

# شناسایی مولکولی ژن‌های بتالاکتاماز CTX-M و SHV در ایزوله‌های بالینی اشرشیا کلی در شهر اصفهان

اسرا مرادی<sup>۱</sup>، مژگان قیاسیان<sup>۱\*</sup>، فرشته قندهاری<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۰/۱۰/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۳

## چکیده

**زمینه و هدف:** مقاومت ضد میکروبی به عنوان یک مشکل جهانی باعث ایجاد تهدیدهای سلامتی می‌شود. اشرشیاکلی یکی از مهم‌ترین باکتری‌ها است که باعث ایجاد مشکلات مقاومت می‌گردد. هدف از این پژوهش تعیین و شناسایی مولکولی ژن‌های بتالاکتاماز CTX-M و SHV در ایزوله‌های بالینی اشرشیاکلی در شهر اصفهان بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه مقطعی - توصیفی که در سال ۱۳۹۸ انجام شد، ۱۰۰ نمونه از سویه‌های اشرشیاکلی جدا شده از نمونه‌های بالینی از بیمارستان‌ها و مراکز غیر بیمارستانی شهر اصفهان تهیه شدند. شناسایی و تأیید سویه‌های اشرشیاکلی با استفاده از آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی انجام گرفت. مقاومت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج با روش دیسک دیفیوژن بر اساس دستورالعمل CLSI ارزیابی گردید. برای انجام تست تأیید فنوتیپی سویه‌های تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف، از روش دیسک ترکیبی بر اساس دستورالعمل CLSI استفاده شد. تست PCR با پرایمرهای اختصاصی جهت بررسی حضور ژن‌های کد کننده SHV و CTX-M انجام گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری بر اساس تحلیل واریانس یک طرفه و تی مستقل تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** از مجموع نمونه‌های مورد بررسی بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به سفوتاکسیم (۴۵ درصد) و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به سفپییم (۳۹ درصد) گزارش شد. نتایج تست غربالگری اولیه نشان داد که از میان ۱۰۰ اشرشیاکلی تأیید شده با تست‌های افتراقی، ۳۸ مورد (۳۸ درصد) نسبت به نماینده‌های سفالوسپورینی مقاوم و احتمالاً تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند. از میان این نمونه‌ها پس از انجام تست تأییدی دیسک‌های ترکیبی ۳۳ نمونه (۸۶/۸ درصد)، تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف شناسایی شدند که ۶۹/۷ درصد (۲۳ سویه) آن‌ها واجد هر دو ژن کد کننده CTX-M و SHV، ۱۵/۲ درصد (۵ سویه) واجد ژن کد کننده CTX-M و ۱۲/۱ درصد (۴ سویه) واجد ژن کد کننده SHV بودند. در یک نمونه (۳ درصد) هیچ یک از ژن‌های کد کننده CTX-M و SHV وجود نداشت.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به آزمایش‌های انجام شده و تحلیل‌های آماری صورت گرفته بر روی جدایه‌های بیمارستانی و غیر بیمارستانی چنین نتیجه‌گیری شد که ژن‌های کد کننده بتالاکتاماز در اشرشیاکلی SHV و CTX-M افزایش چشمگیری داشته است و بین فراوانی ژن‌های شناسایی شده کد کننده SHV و CTX-M در نمونه‌های بیمارستانی و غیر بیمارستانی رابطه معنی‌داری وجود داشت، به طوری که فراوانی اشرشیاکلی تولید کننده بتالاکتاماز SHV و CTX-M در نمونه‌های بیمارستانی بیشتر از نمونه‌های غیر بیمارستانی بود، اما رابطه معنی‌داری بین ژن‌های شناسایی شده و نوع جدایه‌های جمع‌آوری شده وجود نداشت.

**واژه‌های کلیدی:** اشرشیاکلی، بتالاکتاماز وسیع الطیف، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، SHV، CTX-M

\* نویسنده مسئول: مژگان قیاسیان، اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی

Email: m.ghiasian@yahoo.com

مقدمه

ها می‌باشند و در باکتری *S. pneumoniae* آنتروجینوز<sup>(۱)</sup> شناسایی شده‌اند. گروه C که از آن‌ها می‌توان به Ampc اشاره کرد، قادر به هیدرولیز سفومایسین می‌باشد. گروه D با قدرت هیدرولیز بالا مانند OXA<sup>(۲)</sup> قادر به هیدرولیز اکساسیلین می‌باشد. در این تقسیم‌بندی بتالاکتامازهای SHV، TEM، و سفوتاکسیم<sup>(۳)</sup> (CTX-M) از آنزیم‌های شایع می‌باشند که ژن مسئول آنها به وسیله پلاسمیدهای مقاومت به سویه‌های مختلفی از یک جنس یا بین جنس‌های مختلف *انتروباکتریاسه‌ها* انتقال می‌یابند<sup>(۲)</sup>. با توجه به این که آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف به عنوان یک مکانیسم مهم مقاومت در باکتری‌های گرم منفی پدیدار شده‌اند و باکتری‌های گرم منفی به خصوص *اشرشیاکلی* یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت‌های بالینی مانند عفونت ادراری هستند، جهت اتخاذ روش‌های جدید در درمان، تشخیص مقاومت با تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف ضروری به نظر می‌رسد<sup>(۳)</sup>. این مطالعه جهت بررسی ژن‌های بتالاکتامازی کد کننده SHV و CTX-M در *اشرشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستانی و غیر بیمارستانی انجام شده تا حضور ژن‌های یاد شده و فراوانی سویه‌های *اشرشیاکلی* تولید کننده بتالاکتاماز SHV و CTX-M مورد بررسی قرار گیرد.

باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از مهم‌ترین خطرات تهدید کننده بهداشت جهانی معرفی شده‌اند و درصد فراوانی از مرگ و میرهای سالانه بیمارستانی جهانی را به خود اختصاص داده‌اند. در این میان باکتری‌های خانواده *انتروباکتریاسه*<sup>(۱)</sup> و از این خانواده *اشرشیاکلی*<sup>(۲)</sup> با توجه به ایجاد عفونت‌های مختلف و مقاومت بالا به آنتی‌بیوتیک‌ها، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به دلیل قدرت سمیت پایین برای سلول‌های یوکاریوتی و طیف اثر گسترده و اثر ضد میکروبی قوی، از پر مصرف‌ترین گروه آنتی‌بیوتیکی در دسترس به شمار می‌روند. مهم‌ترین روش مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشد. بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs)<sup>(۳)</sup> عمدتاً بر روی پلاسمیدها کدهی شده و توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌های نسل سوم به خصوص سفتازیدیم، سفودوکسیم و سفوتاکسیم را دارند<sup>(۱)</sup>. در طبقه‌بندی آملر این آنزیم‌ها به چهار گروه A، B، C و D تقسیم می‌شوند. گروه A که سبب هیدرولیز پنی‌سیلین و سفالوسپورین‌های با طیف اثر کم می‌شوند شامل؛ SHV-1<sup>(۴)</sup> (به علت محل فعال متغیر سولفیدریل به این نام خوانده شده است)، TEM-1 و TEM-2 (اولین بار از بیماری به نام تمورینا<sup>(۵)</sup> جدا شد و TEM نامیده شد) است که در *کلبسیلا پنومونیه*<sup>(۶)</sup> و *اشرشیاکلی* شناسایی شده‌اند. گروه B شامل متالوبتالاکتامازهای وابسته به روی هستند که قادر به هیدرولیز کارباپنم-

- 1-Enterobacteriaceae
- 2-Escherichia coli
- 3-Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)
- 4-Sulphydryl Variable
- 5-Temoneira
- 6-Klebsiella pneumonia
- 7-Pseudomonas aeruginosa
- 8-Oxacillinase
- 9-Cefotaxime- Munich

## روش بررسی

در این مطالعه مقطعی - توصیفی که در سال ۱۳۹۸ انجام شد، ۱۰۰ ایزوله باکتریایی /شرشیا کلی از عفونت‌های ادرار، خون، بافت زخم، پرپتون چشم، آبسه و واژن از بیمارستان‌های اصفهان (غرضی، شریعتی و الزهرا) و بیمارستان امام خمینی فلاورجان و همچنین از مراکز غیر بیمارستانی (کلینیک برهانیان، آزمایشگاه مهدیه، کلینیک امام رضا) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها برای انجام آزمایش‌های بعدی به آزمایشگاه علمی تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان منتقل گردید. برای تعیین هویت باکتری‌های یاد شده از رنگ‌آمیزی گرم، کشت در محیط‌های کشت مک کانکی آگار، و انجام تست‌های افتراقی MR، VP، SIM، TSI، سیترات و اوره استفاده شد. محیط‌های کشت متعلق به مرک آلمان بود.

بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار و بر اساس دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاهی بالینی (CLSI)<sup>(۱)</sup> انجام شد. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی، کدورت استاندارد نیم مک فارلند ساخته شد و بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. ۶ دیسک آنتی‌بیوتیک شامل سفیپیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، امی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول

(۲۵ میکروگرم) از شرکت پادتن طب ایران استفاده شد.

برای انجام تست تایید فنوتیپی از دیسک ترکیبی<sup>(۲)</sup> سفزازیدیم کلارولانیک اسید (۱۰ میکروگرم بر ۳۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم کلارولانیک اسید (۱۰ میکروگرم بر ۳۰ میکروگرم) از شرکت Rosco استفاده شد. هدف از انجام تست تأیید فنوتیپی با استفاده از دیسک ترکیبی، جداسازی سویه‌های تولید کننده ESBL بر طبق دستورالعمل CLSI بود. در این روش قطر هاله دیسک حاوی سفزازیدیم با قطر هاله دیسک حاوی سفزازیدیم و کلارولانیک اسید و قطر هاله دیسک حاوی سفوتاکسیم با قطر هاله دیسک حاوی سفوتاکسیم کلارولانیک اسید مقایسه شد. افزایش ۵ میلی‌متر یا بیشتر از ۵ میلی‌متر در قطر هاله عدم رشد برای آنتی‌بیوتیک به تنهایی بیانگر تأیید حضور ESBL در سویه مورد بررسی می‌باشد (۴). از سویه /شرشیا کلی ATCC (۲۵۹۲۲) (۵) و کلبسیلا نمونیه ATCC (۷۰۰۶۳) جهت کنترل کیفی آنتی‌بیوگرام استفاده شد (۶). سویه‌های استاندارد از کلکسیون میکروبی شرکت ایده آل گستر به صورت لیوفیلیزه تهیه شدند.

