



بررسی فراوانی و ارتباط حضور ژن‌های بتالاکتامازی *bla*_{SHV}، *bla*_{TEM} و *bla*_{CTX-M} با مقاومت دارویی در *اشریشیا کلی*‌های یوروپاتوژن مقاوم و حساس به چند دارو (MDR) جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر چالوس

ندا مریخی^۱، جمیله نوروژی^{۱*}، علی ناظمی^۲، مهرداد هاشمی^۳، رباب رفیعی طباطبایی^۱

۱- گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

۳- گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های پیشرفته، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

مقاله پژوهشی اصیل

چکیده

مقدمه

این مطالعه با هدف بررسی فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی *bla*_{SHV}، *bla*_{TEM} و *bla*_{CTX-M} و ارتباط حضور این ژن‌ها در سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن مقاوم به چند دارو (MDR) جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر چالوس انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۴۳۷ نمونه کشت مثبت بیمار مبتلا به عفونت ادراری، از بهار ۱۳۹۷ تا زمستان ۱۳۹۸ جمع‌آوری شد. شناسایی سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک با استفاده از آزمایش‌های استاندارد بیوشیمیایی و کیت تشخیصی تجاری انتروباکتریاسه انجام شد. حساسیت دارویی به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، سفازیدیم، سفوتاکسیم، سفکسیم، سفتریاکسون، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، جنتامایسین، نیتروفورانتوئین و آمپی‌سیلین به روش دیسک دیفیوژن (کری-بائر) انجام شد. شناسایی مولکولی *bla*_{CTX-M}، *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. رابطه حضور ژن‌های بتالاکتامازی در سویه‌های MDR سنجیده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از تست آماری مناسب انجام شد.

یافته‌ها

مشخص شد که در میان ۴۳۷ نمونه کشت ادراری مثبت بیمار، ۱۰۶ سویه *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن (۲۴/۳ درصد) وجود دارد. بالاترین سطح مقاومت دارویی نسبت به آمپی‌سیلین (۹۹ درصد) تشخیص داده شد و بیشترین میزان حساسیت دارویی نسبت به سفپیم (۸۳ درصد) و نورفلوکساسین (۸۲ درصد) بود. MDR در ۴۶ جدایه (۴۳ درصد) مشاهده شد. ژن *bla*_{TEM} بیشتر در میان تمام جدایه‌های MDR مثبت (۵۱/۵ درصد) و همچنین ژن *bla*_{CTX-M} نیز بیشتر در میان جدایه‌های MDR مثبت (۶۵/۸ درصد) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، ژن *bla*_{TEM} در میان ژن‌های بتالاکتامازی، ژن غالب بود. همچنین دریافتیم که، حضور ژن *bla*_{CTX-M} می‌تواند در ایجاد MDR نقش داشته باشد.

کلیدواژه‌ها

اشریشیا کلی یوروپاتوژن، عفونت مجاری ادراری، *bla*_{CTX-M}، *bla*_{SHV}، *bla*_{TEM}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۳۰

*نویسنده مسئول: جمیله نوروژی؛

گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم

زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد

تهران شمال، تهران، ایران

تلفن:

پست الکترونیک:

Nowroozij@yahoo.com



مقدمه

عفونت‌های مجاری ادراری (UTI) از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی در انسان است (۱). تخمین زده می‌شود که ۴۰ درصد از زنان و ۱۲ درصد از مردان در طول زندگی خود حداقل یک دوره عفونت ادراری علامت‌دار را تجربه می‌کنند و ۲۷ تا ۴۸ درصد از زنان از عفونت ادراری مکرر رنج می‌برند (۲، ۳). در خانواده *انتروباکتریاسه* باکتری‌هایی مانند *کلبسیلا پنومونیه* (حدود ۷ درصد)، *پروتئوس میرابیلیس* (حدود ۵ درصد)، *سیتروباکتر* و *انتروباکتر* می‌تواند باعث عفونت ادراری شود (۴، ۵). با این حال، در میان گونه‌های باکتریایی درگیر در عفونت‌های ادراری، سویه‌های *شریشیا کلی* یوروپاتوژنیک (UPEC) شایع‌ترین عامل UTI هستند (۶). UPEC حدود ۸۰ درصد عفونت ادراری بدون عارضه، ۹۵ درصد عفونت‌های اکتساب از جامعه و ۵۰ درصد عفونت‌های اکتساب از بیمارستان را تشکیل می‌دهد (۷).

سویه‌های *شریشیا کلی* یوروپاتوژنیک مقاوم به چند دارو (MDR) در سراسر جهان شیوع یافته است که منجر به ایجاد یک معضل بزرگ در بهداشت عمومی شده‌اند (۸، ۹). MDR به نوعی از مقاومت دارویی اطلاق می‌شود که باکتری حداقل به دو کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم باشد (۱۰). یکی از دلایل انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی (AMR) در سویه‌های UPEC که شیوع جهانی آنها را در دام و انسان تحت تأثیر قرار داده است، تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) است (۱۱). مطالعات نشان داده است که بیماران مبتلا به عفونت‌های ناشی از ارگانسیم‌های تولید کننده ESBL در مقایسه با مبتلایان به ارگانسیم‌های غیر تولید کننده ESBL، نتیجه ضعیف‌تری در مقابل درمان‌های آنتی‌بیوتیکی

خواهند داشت، که می‌تواند منجر به افزایش هزینه‌های درمانی شود (۱۲، ۱۳). بیماران مبتلا به عفونت‌های تولید کننده ESBL ممکن است مدت زمان بیشتری در بیمارستان بستری شوند که این امر می‌تواند منجر به عوارض مخرب و حتی کشنده در بیمار شود (۱۴).

