

بررسی مولکولی وجود ژن‌های حدت SHV و TEM در سویه‌های اشریشیاکلی مقاوم به آنتی‌بیوتیک جدا شده از نمونه‌های ادراری شهرستان جیرفت

سینا مشایخی: کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران.

بابک خیرخواه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران.

*کیومرث امینی: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران (*نویسنده مسئول). dr_kumarss_amin@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۹

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: باکتری اشریشیاکلی یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد که به عنوان یکی از رایج‌ترین عوامل عفونت ادراری شناخته شده است. آنزیم‌های بتالاکتامازی، مهمترین عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام در میان باکتری‌های گرم منفی است. با توجه به افزایش روز افزون عفونت ادراری ناشی از اشریشیاکلی مقاوم به آنتی‌بیوتیک هدف از این پژوهش تحقیق پیرامون الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و بررسی وجود ژن‌های بتالاکتاماز (ESBL) SHV و TEM در نمونه‌های اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری می‌باشد.

روش کار: در این پژوهش ۱۸۱ سویه اشریشیاکلی از نمونه‌های ادراری جمع‌آوری شد، سپس بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیک به روش Disk diffusion انجام گرفت. به منظور تایید فنوتیپی اشریشیاکلی‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف (Extended-spectrum beta-lactamases-ESBL) از روش Combined Disk test استفاده گردید و در نهایت حضور ژن‌های بتالاکتامازی SHV و TEM در ایزوله‌های ESBL مثبت توسط روش Multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۱۸۱ ایزوله، ۶۶ (۳۶/۴۶ درصد) ایزوله مقاوم به سفوتاکسیم و ۸۲ (۴۵/۳۰ درصد) ایزوله مقاوم به سفتازیدیم بودند. همچنین ۵۸ درصد ایزوله ESBL مثبت بودند که از این تعداد ۱۶ (۳۳ درصد) ایزوله حامل ژن SHV، ۲۸ (۵۸ درصد) ایزوله حامل ژن TEM و همچنین ۳ (۶ درصد) ایزوله‌ها حامل هر دو ژن SHV و TEM بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه تولید ESBL تهدیدی بزرگ برای جامعه به شمار می‌رود بنابراین ضروری به نظر می‌رسد که برای شناسایی این نوع از مقاومت‌ها از روش‌های مولکولی مناسب در کنار سایر روش‌های فنوتیپی استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: اشریشیاکلی، عفونت ادراری، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بتالاکتاماز وسیع الطیف

مقدمه

خانواده انتروباکتریاسه، بتالاکتامازهایی را تولید می‌کنند که توسط پلازمیدها کد می‌شوند. از جمله مهم‌ترین این بتالاکتامازها می‌توان TEM و SHV را نام برد. این آنزیم‌ها که با نام بتالاکتامازهای وسیع الطیف (Extended-spectrum beta-lactamases -ESBL) شناخته می‌شوند، قادر به تخریب سفالوسپورین‌های با طیف اثر وسیع مانند سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفتازیدیم می‌باشند (۳).

مکانیسم‌های مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مختلف و متفاوت هستند، یکی از این مکانیسم‌ها تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی در

اشریشیاکلی یکی از پنج گونه موجود در جنس اشریشیا از تیره اشریشییه و از خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد، این باکتری اولین بار در سال ۱۸۸۵ توسط Van Theodore Escherich شناسایی گردید (۱). عفونت‌های دستگاه ادراری یکی از رایج‌ترین عفونت‌های باکتریایی هستند که اغلب توسط سویه‌های اشریشیاکلی‌های یورپاتوزنیک ایجاد می‌شوند. عفونت‌های دستگاه ادراری ایجاد شده در اثر این باکتری شامل طیف وسیعی از اختلالات از جمله عفونت مثانه، التهاب و عفونت میزنا و پیلونفریت هستند (۱). اعضای

جنس یا وجود ژن های مختلف در یک اندامگان (Organism) است (۷).

