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

اسرا مرادی[۱]، مژگان قیاسیان[۱*]، فرشته قندهاری[۱]

[۱] گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

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

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت ضدمیکروبی 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 *اشرشیا کلی* در شهر اصفهان بود.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی ـ توصیفی که در سال ۱۳۹۸ انجام شد، ۱۰۰ نمونه از سویه‌های *اشرشیا کلی* 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 تی‌مستقل تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از مجموع نمونه‌های مورد بررسی بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به سفوتاکسیم(۴۵ درصد) و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به سفیپیم(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 وسیع‌الطیف بودند. از میان این نمونه‌ها پس از انجام تست تأییدی دیسک‌های ترکیبی ۳۳ نمونه(۸۶/۸ درصد)، تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف 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 وCTX-M افزایش چشمگیری داشته است و بین فراوانی ژن‌های شناسایی شده کد کننده SHV وCTX-M در نمونه‌های بیمارستانی و غیر بیمارستانی رابطه معنی‌داری وجود داشت، به طوری که فراوانی اشرشیاکلی تولید کننده بتالاکتاز SHV وCTX-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: *اشرشیا کلی*، بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، SHV، CTX-M

---

*__نویسنده مسئول: مژگان قیاسیان،__ اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی

Email: m.ghiasian@yahoo.com

مقدمه

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*[۱] و از این خانواده *اشرشیا کلی*[۲] با توجه به ایجاد عفونت‌های مختلف ومقاومت بالا به آنتی بیوتیک‌ها، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به دلیل قدرت سمیت پایین برای سلول‌های یوکاریوتی و طیف اثر گسترده و اثر ضدمیکروبی قوی، از پر مصرف‌ترین گروه آنتی‌بیوتیکی در دسترس به شمار می‌روند. مهم‌ترین روش مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشد. بتالاکتامازهای وسیع الطیف(ESBLs)[۳] عمدتاً بر روی پلاسمیدها کددهی شده و توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌های نسل سوم به خصوص سفتازیدیم، سفودوکسیم و سفوتاکسیم را دارند(۱). در طبقه‌بندی آمبلر این آنزیم‌ها به چهار گروه A، B، C و D تقسیم می‌شوند. گروه A که سبب هیدرولیز پنی‌سیلین وسفالوسپورین‌های با طیف اثرکم می‌شوند شامل؛ SHV-1[۴] (به علت محل فعال متغیر سولفیدریل به این نام خوانده شده است)، TEM-1 و TEM-2 (اولین بار از بیماری به نام تمورینا [۵] جدا شد و TEM نامیده شد) است که در *کلبسیلا پنومونیه*[۶] و *اشرشیاکلی* شناسایی شده‌اند. گروه B شامل متالوبتالاکتامازهای وابسته به روی هستند که قادر به هیدرولیز کاربا‌پنم‌ها می‌باشند و در باکتری *سودوموناس آئروجینوزا*[۷] 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[۸] قادر به هیدرولیز اکساسیلین می‌باشد. در این تقسیم‌بندی بتالاکتامازهای TEM , SHV وسفوتاکسیم ـ M[۹] (CTX-M) از آنزیم‌های شایع می‌باشند که ژن مسئول آنها به وسیله پلاسمیدهای مقاومت به سویه‌های مختلفی از یک جنس یا بین جنس‌های مختلف *انتروباکتریاسه*ها انتقال می‌یابند(۲). 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 وسیع الطیف ضروری به نظر می‌رسد(۳). [۱] 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.

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

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی ـ توصیفی که در سال ۱۳۹۸ انجام شد، ۱۰۰ ایزوله باکتریایی *اشرشیا 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)[1] انجام شد. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی، کدورت استاندارد نیم مک فارلند ساخته شد و بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. ٦ دیسک آنتی بیوتیک شامل سفیپیم(۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم(۳۰ میکروگرم)، سفترياکسون(۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم(۳۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم(۱۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم) از شرکت پادتن طب ایران استفاده شد.