ESBL‌ها گروهی از آنزیم‌ها هستند که بتالاکتام‌های اکسی ایمینو از جمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف (به جز سفامایسین‌ها و کارباپنم‌ها) را هیدرولیز می‌کنند (۱۵). تاکنون انواع مختلفی از ESBL شناسایی شده است. با این حال، رایج‌ترین آن‌ها مشتقات آنزیم‌های SHV، TEM و CTX-M هستند. سویه‌های UPEC با تولید بتالاکتامازهای CTX-M، TEM و SHV که به ترتیب توسط ژن‌های *bla*_{CTX-M}، *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} کد می‌شوند، در برابر پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و آزترونام مقاوم می‌شوند (۱۶، ۱۷). شناسایی دقیق شیوع سویه‌های UPEC تولید کننده ESBL در بین بیماران ایرانی مبتلا به عفونت ادراری برای مدیریت صحیح درمان بیماران و جلوگیری از افزایش مقاومت دارویی بسیار مهم است. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی فراوانی و ارتباط حضور ژن‌های *bla*_{CTX-M}، *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} در *شریشیا کلی*‌های یوروپاتوژن جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر چالوس است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

این مطالعه توصیفی-مقطعی از بهار ۱۳۹۷ تا زمستان ۱۳۹۸ در آزمایشگاه‌های چالوس انجام شد. نمونه‌گیری از بیماران سرپایی مراجعه کننده به آزمایشگاه که دارای علائم عفونت ادراری بودند انجام شد. ۴۳۷ نمونه ادرار بیمار طبق پروتکل بهداشتی گرفته شد و نمونه‌های ادرار هر بیمار، بر روی محیط بلاد آگار و ائوزین متیلن بلو (EMB) (مرک، آلمان)

¹. Urinary tract infections

². Uropathogenic *Escherichia coli* strains

³. Multi drug-resistant

⁴. Antimicrobial resistance

⁵. Extended-spectrum betalactamase

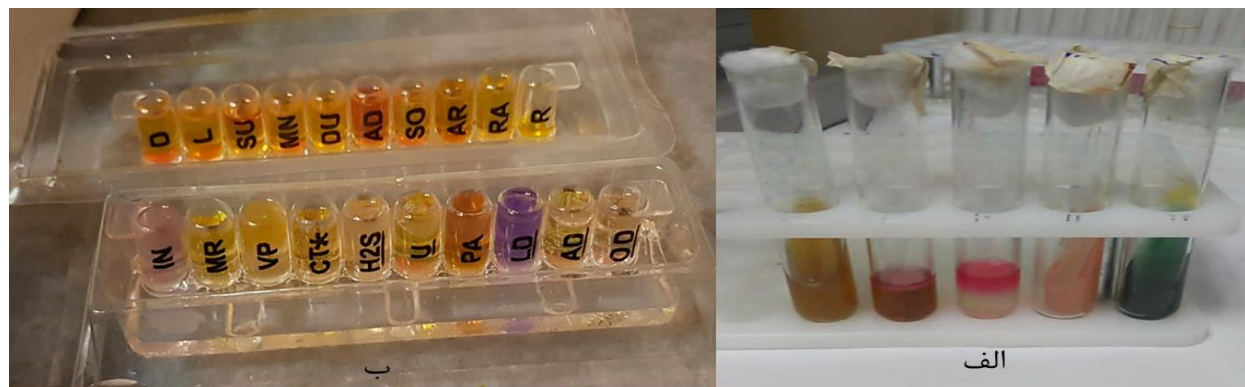
⁶ Eosin methylene blue

کشت داده شد (۱۸). محیط‌های کشت در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و محیط‌های کشت EMB که شمارش کلنی‌های آنها بیش از $10^5 \times 1$ بودند برای شناسایی/شریشیا کلی در نظر گرفته شدند. نمونه‌هایی که در آزمایشگاه، از نظر/شریشیا کلی مثبت تشخیص داده شده بودند وارد مطالعه شدند و نمونه‌هایی که از نظر کشت میکروبی خالص نبودند از مطالعه خارج شدند.

شناسایی باکتری

همه نمونه‌های کشت جمع‌آوری شده روی پلیت آگار EMB و بلاد آگار (مرک، آلمان) که دارای تعداد کلنی $\geq 10^5$ CFU/ml بودند، برای شناسایی سویه‌های UPEC مورد ارزیابی قرار گرفتند. شناسایی سویه‌های UPEC با استفاده از آزمایش‌های استاندارد بیوشیمیایی انجام شد. به طوری که،

جهت بررسی آزمون اندول، متیل-رد، و گس پروسکوئر و هیدرولیز سیترات (IMViC)، کلنی‌های خالص در محیط‌های^۱ SIM، سیمون سیترات آگار و MR-VP (مرک، آلمان) کشت داده شد و جهت بررسی تخمیر قندها، کشت بر روی محیط تریپل شوگر آیرون آگار (TSI) انجام شد. کلنی‌هایی که از نظر تخمیر قندها در محیط TSI به صورت اسید/اسید و سولفید هیدروژن منفی بودند ولی توانایی تولید گاز در آنها مثبت بود و همچنین از نظر آزمون IMViC به صورت اندول مثبت، متیل-رد مثبت، و گس پروسکوئر منفی و سیتراتاز منفی بود، به عنوان/شریشیا کلی در نظر گرفته شدند (شکل ۱). جهت تأیید نهایی از کیت تشخیصی تجاری انتروباکتریاسه (پادتن طب، تهران، ایران) استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱- تست‌های تشخیصی/شریشیا کلی یورپاتوژن. الف. تست‌های بیوشیمیایی، ب. تست تشخیص تجاری انتروباکتریاسه