از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)<sup>(۳)</sup> و پرایمرهای اختصاصی به منظور تکثیر ژن‌های کد کننده بتالاکتاماز SHV و CTX-M استفاده شد (۷). توالی

- 1- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)
- 2-Combined disk
- 3-Polymerase Chain Reaction (PCR)

دقیقه، باز شدن دو رشته DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال<sup>(۲)</sup> پرایمرها در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد برای ژن CTX-M و ۵۵ درجه سانتی گراد برای ژن SHV به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل شدن رشته هدف<sup>(۳)</sup> در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله طویل شدن نهایی<sup>(۴)</sup> در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. برای مشاهده محصول PCR از ژل آگاروز ۱/۵ درصد استفاده گردید.

داده‌های جمع آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری پارامتریک تی مستقل و آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.<sup>(۵)</sup>

از سویه *اشرشیا کلسی* ATCC (۲۵۹۲۲) به عنوان کنترل منفی و *کلبسیلا نمونیه* ATCC (۷۰۰۶۳) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای تهیه ۲۵ میکرولیتر مستر میکس، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۷۵ میکرولیتر منیزیم کلراید، ۰/۵ میکرولیتر دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات ۱۰ میکرولیتر پرایمر رفت، ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت، ۰/۲۵ میکرولیتر تک پلیمرز و ۱۹ میکرولیتر آب دیونیزه استفاده شد. برنامه برای انجام PCR طی ۳۵ سیکل برنامه زمانی ترموسایکلر شامل: مرحله اولیه باز شدن دو رشته DNA<sup>(۱)</sup> در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های کد کننده SHV و CTX-M (۵)

ژن هدف	نام پرایمر	توالی (۳'–۵')	طول قطعه (bp)	دمای اتصال
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CTX-M-F	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	۵۹۲	۵۷
	CTX-M-R	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYSAGCGG		
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV-F	TCGGGCCGCGTAGGCATGAT	۶۲۸	۵۵
	SHV-R	AGCAGGGCGACAATCCCGCG		

- 1-Initial Denaturation
- 2-Denaturation
- 3-Annealing
- 4-Elongation
- 5-Final elongation

## یافته‌ها

از ۱۰۰ نمونه/شرشیاکلی مورد بررسی در این مطالعه ۶۳ مورد (۶۳ درصد) از بیمارستان‌ها و ۳۷ مورد (۳۷ درصد) از سایر مراکز درمانی گردآوری شدند که به ترتیب فراوانی عبارتند از: ۲۷ مورد (۲۷ درصد) از بیمارستان امام خمینی فلاورجان، ۲۲ مورد (۲۲ درصد) از بیمارستان غرضی، ۲ مورد (۲ درصد) بیمارستان دکتر علی شریعتی، ۱۶ مورد (۱۶ درصد) از بیمارستان الزهراء، ۱۵ مورد (۱۵ درصد) از کلینیک برهانیان، ۱۵ مورد (۱۵ درصد) از آزمایشگاه مهدیه، ۲ مورد (۲ درصد) از آزمایشگاه امام رضا و ۱ مورد (۱ درصد) از بیمارستان سینا. پس از انجام تست‌های تأییدی و افتراقی نمونه/شرشیاکلی تأیید شد.

نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مختص به آنتی‌بیوتیک سفیپیم (۳۹ درصد) و بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۴۵ درصد) می‌باشد. همچنین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در/شرشیاکلی مراکز بیمارستانی بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۵۲/۴ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفیپیم (۴۵/۲ درصد) بوده است. در مراکز غیر بیمارستانی بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۳۲/۴ درصد) و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم و سفتریاکسون (۲۷ درصد) بوده است. همان‌طور که از

نتایج مشخص است، مقاومت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها در/شرشیاکلی جدا شده از نمونه‌های بالینی مراکز بیمارستانی نسبت به/شرشیاکلی جدا شده از نمونه‌های بالینی مراکز غیربیمارستانی بیشتر است. البته تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که این اختلاف به دلیل کم بودن تعداد نمونه‌ها، معنی‌دار نیست (جدول ۲).

نتایج تست غربالگری اولیه برای شناسایی ایزوله‌های مولد ESBLs نشان داد که از میان ۱۰۰ /شرشیاکلی تأیید شده با تست‌های افتراقی، ۳۸ مورد (۳۸ درصد) نسبت به نماینده‌های سفالوسپورینی مقاوم و احتمالاً تولید کننده ESBLs بودند. از میان ۳۸ نمونه مقاوم به نماینده‌های سفالوسپورین پس از انجام تست تأییدی دیسک‌های ترکیبی، ۳۳ نمونه (۸۶/۸ درصد) تولید کننده ESBLs شناسایی شدند که از میان آن‌ها، ۲۶ نمونه (۷۸/۷۹ درصد) از بیمارستان‌ها و ۷ نمونه (۲۱/۲۱ درصد) از مراکز غیربیمارستانی (کلینیک‌ها و آزمایشگاه‌ها) جمع‌آوری شده بودند. از مجموع ۳۳ نمونه تأیید شده مولد ESBLs، ۲۳ نمونه/شرشیاکلی واجد ژن‌های کد کننده بتالاکتامازی CTX-M و SHV، ۵ نمونه واجد ژن کد کننده بتالاکتاماز CTX-M و ۴ نمونه واجد ژن کد کننده بتالاکتاماز SHV بودند و در یک نمونه هیچ یک از ژن‌های کد کننده بتالاکتامازی CTX-M و SHV وجود نداشت. درصد شیوع بتالاکتاماز CTX-M و SHV در شکل ۱ نشان داده شده است.