در سال های اخیر در بسیاری از گزارش ها شاهد افزایش میزان بروز عفونت ادراری به واسطه باکتری اشریشیا کلی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف هستیم (۸-۱۰). با توجه به اهمیت بسیار زیاد این نوع مقاومت آنتی بیوتیکی بررسی الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی و وجود ژن های بتالاکتامازی TEM و SHV در نمونه های بالینی اشریشیاکلی به عنوان اهداف این پژوهش در نظر گرفته شد.

روش کار

نمونه گیری و جداسازی باکتری: در یک مطالعه توصیفی در طی سال های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۲ نمونه های مربوط به عفونت های مجاری ادراری افراد مراجعه کننده به بیمارستان های شهر جیرفت جمع آوری شد و مورد مطالعه قرار گرفت. ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری طی یک دوره ۵ ماهه جمع آوری شده و نمونه های مربوطه در ظروف مخصوص، جمع آوری و کد گذاری شدند. نمونه های باکتریایی (اشریشیا کلی) تایید شده نهایتاً در محیط نوترینت آگار تلقیح و پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در جعبه های یونولیت در مجاورت یخ (با رعایت زنجیره سرد) ظرف مدت ۲-۳ ساعت به آزمایشگاه گروه پژوهشی میکروب شناسی پاسارگاد منتقل گردیدند. نمونه ها ابتدا در محیط مک کانکی و آگار خوندار کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون کلونی های لاکتوز مثبت از محیط مک کانکی به محیط EMB به عنوان یک محیط کشت انتخابی، منتقل شدند، و در نهایت برای شناسایی /اشریشیا کلی، تست های بیوشیمیایی ایندول و متیل رد، ووژپرسکائر و سیترات جهت تایید قطعی باکتری اشریشیا کلی بر روی باکتری ها انجام گرفت.

ارزیابی حساسیت ضد میکروبی: حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها به روش دیسک دیفیوژن (کربی-بائر) بر روی محیط کشت مولر

باکتری ها است. آنزیم های بتالاکتاماز در باکتری ها بسیار متنوع اند و در پاسخ به فشار انتخابی آنتی بیوتیک، دائماً در حال موتاسیون و یا جایگزینی اسیدهای آمینه به ویژه در جایگاه فعال آنزیم هستند به طوری که باعث ظهور انواع جدیدی از بتالاکتامازهای با طیف وسیع (ESBL) شده است (۳ و ۱). بیش از ۱۵۰ نوع ESBL از کشورهای مختلف گزارش شده که غالباً باکتری های انتروباکتریاسه مولد آن هستند (۳).

اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، کلبسیلا اکسیتوکا، پروتئوس میرابیلیس، انتروباکتر کلوآکه، مورگانلا مورگانئی، سراثیا مارسنس، بورخولدريا سپاشیا، کاپنوسیتوفاگا اوچراسه، اسپینتوباکتر، گونه های سیتروباکتر و سالمونلا از جمله انتروباکتریاسه هایی هستند که تولید این نوع از بتالاکتامازها در آن ها مشاهده شده است (۴، ۵). درمان عفونت های حاصل از باکتری های مولد ESBL در جامعه بسیار بغرنج است به دلیل اینکه بسیاری از ژن های ESBL بر روی پلاسمیدهای بزرگی قرار دارند که علاوه بر مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین ها همزمان حامل سایر ژن های مقاومت به عوامل ضد میکروبی مانند کلرامفیکل، آمینوگلیکوزیدها، سولفونامیدها و تتراسایکلین ها نیز هستند (۶).

