بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی شیوع ژن‌های بتالاکتاماز طیف گسترده *TEM*، *SHV* و *CTX-M* در سویه‌های *اشرشیاکلی* جداشده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در تهران به روش PCR

راضیه تارقلیزاده مرزرود [۱]، **پدرام حیدری*[۲]**

[۱] گروه میکروبیولوژی واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران ، ایران

[۲] گروه میکروبیولوژی واحدخوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۴

چکیده

در سال‌های اخیر، افزایش سویه‌های *اشرشیاکلی* تولیدکننده‌ی بتالاکتامازهای طیف گسترده ، منجر به محدودشدن گزینه‌های درمانی شده‌است. دراین مطالعه ۱۰۰ایزوله‌ی *اشرشیاکلی* در مدت ۳ ماه جمع‌آوری شدو حساسیت باکتری‌های جداشده نسبت به ۷ نوع آنتی‌بیوتیک با روش انتشار دیسک دیفیوژن براساس دستورالعمل استاندارد CLSI 2021 ، تعیین شد و سویه‌ها با روش دیسک ترکیبی از نظر وجود آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده بررسی شدند. ژن‌های *CTX-M, SHV* و *TEM* باروش PCR شناسایی و تعدادی از ایزوله‌ها به روش توالی‌یابی سنگر، تعیین توالی و در پایگاه داده NCBI، بلاست گردید. از ۴۲ ایزوله‌ی *اشرشیاکلی* جداسازی‌شده، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین، ایمی‌پنم، نالیدیکسیک‌اسید، سفتریاکسون و جنتامایسین به ترتیب برابر با ۹۰/۵ درصد، ۸۵/۷ درصد، ۵۹/۵ درصد، ۵۲/۴ درصد، ۴۰/۵ درصد، ۳۵/۷ درصد و ۹/۵ درصد بودند. از ۴۲ ایزوله‌ی *اشرشیاکلی*، ۲۳ ایزوله(۵۴/۸ درصد) مولد بتالاکتامار طیف گسترده بودند. دراین میان ۷۸/۳ ٪ ایزوله‌ها دارای ژن *CTX-M*، ۷۳/۹ درصد ایزوله‌ها دارای ژن *TEM* و ۲۱/۷ درصدایزوله‌ها دارای ژن *SHV* بودند. فراوانی بالای سویه‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBL، دراین مطالعه نشانگر این‌است که تولید ESBL و شیوع آن از شهری به شهر دیگر متفاوت است. بنابراین توصیه‌می‌شود از روش‌های آنتی‌بیوگرام و روش‌های مولکولی و شناسایی انواع ژن‌های بتالاکتاماز طیف گسترده، به صورت دوره‌ای در تمام مراکز درمانی و بیمارستان‌ها استفاده شود.

واژه‌های کلیدی : *اشرشیاکلی*، بتالاکتاماز طیف گسترده ، دیسک دیفیوژن، ESBL

* Pe.HHeidari@iau.ac.ir

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]

مقدمه

خانواده انتروباکتریاسه، بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین باسیل‌های گرم منفی را شامل می‌شوند که از نمونه‌های بالینی جدا می‌شوند. دراین بین، *اشرشیاکلی* از شایع ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی بوده و با فراوانی بالا از عفونت‌های دستگاه‌ادراری و خون بدست می‌آیند(۱).

اعضای *انتروباکتریاسه* باسیل‌های گرم‌منفی با اندازه متوسط هستند که اسپور تولید نکرده و واجد یک آنتی‌ژن مشترک هستند(آنتی‌ژن عمومی انتروباکتریاسه). همه اعضای این خانواده به راحتی و سریع روی محیط‌های غیرانتخابی(مثل آگار خون‌دار) و محیط‌های انتخابی(مک کانکی) به صورت هوازی و بی هوازی(بی‌هوازی اختیاری) رشد می‌نمایند(۲).

اشرشیاکلی، یکی از شایع ترین عوامل باکتریایی است که از عفونت‌های‌انسانی جداشده و باعث عفونت دستگاه‌ادراری، گوارشی و مننژیت در نوزادان می‌شود(۳).

به طور تیپیک *اشرشیاکلی*، آزمون‌های اندول ، لیزین دکربوکسیلاز و تخمیر مانیتول مثبت دارد و از گلوکز گاز تولید می‌کنند. نمونه باکتری جداشده از ادرار، ایجاد پرگنه با جلای رنگین کمانی در محیط افتراقی نظیر ائوزین متیلن‌بلوآگار و آزمون نقطه‌ای اندول مثبت به سرعت به عنوان *اشرشیاکلی* قابل شناسایی است(۲).

این باکتری یکی از پاتوژن‌های فرصت طلب گرم منفی بوده که به‌علت اکتساب پلاسمیدهای کد کننده بتالاکتامازهای طیف گسترده (ESBLs)، به آنتی بیوتیک های بتالاکتام از جمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مقاوم شده‌اندو ازاین‌رو درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری با مشکل مواجه شده است(۳).

آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شامل پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها و منوباکتام‌ها می‌باشند که با اتصال به پروتئین باند شونده به پنی‌سیلین(PBPs)، که‌در دیواره سلولی باکتری می‌باشد باعث مهار ترانس پپتیدازها و تخریب پپتیدوگلیکان و دیواره سلولی می‌شود و به دنبال آن باکتری از بین می‌رود(۳).

اگرچه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به طور گسترده برای درمان عفونت‌های ناشی‌از باکتری *اشرشیاکلی* استفاده می‌گردد، به دلیل افزایش بروز مقاومت نسبت به‌این آنتی‌بیوتیک‌ها درمان عفونت ها به‌طور فزآینده‌ای بحث برانگیز شده‌است(۴).

یکی‌از رایج‌ترین مکانیسم‌های مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک های بتالاکتام، تولید آنزیم های بتالاکتاماز می‌باشد(۴).

بتالاکتامازهای با طیف گسترده، آنزیم‌های هستند که علاوه بر ایجاد مقاومت به پنی‌سیلین‌ها، واسطه‌ی ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین های نسل سوم مثل سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم و منوباکتام‌ها مثل آزترئونام می‌شوند(۱).

برحسب نوع عملکرد، آنزیم‌های بتالاکتامازی را به چهار گروه یا کلاس اصلی A,B,C وD تقسیم‌بندی می‌کنند. براساس طبقه‌بندی Amber، آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده در گروه A ، قرار گرفته و شامل مشتقات آنزیم های موتاسبون یافته‌ی *TEM, SHV* و *CTX-M* می‌باشند(۶).

در سال ۱۹۸۳، اولین سویه تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs[1] ، در آلمان جداسازی شد و به دنبال آن گسترش سویه‌های مقاوم در دیگر نقاط جهان دیده شد. در سال‌های اخیر افزایش میزان جداسازی سویه‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده از نقاط مختلف جهان گزارش شده‌است(۵).

بسیاری از ژن‌های ESBL ، بر روی پلاسمیدهای بزرگی قرار دارد که هم‌زمان حامل ژن‌های مقاومت به سایر عوامل ضدمیکروبی مثل آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، سولفونامیدها و تتراسایکلین‌ها نیز هستند(۱).

[1] Extended-spectrum beta-lactamases

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]

این توانایی ، موجب بروز مقاومت‌های دارویی چندگانه ، در بین ایزوله‌های مولد ESBL ، می‌شود. میزان مرگ و میر در این گروه به طور قابل توجهی نسبت به عفونت‌های ناشی از باکتری‌های حساس به آنتی‌بیوتیک بالاتر است(۱).

باکتری‌ها یا پاتوژن‌های مقاوم به چند دارو (Multi Drug Resistant)، به انواعی از پاتوژن‌ها گفته می‌شوند که به چند داروی ضدمیکروبی مقاوم هستند(۵).

تنوع جغرافیایی در الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در اغلب پاتوژن‌ها مشاهده می‌شود و این امر در تنظیم استراتژی‌های مؤثر ضدمیکروبی در مراکز درمانی ضروری‌است(۵).

این مطالعه ، باتوجه‌به اهمیت مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و گسترش روزافزون ژن‌های مولد ESBLs ، اقدام به بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی شیوع ژن‌های مرتبط با بتالاکتامازهای با طیف گسترده نظیر *SHV* , *CTX-M* و *TEM* ، در بین جدایه‌های *اشرشیاکلی* بدست‌آمده از بیماران بستری نموده‌است.

