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_amini@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۹

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 آنتی بیوتیک هدف از این پژوهش تحقیق پیرامون الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام و بررسی وجود ژن‌های بتالاکتاماز (ESBL) SHV و TEM در نمونه های اشریشیاکلی جداشده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری می باشد.

روش کار: در این پژوهش ۱۸۱ سویه اشریشیاکلی از نمونه‌های ادرار افراد مبتلا به عفونت ادراری جمع آوری شد، سپس بررسی حساسیت آنتی بیوتیک به روش Disk diffusion انجام گرفت. به منظور تایید فنوتیپی اشریشیاکلی های 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 ۵۸درصد 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 شناسائی این نوع از مقاومت‌ها از روش‌های مولکولی مناسب در کنار سایر روش‌های فنوتیپی استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: اشریشیاکلی، عفونت ادراری، مقاومت آنتی بیوتیکی، بتالاکتاماز وسیع الطیف

مقدمه

اشریشیا کلی یکی از پنج گونه موجود در جنس اشریشیا از تیره اشریشیه 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 اشریشیا کلی‌های یوروپاتوژنیک ایجاد می‌شوند. عفونت‌های دستگاه ادراری ایجاد شده در اثر این باکتری شامل طیف وسیعی از اختلالات ازجمله عفونت مثانه، التهاب و عفونت میزنای و پیلونفریت هستند (۱). اعضای خانواده انتروباکتریاسه، بتالاکتامازهایی را تولید می‌کنند که توسط پلازمیدها کد می‌شوند. ازجمله مهم‌ترین این بتالاکتامازها می‌توان TEM و SHV را نام برد. این آنزیم‌ها که با نام بتالاکتامازهای وسیع الطیف (Extended-spectrum -ESBL beta-lactamases) 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

باکتری‌ها است. آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری‌ها بسیار متنوع‌اند و در پاسخ به فشار انتخابی آنتی‌بیوتیک، دائماً در حال موتاسیون و یا جایگزینی اسیدهای آمینه به‌ویژه در جایگاه فعال آنزیم هستند به‌طوری‌که باعث ظهور انواع جدیدی از بتالاکتامازهای با طیف وسیع (ESBL) شده است (۱و۳). بیش از ۱۵۰ نوع ESBL از کشورهای مختلف گزارش شده که غالباً باکتری‌های انتروباکتریاسه مولد آن هستند (۳).

اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، کلبسیلا اکسیتوکا، پروتئوس میرابیلیس، انتروباکتر کلواکه، مورگانلا مورگانئی، سراشیا مارسسنس، بورخولدریا سپاشیا، کاپنوسیتوفاگا اوچراسه، اسینتوباکتر، گونه های سیتروباکتر و سالمونلا ازجمله انتروباکتریاسه هایی هستند که تولید این نوع از بتالاکتامازها در آن ها مشاهده شده است(۴، ۵). درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌های 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 کلرامنفیکل، آمینوگلیکوزیدها، سولفونامیدها و تتراسایکلین ها نیز هستند (۶).