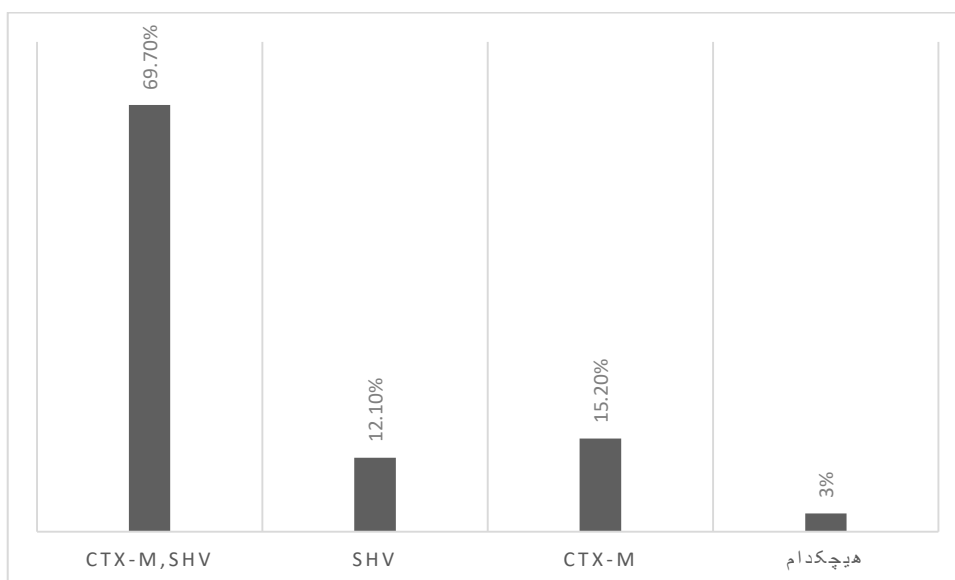
از ۳۳ نمونه/شرشیا کلی مولد ESBL، ۱۹ جدایه (۸۲/۶ درصد) واجد ژن‌های کد کننده بتالاکتاماز SHV و CTX-M، ۱ جدایه (۲۵ درصد) واجد ژن کد کننده بتالاکتاماز SHV، ۵ جدایه (۱۰۰ درصد) واجد ژن بتالاکتاماز SHV، ۱ جدایه (۱۰۰ درصد) که هیچ کدام از ژن‌ها در آن مشاهده نشد، مربوط به نمونه‌های بیمارستانی و ۴ جدایه (۱۷/۴ درصد) واجد ژن‌های کد کننده بتالاکتاماز SHV و CTX-M و ۳ جدایه

از ۳۳ نمونه/شرشیا کلی مولد ESBL، ۱۹ جدایه (۸۲/۶ درصد) واجد ژن‌های کد کننده بتالاکتاماز SHV و CTX-M، ۱ جدایه (۲۵ درصد) واجد ژن کد کننده بتالاکتاماز SHV، ۵ جدایه (۱۰۰ درصد) واجد ژن بتالاکتاماز SHV، ۱ جدایه (۱۰۰ درصد) که هیچ کدام از ژن‌ها در آن مشاهده نشد، مربوط به نمونه‌های بیمارستانی و ۴ جدایه (۱۷/۴ درصد) واجد ژن‌های کد کننده بتالاکتاماز SHV و CTX-M و ۳ جدایه

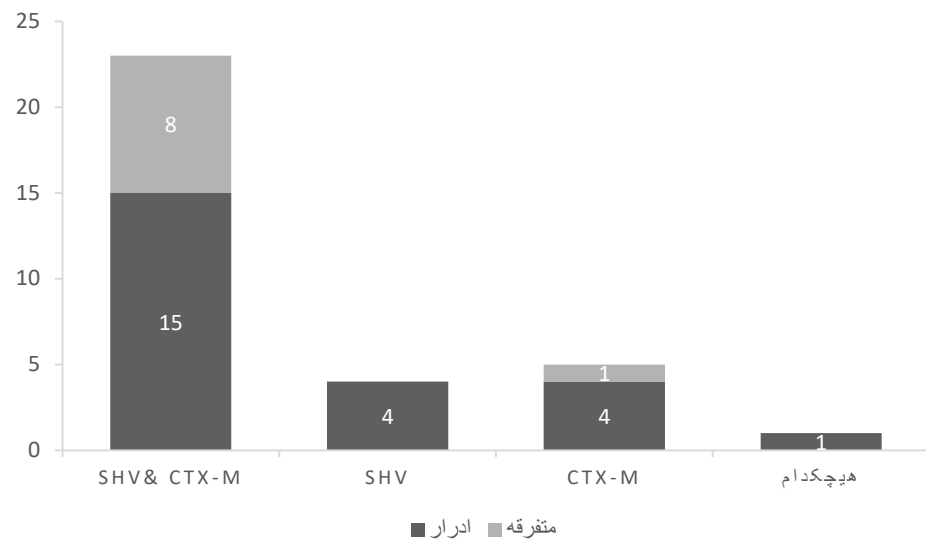
مراکز غیر بیمارستانی بودند. در شکل ۲ از ۳۳/شرشیا کلی مولد بتالاکتاماز SHV و CTX-M، تعداد نمونه‌های ادراری به تفکیک از سایر نمونه‌ها نشان داده شده است. نتیجه آزمون نسبت درست نمایی، نشان داد که رابطه‌ای بین نوع نمونه‌ها و حضور ژن‌ها وجود نداشت ( $p > 0.05$ ,  $\chi^2_3$ ).