^۱ Sulfide Indol Motility

^۲ Triple Sugar Iron Agar



تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای هر جدایه بالینی UPEC با دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفیم (FEP، ۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (GAZ، ۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (CTX، ۳۰ میکروگرم)، سفکسیم (CFM، ۵ میکروگرم)، سفتریاکسون (CRO، ۳۰ میکروگرم)، نالیدکسیک اسید (NA، ۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (CP، ۵ میکروگرم)، تری متوپریم سولفومتوکسازول (SXT) به ترتیب ۱/۲۵ و ۲۳/۷۵ میکروگرم، جنتامایسین (GM، ۱۰ میکروگرم)، نیتروفوران‌توئین (FM، ۳۰۰ میکروگرم) و آمپی‌سیلین (Amp، ۱۰ میکروگرم) با روش دیسک دیفیوژن (کربی-بائر) بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) انجام شد. *E. coli* ATCC 25922 به عنوان سویه کنترل کیفیت آزمون مورد استفاده قرار گرفته شد. نتایج حساسیت طبق دستورالعمل CLSI تفسیر شد (۱۹). جدایه‌هایی که حداقل به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم باشند، به عنوان MDR در نظر گرفته شد.

شناسایی مولکولی ژن‌های *bla*_{CTX-M} و *bla*_{SHV}، *bla*_{TEM}

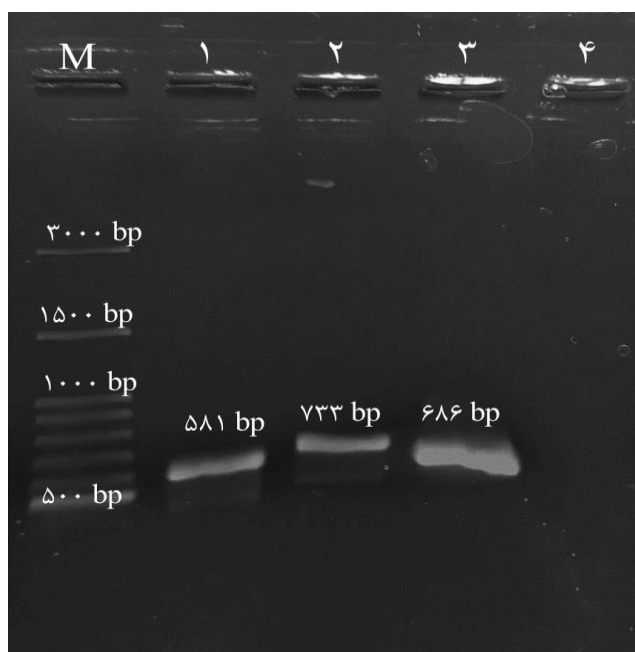
استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری و بر اساس

دستورالعمل شرکت سازنده (PZP، دانش‌بنیان، ایران) انجام شد. پرایمرهای ژن‌های *bla*_{SHV}، *bla*_{TEM} و *bla*_{CTX-M} با استفاده از مطالعه Ojdana و همکاران (۲۰)، طراحی و توسط شرکت ماکروژن کره ساخته شد. پرایمرهای ساخته شده بصورت لیوفیلیزه با غلظت ۱۰۰ پیکومول تحویل گردید. شناسایی مولکولی ژن‌های *bla*_{CTX-M} و *bla*_{SHV}، *bla*_{TEM} با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای همه جدایه‌ها انجام شد (جدول ۱). ترکیب مواد مورد استفاده در این واکنش به شرح زیر بود: ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix Red (آمپلیکون)، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۴ میکرولیتر آب مقطر و ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (غلظت ۱۰ پیکومول) در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر. تجزیه و تحلیل محصولات PCR با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. رنگ آمیزی ژل‌ها با ترکیب ۵ میکرولیتر محصول PCR و ۲ میکرولیتر رنگ RedSafe (PZP، دانش‌بنیان، ایران) انجام شد. مشاهده باند ژن‌های مورد بررسی توسط Bio Intellectica) transilluminator LED انجام شد (شکل ۲).

⁴ Polymerase Chain Reaction

جدول ۱- لیست پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص ژن بتالاکتاماز *bla*_{TEM}، *bla*_{SHV} و *bla*_{CTX-M}

پرایمر	الیگونیوکلوئید	توالی (۵'–۳')	طول (bp)	شرایط واکنش PCR	رفرنس
TEM-F	<i>bla</i> _{TEM}	CCA TCT GGC CCC AGT GCT GC	۶۸۶	۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰۰ ثانیه (۹۴ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه-۵۸ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه-۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه) سیکل، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰۰ ثانیه	(۲۰)
TEM-R		GCT CAC CCA GAA ACG CTG GT			
SHV-F	<i>bla</i> _{SHV}	CAT GCTCGCCGSGTATCCC	۷۳۳	۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰۰ ثانیه (۹۴ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه-۵۸/۵ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه-۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه) سیکل، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰۰ ثانیه	
SHV-R		CCCGCAGCCGCTTGAGCAAA			
CTX-M-F	<i>bla</i> _{CTX-M}	SCVATGTGCAGYACCAAGTAA	۵۸۱	۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱۸۰ ثانیه (۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه-۵۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه-۷۲ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه) سیکل، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰۰ ثانیه	
CTX-M-R		ACCAGAAYVAGCGGBGC			