از آنجایی که انجام تست های فنوتیپی به تنهایی قادر به تعیین سویه های مولد انواع آنزیم های ESBL نمی باشد لذا، روش های مولکولی یکی از کارآمدترین روش ها در تشخیص ژن های مرتبط با ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی می باشند و استفاده از این روش ها علی رغم هزینه های بالا نسبت به روش های فنوتیپی در تعیین سویه های مقاوم حائز اهمیت خواهد بود. روش Multiplex PCR یک روش اختصاصی جهت تکثیر اسیدنوکلئیک و نوع تغییر یافته ی از PCR است که در آن دو یا بیش از دو لوکوس از ژن به طور هم زمان در یک واکنش تکثیر می شود. امروز از این روش در شناسایی سریع و هم زمان بیماری زاها، بررسی کیفیت و کمیت نمونه ها و تشخیص بیماری های ژن شناختی استفاده می شود. Multiplex PCR نشان دهنده وجود یک بیماری زای خاص در میان دیگر باکتری ها یا تمایز گونه ها یا سویه ها در یک

جدول ۱- مشخصات پرایمر های استفاده شده در آزمایش Multiplex PCR

Primer name	Sequence	Amplicon size in bp	refrence
F-SHV	ATGCGTTATATTCGCCTGTG	747	(30)
SHV-R	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA		
TEM-F	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA	445	(30)
TEM-R	ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT		

ایزوپروپانول سرد، DNA رسوب داده شد. شستشو با اتانول ۷۰ درصد انجام گرفت و پس از حذف الکل، رسوب خشک شده در ۳۰ میکرولیتر بافر TE و ۲ میکرولیتر آنزیم RNaseA با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر حل گردید. برای ارزیابی DNA تخلیص شده از روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. پس از اطمینان از خلوص مناسب DNA، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری غلظت نمونه‌های استخراج شده، از دستگاه نانودراپ و طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده گردید.

واکنش Multiplex PCR: طبق بررسی‌های به عمل آمده و مرور مطالعات انجام شده قبلی توسط سایر محققین، جفت پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی ژن‌های حدت SHV و TEM انتخاب گردید (جدول ۱). جهت اطمینان از عملکرد پرایمرهای مورد استفاده، با استفاده از نرم افزار Oligo 5 برخی ویژگی‌های پرایمرها مانند میزان GC، دمای Tm، احتمال تشکیل لوپ و جفت‌شدگی بررسی شد. پرایمرها توسط شرکت سینا کلون سنتز گردید.

به منظور بهینه‌سازی روش PCR، مقادیر و غلظت‌های مختلف MgCl₂، dNTPs و DNA ژنومی و همچنین دماهای مختلف برای مرحله اتصال پرایمرها مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR (10X) ۲ میکرولیتر، dNTPs ۰٫۲ میلی مول، پرایمرها هر کدام ۰٫۵ میکرومول و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمرز، ۲ میلی مول، DNA الگو ۱۵۰ نانوگرم و آب مقطر استریل ۱۰٫۵ میکرولیتر راه‌اندازی گردید (تمامی مواد PCR از شرکت سیناکلون تهیه شد).

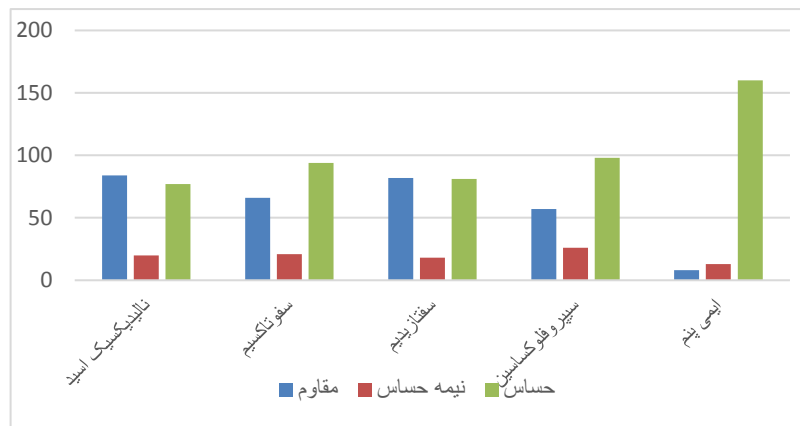
واکنش PCR به صورت Multiplex با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر Bio RAD انجام شده و

هینتون آگار (مرک آلمان) و بر اساس دستور العمل موسسه CLSI (۱۱) و با استفاده از دیسک‌های سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم) تهیه شده از شرکت پادتن طب انجام گرفت.

