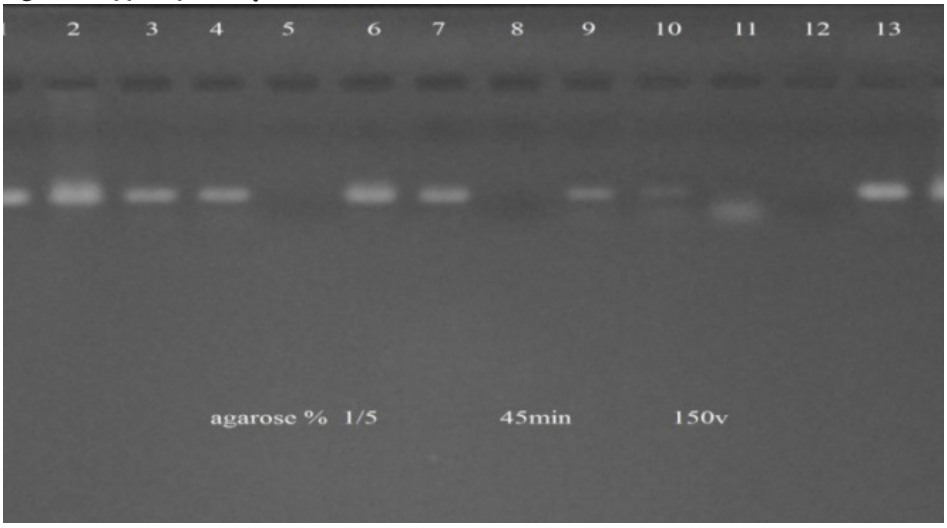
نتایج تایید فنوتیپی سویه‌های پروتئوس نشان داد که تعداد ۱۲ سویه (۴۸ درصد) تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) بودند که تعداد ۱۲ سویه (۴۸درصد) به سفتازیدیم، تعداد ۱۰ سویه (۴۰درصد) به سفوتاکسیم و تعداد ۸ سویه (۳۲درصد) به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند، به این صورت که تعداد ۱۰ سویه هم به سفتازیدیم و هم به سفوتاکسیم مقاومت نشان دادند و ۷ سویه به سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم مقاوم بودند و فقط دو سویه به سفتازیدیم و یک سویه به سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادند.

نتایج دیسک ترکیبی سویه های پروتئوس تولید کننده ESBL:

نتایج هم‌افزایی دیسک ترکیبی نشان داد که تعداد ۱۰ سویه (۴۰درصد) تولیدکننده آنزیم‌های وسیع‌الطیف هستند.

نتایج PCR برای بررسی وجود ژن blaTEM در جدایه‌های پروتئوس:

نتایج انجام واکنش PCR برای بررسی وجود ژن bla_{TEM} در تمامی سویه‌های پروتئوس جدا شده از عفونت‌های مجاری ادراری با تولید باندهای ۸۳۲ جفت بازی بر اساس پرایمر طراحی شده برای این ژن نشان داد که تعداد ۱۰ سویه (۴۰درصد) حاوی این ژن بودند (تصویر۱). همچنین

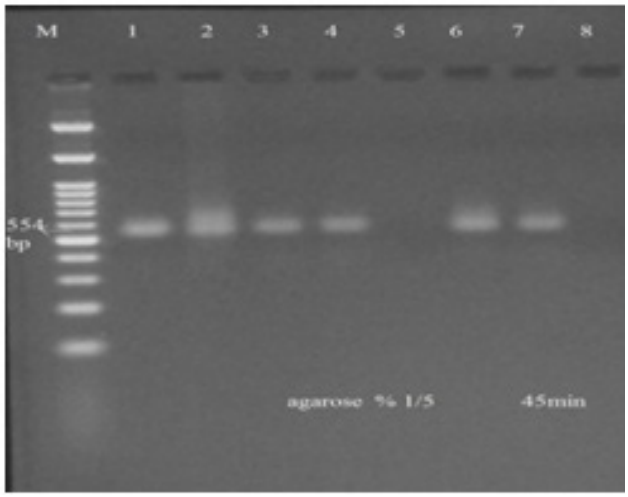


تصویر۱- نتایج PCR ۱۲=کنترل منفی ۱۳=کنترل مثبت M-DNA Ladder

بررسی وجود ژن bla_{CTX-M} در تمامی سویه‌های پروتئوس جدا شده از عفونت‌های مجاری ادراری با تولید باندهای ۵۵۴ جفت بازی با توجه به پرایمر طراحی شده برای این ژن نشان داد که تعداد ۸ سویه (۳۲درصد) حاوی این ژن بودند(تصویر۲).