برای انجام تست تایید فنوتیپی از دیسک ترکیبی[2] سفتازیدیم کلاولانیک اسید (۱۰ میکروگرم بر ۳۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم کلاولانیک 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 قطرهاله دیسک حاوی سفتازیدیم با قطر هاله دیسک حاوی سفتازیدیم وکلاوولانیک اسید و قطر هاله دیسک حاوی سفوتاکسیم با قطر هاله دیسک حاوی سفوتاکسیم کلاولانیک اسید مقایسه شد. افزایش ۵ میلی‌متر یا بیشتر از ۵ میلی‌متر در قطر هاله عدم رشد برای آنتی بیوتیک به تنهایی بیانگر تأیید حضور ESBL در سویه مورد بررسی می‌باشد(٤). از سویه *اشرشیا کلی*ATCC(۲۵۹۲۲)(۵) و *کلبسیلا نمونیه* ATCC(۷۰۰٦۳) جهت کنترل کیفی آنتی‌بیوگرام استفاده شد(٦). سویه‌های استاندارد از کلکسیون میکروبی شرکت ایده آل گستر به صورت لیوفیلیزه تهیه شدند.

از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)[3] 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)

پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است(۵).

از سویه *اشرشیا کلی* 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 ،۱ میکرولیتر پرایمر رفت ، ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت، ۰/۲۵ میکرولیتر تک پلیمراز 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[۱] در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، باز شدن دو رشتهDNA در دمای ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال[۲] پرایمرها در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد برای ژن CTX-M و ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ژن SHV به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل شدن رشته هدف[۳] در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله طویل شدن نهایی[٤] 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 وآزمون‌های آماری پارامتریک تی مستقل و آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه وتحلیل شدند.

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
bla_{CTX-M}	CTX-M-F	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	۵۹۲	۵۷
	CTX-M-R	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYSAGCGG		
bla_{SHV}	SHV-F	TCGGGCCGCGTAGGCATGAT	٦۲۸	۵۵
	SHV-R	AGCAGGGCGACAATCCCGCG		

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

یافته‌ها

از ۱۰۰ نمونه *اشرشیاکلی* مورد بررسی در این مطالعه ٦٣ مورد(٦٣ 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، ١٦ مورد(١٦ درصد) از بیمارستان الزهرا، 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 *اشرشیاکلی* 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(٤٥ درصد) می‌باشد. هم‌چنین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *اشرشیا کلی* مراکز بیمارستانی بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم(٥٢/٤ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک سفیپیم(٤٥/٢درصد) بوده است. در مراکز غیر بیمارستانی بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم(٣٢/٤ درصد) و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم و سفترياکسون(۲۷ درصد) بوده است. همان‌طور که از نتایج مشخص است، مقاومت به اکثر آنتی بیوتیک‌ها در *اشرشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های بالینی مراکز بیمارستانی نسبت به *اشرشیاکلی* 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).