شکل ۲- واکنش زنجیره پلیمرز ژن‌های *bla*_{TEM}، *bla*_{SHV} و *bla*_{CTX-M} در سویه‌های UPEC جدا شده از بیماران مبتلا به UTI. M، ۱۰۰ bp + DNA ladder، چاهک شماره ۴ کنترل منفی، چاهک شماره ۱ ژن *bla*_{CTX-M} (۵۸۱ bp)، چاهک شماره ۲ ژن *bla*_{SHV} (۷۳۳ bp) و چاهک شماره ۳ ژن *bla*_{TEM} (۶۸۶ bp).

آنالیز آماری

متغیرهای طبقه بندی از آزمون مجذور کای (χ^2) و در صورت لزوم از آزمون دقیق فیشر استفاده شد.

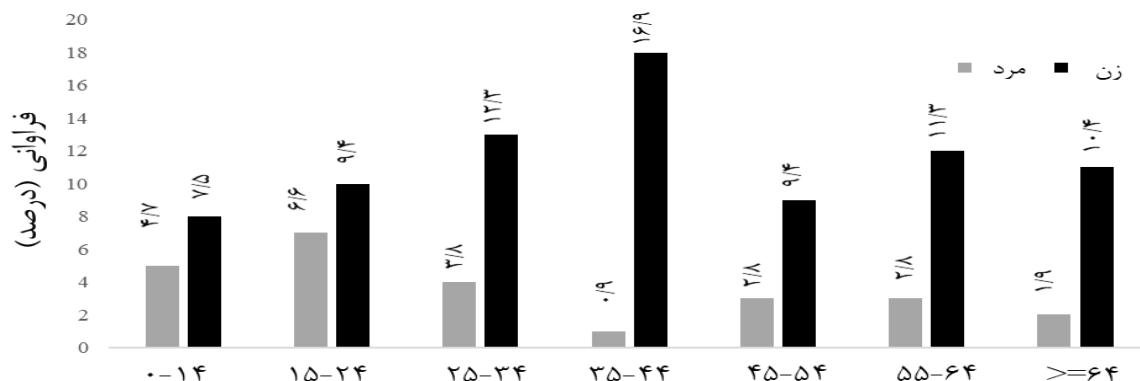
تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار آماری IBM SPSS نسخه ۱۸ (IBM، Armonk، NY، USA) انجام شد. برای ارزیابی



یافته‌ها

۷۸ سال) بود. تقریباً ۷۶/۴ درصد بیماران زن بودند. بیشتر بیماران زن در گروه سنی ۳۵-۴۴ (۱۶/۹ درصد) قرار داشتند (شکل ۳).

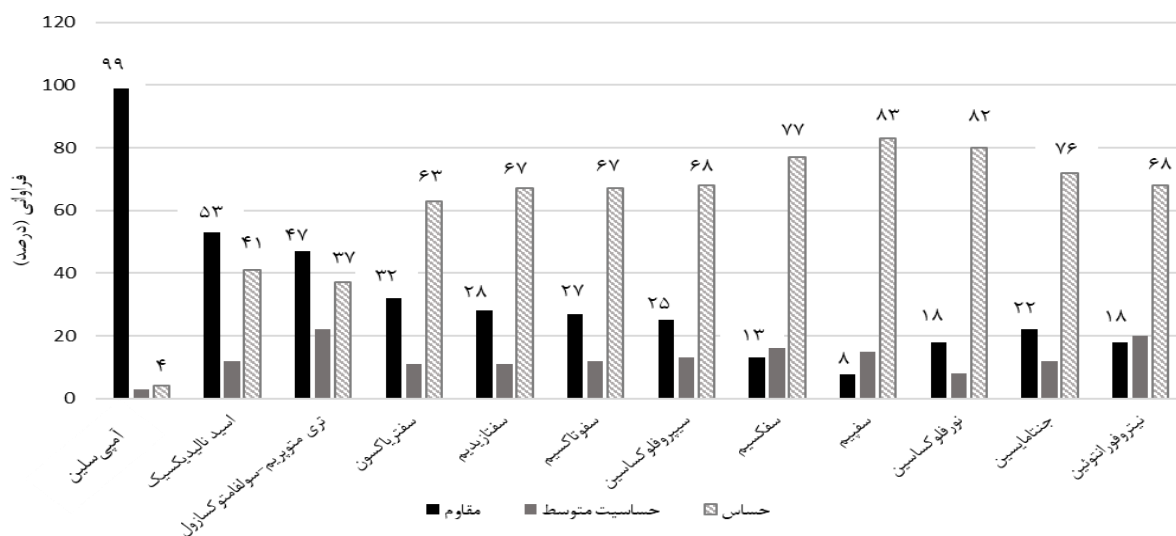
در طی ۲ سال نمونه‌گیری از میان ۴۳۷ کشت مثبت ادرار، ۱۰۶ (۲۴/۳ درصد) سویه UPEC تشخیص داده شد. میانگین سنی بیماران 39.5 ± 19.5 سال (رنج سنی: ۴ تا



شکل ۳- گروه‌های سنی و توزیع جنسی بیماران

درصد)، سفکسیم (۷۷ درصد) و جنتامایسین (۷۶ درصد) مشاهده شد. مقاومت MDR در ۴۶ مورد (۴۳ درصد) مشاهده شد.