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که باکتری پروتئوس به میزان ۱۲/۵درصد در میان عوامل ایجاد عفونت‌های مجاری ادراری وجود داشت. در میان این سویه‌ها در مجموع ۴۰درصد آن‌ها تولیدکننده آنزیم‌های ESBL



تصویر۲- نتایج PCR4=کنترل مثبت ۵= کنترل منفی M=DNA Ladder

بودند که تعداد ۴۰درصد آن‌ها تولید کننده bla_{TEM} و تعداد ۳۲درصد آن‌ها تولیدکننده bla_{CTX-M} بودند. در مطالعه‌ای که از سوی O.Philips ,Orhue در سال ۲۰۱۴ در نیجریه روی باکتری‌های جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری به عمل آمد سویه‌های پروتئوس به عنوان عامل ۱۴/۵درصد این عفونت‌ها شناخته شده و دارای الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی شبیه مطالعه حاضر بوده است، با این تفاوت که آنان بررسی مولکولی روی این سویه‌ها انجام ندادند(۱۰). در مطالعه‌ای که از سوی Okesola ,A.O و Adeniji,T.W در سال ۲۰۱۰ در نیجریه روی تعداد ۵۰ ایزوله پروتئوس که از نمونه‌های کلینیکی مختلف شامل: ادرار، سواب زخم، سواب گوش، خلط و سواب واژن به عمل آمد، مشخص شد که اولا بیش‌ترین میزان سویه‌های تولیدکننده ESBL در بین این باکتری‌ها مربوط به سویه‌های جدا شده از ادرار با میزان ۳۹ درصد و کم‌ترین آن‌ها مربوط به سویه‌های