تست فنوتیپی تاییدی: هدف از این آزمایش جداسازی سوش‌های تولیدکننده ESBLs بود. دیسک‌های مورد آزمایش سفنازیدیم/کلاولانیک اسید (CA:10μg / CAZ:30μg)، سفوتاکسیم /کلاولانیک اسید (CTX:30μg/CA:10μg)، سفوتاکسیم و سفنازیدیم بود. بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تولید ESBLs از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی‌متر و یا بیشتر در اطراف دیسک سفنازیدیم-کلاولانیک اسید و یا سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید بر طبق ضابطه Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) تعیین گردید.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از روش Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) استفاده شد (۱۲). برای تخلیص DNA، بافر TE به رسوب باکتری اضافه و همگن شد. مقدار ۳ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۳۰ میکرولیتر از SDS ۱۰ درصد به میکروتیوب اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری، ۱۰۰ میکرولیتر محلول کلرید سدیم ۵ مولار و ۶۰ میکرولیتر از CTAB/NaCl اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، در ادامه با استفاده از مخلوط کلروفرم-ایزوامیل‌الکل (به نسبت ۱:۲۴) پروتئین‌ها حذف شد و با استفاده از



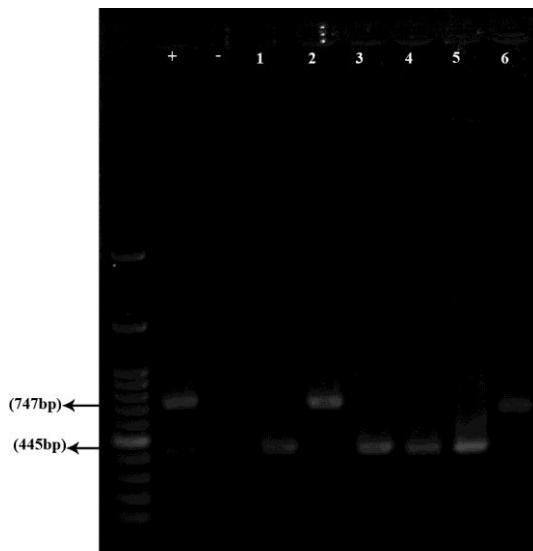
نمودار ۱- مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های مورد بررسی در این پژوهش

برنامه دمایی استفاده شده شامل مرحله واسرشت اولیه در درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل مرحله واسرشت در درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در درجه حرارت ۵۵ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۴۵ ثانیه، مرحله تکثیر در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۱ دقیقه انجام شد. در انتها نیز مرحله تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. واکنش PCR بر روی باکتری اشریشیا کلی دارای ژن های SHV و TEM که از گروه پژوهشی میکروب شناسی پاسارگاد تهیه شده بود، به عنوان کنترل مثبت انجام شد.

جهت انجام الکتروفورز، ۶ میکرولیتر محصول PCR به همراه ۱ میکرولیتر بافر نمونه گذاری الکتروفورز (6X) مخلوط گردید و بر روی ژل آگارز ۱،۵ درصد ساخته شده با بافر TAE 1X، به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز گردید، سپس با رنگ اتیدیوم برمایند رنگ آمیزی و در نهایت زیر نور ماورای بنفش مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

در این پژوهش از مجموع ۲۳۱ نمونه گرفته شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری تعداد ۱۸۱ جدایه/شریشیا کلی پس از انجام تست‌های تاییدی بیوشیمیایی جداسازی گردیدند. از این تعداد ۱۴۵ نمونه (۸۰،۱۱ درصد) مربوط به زنان و ۳۶ نمونه