توزیع مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی در شکل ۴ نشان داده شده است. بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین (۹۹ درصد) و بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم (۸۳ درصد)، نورفلوکساسین (۸۲)



شکل ۴- فراوانی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های UPEC جدا شده از بیماران مبتلا به UTI



دیگر نیز گزارش شده است (۲۱، ۲۲). شیوع UPEC در زنان در گروه سنی ۳۵-۴۴ سال بیشتر بود (۱۶/۹ درصد) این یافته توسط دهبانی پور و همکاران و طبسی و همکاران نیز مشاهده شده است (۸، ۲۳). شیوع بالای UPEC در زنان می‌تواند به دلیل ساختار فیزیولوژی و فلور طبیعی واژن باشد (۲۴، ۲۵).

در بررسی حاضر، در طی ۲ سال نمونه‌گیری ۴۳۷ مورد کشت ادراری مثبت جمع‌آوری شد. عفونت ادراری بار اقتصادی و بهداشت عمومی قابل ملاحظه‌ای را به همراه دارد و به میزان زیادی کیفیت زندگی افراد مبتلا را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۶). در مطالعه حاضر نشان داده شد که عامل ۲۴/۳ درصد از موارد عفونت ادراری سویه‌های UPEC می‌باشند. سویه‌های /شریشیا کلی عامل درصد بالایی از موارد UTI هستند که می‌توانند به عوامل ضد باکتریایی مقاومت پیدا کنند، بنابراین مدیریت بالینی عفونت‌های ادراری از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۷، ۲۸).

در این مطالعه بالاترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۹۰ درصد) و نالیدیکسیک اسید (۵۳ درصد) مشاهده شد و بالاترین حساسیت نیز در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم (۸۳ درصد) و نورفلوکساسین (۸۲ درصد) مشاهده شد. در حال حاضر، آنتی‌بیوتیک‌هایی - از قبیل تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین و آمپی‌سیلین - معمول‌ترین داروهای توصیه شده برای عفونت ادراری هستند (۲۹). با این حال، افزایش میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک و افزایش میزان عود عفونت تهدیدی برای بهداشت عمومی جامعه تحمیل کرده است. به دلیل ظهور گسترده مجموعه‌ای از مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک، به طور فزاینده‌ای درمان عفونت ادراری دشوارتر شده است (۲۹، ۳۰). در مطالعه فخری و همکاران (۸)، مقاومت به آمپی‌سیلین، سفتازیدیم و نالیدیکسیک اسید بیشتر از ۵۰

شکل ۴، فراوانی توزیع ژن‌های ESBL را در میان سویه‌های UPEC نشان می‌دهد. به طور کلی، مشاهده شد که ۶۴/۱ درصد از جدایه‌ها، ژن *bla*_{TEM} را حمل می‌کنند، با این حال، ژن‌های *bla*_{SHV} و *bla*_{CTX-M} به ترتیب در ۴۶/۲ درصد و ۳۵/۹ درصد از جدایه‌ها تشخیص داده شد. ژن *bla*_{TEM} بیشتر در میان جدایه‌های MDR مثبت (۵۱/۵ درصد) مشاهده شد، همچنین ژن *bla*_{CTX-M} نیز بیشتر در میان جدایه‌های MDR مثبت (۶۵/۸ درصد) مشاهده شد. تفاوت توزیع فراوانی ژن‌های *bla*_{TEM} و *bla*_{CTX-M} در میان سویه‌های UPEC، از نظر آماری معنی‌دار بود (به ترتیب $p=0/01$ و $p=0/001$) (جدول ۲).

جدول ۲- فراوانی حضور ژن‌های *bla*_{SHV}، *bla*_{TEM} و *bla*_{CTX-M} در میان جدایه‌های MDR و غیر MDR سویه‌های UPEC مورد

بررسی

ژن	MDR		کای دو	P-value
	مثبت	منفی		
<i>bla</i> _{SHV}	۲۰ (۳۵/۱)	۳۷ (۶۴/۹)	۲/۷۴	۰/۱۰
	۲۵ (۵۱/۱)	۲۴ (۴۸/۹)		
<i>bla</i> _{TEM}	۱۰ (۲۶/۳)	۲۸ (۷۳/۷)	۶/۳	۰/۰۱
	۳۵ (۵۱/۵)	۳۳ (۴۸/۵)		
<i>bla</i> _{CTX-M}	۲۰ (۲۹/۴)	۴۸ (۷۰/۶)	۱۳/۲	۰/۰۰۰۰۱
	۲۵ (۶۵/۸)	۱۳ (۳۴/۲)		

بحث

در مطالعه حاضر تعداد ۱۰۶ نمونه، از نمونه‌های کشت مورد بررسی به عنوان سویه‌های UPEC تشخیص داده شد که در این میان جدایه‌های UPEC در زنان شیوع بالاتری (۷۶/۴ درصد) را نشان دادند. این یافته همچنین در چندین مطالعه