مواد و روش ها

در این مطالعه‌ی توصیفی- مقطعی، در بازه زمانی فروردین تا خرداد ماه ۱۴۰۱، تعداد ۱۰۰ نمونه‌ی بالینی شامل نمونه‌های ادرار، خون، زخم و ترشحات از بیمارستان الغدیر تهران جمع‌آوری شد.(کداخلاق با شماره IRIAU.TNB.REC.1403.008 دریافت شده‌است).

جهت جداسازی ایزوله‌های *اشرشیاکلی* ، نمونه‌ها بر روی محیط کشت ائوزین‌متیلن‌بلو آگار و مک‌کانکی‌آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. نمونه‌ها از نظر رشد باکتری و تشکیل کلونی روی محیط‌های کشت بررسی شدند. بعد از مشاهده جلای فلزی کلنی‌های باکتری بر روی محیط کشت ائوزین‌متیلن‌بلو، تست‌های شیمیایی افتراقی نظیر TSI، سیترات ، اوره‌آز ، تولید اندول و MR/VP مورد بررسی قرار گرفتند.

پس از تعیین هویت باکتری‌ها در آزمایشات کلاسیک ، سویه های خالص شده در محیط BHI مایع حاوی ۳۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت انجام آزمایشات بعدی نگهداری و ذخیره‌سازی شدند.

تعیین الگوی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی با روش دیسک انتشار دیفیوژن

جهت تعیین حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اشرشیاکلی* ،از روش دیسک انتشار دیفیوژن (کربی بائر) انجام شد.

ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری، سوسپانسیون میکروبی با آب مقطر استریل با کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه شد و بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولرهینتون‌آگار به صورت کشت چمنی تلقیح شد.

سپس تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌ها نسبت به ۷ نوع آنتی بیوتیک (ساخت شرکت پادتن طب)، شامل سفتازیدیم ۳۰ میکروگرم ، سفتریاکسون ۳۰ میکروگرم، ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم، نالیدیکسیک اسید ۳۰ میکروگرم، سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم، جنتامایسین ۱۰ میکروگرم و آمپی‌سیلین ۱۰ میکروگرم انجام‌شد. دیسک های آنتی‌بیوتیک به فاصله ۲۵ میلی متر از یکدیگر قرار داده شدند و پس‌از ۲۴-۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ، قطر هاله عدم رشد باکتری دراطراف هر دیسک با خط کش اندازه گیری و تفسیر نتایج طبق دستورالعمل CLSI 2021، به صورت نمونه‌های مقاوم ، نیمه حساس و حساس گزارش شد . از باکتری استاندارد *اشرشیاکلی* با۲۵۹۲۲ ATCC به عنوان شاهد استفاده‌شد.

بررسی فنوتیپی ایزوله های مولد ESBLs ، با استفاده از روش دیسک ترکیبی

جهت انجام این آزمایش، ابتدا از ایزوله های *اشرشیاکلی* بعد از کشت ۲۴ساعته ، برابر استاندارد نیم‌مک فارلند تهیه شد و به صورت چمنی بر روی محیط مولرهینتون‌آگار کشت داده‌شد. سپس دیسک‌های سفتازیدیم و سفوتاکسیم با غلظت ۳۰ میلی گرم ، به فاصله ۲۵ میلی متر از دیسک های حاوی سفتازیدیم –کلاوولانیک‌اسید و سفوتاکسیم – کلاوولانیک‌اسید با غلظت‌های ۳۰-۱۰ میلی گرم ، بر روی محیط‌کشت مولرهینتون‌آگار در شرایط استریل قرار داده شدند. ایزوله‌هایی که قطر هاله عدم رشد آن‌ها دراطراف

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]

هریک ازدیسک‌های حاوی سفالوسپورین همراه کلاوولانیک اسید نسبت به دیسک‌های فاقد کلاوولانیک‌اسید به تنهایی ، بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر باشد، به‌عنوان باکتری‌های تولیدکننده ESBLs در نظر گرفته شدند.

بررسی ژنوتیپی ایزوله های مولد ESBLs

برای استخراج DNA ، ایزوله‌های *اشرشیاکلی*، ابتدا کشت تازه از نمونه‌ها بر روی محیط کشت مولرهینتون براث در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام‌گردید. بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA سازنده شرکت(کیاژن-ایران) انجام‌شد. کمیت و کیفیت ژنوم استخراج‌شده از طریق ژل الکتروفورز ۲درصد بررسی شد و ژنوم بدست‌آمده تا انجام PCR ، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمایش PCR برای شناسایی ژن‌های مولد ESBL شامل ژن‌های *CTX-M, TEM* و *SHV*، در سویه‌های *اشرشیاکلی* با پرایمرهای اختصاصی این ژن‌ها (ساخت شرکت متابیون آلمان) صورت گرفت(جدول۱)

برای انجام آزمایش PCR، از حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲ میکرولیتر مسترمیکس (ساخت شرکت پیشگام) ، ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای پیشرو و معکوس ، ۶ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل و ۵ میکرولیتر DNA ، استفاده شد.

برنامه‌ی دستگاه ترموسایکلر استفاده‌شده جهت تکثیر قطعات ژنوم در جدول۲ آمده‌است. بعد از اتمام PCR و تکثیر ژن ، برای بررسی محصولات PCR، از الکتروفور ژل‌آگارز ۲درصد استفاده‌شد. رنگ‌آمیزی محصولات PCR، با رنگ DNA safe stain انجام شد و برای مقایسه اندازه قطعات ژنوم از DNA ladder 50 bp استفاده شد.

جدول ۱ : مشخصات پرایمرهای مورداستفاده در واکنش PCR (۳).

ژن هدف	توالی پرایمر (5' to 3')	شماره رفرنس/سایز(bp)
CTX-M-F	GCGATGGGCAGTACCAGTAA	392bp۳
CTX-M-R	TTACCCAGCGTCAGATTCCG	392bp۳
SHV-F	TTAGCGTTCCCAGTGCTC	846bp۳
SHV-R	GGTTATGCGTTATATTCGCC	846bp۳
TEM-F	TCGGGGAAATGTGCGCGG	972bp۳
TEM-R	TGCTTAATCAGTGAGGCACC	972bp۳

جدول۲: شرایط PCR برای تکثیر ژن‌های *bla(CTX-M, SHV, TEM)*

مراحل واکنش	دما(درجه سانتی گراد)			زمان(دقیقه)
	ژن *blaTEM*	*blaSHV*	*blaCTX-M*	
دناتوراسیون اولیه	۹٤	۹٤	۹٤	۵
دناتوراسیون ثانویه	۹٤	۹٤	۹٤	۱
اتصال	۵۸	۵۵	٦۰	۱
طویل شدن	۷۲	۷۲	۷۲	۱
طویل شدن نهایی	۷۲	۷۲	۷۲	۵
کل سیکل	۳٦			

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]

توالی‌یابی DNA به‌روش سنگر

دراین مطالعه، تعدادی‌از نمونه‌های حاوی ژن‌های بتالاکتاماز مثبت، بعد از انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن‌های *CTX-M*، *TEM* و *SHV* و مشاهده باندهای موردنظر به روش الکتروفورز، جهت توالی یابی به روش سنگر توسط آزمایشگاه کدون توالی‌یابی گردید.توالی‌های نوکلئوتیدی مشابه در برنامه MEGA-X، همردیف سازی شد و بر اساس نتایج بدست‌آمده درخت فیلوژنی ترسیم شد.

تجزیه و تحلیل آماری ایزوله‌ها با آزمون SPSS انجام شد و نمونه‌های سطح معنی‌دار کمتراز P-value <۰/۰۵ ، را نشان‌دادند

نتایج

دراین مطالعه ، از ۱۰۰ نمونه‌ی جمع‌آوری‌شده از نمونه‌های بالینی بیماران، ۴۲ ایزوله‌ی *اشرشیاکلی*، تعیین هویت و شناسایی شدند. بر اساس تست مقاومت آنتی‌بیوگرام، ۵۳/۳ درصد ایزوله‌ها ،مقاوم به چند دارو شناسایی شدند.