شکل ۲- نتایج آزمایش Multiplex-PCR برای ژن های TEM و SHV، نمونه مثبت گرفته شده از گروه پژوهشی میکروب شناسی پاسارگاد، نمونه منفی *E. coli* ATCC 25922 (وزن مولکولی مارکر 100bp)

مطالعه ای که توسط شاهچراغی و همکاران در سال ۱۳۸۶ انجام گرفت الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای تمامی نمونه‌ها نسبت به پنج آنتی‌بیوتیک بررسی شد و بیشترین مقاومت سویه‌ها (۴۲٫۹٪) به کوترموکسازول بود (۱۸). در مطالعه انجام شده توسط مهرگان در سال ۲۰۰۸، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کل نمونه‌ها نسبت به ۱۸ دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک بررسی شد که بیشترین مقاومت به تتراسایکلین (۹۴٫۵٪) بود (۱۹).

در مطالعه حاضر، سویه‌هایی که مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بودند به منظور انجام تست تاییدی جهت تولید ESBL با استفاده از روش (Double Disk) از نظر فنوتیپی مورد بررسی قرار گرفتند که ۵۸٫۵۳ درصد تولید کنند آنزیم‌های بتالاکتامازی وسیع الطیف بودند. نتایج منتشره از تحقیقات علمی مختلف نشان می‌دهد که درصد سویه‌های اشریشیا کلی تولید کننده ESBL در مطالعه انجام شده توسط فاضلی در سال ۱۳۸۶ (۵۳٫۹٪) (۲۰)، مهرگان در سال ۲۰۰۸ (۶۷٫۲٪) (۱۹)، Van Cao در سال ۲۰۰۲ (۳۲٪) در ویتنام (۲۱)، Bali در سال ۲۰۰۴ (۸۴٪) در ترکیه (۲۲)، نتایج مختلف از کشورهای مختلف بیانگر این است که متأسفانه شیوع باکتری‌های تولید کننده ESBL بالا می‌باشد و بیش از نیمی از سویه‌های تولید کننده ESBL هستند که این مسئله منجر به شکست درمان می‌گردد و میزان ESBL در سویه‌های ایزوله شده از کشورهای مختلف و همچنین در یک کشور و در هر بیمارستان متفاوت می‌باشد که این مسئله به سیستم کنترل عفونت در رژیم درمانی بستگی دارد (۲۳).

بتالاکتام‌ها انواع مختلفی دارند که از آن جمله می‌توان به آنزیم‌های نوع SHV و TEM اشاره نمود. میزان شیوع ESBL در میان باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه از کشوری به کشور دیگر و از بیمارستانی به بیمارستان دیگر متفاوت است. امروزه گزارش‌های متعددی، حاکی از شیوع مقاومت‌های چندگانه دارویی با واسطه انواع مختلف ESBL خصوصاً آنزیم‌های تیپ SHV،

نتایج آزمون Multiplex PCR: از تعداد ۴۸ ایزوله مولد ESBLs که توسط روش فنوتیپی تایید شدند، ۱۶ (۳۳٫۳۳ درصد) ایزوله حامل ژن SHV، ۲۸ (۵۸٫۳۳ درصد) ایزوله حامل ژن TEM و همچنین ۳ (۶٫۲۵ درصد) ایزوله‌ها حامل هر دو ژن SHV و TEM بودند (شکل ۱).

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت ادراری شایع‌ترین عفونت بیمارستانی در بین انسان‌ها است. طبق مطالعات انجام شده ۹۰ درصد از عفونت‌های ادراری توسط اشریشیا کلی ایجاد می‌شود (۱۳). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که اشریشیا کلی جدا شده از انسان مهم‌ترین پاتوژنی است که افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به اغلب داروهای ضد میکروبی خصوصاً نسل اول آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف مثل آمپی سیلین (۱۴) و سومین نسل سفالوسپورین‌ها و آمینوگلیکوزید و حتی فلورکئینولون نشان می‌دهد (۱۵). اطلاع ما از فراوانی این ایزوله‌های مقاوم در زمان‌های مختلف باعث خواهد شد تا میزان تاثیر داروهای مختلف در درمان عفونت‌های ادراری شایع مشخص گردد.