درصد بود، در حالی که آمیکاسین و جنتامایسین فعالیت ضد میکروبی بالایی در برابر سویه‌های UPEC نشان دادند که همراستا با مطالعه حاضر بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ۴۳ درصد از جدایه‌های UPEC دارای مقاومت MDR بودند. در مطالعه Pishtiwan و همکاران (۳۱)، نشان داده شد که ۸۷/۵ درصد جدایه‌های /شریشیا کلی دارای مقاومت MDR هستند که بالاتر از مطالعه ما بود. در دهه‌های اخیر مقاومت ضد میکروبی در UPEC و شیوع MDR UPEC، به ویژه در زنان مبتلا به عفونت ادراری مکرر به صورت یک مشکل بالینی ظهور کرده است. افزایش فراوانی MDR UPEC، به ویژه در کشورهای در حال توسعه، منجر به استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف مانند فلوروکینولون‌ها، سفالوسپورین‌ها و آمینوگلیکوزیدها شده است که هزینه‌های درمان و بستری شدن در بیمارستان را افزایش داده است (۳۲، ۷).

یکی از نگرانی‌هایی که در مورد افزایش مقاومت دارویی /شریشیا کلی وجود دارد این است که این باکتری توانایی کسب پلاسمیدهای کد کننده ESBL را دارا می‌باشد. این پلاسمیدها به سرعت مقاومت در برابر سفالوسپورین‌های نسل سوم و همچنین سایر آنتی‌بیوتیک‌ها را منجر می‌شوند (۳۳، ۳۴). نتایج این بررسی نشان داد که بیشتر جدایه‌های مورد مطالعه (تقریباً ۷۵ درصد) به همه آنتی‌بیوتیک‌های کلاس سفالوسپورین نسل سوم حساس می‌باشند، در حالی که سایر مطالعات حساسیت کمتری به سفم‌ها گزارش کرده‌اند (۳۵، ۳۶).

مطالعه حاضر با استفاده از روش PCR برای تشخیص شیوع ژن‌های *bla_{TEM}*، *bla_{SHV}* و *bla_{CTX-M}* نشان داده است که در بین تمام جدایه‌های UPEC، ژن *bla_{TEM}* (۶۴/۱ درصد) و سپس ژن *bla_{SHV}* (۴۶/۲ درصد) شایع‌ترین ژن ESBL است.

ژن *bla_{CTX-M}* در مناطق مختلف جغرافیایی بیشتر از سایر ژن‌های ESBL مانند *bla_{TEM}* و *bla_{SHV}* تشخیص داده شده است (۳۷، ۳۸). اگرچه، یافته‌های این مطالعه با توجه به نتایج مطالعات دیگر مورد تأیید قرار نگرفت، در چندین بررسی دیگر غالب بودن ژن *bla_{TEM}* تأیید شده است (۲۸، ۳۹).

بررسی رابطه بین حضور ژن‌های بتالاکتاماز (*bla_{TEM}*)، *bla_{SHV}* و *bla_{CTX-M}* و ایجاد سویه‌های MDR در مطالعه حاضر نشان داد که توزیع ژن‌های *bla_{TEM}* و *bla_{CTX-M}* در میان سویه‌های MDR و غیر MDR می‌تواند از نظر آماری معنی‌دار باشد. تا آنجا که مطالعات مشابه مورد ارزیابی واقع شد، در هیچ مطالعه‌ای این رابطه مورد بررسی قرار نگرفته است ولی مطالعه حاضر با بررسی میانگین سویه‌های MDR و غیر MDR این احتمال را می‌دهد که ممکن است این رابطه در مورد ژن *bla_{TEM}* (به ترتیب در ۴۸/۵ درصد و ۵۱/۵ درصد) ناشی از شانس باشد. با این وجود، بررسی میانگین حضور ژن *bla_{CTX-M}* در میان سویه‌های MDR و غیر MDR (به ترتیب ۳۴/۲ درصد و ۶۵/۸ درصد) و همچنین سطح معنی‌داری بالای آماری ($p = 0/00001$) احتمال وجود این رابطه را قوی می‌داند.

نتیجه‌گیری

آگاهی از الگوهای مقاومت ضد میکروبی و ژن‌های مقاومت دارویی در یک منطقه جغرافیایی برای کنترل و نظارت بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی مهم است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که MDR شیوع بالایی دارد. علاوه بر این، مشخص شد که آمپسلین بیشترین مقاومت دارویی را در شرایط آزمایشگاهی دارا می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، ژن *bla_{TEM}* در میان انواع دیگر ژن‌های ESBL شیوع بالاتری را داشت. بررسی فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی *bla_{TEM}*، *bla_{SHV}* و *bla_{CTX-M}* در میان سویه‌های

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر بابک جاهد، مسئول فنی آزمایشگاه پاتوبیولوژی چالوس، ایران و همچنین از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ایران تشکر می‌نماییم.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله، هیچ گونه تعارضی درباره منابع مالی و حمایتی مقاله ندارند.

اشریشیا کلی یوروپاتوژن MDR مثبت و MDR منفی، نشان داد که فراوانی ژن *bla_{CTX-M}* در میان جدایه‌های MDR مثبت و MDR منفی از نظر آماری معنی‌دار بود، ارتباط معنی‌داری حضور ژن *bla_{CTX-M}* و MDR می‌تواند بیانگر نقش احتمالی این ژن در ایجاد مقاومت دارویی چندگانه باشد، که تأیید این نکته نیاز به بررسی و مطالعات بیشتر دارد.