دراین تحقیق، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشرشیاکلی* نسبت به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین با ۹۰/۵ درصد، آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم با ۸۵/۷ درصد ، سیپروفلوکساسین۵ ۹۵/۵ درصد و آنتی بیوتیک ایمی پنم با ۵۲/۴ ٪می‌باشد و همچنین کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین با ۸۳/۳٪ و آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون با ۵۴/۸٪ گزارش شد(نمودار۱).

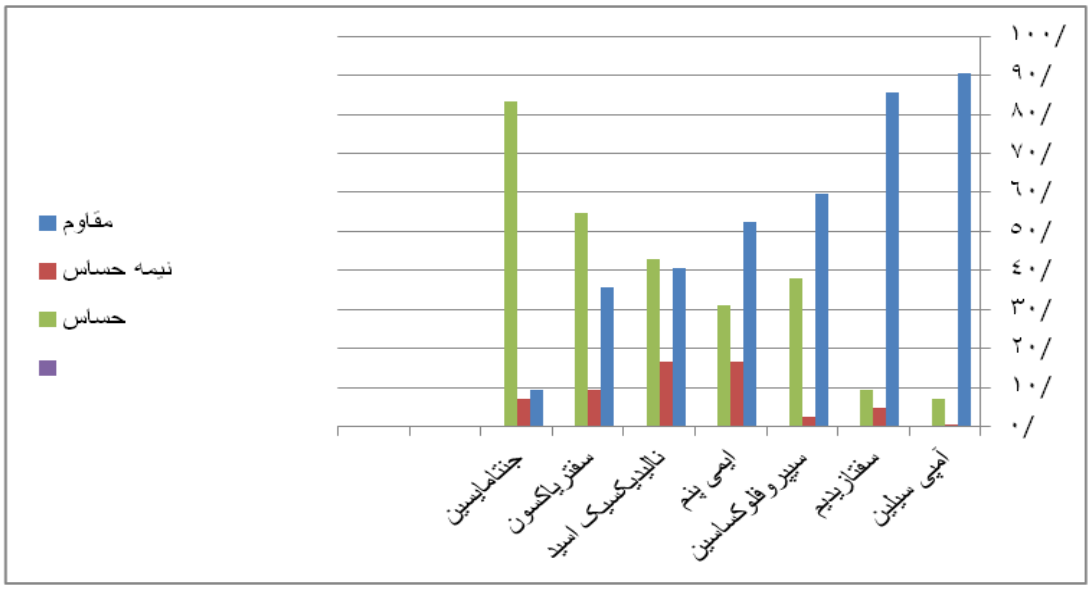
دراین مطالعه ۲۳ سویه معادل ۵۴/۸ درصد از کل نمونه‌ها تولیدکننده‌ی آنزیم بتاتاکتاماز مثبت بودند

نتایج شیوع ژن های مقاومت

مولکول DNA نمونه‌های ESBL مثبت بااستفاده‌از کیت استخراج شرکت کیاژن استخراج گردید.

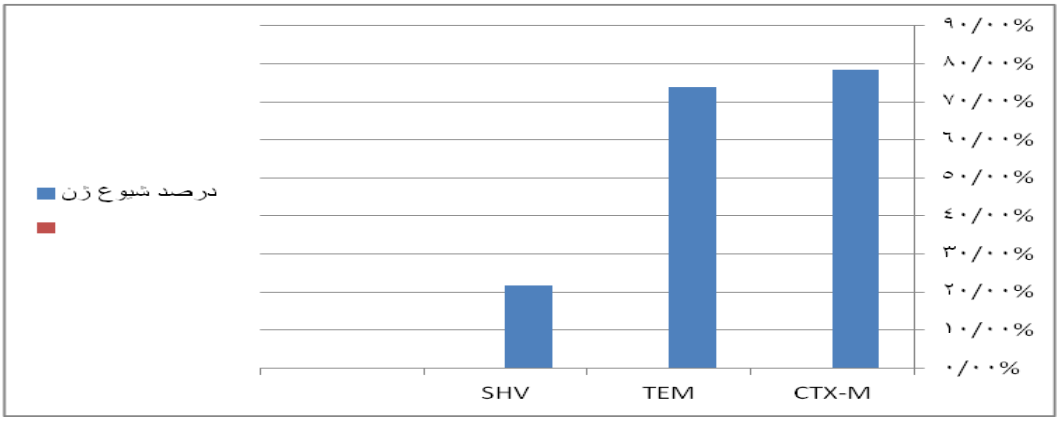
مولکول DNA نمونه‌های بتالاکتاماز مثبت بااستفاده‌از ۳جفت پرایمراختصاصی برای بررسی وجود ژن‌های (blaCTX-M, TEM, SHV) به‌روش واکنش PCR، تکثیر شد و نتایج واکنش PCR، ازطریق الکتروفورز برروی ژل الکتروفورز ۲ درصد مورد بررسی قرارگرفت.

در پژوهش حاضر مطابق نمودار ۲، ژن CTX-M بافراوانی ۷۸/۳ درصد، بیشترین شیوع ژن را دارا می‌باشد. افزایش شیوع این ژن در بیماران بستری بسیار نگران‌کننده می‌باشد(شکل۱).



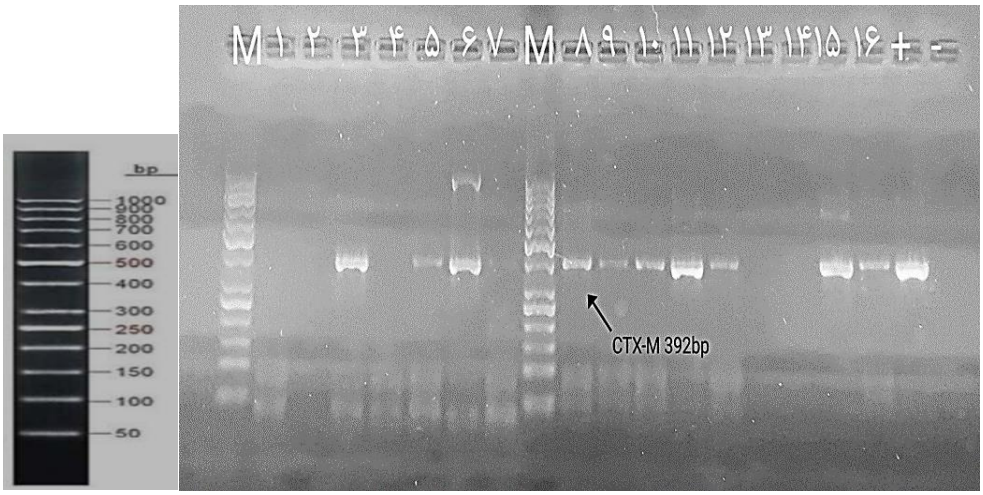
نمودار۱: نمودار آزمون آنتی‌بیوگرام نمونه‌های *اشرشیاکلی*

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]



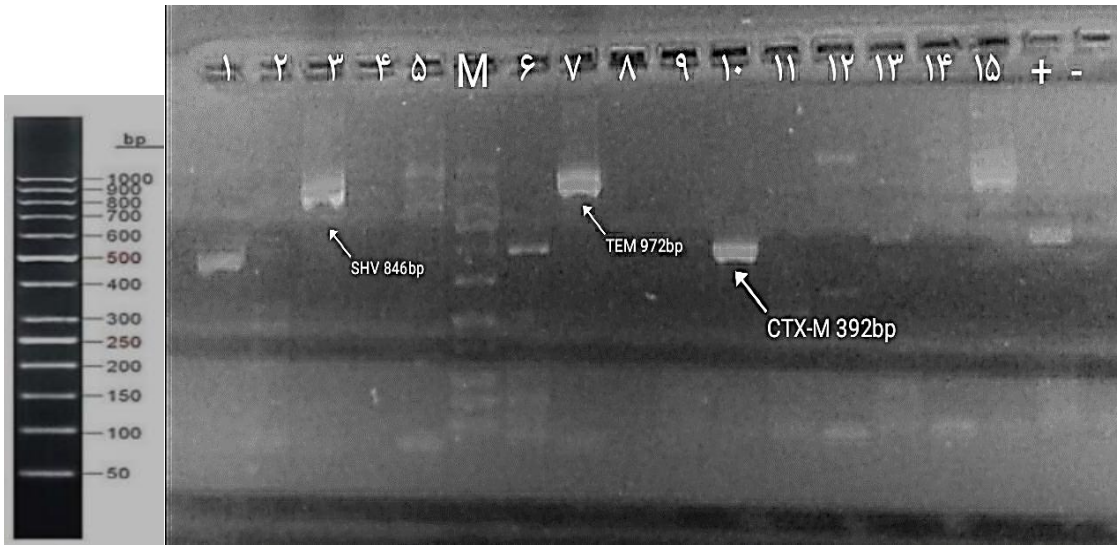
نمودار۲: میزان شیوع ژن‌های ESBL مثبت اایزوله‌های *اشرشیاکلی*