ژن‌های بتالاکتامازی در باکتری به‌ویژه ژن‌های ESBLs، یکی از عوامل موثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله سفالوسپورین‌های وسیع الطیف است (۱۶).

ژن‌های عامل مقاومت به بتالاکتام‌ها اغلب پلاسمیدی بوده و از آنجایی که این پلاسمیدها به راحتی در میان انواع مختلفی از باکتری‌ها به‌ویژه در خانواده انتروباکتریاسه انتقال می‌یابند، تجمع ژن‌های مقاوم منجر به ایجاد سویه‌هایی با مقاومت دارویی چندگانه می‌گردد (۱۷). افزایش مصرف داروهای بتالاکتام وسیع الطیف و بستری طولانی مدت بیماران سبب انتشار باکتری‌های تولید کننده ESBL می‌شوند.

در مطالعه حاضر جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن توسط پنج دیسک آنتی‌بیوتیکی انجام گرفت که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به نالیدیکسیک اسید (۴۶٫۶٪) بود. در

هستیم با توجه به اینکه تولید ESBL تهدیدی بزرگ برای جامعه به شمار می‌رود بنابراین ضروری به نظر می‌رسد که برای شناسائی این نوع از مقاومت‌ها از روش‌های مولکولی مناسب در کنار سایر روش‌های فنوتیپی استفاده شود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان بر خود لازم می‌داند تا از گروه پژوهشی میکروب‌شناسی پاسارگاد تقدیر و تشکر نمایند.

منابع

1. Młynarczyk G, Młynarczyk A, Bilewska A, Dukaczewska A, Goławski C, Kicman A, et al. High effectiveness of the method with ceftiofime in detection of extended-spectrum beta-lactamases in different species of gram-negative bacilli. *Med Dosw Mikrobiol* 2006;58(1):59-65.
2. Riccabona M. Urinary tract infections in children. *Curr Opin Urol* 2003;13(1):59-62.
3. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci* 2015;22(1):90-101.
4. Sinha M, Srinivasa H, Macaden R. Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter* species. *Indian J Med Res* 2007;126(1):63-7.
5. Palasubramaniam S, Muniandy S, Navaratnam P. Rapid detection of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in blood cultures by fluorescent in-situ hybridization. *J Microbiol Methods* 2008;72(1):107-9.
6. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003;47(4):273-95.
7. Dalmaso A, Civera T, Bottero MT. Multiplex primer-extension assay for identification of six pathogenic vibrios. *Int J Food Microbiol* 2009;129(1):21-5.
8. Picozzi S, Ricci C, Gaeta M, Macchi A, Dinang E, Paola G, et al. Do we really know the prevalence of multi-drug resistant *Escherichia coli* in the territorial and nosocomial population? *Urol Ann* 2013;5(1):25-9.
9. Briongos-Figuero LS, Gómez-Traveso T, Bachiller-Luque P, Domínguez-Gil González M, Gómez-Nieto A, Palacios-Martín T, et al. Epidemiology, risk factors and comorbidity for urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing

TEM و CTX در نقاط مختلف دنیا می‌باشد. این مطالعات مقاومت‌های چندگانه دارویی باکتری‌ها را یکی از معضلات عمده پزشکی دانسته و بر لزوم بررسی و کنترل آن‌ها تاکید دارند (۲۴ و ۲۵).

به واسطه اهمیت اشريشيا کلي به خصوص اشريشيا کلي‌های مولد ESBLs‌ها در بروز عفونت‌های ادراری، مطالعات مختلفی در نقاط مختلف ایران و سایر کشورها انجام گرفته است.