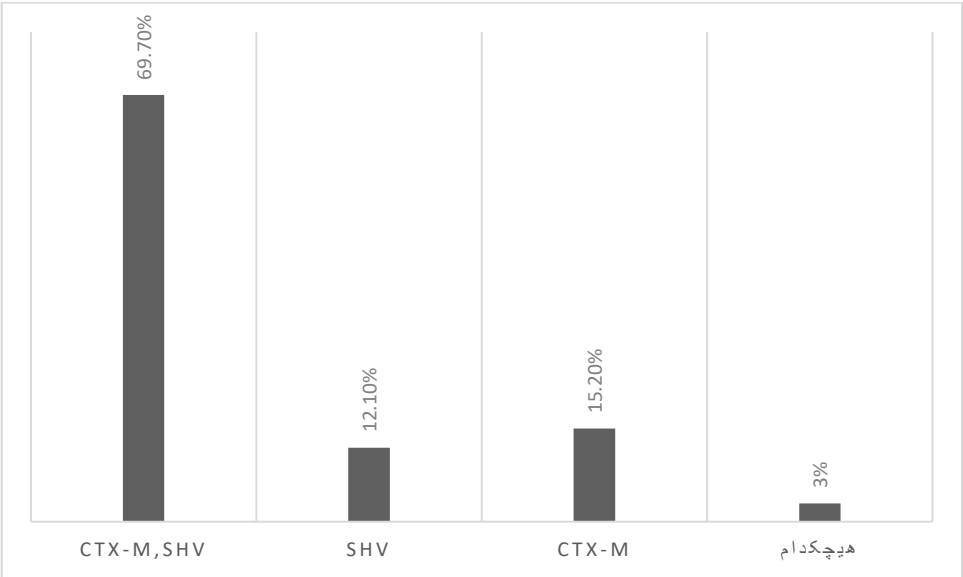
نتایج تست غربالگری اولیه برای شناسایی ایزوله‌های مولد ESBLs نشان داد که از میان ۱۰۰ *اشرشیاکلی* تأیید شده با تست‌های افتراقی، ۳۸ مورد(۳۸ درصد) نسبت به نماینده‌های سفالوسپورینی مقاوم و احتمالاً تولید کننده ESBLs بودند. از میان ۳۸ نمونه مقاوم به نماینده‌های سفالوسپورین پس از انجام تست تأییدی دیسک‌های ترکیبی، ۳۳ نمونه (٨٦/٨ درصد) تولید کننده ESBLs شناسایی شدند که از میان آن‌ها، ٢٦ نمونه(٧٨/٧٩ درصد) از بیمارستان‌ها و ۷ نمونه(۲۱/۲۱ درصد) از مراکز غیربیمارستانی(کلینیک‌ها وآزمایشگاه‌ها) جمع‌آوری شده بودند. از مجموع ۳۳ نمونه تأیید شده مولد ESBLs، ۲۳ نمونه *اشرشیاکلی* واجد ژن‌های کد کننده بتالاکتامازی CTX-M و SHV، ٥ نمونه واجد ژن کد کننده بتالاکتاماز CTX-M و ٤ 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 *اشرشیا کلی* مولد ESBL، ۱۹ جدایه(۸۲/٦ درصد) واجد ژن‌های کد کننده بتالاکتاماز CTX-M و SHV، ۱ جدایه(۲۵ درصد) واجد ژن کد کننده بتالاکتاماز SHV، ٥ جدایه(۱۰۰ درصد) واجد ژن بتالاکتاماز کد کننده CTX-M و ۱ جدایه(۱۰۰ درصد) که هیچ کدام از ژن‌ها در آن مشاهده نشد، مربوط به نمونه‌های بیمارستانی و ٤ جدایه(۱۷/٤ درصد) واجد ژن‌های کد کننده بتالاکتاماز SHV و CTX-M و ۳ جدایه (۰/ ۷٥ درصد) واجد ژن کد کننده بتالاکتاماز SHV از مراکز غیر بیمارستانی بودند.