در مطالعه‌ی انجام‌شده بر روی شیوع ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی ESBL، ژن مقاومت TEM، به میزان ۷۳/۹ درصد گزارش شد که نشان از افزایش شیوع این نوع ژن در بررسی انجام‌شده می‌باشد که باعث بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز می‌شود(شکل۲).در مطالعه‌ی انجام‌شده، ژن SHV نسبت به ژن‌های CTX-Mو TEM، شیوع پایین‌تری دارد و در۲۱/۷ درصد ایزوله‌ها (۵ ایزوله) یافت شد. در مطالعه‌ی انجام‌شده شیوع چند ژنی هم وجودداشت. ژن‌های TEM-CTX-M، در ۴۷/۸۲درصد نمونه‌ها ژن‌های CTX-M – SHV,TEMدر ۲۱/۷۳ درصد نمونه‌ها باهم بروز پیدا کردند.



شکل ۱ : الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژن *CTX-M* در سویه‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBL بر روی ژل آگارز ۲٪، چاهک‌های ۱۶،۱۵،۱۲،۱۱،۱۰،۹،۸،۶،۵،۳ حاوی ایزوله‌های دارای ژن *CTX-M* و چاهک های ۷،۴،۲،۱، ۱۳ و ۱۴ حاوی ایزوله های فاقد ژن *CTX-M* . کنترل مثبت دارای ایزوله‌ی *E.coli* با ATCC25299 وکنترل منفی ایزوله ی *کلبسیلا پنومونیه* با ATCC 13883، می‌باشد.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]



شکل۲ : نمونه‌ای از الکتروفورز ۳ ژن TEM،CTX-M و SHV درولتاژ ۸۰ ولت می‌باشد.
چاهک ۱، ٦، ۱۰و ۱۳ دارای نمونه‌های دارای ژن CTX-M، چاهک ۳ نمونه دارای ژن SHV می‌باشد.

شکل ۳ : نمونه‌ای از انجام الکتروفورز ژن های *TEM* 972bp می باشد. چاهک‌های ۱، ۳، ٤ و ٥ ، نمونه‌های دارای ژن‌های *TEM* و چاهک ۲، فاقد ژن *TEM* می‌باشد. دو چاهک آخر به ترتیب دارای نمونه کنترل مثبت *E.coli* ATCC 25922 و نمونه‌ی کنترل منفی دارای *کلبسیلا پنومونیه* با ATCC 13883 می‌باشد.

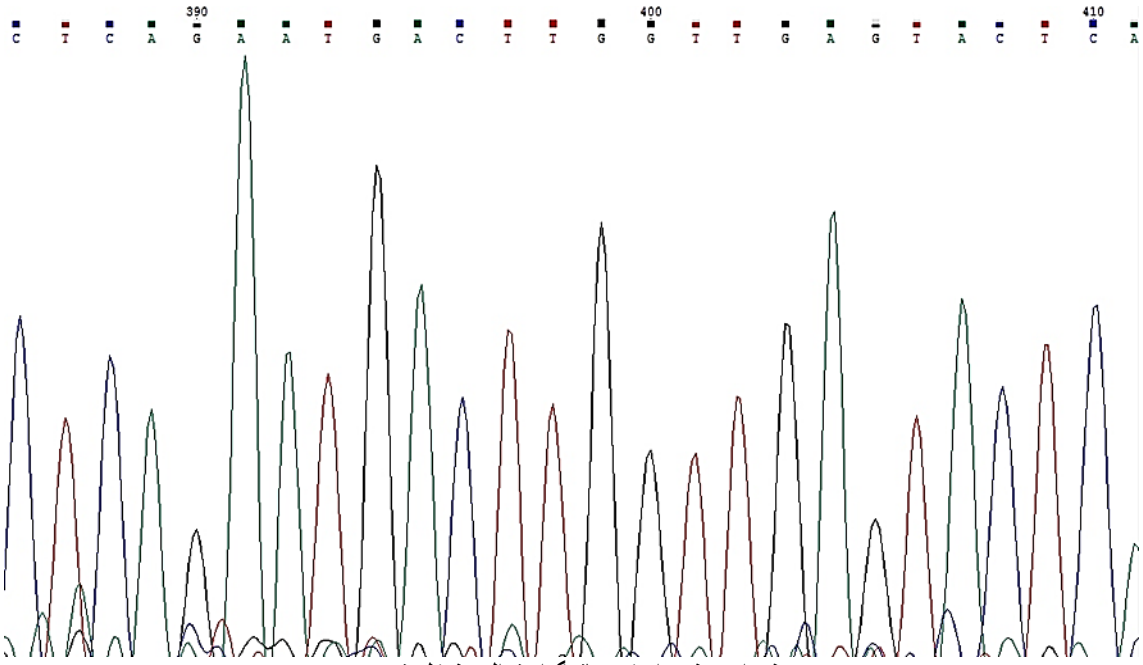
نتایج توالی‌یابی به روش سنگر

نمودارهای حاصل از توالی‌یابی نوکلئوتیدی نشان می‌دهد که کیفیت توالی‌های بدست آمده درست و فاقد noise می‌باشند و DNA استخراج شده‌ی نمونه‌های ESBL مثبت، به‌روش صحیح و شرایط دمایی درست PCR شده‌اند(نمودار۳).

در مطالعه‌ی انجام‌شده بر روی نمونه‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBL، نمودار Graphic Summary حاصل از بلاست‌کردن توالی‌های نوکلئوتیدی به رنگ قرمز می‌باشد که نشان‌از تشابه بالای توالی‌های مورد مطالعه نمونه‌های مولد ESBL، با توالی‌های موردنظر دارد.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]

پس از همردیف سازی توالی های خوانش شده در پایگاه داده NCBI، سکانس های مورد نظر بلاست گردید و نتایج زیر مشاهده شد



نمودار3: نمودار کروماتوگرام توالی نوکلئوتیدی

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

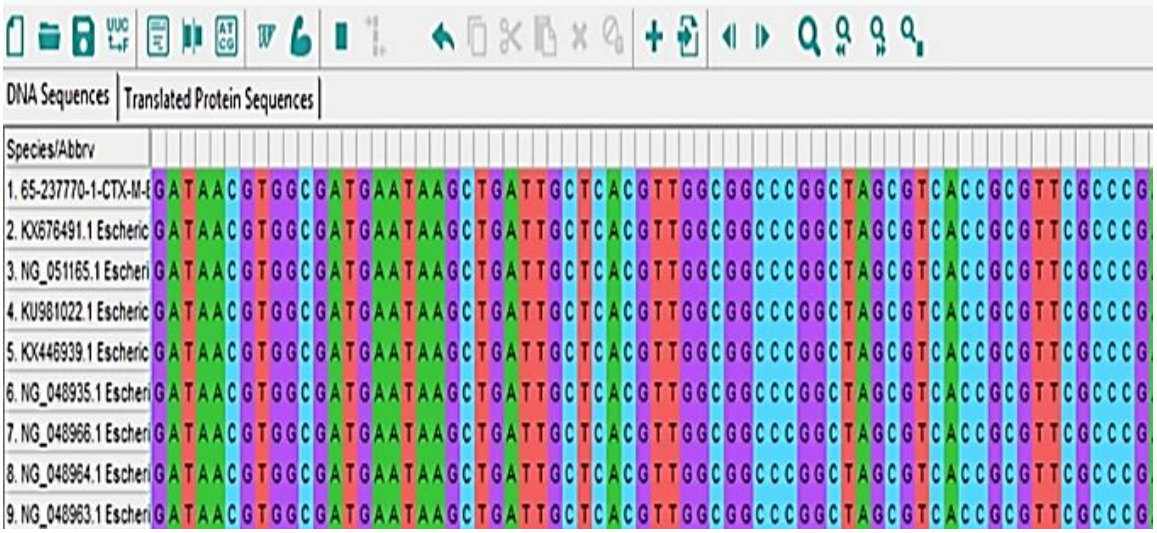
Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all *100 sequences selected* GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewe

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Escherichia coli strain EMBWKHESIC1 TEM family beta-lactamase (blaTEM) gene, partial cds	Escherichia coli	1061	1061	99%	0.0	98.66%	635	MN200725.1
Escherichia coli strain UK_Dog_Liverpool plasmid pCARB35_02, complete sequence	Escherichia coli	1061	1061	99%	0.0	98.66%	89335	CP031655.1
Escherichia coli strain 127 plasmid p43, complete sequence	Escherichia coli	1061	1061	99%	0.0	98.66%	43592	CP023380.1
Escherichia coli U184 pUE184 blaTEM gene for extended-spectrum class A beta-lactamase TEM-169, complete...	Escherichia coli	1061	1061	99%	0.0	98.66%	861	NG_050212.1
Escherichia coli strain U184 plasmid pUE184 TEM beta lactamase (bla-TEM) gene, complete cds	Escherichia coli	1061	1061	99%	0.0	98.66%	861	KP012538.1
Escherichia coli strain U195 plasmid pUE195 inhibitor resistant TEM (bla-IRT) gene, complete cds	Escherichia coli	1061	1061	99%	0.0	98.66%	861	KM350703.1
Escherichia coli strain RIVM_C029554 plasmid pRIVM_C029554_1, complete sequence	Escherichia coli	1061	1061	99%	0.0	98.66%	128103	CP068934.1
Escherichia coli strain 1EC213 plasmid pEC213_1-OXA-181, complete sequence	Escherichia coli	1061	1061	99%	0.0	98.66%	95832	CP061102.1
Escherichia coli strain AR_0015 plasmid unitig_2_pilon, complete sequence	Escherichia coli	1055	1055	99%	0.0	98.50%	88768	CP024864.1
Escherichia coli blaTEM gene for inhibitor-resistant broad-spectrum class A beta-lactamase TEM-77, complete C...	Escherichia coli	1055	1055	99%	0.0	98.50%	995	NG_050286.1
Escherichia coli 13S00929-3 blaTEM gene for inhibitor-resistant broad-spectrum class A beta-lactamase TEM-35...	Escherichia coli	1055	1055	99%	0.0	98.50%	879	NG_050264.1
Escherichia coli B24 pEC_B24 blaTEM gene for inhibitor-resistant broad-spectrum class A beta-lactamase TEM-...	Escherichia coli	1055	1055	99%	0.0	98.50%	1061	NG_050262.1

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]

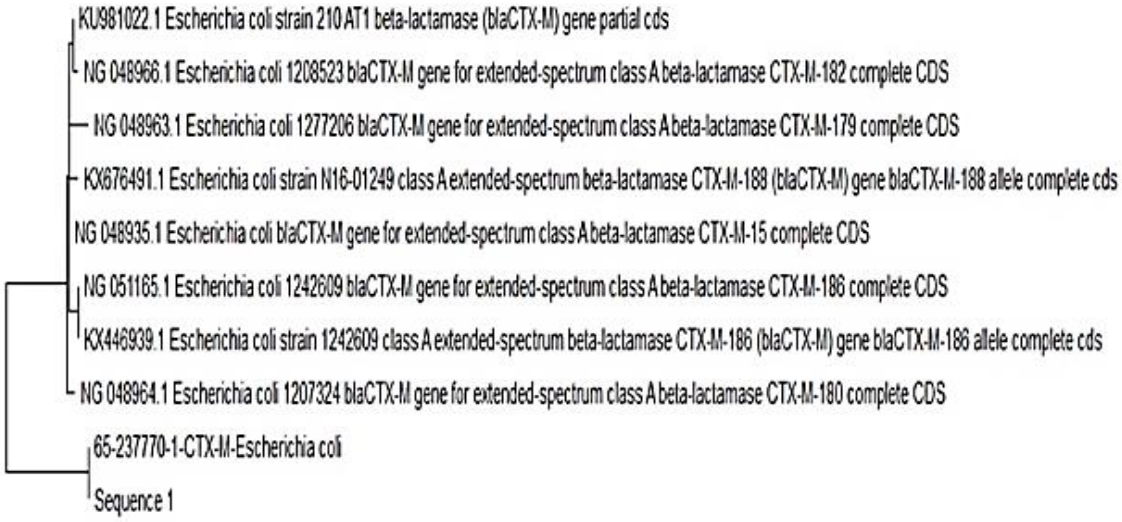
شکل ٤. نشان می‌دهد که طبق انتظار، توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مورد مطالعه، کاملا مشابه به ژن‌های *TEM*، *SHV* و *CTX-M* *اشرشیاکلی* مولد ESBL می‌باشد و با Query cover نزدیک به ۱۰۰ درصد، هم‌پوشانی(cover) بالایی دارد.



شکل ٥. نتایج حاصل از هم‌ردیف سازی توالی‌های نوکلئوتیدی ایزوله‌های *E.coli* در نرم‌افزار MEGA-x

در مطالعه‌ی انجام‌شده، طبق شکل‌های ۴و ۵، هم‌ریف سازی ژن های مولد بتالاکتاماز در سویه *اشرشیاکلی* با سایر سویه‌های *اشرشیاکلی* در نرم افزار MEGA-X انجام‌شد و نتایج بدست‌آمده نشان از انجام صحیح کارهای مولکولی دراین تحقیق می‌باشد.

تجزیه و تحلیل تکاملی در نرم افزار MEGA-X انجام شد و درخت فیلوژنی رسم‌شد.



شکل 6. رسم درخت فیلوژنی توالی نوکلنوتیدی حاصل از ایزوله های مولد ESBL در *اشرشیاکلی*

بحث و نتیجه گیری

اشرشیاکلی از پاتوژن‌های فرصت طلب بیمارستانی می‌باشد و به‌علت اکتساب پلاسمیدهای کدکننده بتالاکتامازهای

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]

وسیع‌الطیف، به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام ازجمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مقاوم شده‌است(۳).

این میکروارگانیسم شایع ترین عامل سپتی سمی دراغلب بیمارستانها بوده وعلاوه برآن، عامل درصد قابل توجهی از موارد پنومونی بیمارستانی می‌باشد. همچنین این ارگانیسم ازعلل مهم مننژیت در نوزادان، عفونت ادراری، اسهال و سندروم‌اورمی همولیتیک به شمار می‌رود. دراین میان، سویه‌های *اشرشیاکلی* تولیدکننده بتالاکتاماز با طیف وسیع به عنوان عامل مهمی در عفونت های بیمارستانی مطرح است(۳).

شناسایی و تشخیص به موقع بتالاکتامازهای با طیف وسیع (ESBLs) درباکتری های مقاوم به کارباپنم وسفالوسپورین ها، هم ازلحاظ اپیدمولوژیک وهم به منظور کمک به متخصصان درانتخاب داروی مناسب برای درمان موفق بیماران و نیز کنترل سویه‌های مقاوم به داروها و جلوگیری از انتشار چنین عفونت هایی در بیمارستان، ضروری به نظر می‌رسد(۳).

در مطالعه ی حاضر، با بررسی برروی ۱۰۰ نمونه ی بالینی از ادرار، خون، ترشحات چرکی و.... بیماران بستری، ایزوله‌های *اشرشیاکلی* با روش های بیوشیمیایی از سایر ایزوله‌ها جداسازی شدند.

برای جداسازی ایزوله‌های مولد ESBL، از روش فنوتیپی دیسک ترکیبی بر روی ایزوله‌ها انجام‌شد و ۵۴/۸ درصد ایزوله‌ی *اشرشیاکلی* مولد ESBL، جدا گردید.

در مطالعه‌ی حاضر، سویه‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBL ، افزایش مقاومت به ایمی‌پنم را نسبت به سال های گذشته بادرصد فراوانی ۵۲/۴ ٪را نشان دادند.