از آنجایی که انجام تست های فنوتیپی به تنهایی قادر به تعیین سویه‌های مولد انواع آنزیم‌های ESBL نمی‌باشد لذا، روش های مولکولی یکی از کارآمدترین روش ها در تشخیص ژن های مرتبط با ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشند و استفاده از این روش ها علی رغم هزینه های بالا نسبت به روش های فنوتیپی در تعیین سویه‌های مقاوم حائز اهمیت خواهد بود. روش Multiplex PCR یک روش اختصاصی جهت تکثیر اسیدنوکلئیک و نوع تغییر یافته‌ی 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 بیماری‌زای خاص در میان دیگر باکتری‌ها یا تمایز گونه‌ها یا سویه‌ها در یک 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 (۱۰-۸). با توجه به اهمیت بسیار زیاد این نوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی بررسی الگوهای حساسیت آنتی‌بیوتیکی و وجود ژن های بتالاکتامازی TEM و SHV در نمونه های بالینی اشیریشیاکلی 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 عفونت‌های مجاری ادراری افراد مراجعه کننده به بیمارستان‌های شهر جیرفت جمع‌آوری شد و مورد مطالعه قرار گرفت. ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری طی یک دوره ۵ ماهه جمع‌آوری شده و نمونه‌های مربوطه در ظروف مخصوص، جمع‌آوری و کد گذاری شدند. نمونه‌های باکتریایی (اشریشیا کلی) تایید شده نهایتاً در محیط نوترینت آگار تلقیح و پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در جعبه‌های یونولیت در مجاورت یخ (با رعایت زنجیره سرد) ظرف مدت ۳-۲ ساعت به آزمایشگاه گروه پژوهشی میکروب شناسی پاسارگاد منتقل گردیدند. نمونه‌ها 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 کلونی‌های لاکتوز مثبت از محیط مک کانکی به محیط EMB به عنوان یک محیط کشت انتخابی، منتقل شدند، و در نهایت برای شناسایی *اشریشیا کلی*، تست‌های بیوشیمیایی ایندول و متیل رد، ووژپرسکائر و سیترات جهت تایید قطعی باکتری اشریشیا کلی بر روی باکتری‌ها انجام گرفت.

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

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		

هینتون آگار (مرک آلمان) و بر اساس دستور العمل موسسه CLSI (۱۱) و با استفاده از دیسک های سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (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 سوش های تولید کننده ESBLs بود. دیسک های مورد آزمایش سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید (CA:10µg/ CAZ:30µg)، سفوتاکسیم /کلاولانیک اسید (CTX:30µg/CA:10µg)، سفوتاکسیم و سفتازیدیم بود. بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجع سانتی گراد، تولید ESBLs از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی‌متر و یا بیشتر در اطراف دیسک سفتازیدیم-کلاولانیک اسید و یا سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید بر طبق ضابطه Clinical and Labaratory standards Institute (CSLI) تعیین گردید.

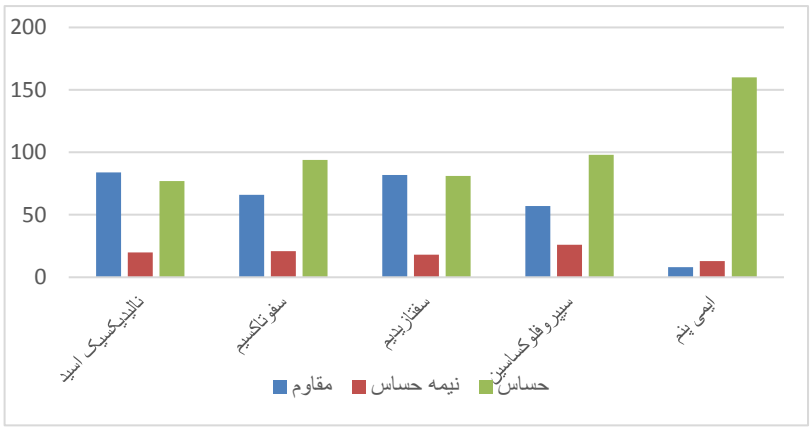
استخراج DNA

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 ۱۰درصد 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- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴) پروتئین ها حذف شد و با استفاده از ایزوپروپانول سرد، DNA رسوب داده شد. شستشو با اتانول ۷۰ درصد انجام گرفت و پس از حذف الکل، رسوب خشک‌شده در ۳۰ میکرولیتر بافر TE و ۲ میکرولیتر آنزیم RNaseA با غلظت۱۰ میلی گرم در میلی‌لیتر 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 اندازه گیری غلظت نمونه های استخراج شده، از دستگاه نانودراپ و طول موج ۲۶۰و ۲۸۰ نانومتراستفاده گردید.

واکنش Multiplex PCR: طبق بررسی های به عمل آمده و مرور مطالعات انجام شده قبلی توسط سایر محققین، جفت پرایمر های اختصاصی برای شناسایی ژن های 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 جفت شدگی بررسی شد. پرایمرها توسط شرکت سینا کلون سنتز گردید.