منصوری و همکاران در پژوهشی که در مورد ۲۰۰ ایزوله/اشريشيا کلي انجام دادند تعداد ایزوله‌های/اشريشيا کلي مولد آنزيم ESBL را ۶۳ درصد تشخیص دادند که در پژوهش حاضر ۵۸ درصد ایزوله‌های/اشريشيا کلي مولد آنزيم ESBL بودند (۲۶). مسجديان و همکاران نشان دادند که از میان ۱۴۸ سویه اشريشيا کلي، ۸۶/۴ درصد ایزوله‌ها ژن TEM را در برداشتند در حالی که میزان شیوع این ژن در نمونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش ۵۸ درصد بود (۲۷). مطالعات مشابهی در ترکیه نشان داده شد که حدود ۵۲ درصد سویه‌های اشريشيا کلي دارای ژن TEM و حدود ۷۴ درصد دارای ژن SHV بوده‌اند که در مقایسه با نتایج پژوهش حاضر مشاهده می‌شود تقریباً میزان شیوع TEM تفاوت فاحشی با این پژوهش نداشته است (۲۸). در پژوهشی که سیدجوادى و همکاران در سال ۲۰۱۶ داشتند مشخص شد که حدود ۴۱ درصد نمونه‌های/اشريشيا کلي مولد آنزيم ESBL بودند و از این میان ۶۷ درصد نمونه‌ها دارای ژن TEM و ۴۵ درصد نمونه‌ها دارای ژن SHV بودند که در قیاس با نتایج بررسی پژوهش حاضر شاهد کاهش شیوع این ژن‌ها در این بررسی هستیم (۲۹).

مقایسه نتایج پژوهش دیگران با نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که میزان ESBL در سویه‌های ایزوله شده از کشورهای مختلف و هم‌چنین در یک کشور از یک بیمارستان با بیمارستان دیگر متفاوت می‌باشند، که این مسئله بستگی به سیستم کنترل عفونت و نحوه درمان بیماران آن بیمارستان دارد. با دقت در مطالعات صورت گرفته شاهد شیوع بالای ژن‌های بتالاکتامازی به خصوص تیپ TEM و SHV در سویه‌های اشريشيا کلي

Agent Chemother 2002;46: 3739-43.

22. Bali E, Acik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM-, CTX-M and extended-spectrum B-lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacterbaumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. *Afr J Microbiol Res* 2010;4:650-4.

23. Yazdi M, Nazemi A, Mirnargesi M. [The Prevalence of beta-lactamase resistance SHV/CTX-M/TEM genes in *E.coli* strain isolated from urine samples in Tehran, Iran]. *J Lab Med* 2009;4:48-54. [Persian].

24. Pałucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Concurrent outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw hospital. *J Antimicrob Chemother* 1999 Oct;44(4):489-99.

25. Nüesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hächler H. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(5):943-9.

26. Mansouri M, Abbasi S. Prevalence of multiple drug resistant clinical isolates of extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in southeast Iran. *IJMS* 2015;35(2):101-8. [Persian].

27. Masjedian G, Valehi F, Talebi A, Rastegar L. Molecular evaluation of resistance to expanded antibiotics in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Med Microbiol* 2006;1(2):27-34. [Persian].

28. Taşlı H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based Enterobacteriaceae in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2005;58(3):162-7.

29. Seyedjavadi SS, Goudarzi M, Sabzehali F. Relation between blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genes and acute urinary tract infections. *J Acute Dis* 2016;5(1):71-6.

30. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson M V, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS* 2007;115(12):1400-8.

enterobacteria. *Int J Clin Pract* 2012;66(9):891-6.

10. Lu PL, Liu YC, Toh HS, Lee YL, Liu YM, Ho CM, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: 2009-2010 results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Int J Antimicrob Agents* 2012;40 Suppl:S37-43.