در مطالعه‌ای که توسط قانع در کرج در سال ۱۴۰۰ انجام‌شده‌است، بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم با ٪۶۰ گزارش شده‌است که همسو با این مطالعه‌است. درنتیجه افزایش مقاومت به این دارو نشان داده که این دارو به عنوان داروی آنتی باکتریال تجربی نمی تواند اثربخشی لازم را داشته باشد(۸).

این مطالعه سطح بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ظهور ایزوله‌های مقاوم به چند دارو(Multi Drug Resistant) ، را در بین نمونه‌های بالینی در بیمارستان منطقه‌ای نشان داد.

در مطالعه‌ی حاضر ایزوله‌های *اشرشیاکلی* بتالاکتاماز مثبت، ۵۹/۳ درصد مقاومت به چند دارو را نشان دادند که با نتایج حاصل در مطالعه‌ی مرادپور در رشت (۱۴۰۱) با فراوانی ۷۲/۷ درصد(۱۷)و با مطالعه‌ی برزگر در اردبیل(۱۴۰۱) با فراوانی ۸۴/۷ درصد نمونه‌های مقاوم به چند دارو، در مورد افزایش بروز MDR همخوانی داشته‌است(۱۴).

درمطالعه Mofolorunsh و همکارانش نیز درنیجریه(۲۰۲۱)، پاتوژن‌های *اشرشیاکلی* در برابر بیش‌از سه آنتی‌بیوتیک مقاوم‌بودند (۴۱). در مطالعه‌ای در عراق نیز ۸۷/۵ درصد سویه ها(۲۹) و در بررسی Manandhar در نپال ۹۰/۱ درصد سویه‌های *اشرشیاکلی* مقاوم به چنددارو بودند(۲۳).

همچنین در مطالعه ی انجام شده توسط Gaviria در اسپانیا(۲۰۲۲)، تمام ایزوله‌های *اشرشیاکلی* مورد مطالعه به چند دارو مقاوم بودند(۳۱).

در مطالعه‌ی حاضر بیشترین حساسیت ایزوله های *اشرشیاکلی* مربوط به آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون با فراوانی ۵۴/۸ ٪ و جنتامایسین با فراوانی ۸۳/۳ درصد می‌باشد. در نتیجه باید از آنتی بیوتیکی برای بیماران بستری بخصوص در بخش مراقبت ویژه استفاده شود که به آن آنتی بیوتیک حساس‌تر هستند و ازدادن آنتی‌بیوتیک به صورت روتین بخش و بدون انجام تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی اجتناب شود.

در مطالعه‌ی باباحیدریان در بیمارستان رسول اکرم تهران در سال ۲۰۲۳، برروی نمونه‌های انتروباکتریاسه نیز کمترین مقاومت مربوط به کولیستین و سفتریاکسون بود(۸).

در مطالعه‌ی حاضر ۹۰/۵ درصد ایزوله های *اشرشیاکلی* مقاوم به آمپی‌سیلین بودند که درصد بالای مقاومت را به این آنتی‌بیوتیک نشان می‌دهد. این مقاومت به احتمال بالا به علت استفاده بی‌رویه مردم از این آنتی‌بیوتیک‌ها است که بدون نسخه پزشک در داروخانه‌ها تهیه می‌شود.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]

مطالعه حاضر با مطالعه‌ی انجام شده با نسیمه علیزاده کنانی در تهران(۱۴۰۲)، از نظر مقاومت به آمپی‌سیلین همخوانی دارد و تمام جدایه‌ها به آمپی‌سیلین مقاوم بودند(۴).

در بررسی در اهواز (۱۴۰۰) توسط فتاحی و همکارانش، نیز میزان درصد فراوانی به آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین ۹۳/۱ درصد گزارش شد(۱۸). که با مطالعه‌ی ما همسو است. همچنین در زابل در مطالعه‌ی حمیدیان، میزان مقاومت به آمپی‌سیلین ۷۷/۱ درصد گزارش شد(۱۶).

همچنین در مطالعه‌ی Abalkhalil در عربستان، درمیان ایزوله‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBL، بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در ۱۰۰ درصد نمونه‌ها، سفتازیدیم در ۹۸/۴۳ درصد نمونه‌ها و سفتریاکسیون در ۹۹/۱۶ درصد نمونه‌ها بود(۳۲).

در مطالعه‌ی انجام شده ، ایزوله‌های بالینی مقاومت بالایی به سفتازیدیم نشان دادند. ایزوله‌های ESBL مثبت، ۸۵/۷ درصد مقاومت را به سفتازیدیم نشان دادند که حاکی از مقاومت بالا و عدم تأثیر این آنتی‌بیوتیک می‌باشد.

در مطالعه‌ی فتاحی و همکارانش در اهواز (۱۴۰۰)، مقاومت ایزوله‌های اشرشیاکلی به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم ۷۷/۵۰ درصد گزارش شد که مطالعه‌ی حاضر با نتایج آنها، همخوانی داشته‌است(۱۶).

میزان شیوع سویه‌های *اشرشیاکلی* تولیدکننده بتالاکتاماز طیف وسیع(ESBLs) در مطالعه ما ۵۴/۸ درصد بود که با مطالعات افشاری خواه در جیرفت (۱۴۰۲) ، که میزان شیوع سویه های مولد ESBL در مطالعه ی آن ها ۵۲/۸۳ درصد گزارش شده ، همخوانی داشت(۱۸).

در مطالعه‌ای در بیمارستان اطفال در نوار غزه (۲۰۲۳) توسط Nabil Abdollah، نشان می‌دهد که میزان شیوع ایزوله‌های ESBL در کودکان بیمارستان‌های غزه با نرخ شیوع ۵۱/۶ ٪ ، در حال افزایش است. با مطالعه‌ی ما همخوانی داشته‌است (۳۴).

شیوع پایین‌تری از *اشریشیاکلی* مولد ESBL در مطالعات قانع با ۳۶ درصد مشاهده شد(۷).

در مطالعه‌ی حاضر، جهت شناسایی مولکولی ژن‌های مولد ESBL ، در ایزوله های اشرشیاکلی، از روش PCR استفاده شد. . ژن *CTX-M* در ۷۸/۳ درصد ایزوله‌ها، ژن *TEM* در ۷۳/۹ درصد ایزوله‌ها و ژن *SHV* در ۲۱/۷ درصد ایزوله‌ها یافت شد. در نتیجه در این مطالعه ژن غالب، ژن *CTX-M* می‌باشد.

در مطالعه‌ای که توسط Kengkana در کامرون انجام شد، شیوع بالای ژن‌های *CTX-M* و *TEM* را در میان ایزوله های مولد ESBL ، به ترتیب با درصد شیوع ۸۹/۹۵ درصد و ۷۳/۹۱ درصد تأیید کرد(۳۶).

در بررسی‌انجام‌گرفته برروی بیماران تالاسمی توسط پیشیوان در عراق، بیشترین شیوع ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف توسط ژن *TEM* با ۸۱ درصددر ایزوله‌ها یافت شد. شیوع ژن های *CTX-M* و *SHV* به ترتیب در ۳۴/۴ درصد و ۱۶/۲درصد نمونه‌ها یافت شد(۲۷).

در مطالعه‌ای در یکی از بیمارستان های تهران توسط یاسبولاغی و همکارانش در سال ۱۴۰۰، بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک سفتازیدیم ۸۷/۶ درصد بود . شیوع ژن *TEM* (۵۹/۴درصد)، ژن *CTX-M* (۴۶/۷درصد) و ژن *SHV* (۳۲/۷ ٪) گزارش شد(۱۳).

در مطالعه‌ای در شرق آسیا توسط Peiyao Jia و همکارانش در چین (۲۰۲۱)، آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم، کلیستین، آمیکاسین و نیتروفورانتوئین فعال ترین آنتی‌میکروبیال بر علیه ایزوله‌های اشرشیاکلی مقاوم بودند. ژن *CTX-M-14*، ژن غالب در سویه‌های مولد ESBL بود، دراین مطالعه نیز ژن غالب، ژن *CTX-M* می‌باشد(۲۴).

همچنین درمطالعه‌ی Ram Shankar در نپال، ژن‌های *CTX-M* از ۵۸/۴ درصد و ژن های *TEM* در ۴۱/۶ درصد از ایزوله ها جداسازی شدند(۲۶) که درصد شیوع ژن‌های مقاوم نسبت به مطاله‌ی ما پایین‌تر است.