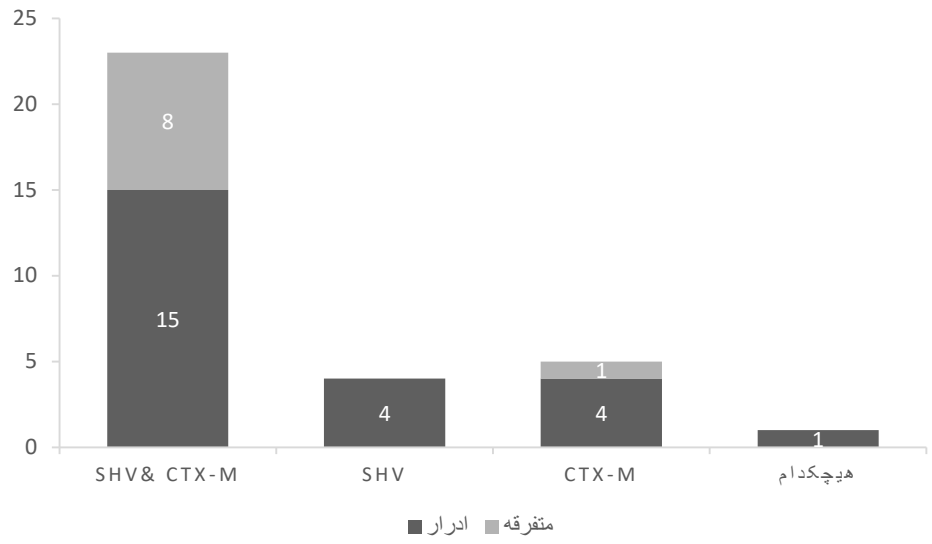
در شکل۲ از ۳۳/*شرشیا کلی* مولد بتالاکتاماز CTX-M و SHV، تعداد نمونه‌های ادراری به تفکیک از سایر نمونه‌ها نشان داده شده است. نتیجه آزمون نسبت درست نمایی، نشان داد که رابطه‌ای بین نوع نمونه‌ها و حضور ژن‌ها وجود نداشت(x_3^2 ،X=۳/۹٥ ،p>۰/۰٥).

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)
سفتریاکسون	٤۹/۲	۲۷
سفوتاکسیم	٥۲/٤	۳۲/٤
سفتازیدیم	٤۹/۲	۲۷
سفپیم	٤٥/۲	۳۰/٦



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



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

بحث

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.

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 کد کننده CTX-M و ۱۲/۱ درصد واجد ژن کد کننده SHV بودند و در یکی از جدایه‌ها(۳/۰ درصد) هیچ‌کدام از ژن‌های کد کننده CTX-M و SHV حضور نداشتند. محسن میرزایی و همکاران ارتباط بین حضور ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف و الگوی حساسیت ضدمیکروبی در جدایه‌های بالینی *اشرشیاکلی* را بررسی کردند. از ۱۹۰ جدایه مولد ESBL مورد بررسی ٦٢ جدایه(٣٢/٦ درصد) واجد ژن کد کننده CTX-M، ٦٠ جدایه(٣١/٦ درصد) واجد ژن کد کننده SHV گزارش

شد. هم‌چنین ۷ جدایه(۳/۷ درصد) واجد هیچ‌کدام از ژن‌های مورد بررسی نبود. ۲۵ جدایه(۱۳/۱درصد) 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 *اشرشیاکلی* 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 دوژن کد کننده CTX-M وSHV بودند(۹). هم‌چنین در پژوهش مشابه دیگری لیا او و همکاران، تعداد ۱۶۷ گونه *اشرشیاکلی* تولیدکننده ESBL را طی سال‌های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳ ، از ۹ بیمارستان چین جمع‌آوری کردند. در ۱۶۷ سویه *اشرشیاکلی* 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 دیگرمتفاوت 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 *اشرشیاکلی* 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 مقاومت در برابر همین آنتی‌بیوتیک در مطالعه شاه‌چراغی و همکاران ۳۲ درصد، در مطالعه زابلی و گتابی ۴۲/۴ درصد و در مطالعه شبان پیشه و همکاران ۴۲/۴۸ درصد بیان شده است. میزان مقاومت در مقایسه نتایج به دست آمده از این تحقیق با نتایج حاصل از پژوهش‌های دیگر حاکی از افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سوش‌های *اشرشیاکلی* می‌باشد. در نهایت می‌توان به این نتیجه رسید که مصرف بی‌رویه و خودسرانه دارو به ویژه آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورینی باعث ایجاد درصد بالای مقاومت و هم‌چنین میزان بالای تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف ESBL شده است. در این پژوهش میزان درصد

مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشرشیاکلی* 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 (٥٢/٤ درصد) و در جدایه‌های غیربیمارستانی بیشترین میزان مقاومت باز هم نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با میزان ٣٢/٤ درصد مشاهده شد. موسوی و همکاران ١٠٠ نمونه ادراری از بیمارستان‌های سطح شهر سنندج جمع‌آوری کردند که؛ ٣٧ درصد به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم، ٣٢ درصد به سفتریاکسون، ٢٥ درصد به سفیپم و ٢٧ درصد به سفتازیدیم مقاوم تشخیص داده شدند که تمام نمونه‌ها از مراکز بیمارستانی جمع‌آوری شده بودند(١٣). در این پژوهش، تعداد ١٩ جدایه(٨٢/٦ درصد) از ٣٣ سویه *اشرشیا کلی* فنوتیپ مثبت واجد ژن‌های CTX-M و SHV، از بیمارستان‌ها و ٧ جدایه(٢١/٢ 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 ١٨١ سویه جدا شده از بیمارستان‌ها، ٥٨ درصدESBL مثبت بودند که از این تعداد ١٦جدایه(٣٣ درصد) حاوی ژن SHV ، ٢٨ جدایه(٥٨ درصد) حامل ژن TEM، ٣ جدایه(٦ درصد) حامل هر دو ژن SHV و TEM بودند(١٤).

در مطالعه سرو آزاد و همکاران از تعداد ٩٧ نمونه جمع‌آوری شده از سطح بیمارستان‌ها، ٣٥ درصد جدایه‌ها دارای ژن CTX-M و ٦٣/٩١ درصد جدایه‌ها دارای ژن SHV بودند. ١ جدایه(٠/٢٥ درصد) از ژن SHV در مراکز غیربیمارستانی، همه ٥ جدایه(١٠٠ درصد) از ژن CTX-M و یک جدایه که هیچ‌کدام از ژن‌ها در آن شناسایی نشد، در بیمارستان جمع‌آوری شدند(١٥). در پژوهش مشایخی و همکاران ٢٣ درصد جدایه‌های حاوی ژن SHV از مراکز بیمارستانی بودند، این درحالی است که در مطالعه شبان پیشه وهمکاران از ٣٤٦ نمونه، ٢/٣٥ درصد جدایه‌های جداشده از آزمایشگاه واجد ژن‌های SHV و CTX-M بودند(١٦). 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 ٣٣ سویه‌ی *اشرشیا کلی* (٨٦/٨ درصد) مولد ESBL، تعداد ١٥ جدایه(٦٥/٢ درصد) واجد ژن‌های CTX-M و SHV، ٤ جدایه (١٠٠ درصد) واجد ژن SHV، ٤ جدایه(٨٠ درصد) واجد ژن CTX-M و یک جدایه هیچ کدام از ژن‌ها در آن شناسایی نشد، جدایه‌های ادرار بودند. نتایج آزمون نسبت درست نمایی، نشان داد که رابطه‌ای بین نوع جدایه و حضور

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 ٦٢ درصد از آن‌ها نمونه ادرار، ۲۹ درصد ازنمونه‌ها 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 *اشرشیا کلی*، ۳٦۰ جدایه (۷۲ درصد) از نمونه ادرار، ۵۰ جدایه(۱۰ درصد) از نمونه زخم، ۲۰ جدایه(٤۰ درصد) از نمونه تراشه، ۲۰ جدایه(٤۰ 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، ۵جدایه(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 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 وCTX-M در نمونه‌های بیمارستانی و غیر بیمارستانی رابطه معنی‌داری وجود داشت، به طوری که میزان فراوانی *اشرشیاکلی* تولید کننده SHV وCTX-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.

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 Ahmadi1 A. The occurrence of TEM gene among the extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) producing uropathogenic *Escherichia coli* strains, isolated from Khorramabad city in 2013. Pajoohande 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 β-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 β-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 β-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-β-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.Mashaiekhi 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.Griebling 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.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

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

Moradi A, Ghiasian M*, Ghandehari F

[1]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.