به منظور بهینه سازی روش PCR، مقادیر و غلظت های 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 بافرPCR (10X) ۲ میکرولیتر، ۰,۲dNTPs میلی مول، پرایمر ها هرکدام ۰,۵ میکرومول و ۱ واحد آنزیم Taqپلیمراز، $MgCl_2$ ۲ میلی مول ، DNA الگو ۱۵۰ نانوگرم و آب مقطر استریل ۱۰,۵میکرولیتر راه اندازی 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



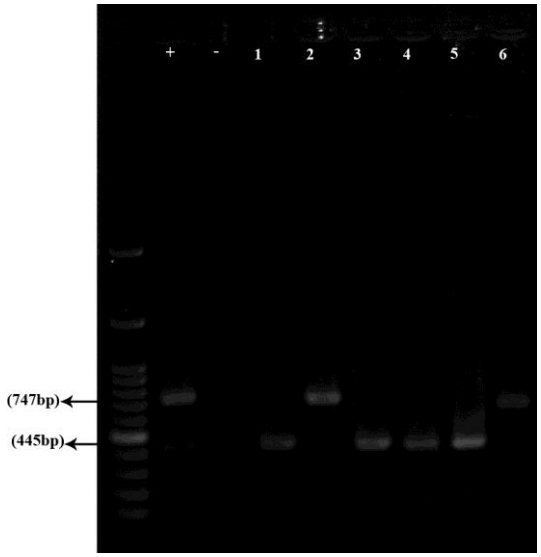
نمودار ۱- مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های مورد بررسی در این پژوهش

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 میکرولیتربافر نمونه گذاری الکتروفورز (6X) مخلوط گردید و بر روی ژل آگارز ۱,۵ درصد ساخته شده با بافرTAE 1X، به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز گردید، سپس با رنگ اتیدیوم برماید 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 *اشریشیا کلی* پس از انجام تست‌های تاییدی بیوشیمیایی جداسازی گردیدند. از این تعداد ۱۴۵ نمونه (۸۰,۱۱ درصد) مربوط به زنان و ۳۶ نمونه (۱۹,۸۸ درصد) مربوط به مردان بود. میزان مقاومت ایزوله ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به شرح ذیل بود: ۸۴ (۴۶,۴ درصد) ایزوله مقاوم به نالیدیکسیک اسید، ۶۶ (۳۶,۴۶ درصد) ایزوله مقاوم به سفوتاکسیم، ۸۲ (۴۵,۳ درصد) ایزوله مقاوم به سفتازیدیم، ۵۷ (۳۱,۴۹ درصد) مقاوم به سیپروفلوکساسین و ۸ (۴,۴۱ درصد) ایزوله مقاومت به ایمی پنم نشان دادند (نمودار ۱). بر اساس نتایج ارزیابی حساسیت ضد میکروبی ۸۲ نمونه که مقاوم به سفتازیدیم-سفوتاکسیم بودند به منظور تایید تولید ESBLs مورد ارزیابی فنوتیپی قرار گرفتند که از این تعداد ۴۸ (۵۸,۵۳ درصد) ایزوله به عنوان مولد ESBLs شناسایی شد.



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)

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 همچنین۳ (۶,۲۵ درصد) ایزوله ها 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 می شود (۱۳). مطالعات اخیر نشان می دهد که *اشریشیا کلی* جدا شده از انسان مهمترین پاتوژنی است که افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به اغلب داروهای ضد میکروبی خصوصا 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 زمان های مختلف باعث خواهد شد تا میزان تاثیر داروهای مختلف در درمان عفونت‌های ادراری شایع مشخص گردد.