در بررسی انجام گرفته توسط Idrees در پاکستان(۲۰۲۳)، نیز همانند این مطالعه، بیشترین ژن کدکننده برای تولید ESBL، مربوط به ژن *CTX-M* با درصد فراوانی ۹۱/۲ درصد بود و ژن های *TEM* و *SHV* به ترتیب ۶۱/۸ درصد و ۱۷/۶درصد

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]

یافت شدند(۲۲) و همچنین تحقیق انجام‌شده درسال ۲۰۲۴ در پاکستان بر روی عفونت‌های مجاری ادرای توسط Riaz، ۲۸درصد ایزوله‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBL بودند(۲۸).

این مطالعات نشان‌دادند که بیشترین شیوع ژن‌های ESBL در کشورهای چین، نپال و پاکستان همانند مطالعه ما ، ژن *CTX-M* می‌باشد.

دراین مطالعه بیشتر سویه‌های *اشرشیاکلی* ESBL مثبت از ژن‌های *TEM*، *CTX-M* منشأ گرفته و باعث مقاومت به آمپی‌سیلین، سفتازیدیم ، همچنین سفالوسپورین‌های نسل‌سوم و کارباپنم ها شده‌است. وقتی موتاسیون در ژن های کدکننده *TEM*، *CTX-M* و *SHV* اتفاق می‌افتد، بتالاکتامازهای جدیدی تولید می‌شود که قادرند سفالوسپورین‌های نسل سوم و کارباپنم را هیدرولیز کنند.

در مطالعه مصدق و همکارانش در یزد در سال ۲۰۲۰، کارباپنم‌ها موثرترین آنتی‌بیوتیک علیه ایزوله‌ها بودند. به طور کلی ۲۷ سویه از نظر تولید بتالاکتاماز وسیع‌الطیف مثبت بودند. ۸۹ درصد ایزوله‌ها از نظر ژن *CTX-M* مثبت بودند(۱۷).

در بررسی انجام گرفته توسط Azab. و همکارانش در ۳کشور سودان، عربستان و مصر در سال ۲۰۲۱، ژن *CTX-M* ، ژن غالب در تمامی جدایه‌ها بود(۱۰۰ درصد) درحالی‌که ژن *TEM*در ۶۶/۷ درصد جدایه‌ها شناسایی شد. نشان از افزایش شیوع ژن‌های ESBL است و پیشنهاد می‌کنند مقامات پزشکی فوراً نظارت ضدمیکروبی را اجرا کنند و همسو با مطالعه ما است(۳۷).

در مطالعه‌ی حاضر، ژن‌های *SHV*، در بین ایزوله‌های مولد ESBL، در ۲۱/۷ درصد ایزوله‌ها یافت شدند. این مطالعه نشان‌داد که میزان شیوع ژن های *SHV* نسبت به ژن های *CTX-M* و *TEM* پایین‌تر است ولی نسبت به مطالعات گذشته درحال افزایش می‌باشد.

میزان شیوع ژن *SHV* در مطالعه‌ی فکری‌کهن در یکی از بیمارستان‌های رشت، ۸۹/۸ درصد می‌باشد که افزایش شیوع بالایی را دربین ایزوله‌های *اشرشیاکلی* نشان می‌دهد. همچنین ژن‌های *TEM* در ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها و ژن *CTX-M* در ۸۹ درصد ایزوله‌ها یافت شده که بسیار نگران‌کننده می‌باشد ،چرا که در بین شهرهای ایران بیشترین شیوع ژن‌های بتالاکتاماز توسط این تحقیق بیان شده‌است(۵).

از طرفی در مطالعه‌ی انجام شده در خرم‌آباد، از مجموع ۱۳۰ جدایه، تنها ۳۱/۵ درصد جدایه‌ها مولد ESBL بودند و ژن های *TEM* و *SHV* به ترتیب در ۱۸/۴ درصد و ۱۷/۶درصدایزوله‌ها شیوع داشتند. در نتیجه در شهر خرم‌آباد شیوع ایزوله‌های ESBL نسبت به سایر مناطق ایران پایین‌تر بود(۱۹).

در مطالعه‌ی حاضر بروز ژن‌های SHV CTX-M وTEM در ۲۱/۷۳درصد از ایزوله‌ها و بروز چند ژن مقاومت CTX-M-*TEM* در ۴۷/۸۲ درصد از ایزوله‌ها مشاهده‌شد.

در مطالعه‌ای در نوارغزه توسط Nabil، نیز در ۸۵ درصد ایزوله‌ها و در بررسی باباحیدریان در ۴۹/۳ درصد بروز چندژنی مشاهده شد(۹) که با نتایج ما ، همخوانی دارد(۲۹). همچنین در بررسی انجام گرفته توسط Hassuna، همزیستی دو ژن *TEM* و *CTX-M* در ۲۱/۲۵ درصد ایزوله‌ها و *CTX-M* و *SHV*، در ۱۰ درصد ایزوله‌ها گزارش شد(۲۱).

از آنجا که ژن‌های بتالاکتاماز طیف گسترده، اغلب بر روی پلاسمید حمل می‌شوند ، به واسطه‌ی انتقال افقی می‌توانند به سویه‌های دیگر منتقل شوند و باعث افزایش سویه‌های مقاوم در مراکز درمانی شوند. لذا باید تدبیری اندیشه شود که مانع افزایش شیوع ژن‌های ESBL و مقاومت دارویی، در مراکز درمانی و بیمارستان‌ها شد.

دراین مطالعه توالی ژن‌های ایزوله‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBL، به روش سنگر توالی یابی شد. توالی‌های موردنظر با برنامه کروماس استخراج گردید.

جهت پیداکردن توالی‌های نوکلئوتیدی مشابه توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده در پایگاه داده NCBI، بلاست گردید. نتایج بدست‌آمده نشانگر آن است که توالی‌های بدست‌آمده به درستی توالی‌یابی شده‌اند.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]

در توالی‌یابی نوکلئوتیدی به روش گرافیکی، توالی‌های نوکلئوتیدی مشابه با امتیاز بیش از ۲۰۰، توالی‌هایی هستند که شباهت بیشتری باهم دارند و با خطوط قرمز نشان داده می‌شود. که توالی‌های نوکلئوتیدی بدست‌آمده ازاین تحقیق، جورشدن بالایی را با توالی‌های نوکلئوتیدی دیگر نشان می‌دهد.

پارامتر E-valu بدست‌آمده از بلاست کردن توالی‌های نوکلئوتیدی ، عدد کمتر از ۰/۰۱ را نشان‌داد که می‌توان با اطمینان بیشتری گفت که توالی‌های بدست‌آمده از ایزوله‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBL، با توالی‌های نوکلئوتیدی ایزوله‌های اشرشیاکلی مشابهت دارد. و همچنین پارامتر Query cover بدست‌آمده از توالی‌یابی ، درصد بالای ۹۹درصد را نشان‌داد که نشان‌می‌دهد ایزوله‌های *اشرشیاکلی* مورد تحقیق به‌درستی جداسازی شده‌اند.

نتیجه گیری

فراوانی سویه‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBL در این مطالعه نشانگر این است که تولید ESBL یک تهدیدبزرگ در مصرف سفالوسپورین‌های نسل سوم به شمارمی رود. بنابراین استفاده از روش‌های مولکولی جهت مطالعات وسیع‌تر و شناسایی انواع آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف‌وسیع و ردیابی انواع ژن‌های ESBL، در جلوگیری از گسترش مقاومت‌ها می‌تواند تأثیرگذار باشد.درنتیجه، شیوع ایزوله‌های ESBL، در مناطق جغرافیایی مختلف در جهان و حتی در شهرهای مختلف ایران ومتفاوت بودن شیوع‌آن از بیمارستانی به بیمارستان دیگر، مطالعات از این دسته بطور هر ساله ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از پرسنل محترم بیمارستان الغدیر تهران ، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه‌آزاد واحد تهران-شمال و اساتید محترم ، خانم دکتر حسینی و مسئولین محترم مراکز تحقیقات میکروبیولوژی خانم کاتوزیان و سرکار خانم رضوی‌پور جهت همکاری صمیمانه در پیش برد مراحل عملی تحقیق کمال تشکر را دارم.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]

منابع

1. Kalashani s, Sharifi Y, Talebi R. The frequency of *TEM*, *SHV* and *OXA* Genes among Extended-Spectrum Beta-lactamase producing *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* obtained from kidney transplant patients Iran. Studies in MedicalSciencesjournal.2020;31(7).