جدول ۲: درصد مقاومت اشرشیاکلی جدا شده از نمونه‌های بالینی در مراکز بیمارستانی و غیر بیمارستانی

آنتی بیوتیک	درصد مقاومت (نمونه مراکز بیمارستانی)	درصد مقاومت (نمونه مراکز غیر بیمارستانی)
سفترایکسون	۴۹/۲	۲۷
سفتواکسیم	۵۲/۴	۳۲/۴
سفتازیدیم	۴۹/۲	۲۷
سفیپیم	۴۵/۲	۳۰/۶



شکل ۱: نمودار فراوانی اشرشیا کلی تولید کننده بتالاکتاماز SHV و CTX-M.



شکل ۲: تعداد اشرشیاکلی مولد CTX-M و SHV به تفکیک نوع جدایه (ادرار و متفرقه)

## بحث

در پژوهش حاضر از میان ۱۰۰ اشرشیا کلی

جدا شده از نمونه‌های بالینی ۳۳ درصد ایزوله‌ها از نظر تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف فنوتیپ مثبت بودند که نشان می‌دهد این سویه‌ها پتانسیل بالای مقاومتی دارند. پس از انجام تست PCR از میان ۳۳ سویه اشرشیاکلی که از نظر فنوتیپی حاوی آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف تشخیص داده شدند، ۱۵/۲ درصد از سویه‌های اشرشیاکلی واجد ژن کدکننده CTX-M و ۱۲/۱ درصد واجد ژن کدکننده SHV بودند و در یکی از جدایه‌ها (۳/۰ درصد) هیچکدام از ژن‌های کدکننده CTX-M و SHV حضور نداشتند. محسن میرزایی و همکاران ارتباط بین حضور ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و الگوی حساسیت ضد میکروبی در جدایه‌های بالینی اشرشیاکلی را بررسی کردند. از ۱۹۰ جدایه مولد ESBL مورد بررسی ۶۲ جدایه (۳۲/۶ درصد) واجد ژن کدکننده CTX-M، ۶۰ جدایه (۳۱/۶ درصد) واجد ژن کدکننده SHV گزارش

سویه‌های اشرشیا کلی، باکتری‌های فرصت‌طلبی هستند که عامل برخی عفونت‌ها، از جمله؛ عفونت ادراری، سپتی‌سمی، عفونت دستگاه تنفسی، عفونت زخم و اسهال می‌شوند (۱۷). یکی از دلایل مهم که این باکتری مورد توجه قرار گرفته است، توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و به دنبال آن افزایش مقاومت در برابر گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی می‌باشد (۳). پژوهش حاضر با هدف تعیین و شناسایی مولکولی ژن‌های بتالاکتاماز CTX-M و SHV در ایزوله‌های بالینی اشرشیا کلی در شهر اصفهان انجام گردید.

این پژوهش روی اشرشیا کلی جدا شده از نمونه‌های بالینی از بیمارستان‌ها و مراکز غیر بیمارستانی اصفهان انجام شد. از میان نمونه‌های بالینی، نمونه ادرار (۷۹ درصد) بیشترین فراوانی را داشت.

شد. همچنین ۷ جدایه (۳/۷ درصد) واجد هیچ‌کدام از ژن‌های مورد بررسی نبود. ۲۵ جدایه (۱۳/۱ درصد) دارای هر دو ژن SHV و CTX-M بودند (۸). علت تفاوت نتایج پژوهش حاضر با نتایج ما این است که سویه‌ها از مکان‌های جغرافیایی مختلفی جدا شده‌اند که الگوی مصرف آنتی‌بیوتیکی متفاوتی داشته‌اند و به همین دلیل نتایج یکسان نیستند (۱۱).

یزدی و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی شیوع ژن‌های مقاومت بتالاکتامازی TEM، CTX-M و SHV در نمونه‌های /شرشیاکی انجام دادند این چنین گزارش کردند که ژن‌های کد کننده SHV، TEM و CTX-M به ترتیب در ۹۵ مورد (۸۷/۱ درصد)، ۷۵ مورد (۶۸/۸ درصد) و ۷۷ مورد (۷۰/۶ درصد) جدایه‌های ESBL یافت شدند. ۴۰ مورد (۳۶/۶ درصد) حاوی هر سه ژن کد کننده SHV، CTX-M و TEM بودند. علاوه بر این ۶۱ نمونه (۵۵/۹ درصد) واجد دو ژن کد کننده SHV و TEM و ۶۸ نمونه (۶۲/۳ درصد) واجد دو ژن کد کننده SHV و CTX-M بودند (۹). همچنین در پژوهش مشابه دیگری لیا او و همکاران، تعداد ۱۶۷ گونه /شرشیاکی تولیدکننده ESBL را طی سال‌های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳، از ۹ بیمارستان چین جمع‌آوری کردند. در ۱۶۷ سویه /شرشیاکی تولیدکننده ESBL، ۱۰۴ سویه (۶۲/۳ درصد) از نظر ژن CTX-M مثبت و تعداد ۹ سویه (۵/۳۹ درصد) از نظر ژن SHV مثبت بودند (۱۰). مقایسه نتایج پژوهش حاضر با این نتایج پژوهش‌های فوق نشان می‌دهد که میزان ESBL در سویه‌های جدا شده از کشورهای مختلف و همچنین در یک کشور از یک بیمارستان تا

بیمارستان دیگر متفاوت می‌باشند و دلیل این عدم تشابه، تفاوت در نحوه سیستم کنترل عفونت و درمان بیماران در بیمارستان است (۱۱). در تمام این نتایج فراوانی ژن‌ها بالاتر از فراوانی ژن‌های حاضر بود که علت تفاوت می‌تواند به تعداد نمونه‌ها، مراکز بیمارستانی و شرایط جغرافیایی بستگی داشته باشد، ولی در سال‌های اخیر CTX-M پراکندگی بیشتری یافته است به طوری که امروزه آنزیم CTX-M نقش مهمی را در مقاومت آنتی‌بیوتیکی کشورهای مختلف ایفا می‌کند (۱۲). همچنین مقایسه نتایج این پژوهش با سایر پژوهش‌ها نشان می‌دهد افزایش چشمگیری در شیوع /شرشیاکی تولید کننده SHV و CTX-M وجود داشته است.