جدا شده از سواب زخم ۵/۷ درصد است. در این بررسی میزان حساسیت تمامی این ایزوله‌ها به آنتی بیوتیک‌های سفوروکسیم، سفتازیدیم و سفتریاکسون به ترتیب ۵۴ درصد ، ۲۲ درصد و ۲۴درصد است که نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه حاضر همخوانی زیادی دارد.(۱۱) در مطالعه‌ای که از سوی طلوع بابایی همتی و همکاران در سال ۱۳۹۲ روی ۳۳ جدایه اشریشیا کلی از نمونه‌های اداری در رشت ایران به عمل آمد، مشخص شد که تمامی این سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک پیپراسیلین حساس بوده ولی ۵۵ درصد آن‌ها به سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم مقاوم بودند و ۸۸ درصد این جدایه‌ها بر اساس روش PCR حاوی ژن bla_{CTX-M} بودند که مقاومت چندگانه دارویی در بین این سویه‌ها به نسبت پایین بود. هر چند که این مطالعه روی جدایه‌های اشریشیا کلی انجام گرفته اما میزان سویه‌های تولیدکننده ESBL در این مطالعه با نتایج حاصل از این پژوهش سیار تفاوت دارد.(۱۲) در مطالعه‌ای که از سوی Chaudhary,N.K و Morthys,S.M در سال ۲۰۱۳ در کشور هندوستان روی باکتری‌های عامل عفونت مجاری ادراری که کشت میکروبی آن‌ها مثبت بود، انجام شد تعداد ۱۰۰ باکتری بررسی و در بین آنها میزان مقاومت سویه‌های پروتئوس به آنتی بیوتیک‌های سفتریاکسون، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین و امیکاسین به ترتیب ۶۰ درصد، ۴۰درصد، ۴۰درصد و ۲۰درصد بود و در نهایت ۴۰ درصد سویه‌های پروتئوس تولیدکننده ESBL بودند که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.(۱۳) در مطالعه‌ای که از سوی Lura,P و همکاران در سال ۲۰۰۲ روی ۲۸۲ سویه پروتئوس میرابیلیس جدا شده از نمونه‌های کلینیکی مختلف انجام گرفت، با استفاده از روش تشخیص فنوتیپی نمونه‌ها ۵۲درصد از این سویه‌ها به عنوان تولیدکننده ESBL تشخیص داده شدند، در حالی که بررسی‌های هم‌افزایی دیسک ترکیبی و روش مولکولی مشخص کرد که میزان ۴۸درصد این سویه‌ها مولد ESBL هستند.(۱۴) در مطالعه‌ای که از سوی علی هاشمی و همکاران در سال ۱۳۹۳ روی ۸۳ نمونه از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از دو بیمارستان طالقانی و مفید (کودکان) تهران انجام شد، مشخص شد که به طور کلی از ۸۳ نمونه مورد بررسی تعداد ۴۸ سویه (۵۷/۸۳ درصد) از این سویه‌ها مولد ESBL بودند و از این ۴۸ سویه ، ۳۰ سویه (۶۲/۵ درصد) حاوی ژن CTX-M بودند که از نتایج حاصل از مطالعه حاضر بیشتر است. براساس اظهارات همین محققان میزان شیوع ژن CTX-M بر حسب شرایط جغرافیایی متفاوت خواهد بود.(۱۵) در مطالعه‌ای که از سوی مجتبی موسویان و بهناز دیهیم در سال ۱۳۹۱ روی ۴۲۰ سویه از انتروباکتریاسه جمع‌آوری شده از بیماران بستری شده در بیمارستان گنجوان دزفول به عمل آمد، ۱۲۸ سویه (۳۰/۵ درصد) از سویه‌ها، مولد ESBL بودند که ۷۳ سویه (۵۷ درصد) دارای ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} بودند که بیشتر از نتایج مطالعه حاضر است.(۱۶) در مطالعه‌ای که از سوی سعید سعیدی و همکاران در سال ۱۳۹۲ روی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از عفونت مجاری ادراری از بیماران بستری شده در بیمارستان امیرالمومنین (ع) زابل انجام شد، مشخص شدکه ۳۰ سویه متعلق به جنس کبلسیلا پنومونیه و ۱۵۰ سویه متعلق به جنس پسودوموناس آئروژینوزا بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان ۶۵درصد از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای ژن‌های TEM و CTX-M بودند، در حالی که ۴۵درصد سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا حاوی ژن TEM و همگی فاقد ژن CTX-M بودند(۱۷). در مطالعه‌ای که از سوی لیلا ناصحی و همکاران در سال ۱۳۸۹ بر روی ۲۰۰ نمونه از سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری شده در بیمارستان های مختلف تهران– ایران بعمل آمد مشخص شد که تعداد ۲۳درصد از این سویه ها حاوی ژن bla_{SHV} و ۲۲/۵درصد از این سویه ها حاوی ژن bla_{CTX-M} و میزان ۱۶درصد سویه ها دارای ژن bla_{TEM} و تعداد ۷/۵درصد سویه‌ها حاوی ژن bla_{PER} بودند.(۱۸) در مطالعه‌ای که توسط افتخاری و همکاران در سال ۱۳۸۷ روی ۵۱ سویه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری بستری شده در دو بیمارستان طالقانی و امام‌حسین (ع) تهران انجام شد، مشخص شد که ۲۲ ایزوله (۴۳/۳۷درصد) دارای ژن bla_{SHV} و ۱۸ سویه (۳۵/۲۹درصد) حاوی ژن bla_{TEM} و ۱۶ سویه (۳۱/۳۷درصد) دارای ژن bla_{CTX-M} بودند که تا حدودی با نتایج این پژوهش همخوانی دارد.(۱۹) در این پژوهش مشخص شد که در ایران میزان سویه‌های پروتئوس مولد ESBL و ژن‌های مختلفی را که باعث مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف بخصوص سفالوسپورین‌های نسل سوم در آن‌ها می‌شود، در استان‌های مختلف کشور متفاوت بوده و حتی در شهری مثل تهران میزان این مقاومت از ناحیه‌ای به ناحیه دیگر و حتی در طول سال‌های مختلف ، متغیر است. با توجه به افزایش روزافزون مقاومت باکتری‌های این خانواده و همچنین انتقال افقی ژن‌های عامل این مقاومت‌ها به روش‌های مختلف از جمله جهش‌ها، ترانسپوزون‌ها، اینتگرون‌ها و پلاسمیدها، توجه هرچه بیشتر به این مسئله ضروری بوده و لازم است که قبل از تجویز هرگونه آنتی بیوتیکی در مراکز درمانی، انجام آنتی بیوگرام و بررسی الگوی فنوتیپی و مولکولی مقاومت انواع سویه‌های باکتریایی به عمل آید. چون تولید ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف معمولا درمان بیماران را با سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف را با شکست مواجه کرده و احتمال مرگ و میر را در بیماران و بخصوص کودکان، افراد سالخورده و افراد مستعد از نظر سیستم ایمنی را افزایش خواهد داد.