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

ژن های عامل مقاومت به بتالاکتام ها اغلب پلاسمیدی بوده و از آنجایی که این پلاسمیدها به راحتی در میان انواع مختلفی از باکتری‌ها به‌ویژه در خانواده انتروباکتریاسه انتقال می یابند، تجمیع ژن های مقاوم منجر به ایجاد سویه‌هایی با مقاومت دارویی چندکانه می گردد (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 سویه ها، آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن توسط پنج دیسک آنتی‌بیوتیکی انجام گرفت که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به نالیدیکسیک اسید (۴۶,۶٪) بود. در مطالعه ای که توسط شاهچراغی و همکاران در سال ۱۳۸۶ انجام گرفت الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای تمامی نمونه ها نسبت به پنج آنتی‌بیوتیک بررسی شد و بیشترین مقاومت سویه ها (۴۲,۹٪) به کوترموکسازول بود (۱۸). در مطالعه انجام شده توسط مهرگان در سال ۲۰۰۸، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کل نمونه ها 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 می دهد 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 متاسفانه شیوع باکتری‌های تولید کننده ESBL بالا می باشد و بیش از نیمی از سویه‌های تولید کننده ESBL هستند که این مسئله منجر به شکست درمان می گردد و میزان ESBL در سویه‌های ایزوله شده از کشورهای مختلف و همچنین در یک کشور و در هر بیمارستان متفاوت می باشد که این مسئله به سیستم کنترل عفونت در رژیم درمانی بستگی دارد (۲۳).

بتالاکتامازها انواع مختلفی دارند که از آن جمله می توان 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 گزارش های متعددی، حاکی از شیوع مقاومت های چندگانه دارویی با واسطه انواع مختلف ESBL خصوصاً آنزیم‌های تیپ SHV،

TEM و CTX در نقاط مختلف دنیا می باشد. این مطالعات مقاومت های چندگانه دارویی باکتری‌ها را یکی از معضلات عمده پزشکی دانسته و بر لزوم بررسی و کنترل آن ها تاکید دارند (۲۴و۲۵).

به واسطه اهمیت اشریشیا کلی به خصوص اشریشیا کلی‌های مولد ESBLs ها 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 *اشریشیا کلی* انجام دادند تعداد ایزوله های *اشریشیا کلی* مولد آنزیم ESBL را ۶۳ درصد تشخیص دادند که در پژوهش حاضر ۵۸ درصد ایزوله‌های *اشریشیا کلی* مولد آنزیم ESBL بودند (۲۶). مسجدیان و همکاران نشان دادند که از میان ۱۴۸ سویه اشریشیا کلی، ۸۶/۴ درصد ایزوله‌ها ژن TEM را در برداشتند در حالی که میزان شیوع این ژن در نمونه های مورد مطالعه در این پژوهش ۵۸ درصد بود (۲۷). مطالعات مشابهی در ترکیه نشان داده شد که حدود ۵۲ درصد سویه‌های *اشریشیا کلی* دارای ژن TEM و حدود ۷۴ درصد دارای ژن SHV بوده اند که در مقایسه با نتایج پژوهش حاضر مشاهده می‌شود تقریباً میزان شیوع TEM تفاوت فاحشی با این پژوهش نداشته است (۲۸). در پژوهشی که سیدجوادی و همکاران در سال ۲۰۱۶ داشتند مشخص شد که حدود ۴۱ درصد نمونه های *اشریشیا کلی* مولد آنزیم ESBL بودند و از این میان ۶۷ درصد نمونه ها دارای ژن TEM و ۴۵ درصد نمونه ها 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 می دهد که میزان ESBL در سویه-های 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 اشریشیا کلی 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 مقاومت ها از روش های مولکولی مناسب در کنار سایر روش های فنوتیپی استفاده شود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان بر خود لازم می داند تاز از گروه پژوهشی میکروب شناسی 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 cefpirome 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. Dalmasso 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

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, Kacaniova 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 antibioticresistant 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 β-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 Esfehan, 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 .Distributionof extended-spectrum β-Lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. J Antimicrob 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. Moulecular evaluation of resistance to espanded antibiotics in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Iran J Med Microbiol 2006;1(2):27-34. [Persian].
28. Taşli 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.

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

Sina Mashaiekhi, 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_amini@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