در پژوهش حاضر میزان مقاوت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم ۴۵ درصد بوده، این در حالی است که میزان مقاوت در برابر همین آنتی‌بیوتیک در مطالعه شاه‌چراغی و همکاران ۳۲ درصد، در مطالعه زابلی و گتایی ۴۲/۴ درصد و در مطالعه شبان پیشه و همکاران ۴۲/۴۸ درصد بیان شده است. میزان مقاوت در مقایسه نتایج به دست آمده از این تحقیق با نتایج حاصل از پژوهش‌های دیگر حاکی از افزایش مقاوت آنتی‌بیوتیکی در سوش‌های /شرشیاکی می‌باشد. در نهایت می‌توان به این نتیجه رسید که مصرف بی‌رویه و خودسرانه دارو به ویژه آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورینی باعث ایجاد درصد بالای مقاوت و همچنین میزان بالای تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف ESBL شده است. در این پژوهش میزان درصد



مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشرشیا کلی* به تفکیک محل جمع‌آوری نیز برآورد شد و چنین نتیجه‌گیری شد که سویه‌های جداسازی شده از بیمارستان بیشترین میزان مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۵۲/۴ درصد) و در جدایه‌های غیربیمارستانی بیشترین میزان مقاومت باز هم نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با میزان ۳۲/۴ درصد مشاهده شد. موسوی و همکاران ۱۰۰ نمونه ادراری از بیمارستان‌های سطح شهر سمنان جمع‌آوری کردند که؛ ۳۷ درصد به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم، ۳۲ درصد به سفتریاکسون، ۲۵ درصد به سفپیم و ۲۷ درصد به سفنازیدیم مقاوم تشخیص داده شدند که تمام نمونه‌ها از مراکز بیمارستانی جمع‌آوری شده بودند (۱۳). در این پژوهش، تعداد ۱۹ جدایه (۸۲/۶ درصد) از ۳۳ سویه *اشرشیا کلی* فنوتیپ مثبت واجد ژن‌های CTX-M و SHV، از بیمارستان‌ها و ۷ جدایه (۲۱/۲ درصد) واجد ژن‌های SHV و CTX-M، از مراکز غیر بیمارستانی جمع‌آوری شدند. نتیجه آزمون نسبت درست نمایی، نشان داد که رابطه معنی‌دار بین گروه بیماران (بیمارستانی و غیربیمارستانی) و حضور ژن‌ها وجود داشت. در پژوهش مشایخی و همکاران از مجموع ۱۸۱ سویه جدا شده از بیمارستان‌ها، ۵۸ درصد ESBL مثبت بودند که از این تعداد ۱۶ جدایه (۳۳ درصد) حاوی ژن SHV، ۲۸ جدایه (۵۸ درصد) حامل ژن TEM، ۳ جدایه (۶ درصد) حامل هر دو ژن SHV و TEM بودند (۱۴).

در مطالعه سرو آزاد و همکاران از تعداد ۹۷ نمونه جمع‌آوری شده از سطح بیمارستان‌ها، ۳۵

درصد جدایه‌ها دارای ژن CTX-M و ۶۳/۹۱ درصد جدایه‌ها دارای ژن SHV بودند. ۱ جدایه (۰/۲۵ درصد) از ژن SHV در مراکز غیربیمارستانی، همه ۵ جدایه (۱۰۰ درصد) از ژن CTX-M و یک جدایه که هیچ‌کدام از ژن‌ها در آن شناسایی نشد، در بیمارستان جمع‌آوری شدند (۱۵). در پژوهش مشایخی و همکاران ۲۳ درصد جدایه‌های حاوی ژن SHV از مراکز بیمارستانی بودند، این درحالی است که در مطالعه شبان پیشه و همکاران از ۳۴۶ نمونه، ۲/۳۵ درصد جدایه‌های جدا شده از آزمایشگاه واجد ژن‌های SHV و CTX-M بودند (۱۶).

مقایسه پژوهش حاضر در مورد میزان فراوانی ژن‌ها در مراکز بیمارستانی و غیر بیمارستانی با پژوهش‌های نامبرده شده نشان داد که بیشترین میزان فراوانی ژن‌ها را می‌توان در مراکز بیمارستانی یافت. همچنین دیده شد که رابطه معنی‌داری بین حضور ژن‌ها و محل جمع‌آوری نمونه‌ها یعنی مراکز بیمارستانی و غیربیمارستانی وجود دارد که دلیل فراوانی بیشتر ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در نمونه‌های بیمارستانی احتمالاً به دلیل تجویز بیشتر آنتی‌بیوتیک برای بیماران به دلیل شرایط خاص آن‌ها می‌باشد. در این پژوهش از ۳۳ سویه *اشرشیا کلی* (۸۶/۸ درصد) مولد ESBL، تعداد ۱۵ جدایه (۶۵/۲ درصد) واجد ژن‌های CTX-M و SHV، ۴ جدایه (۱۰۰ درصد) واجد ژن SHV، ۴ جدایه (۸۰ درصد) واجد ژن CTX-M و یک جدایه هیچ‌کدام از ژن‌ها در آن شناسایی نشد، جدایه‌های ادرار بودند. نتایج آزمون نسبت درست نمایی، نشان داد که رابطه‌ای بین نوع جدایه و حضور

تحت تأثیر قرار دهد. با توجه به این که بیش از نیمی از ایزوله‌های حاوی آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف واجد ژن‌های کد کننده بتالاکتامازی CTX-M و SHV بودند، لازم است در پژوهش‌های بعدی سایر ژن‌های مسئول فنوتیپ ESBL مانند TEM نیز بررسی شود.