منابع

Li Q, Lee JY, Castillo R, Hixon MS, Pujol C, Doppalapudi VR, et al. A novel antibacterial agent with broad-spectrumactivity and enhanced potency against beta-lactamase-producingstrains. Antimicrob AgentsChemother .2002; 46(5):1262-8.

Fernandes,R. Amador, P and Prudencio,C. Beta-lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. Reviews in medical microbiology.2013; 24(6): 7-17.

Debusscher,J. Zhang,L, Buxton,M. Foxman, B and barbosa Cesnik,C. Persistent extended- spectrum B- lactamase urinary tract infection. Emergency of Infection Disease; 2009; 15(3):1862-1864.

Storberg,RN.V. ESBL-producing Enterobacteriaceae in Africa a non-systematic literature review of research published 2008-2012. Infection ecology & epidemiology.2014; 4(12):1-16.

Poirel,L. Naas,T and Nordman,P. diversity, Epidemiology, and Genetics of class D beta-lactamases. Antimicrobial Agents Chemotherapy.2010; 54(6):24-38.

Clinical and Laboratory Standards Iinstitute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth informational supplement ed. CLSI document M100-S20. Wayne, PA: CLSI; 2010.

J. Vinoth,J. Shamsadhbegum, R. Satish,K and Ramesh,s. Phenotyping detection and antibiogram of AmC bet-alactamases producing Tribe Proteea in a tertiary care hospital.Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.2012;5(4):1-3.

Gaurav,D. Prevalence of Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) Producers among Gram Negative Bacilli from Various Clinical Isolates in a Tertiary Care Hospital at Jhalawar, Rajasthan, India. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2012; 6(2): 182-187.

Samuel,K.Gunturu,R. John, C.John,K.Joyce, M.Nazir,M. C. Anthony, H. Escherichia coli from community-acquired urinary tract infections resistant to fluoroquinolones and extended-spectrum beta-lactams. Journal Infection in Developing Countries 2007; 1(3):257-262.

Orhe,O.Philips.Antibiogram study of proteus SPP. Bacterial isolated from uropathogenic infection in university of Benin teaching hospital,Nigeria. Current Research in Bacteriology.2014; 7(1):12-21.

Okesola,A.O, and Adeniji,T.W. Pattern of extended spectrum beta-lactamases production amoung clinical isolates of Proteus species in western Nigeria. World Journal of Medical Sciences. 2010; 5(4):94-97.

Tolou, B. H, Mohammad Javad, M. M, Zivar, S. Seyyed Mahmood, H. Prevalence of CTX-M-type β-Lactamases in multi-drug resistant Escherichia coli isolates from north of Iran, Rasht. Biological Journal of Microorganism.2015; 3(12):1-11.

Chaudhary,N.K, and Murthys, M. Extended Expectrum beta-lactamase in uropathogen.Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.2013;6(3):1-4.

Laura, P. Roberta, M. Lucia, P, Cecilia, M. Ernesto, G.Gianfranco, A. Egidio, R,and Gian Maria, R. Emerging Extended-Spectrum β- Lactamases in Proteus mirabilis. Journal of Clinical Microbiology.2002; 40(4):1549–1552.

Hashemi,A . Fallah,F. Erfanimanesh,S. Parastu Hamedani, Shadi Alimehr, Hossein Goudarzi. Detection of β-Lactamases and Outer Membrane Porins among Klebsiella pneumoniae Strains Isolated in Iran. Hindawi Publishing Corporation Scientifica. 2014; 10 (11):1-7.

Moosavian,M. and Deiham.B. Distribution of TEM, SHV and CTX-M genes among ESBL-producing enterobacteriaceae isolates in Iran. African Journal of Microbiology Research. 2012; 6(26):5433-5437.

Saeidi,S. Alavi-Naini, R. Shayan. S. Antimicrobial Susceptibility and Distribution of TEM and CTX-M Genes among ESBL-producing Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa Causing Urinary Tract Infections. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences.2014; 16(4): 1-5.

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. Iranian Journal of Basic Medical Sciences.2010; 13 (3):111-118.

Eftekhar, F. Rastegar,M. Golalipoor,M., MansourSamaei, N. Detection of Extended Spectrum B-Lactamases in Urinary Isolates of Klebsiella pneumoniae in Relation to BlaSHV, BlaTEM and BlaCTX-M Gene Carriage. Iranian J Publ Health, Vol. 41, No.3, 2012, pp.127-132.