References

1. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol Res*. 1987;169(12):5429-33.
2. Brumbaugh AR, Smith SN, Mobley HL. Immunization with the yersiniabactin receptor, FyuA, protects against pyelonephritis in a murine model of urinary tract infection. *Infection and immunity*. 2013;81(9):3309-16.
3. Micali S, Isgro G, Bianchi G, Miceli N, Calapai G, Navarra M. Cranberry and recurrent cystitis: more than marketing? *Critical reviews in food science and nutrition*. 2014;54(8):1063-75.
4. Hof H. [Candiduria! What now?: Therapy of urinary tract infections with Candida]. *Der Urologe Ausg A*. 2017;56(2):172-9.
5. Mann R, Mediati DG, Duggin IG, Harry EJ, Bottomley AL. Metabolic Adaptations of Uropathogenic *E. coli* in the Urinary Tract. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017; 7:241.
6. Tabasi M, Karam MR, Habibi M, Mostafavi E, Bouzari S. Genotypic Characterization of Virulence Factors in *Escherichia coli* Isolated from Patients with Acute Cystitis, Pyelonephritis and Asymptomatic Bacteriuria. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2016;10(12): Dc01-dc7.
7. Bartoletti R, Cai T, Wagenlehner FM, Naber K, Johansen TEB. Treatment of urinary tract infections and antibiotic stewardship. *European Urology Supplements*. 2016;15(4):81-7.
8. Dehbanipour R, Rastaghi S, Sedighi M, Maleki N, Faghri J. High prevalence of multidrug-resistance uropathogenic *Escherichia coli* strains, Isfahan, Iran. *Journal of natural science, biology, and medicine*. 2016;7(1):22.
9. Ochoa SA, Cruz-Córdova A, Luna-Pineda VM, Reyes-Grajeda JP, Cázares-Domínguez V, Escalona G, et al. Multidrug-and extensively drug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* clinical strains: phylogenetic groups widely associated with integrons maintain high genetic diversity. *Frontiers in microbiology*. 2016; 7:2042.
10. Ortega B, Groeneveld AJ, Schultsz C. Endemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2004;25(10):825-31.



11. Chong Y, Shimoda S, Shimono N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2018; 61:185-8.
12. Musa HA, Osman MA, Abdelaziz YH, Mohamed S, Ibrahim-Saeed M. Distribution of extended-spectrum beta-lactamase TEM and CTX-M resistance genes among *Proteus* species isolated in Sudan. *VacchiMonitor*. 2019;28(2):80-4.
13. Ugbo E, Anyamene C, Moses I, Iroha I, Babalola O, Ukpai E, et al. Prevalence of blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M genes among extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Gene Reports*. 2020; 21:100909.
14. Ejikeugwu C, Ikegbunam M, Ugwu C, Eze P, Iroha I, Esimone C. Phenotypic detection of *Klebsiella pneumoniae* strains-producing extended spectrum β -lactamase (ESBL) enzymes. *Scholars Acad J Biosci*. 2013;1(1):20-3.
15. Maharjan A, Bhetwal A, Shakya S, Satyal D, Shah S, Joshi G, et al. Ugly bugs in healthy guts! Carriage of multidrug-resistant and ESBL-producing commensal Enterobacteriaceae in the intestine of healthy Nepalese adults. *Infection and drug resistance*. 2018; 11:547.
16. Michael GB, Freitag C, Wendlandt S, Eidam C, Feßler AT, Lopes GV, et al. Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. *Future microbiology*. 2015;10(3):427-43.
17. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi journal of biological sciences*. 2015;22(1):90-101.
18. Terlizzi ME, Griboaldo G, Maffei ME. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in microbiology*. 2017; 8:1566.
19. XIONG Y, FOWLER JR V, YEAMAN M, PERDREAU-REMYINGTON F, Watts, A., Ke, D., Wang, Q., Pillay, A., Nicholson-Weller, A. & Lee, JC 2005. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infection and immunity*, 73, 3502-3511. WAYNE, P. 2014. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fourth informational. DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGÍA I ECOLOGÍA. 2019; 25:167.
20. Ojdana D, Sacha P, Wiecezorek P, Czaban S, Michalska A, Jaworowska J, et al. The occurrence of blaCTX-M, blaSHV, and blaTEM genes in extended-Spectrum β -lactamase-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland. *International Journal of Antibiotics*. 2014;2014.
21. Issazadeh K, Naghibi SN, Khoshkholgh-Pahlaviani MRM. Drug resistance and serotyping of uropathogenic *Escherichia coli* among Patients with urinary tract infection in Rasht, Iran. *Zahedan J Res Med Sci*. 2015;17(6):1-5.
22. Pourzare M, Derakhshan S, Roshani D. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection in Sanandaj, Iran. *Arch Pediatr Infect Dis*. 2017;5(3): e41995.
23. Tabasi M, Karam MRA, Habibi M, Yekaninejad MS, Bouzari S. Phenotypic assays to determine virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolates and their correlation with antibiotic resistance pattern. *Osong public health and research perspectives*. 2015;6(4):261-8.
24. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Annals of epidemiology*. 2000;10(8):509-15.