### نتیجه‌گیری

با توجه به آزمایش‌های انجام شده و تحلیل‌های آماری صورت گرفته بر روی جدایه‌های بیمارستانی و غیر بیمارستانی چنین نتیجه‌گیری شد که *اشرشیاکلی* تولید کننده بتالاکتاماز SHV و CTX-M افزایش چشمگیری داشته است و بین فراوانی ژن‌های شناسایی شده SHV و CTX-M در نمونه‌های بیمارستانی و غیر بیمارستانی رابطه معنی‌داری وجود داشت، به طوری که میزان فراوانی *اشرشیاکلی* تولید کننده SHV و CTX-M در نمونه‌های بیمارستانی بیشتر از نمونه‌های غیر بیمارستانی بود، اما رابطه معنی‌داری بین ژن‌های شناسایی شده و نوع نمونه بالینی جمع‌آوری شده وجود نداشت.

### تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان با کد اخلاق IR.IAU.FALA.REC.1398.058 می‌باشد.

ژن‌ها وجود ندارد. پژوهش‌های فاضلی و همکاران شامل ۲۷۸ نمونه کلینیکی شامل؛ نمونه‌های ادرار، خون، آبسه و زخم بود که از این تعداد، ۱۵۰ نمونه (۵۳/۹ درصد) قادر به تولید ESBL بودند که ۶۲ درصد از آن‌ها نمونه ادرار، ۲۹ درصد از نمونه‌ها از آبسه و زخم و ۹ درصد از دیگر نمونه‌های کلینیکی بود (۱۷).

مطالعه میرزایی و همکاران شامل ۵۰۰ نمونه کلینیکی از جمله نمونه‌های ادرار، خون، زخم، تراشه، خلط و آبسه بود. از ۵۰۰ جدایه *اشرشیاکلی*، ۳۶۰ جدایه (۷۲ درصد) از نمونه ادرار، ۵۰ جدایه (۱۰ درصد) از نمونه زخم، ۲۰ جدایه (۴۰ درصد) از نمونه تراشه، ۲۰ جدایه (۴۰ درصد) از نمونه خلط، ۲۵ جدایه (۵ درصد) از نمونه خون، ۱۰ جدایه (۲ درصد) از نمونه آبسه، ۱۰ جدایه (۲ درصد) از مایع مغزی نخاعی، ۵ جدایه (۱ درصد) از نمونه بیوپسی جدا شدند (۸). مقایسه پژوهش حاضر با پژوهش فاضلی و همکاران، هم‌چنین میرزایی و همکاران بیانگر آن است که بیشترین جدایه‌های *اشرشیاکلی* مربوط به نمونه‌های ادراری است. این تشابه به این دلیل است که عفونت مجرای ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی در انسان است که به طور عمده به وسیله *اشرشیاکلی* ایجاد می‌شود (۱۸). باکتری *اشرشیاکلی* عامل ۸۰ تا ۹۰ درصد از عفونت مجرای ادراری از جامعه و ۳۰ تا ۵۰ درصد از عفونت مجرای ادراری از بیمارستان است (۱۹).

آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در هر بیمارستان و مرکز درمانی می‌تواند توزیع ژنوتیپ‌های مقاومت را