11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 27th informational supplement, M100-17. Wayne: CLSI, 2017.

12. Wang TY, Wang L, Zhang JH, Dong WH. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genet Mol Res* 2011;10(1):519-25.

13. Beyene G, Tsegaye W. Bacterial Uropathogens in Urinary Tract Infection and Antibiotic Susceptibility Pattern in Jimma University Specialized Hospital, Southwest Ethiopia. *Ethiop J Health Sci* 2011;21(2):141-6.

14. Jan N, Meshram S, Kulkarni A. Plasmid profile analysis of multidrug resistant *E.coli* isolated from UTI patients of Nagpur city, India. *Rom Biotech Let* 2009;14(5):4635-40.

15. Novakova I, Kacaniová M, Hascik P, Pavlicova S, Hleba L. The resistance to antibiotics in strains of *E. coli* and enterococcus sp. Isolated from rectal swabs of lambs and calves. *Lucr Stiint Zooteh Sibiotehnologii* 2009;42(2):322-6.

16. Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, et al. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis* 2005 Jan;11(1):54-61.

17. Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol* 2015;17:11-21.

18. Shahcheraghi F, Nasiri S, Noviri F. Detection of blaTEM & blaSHV antibiotic resistant genes in *E.coli* strain isolated from clinical specimens from hospitals in Tehran, Iran. *J Med Microbiol* 2007;1:1-8. [Persian].

19. Mehrgan H, Rahbar M. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. *Int J Antimicrob Agent* 2008;31:147-51. Persian.

20. Fazeli H, Hoseini M, Mohammadi P. [Frequency and antibiotic susceptibility of ESBL-producing *Escherichia coli* in clinical samples isolated from Alzahra Hospital in Esfahan, Iran]. *Sharkord J Med Sci* 2008;10:58-64. Persian.

21. Cao V, Lambert T, Quynh ND, Kim-Loan H, Hoang N, Arlet G, Courvalin P. Distribution of extended-spectrum beta-Lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. *J Antimicrob*

Molecular study of virulence genes SHV and TEM in antibiotic resistant *Escherichia coli* strains isolated from urethral specimens in city of Jiroft

Sina Mashaieki, MSc, Department of Microbiology, Sirjan Branch Islamic Azad University, Sirjan, Iran.

Babak Kheirkhah, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

Kumarss Amini, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran (*Corresponding author). dr_kumarss_amin@yahoo.com

Abstract

Background: *Escherichia coli* (*E.coli*) bacteria are member of Enterobacteriaceae which are one of the common causes of urinary tract infections. Beta-lactamase enzymes are important factors for antibiotic resistance of beta-lactam family in gram-negative bacteria. According to increasing rate of urinary tract infections due to antibiotic resistant *E. coli*, the aim of this study was to study the antibiotic sensitivity pattern relative to beta-lactam antibiotics and the presence of SHV and TEM beta-lactamase genes in *E. coli* specimens isolated from patients with urinary tract infections.

Methods: In a descriptive study, 181 *E.coli* strains are collected from urine of patients with urinary tract infections and then the sensitivity of the antibiotic is measured by Disk diffusion method. Combined Disk test is used for confirming ESBL-producing *E. coli* phenotype and finally, the presence of SHV and TEM beta-lactamase genes in ESBL positive isolates were analyzed by multiplex PCR.

Results: From 181 isolates, 66 strains (36.46%) were resistant to cefotaxime and 82 strains (45.30%) were resistant to ceftazidime. Also, 58 percent of isolates were ESBL positive, 16 strains (33%) of them were the carrier of SHV gene and 28 strains (58%) were the carrier of TEM gene and also 3 isolates (6%) were the carrier of both TEM and SHV genes.

Conclusion: According to the production of ESBL which is considered as a great threat to society, it seems it is essential to use suitable molecular methods along with other phenotypic methods to identify this type of resistance.

Keywords: *E. coli*, Urinary tract infections, Antibiotic resistance, Broad range beta-lactamase