25. Hooton TM. Recurrent urinary tract infection in women. *International journal of antimicrobial agents*. 2001;17(4):259-68.
26. Kostakioti M, Hultgren SJ, Hadjifrangiskou M. Molecular blueprint of uropathogenic *Escherichia coli* virulence provides clues toward the development of anti-virulence therapeutics. *Virulence*. 2012;3(7):592-3.
27. Goudarzi H, Aghamohammad S, Hashemi A, Nikmanesh B, Noori M. Distribution of blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genes among *Escherichia coli* isolates causing urinary tract infection in children. 2013.
28. Lesani SS, Soleimani M, Shakib P, Zolfaghari MR. Prevalence of bla CTX-M, bla SHV, and bla TEM Genes in *Escherichia coli* Strains Isolated from Urinary Tract Infection Samples of Patients in the Intensive Care Unit in Qom, Iran. *Gene, Cell and Tissue*. 2020;7(2).
29. Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*. 2010;7(12):653-60.
30. Foxman B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious disease clinics of North America*. 2013;28(1):1-13.
31. Pishtiwan AH, Khadija KM. Prevalence of blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M Genes among ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolated from Thalassemia Patients in Erbil, Iraq. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2019;11(1): e2019041-e.
32. Sanchez GV, Babiker A, Master RN, Luu T, Mathur A, Bordon J. Antibiotic resistance among urinary isolates from female outpatients in the United States in 2003 and 2012. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(5):2680-3.
33. Chen Y-H, Ko W-C, Hsueh P-R. Emerging resistance problems and future perspectives in pharmacotherapy for complicated urinary tract infections. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2013;14(5):587-96.
34. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *American journal of infection control*. 2006;34(5): S20-S8.
35. Hassuna NA, Khairalla AS, Farahat EM, Hammad AM, Abdel-Fattah M. Molecular characterization of Extended-spectrum β lactamase-producing *E. coli* recovered from community-acquired urinary tract infections in Upper Egypt. *Scientific reports*. 2020;10(1):1-8.
36. Zhao R, Shi J, Shen Y, Li Y, Han Q, Zhang X, et al. Phylogenetic distribution of virulence genes among ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from long-term hospitalized patients. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2015;9(7): DC01.
37. Seyedjavadi SS, Goudarzi M, Sabzehali F. Relation between blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genes and acute urinary tract infections. *Journal of Acute Disease*. 2016;5(1):71-6.
38. Gundran RS, Cardenio PA, Villanueva MA, Sison FB, Benigno CC, Kreausukon K, et al. Prevalence and distribution of blaCTX-M, blaSHV, blaTEM genes in extended- spectrum β - lactamase- producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. *BMC Veterinary Research*. 2019;15(1):227.
39. Liu H, Wang Y, Wang G, Xing Q, Shao L, Dong X, et al. The prevalence of *Escherichia coli* strains with extended spectrum beta-lactamases isolated in China. *Frontiers in microbiology*. 2015; 6:335.



Prevalence and association of the presence of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} beta-lactamase genes in multiple drug resistance (MDR) Uropathogenic *Escherichia coli* resistant and susceptible isolated from patients with urinary tract infections in Chalus

Neda Merikhi¹, Jamileh Nowroozi^{1*}, Ali Nazemi², Mehrdad Hashemi³, Robab Rafiei Tabatabaei¹

1- Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Biology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

3- Department of genetics, Faculty of advanced sciences and technology, Islamic Azad University, Tehran medical sciences branch, Tehran, Iran.

Original Article

Received: 6 May 2021

Accepted: 30 Nov 2021

*Corresponding Author:

Jamileh Nowroozi;

Department of
Microbiology, North
Tehran Branch, Islamic
Azad University, Tehran,
Iran

TEL:

Email:

Nowroozij@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction

This study was performed to investigate the prevalence and association of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{SHV} beta-lactamase genes in multiple drug resistance (MDR) uropathogenic *Escherichia coli* resistant and susceptible isolated from patients with urinary tract infections in Chalus, Iran.

Materials and Methods

In the cross-sectional study a total of 437 samples were obtained from December 2018 to November 2019. Identification of Uropathogenic *Escherichia coli* strains was performed using standard microbiological and biochemical tests. Drug susceptibility to cefepime, ceftazidime, cefotaxime, cefixime, ceftriaxone, nalidixic acid, ciprofloxacin, trimethoprim, sulfamethoxazole, gentamicin, nitrofurantoin, and ampicillin was done by Kirby-Bauer disk diffusion method. Molecular identification of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} was conducted by PCR (polymerase chain reaction) assay. The relationship between the presence of beta-lactamase genes in MDR strains was measured. Data analysis was performed using an appropriate statistical test.

Results

It was observed that among the 437 positive urine culture samples of the patient, there were 106 UPEC strains (24.3%). The highest level of drug resistance was recognized toward ampicillin (99%), and the highest level of drug susceptibility was against cefepime (83%), and norfloxacin (82%). Multiple drug resistance (MDR) resistance was observed in 46 (43%) isolates. The *bla*_{TEM} gene was more common among MDR-positive isolates (51.5%), and the *bla*_{CTX-M} gene was more seen among MDR-positive isolates (65.8%).

Conclusion

Based on the present study results, the *bla*_{TEM} gene was the dominant gene between beta-lactamase genes. Moreover, we found that the *bla*_{CTX-M} gene's presence could be playing a role in MDR development.

Keywords

Uropathogenic *Escherichia coli*, Urinary tract infections, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}

► Please cite this article as: Merikhi N, Nowroozi J, Nazemi A, Hashemi M, Rafiei Tabatabaei R. Prevalence and association of the presence of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} beta-lactamase genes in multiple drug resistance (MDR) Uropathogenic *Escherichia coli* resistant and susceptible isolated from patients with urinary tract infections in Chalus. J Neyshabur Univ Med Sci 2022;9(4):121-132.