## REFERENCES

1. Maeyama Y, Taniguchi Y, Hayashi W, Ohsaki Y, Osaka S, Koide S, et al. Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* from canine and feline clinical specimens in Japan. *Vet Microbiol* 2018; 216: 183-9.
2. Dorado-García A, Smid JH, Van Pelt W, Bonten MJ, Fluit AC, van den Bunt G, et al. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73(2): 339-47.
3. Goudarzi G, Baharvand Ahmadi A. The occurrence of TEM gene among the extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) producing uropathogenic *Escherichia coli* strains, isolated from Khorramabad city in 2013. *Pajohande* 2015; 20(1): 33-7.
4. Malik T, Naim A. Occurrence of ESBLs in Clinical isolates of *klebsiella* species and comparative analysis of phenotypic detection methods. *Anti-Infect Agents* 2020; 18(3): 255-60.
5. Gundran RS, Cardenio PA, Villanueva MA, Sison FB, Benigno CC, Kreausukon K, et al. Prevalence and distribution of bla CTX-M, bla SHV, bla TEM genes in extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. *BMC Vet Res* 2019; 15(1): 1-8.
6. Pathak A, Marothi Y, Kekre V, Mahadik K, Macaden R, Lundborg CS. High prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing pathogens: results of a surveillance study in two hospitals in Ujjain, India. *Infect Drug Resist* 2012; 5: 65.
7. Mattila S, Ruotsalainen P, Ojala V, Tuononen T, Hiltunen T, Jalasvuori M. Conjugative ESBL plasmids differ in their potential to rescue susceptible bacteria via horizontal gene transfer in lethal antibiotic concentrations. *The Journal of antibiotics* 2017; 70(6): 805-8.
8. Mirzaee M, Eftekhari R, Taghizadeh N, Mehrabi M R. Relationship between presence of genes encoding ESBLs and antimicrobial susceptibility pattern in *Escherichia coli* clinical isolates. *Iran J Med Microbiol* 2016; 10(1): 8-15.
9. Yazdi M, Nazemi A, Mir Inargasi M, Khataminejad M.R, Sharifi S, Babai Kochkaksaraei M. Prevalence of SHV/CTX-M/TEM (ESBL) Beta-Lactamase resistance genes in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in tehran, iran. *Med Lab J* 2010; 4(1): 48-54.
10. Liao K, Chen Y, Wang M, Guo P, Yang Q, Ni Y, et al. Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* causing intra-abdominal infections from 9 tertiary hospitals in China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2017; 87(1): 45-8.
11. Robin F, Aggoune-Khinache N, Delmas J, Naim M, Bonnet R. Novel VIM metallo- $\beta$ -lactamase variant from clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(1): 466-70.
12. Livermore DM, Hawkey PM. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(3): 451-4.
13. Moosavi SS, Davari K, Amini S. Prevalence of (CTX-M-2) beta lactamase gene in *E.coli* isolated from patients with urinary tract infections (UTI) in Sanandaj, Iran. *SJKU* 2016; 20(6): 107-15.
14. Mashaieki S, kheirkhah B, amini K. Molecular study of virulence genes SHV and TEM in antibiotic resistant *Escherichia coli* strains isolated from Urethral specimens of city of Jiroft. *RJMS* 2018; 25(1): 75-82.
15. Sarvazad H, Darbouy M. Correlation of antibiotic resistance with shv, ctx-m and tem extended-spectrum beta lactamases genes among *klebsiella pneumoniae* isolates from patients in kermanshah hospitals. *J Ardabil Univ Med Sci* 2017; 17(3): 353-62.
16. Shabanpishe S, Rezaeian A. The prevalence and frequency of TEM and SHV beta-lactamase resistance genes and CTX-M in *Enterobacteriaceae* isolated from clinical samples in the laboratory kahooresten . *NCMBJ* 2018; 8(30): 9-16.
17. Fazeli H, Hoseini MM, Mohammadi Ghalaei P. Frequency and resistance pattern of extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* in clinical specimen of Alzahra hospital in Isfahan, Iran, 2007. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2009; 10(4): 58-64.
18. Griebing TL. Urologic diseases in America project: trends in resource use for urinary tract infections in women. *J Urol* 2005; 173(4): 1281-7.
19. Ejrnæs K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull* 2011; 58(4): B4187.

# Molecular Identification of CTX-M and SHV Betalactamase Genes in *Escherichia Coli* Clinical Isolates in Isfahan

Moradi A, Ghiasian M\*, Ghandehari F

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Received: 25 Dec 2021 Accepted: 04 Jul 2022

## Abstract

**Background & aim:** Antimicrobial resistance is a worldwide problem causing health threats. *Escherichia coli* is one of the most important bacteria that causes resistance problems. The aim of the present study was to evaluate the frequency of *Escherichia coli*, a extended spectrum beta-lactamase producing CTX-M and SHV, in hospital and non-hospital clinical specimens in Isfahan.

**Methods:** In the present cross-sectional descriptive study conducted in 2019, 100 samples of hospital and non-hospital of *Escherichia coli* strains were collected and confirmatory biochemical tests were performed to identify these strains. Resistance of strains to common antibiotics was assessed by disk diffusion method according to CLSI instructions. To perform phenotypic confirmation test of extended spectrum beta-lactamase producing strains, the combined disk method based on CLSI instructions was used. PCR was performed with specific primers to examined of encoding genes presence of SHV and CTX-M. The collected data were analyzed using statistical tests based on one-way analysis of variance and independent t-test.

**Results:** From the studied samples, the highest antibiotic resistance was related to cefotaxime (45%) and the least antibiotic resistance was related to cefepime (39%). The results of the initial screening test showed that out of 100 *Escherichia coli* approved by differential tests, 38 (38%) were resistant to cephalosporin representatives and possibly produced extended-spectrum beta-lactamase. Among these samples, 33 (86.8%) after Combined disk method were confirmed as extended spectrum beta-lactamases (ESBL) producing, of which 69.7% (23 strains) had both genes encoding CTX-M and SHV had 15.2% (5 strains) of the gene encoding CTX-M and 12.1% (4 strains) had the gene encoding SHV. In one sample (3%) none of the genes encoding CTX-M and SHV were present.

**Conclusion:** Based on the performed experiments and statistical analysis on hospital and non-hospital isolates, it was concluded that the SHV and CTX-M beta-lactamase genes in *Escherichia coli* had a significant increase in frequency. There was a significant relationship between SHV and CTX-M genes in hospital and non-hospital samples, so that the frequency of SHV and CTX-M genes in *Escherichia coli* was higher in hospital samples than non-hospital samples. There was no significant relationship between the genes identified and the type of isolates collected.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Extended-spectrum Beta-lactamase, Antibiotic resistance, SHV, CTX-M.

---

**Corresponding author:** Ghiasian M, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

**Email:** m.ghiasian@yahoo.com

**Please cite this article as follows:** Moradi A, Ghiasian M, Ghandehari F. Molecular Identification of CTX-M and SHV Betalactamase Genes in *Escherichia Coli* Clinical Isolates in Isfahan. Armaghane-danesh 2022; 27(4): 472-483.