2. Broks, G. butel, g.M orse, E. (2010). Jawetz Medical Microbiology.

3. Shams S, Hashemi A, Kermani S, Esmkhani M, Tarashi S. Determination of Extended-spectrum beta- lactamase Genes *(bla TEM-bla SHV, bla CTX-M* in Escherichia coli Strains Isolated from Clinical Specimens in Ali-Ibne Abi Taleb Hospital in Qom, Iran. Qom university of medical sciences journal.2017; Vol.10, No.

4. Alizadeh-DarzehKanani N, Jabalameli L, Beigverdi R, Jabalameli F. Phenotypic and Genotypic Detection of AmpC in *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Urinary Tract Infection, Tehran. Journal of Knowledge and Health in Basic Medical Sciences.2023;18(2):1-8.

5. FekriKohan Sh, Hedayati M, Balasbaneh Z, Majlesi Sh, Ranji N. Investigation of *SHV*, *TEM*, and *CTX-M* Genes Frequency in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Children with UTI in Rasht, city, Iran. Studies in Medical Sciences. 2022; 33(2):80.

6. Nejat S H, Abbasi Montazeri E, Ebrahimipour Gh, Savari M. Examining the Frequency of bla CTX-M and bla TEM Genes in *Escherichia coli* Isolates with Muitiple Drug Resistance from Patients Hospitalized in Ahvaz University Hospitals.Jundishapur Scientific Medical Journal. 2023; 22(4):469-482.

7.Ghane M, Adham F. Frequency of *TEM* and *PER* Beta-Lactamase Genes in Urinary Isolates of *Escherichia coli* Producing Extended –Spectrum Beta-Lactamases, Presian.International Journal of Applied Mathematical Sciences.2020; 22(6):218-229.

8. Babaheidarian P, Mehdinejad M, Zare-Mirzaie A, Mokarinejad R, Jafari E. The Association Between Genetic Variants in Extended Spectrum Beta-Lactamases and AmpC-producing Gram-Negative Bacilli and Antibiotic Resistance. Iranian Journal of Medical microbiology.2022; 16(2): 116-126.

9. Amirmozafari N, BabaieKamaie Z, Mohsenpour M. The Frequency Beta lactamase genes in *Escherichia coli* isolate from outpatient suffering from urinary tract infections in Guilan province. Yafte Journal of Medical Sciens.2018; 19(5):4352.

10. Khalili A, Zaboli F, Nazarian Sh. Antibiotic Resistance Pattern and Prevalence of Beta-Lactamase *CTX-M* Gene in isolated ESBL-Producing *E. coli* in Mazandaran, Iran.Sadra Medical Sciences Journal.2018; 6(2): 101-112.

11. Hamidian K, et al; Antibiotic Resistance and Patterns and Prevalence of Class I, II and III Integrons among *Escherichia coli* Strains collected from Urinary Tract Infections in Patients Referred to Amiralmomenin Hospital, Zabol, Iran. Journal of Ardebil University of Medical Sciences.2021; 21.1. 66.

12. Moradi A, Ghiasian M, Ghandehari F. Molecular Identification of *CTX-M* and *SHV* Beta-lactamase Genes in *Escherichia coli* Clinical Isolates in Isfahan.Armaghane-danesh,Yasuj University of Medical Sciences Journal. 2022; 27(4) 472-483.

13. Yasbolaghi Sharahi J, Hashemi A, Ardebili A, Davoudabadi S. Molecular characteristics of antibiotic resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* strains isolated from hospitalized patients in Tehran, Iran. Annals of Clinical and Antimicrobials.2021; 20:30

14. Barzegar J, et al. Prevalence of the Integrons and ESBL Genes in Multidrug-Resistant Strains of *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections, Ardabil, Iran. Iranian Journal of Medical microbiology.2022; 16(1): 56-65.

15. Muradpour A, Anuri M, Toubi Shafiqi S, Sedq Ebrahim –Sarai H. Investigation of Antibiotic Susceptibility Pattern and Frequency of Serogroups O25 and O16 and among Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated in Rasht City. Arak University Medical Sciences.2022; 25(5):3-9.

16. Fatahi L, Soleimani Zar M. Evaluation of Urine Isolated Bacteria and Their Antimicrobial Resistance in Hospitalized Patients in Ahvaz Golestan Hospital. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2021; 20(2): 128-139.

17. Mosadegh A, Astani A, Naghizadeh H, Mardaneh J. Characterization of Antibiotic Resistance and Detection of *pap* and *bla CTX-M* in *Escherichia coli* isolates. Quarterly of The Horizon of Medical Sciences. 2022; 26(4): 448-467.

18. Afsharikhah S; et al. High prevalence of β-lactam and fluoroquinolone resistance in various phylotypes of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in Jiroft city, Iran.BMC Microbiology. 2023; 23:114.

19. Delfani S, Kalantar-Neyestanaki D, Goudarzi Gh, Soroush S, Rezaei F. Characterization co-existence of ESBL, AmpC and MBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Khorramabad Hospitals.Yafte Journal of Medical Science. 2020; 22(3):58-67.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]

20. Chaudhary M. K, Jadhav I, Banjira M. Molecular detection of plasmid mediated *blaTEM, blaCTX− M*, and *blaSHV* genes in Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL) *Escherichia coli* from clinical samples. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2023; 22:33.

21. Hassuna NA; et al. Molecular characterization of Extended- spectrum β lactamase-producing *E. coli* recovered from community- acquired urinary tract infections in Upper Egypt. Scientific Reports. 2020;10; 2772.

22.Idrees, M. M, Rimsha R, Idrees M, D, Saeed A. Antimicrobial Susceptibility and Genetic Prevalence of Extended-Spectrum β-Lactamases in Gram-Negative Rods Isolated from Clinical Specimens in Pakistan. Antibiotics Journal. 2023; 12: 29.

23. Manandhar S; et al. A high prevalence of multi-drug resistant Gram-negative bacilli in a Nepali tertiary care hospital and associated widespread distribution of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and carbapenemase-encoding genes. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.2020; 19; 48.

24. Jia P., et al. High prevalence of extended-spectrum of beta-lactamases in *Escherichia coli* strains collected from strictly defined community-acquired urinary tract infections in adults in China: a multicenter prospective clinical microbiological and molecular study. Frontier in Microbiology. 2021; 12: 663033.

25. Perera P. D. V. M; et aL. Phenotypic and genotypic distribution of ESBL, AmpC β-lactamase and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in community-acquired and hospital-acquired urinary tract infections in SriLanka.Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2022; 115-122.

26. Sah R.S. P; et al. Detection of TEM and CTX-M Genes in *Escherichia coli* isolated from clinical specimens at tertiary care heart hospital, Kathmandu, Nepal. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.2020; 9: 15.

27. Pishtiwan A.H, Khadija Kh. Prevalence of bla TEM, blaSHV and blaCTX-M Genes among ESBl-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolated from Thalasemia patients in Erbil, Iraq. Mediterranean Journal of Hematology Infectious Diseases.2019; 11(1): e2019041.

28. Riaz M; et al. The abundance of ESBL-expressing, multidrug-resistant *Escherichia coli* in Pakistani patients with urinary infections, Pakistan. Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery. 2024; 55:03.1673-0860.

29. AROOJ I, Ijaz S, Elahi A, Khan P. Antibiotic sensitivity of ESBL-producing gram-negative bacteria among patients of urinary tract infections in Southern Punjab, Pakistan. Research Square.2022;10. 21203.

30. Ramachandran G; et al. Isolation and molecular identification of extended spectrum beta-lactamase producing bacteria from urinary tract infection, Indian. Journal of Infection and Public Health12. 2021; 1911-1916.

31. Gaviria L.P; et al. A Descriptive Analysis of Urinary ESBL-Producing- Escherichia coli in Cerdanya Hospital. Microorganisms. 2022; 10, 488.

32. Abalkhail, A; AIYami, A.S; et al. The prevalence of multidrug- resistant Escherichia *coli* producing ESBL among male and female patients with Uninar Tract infections in Riyadh Region Saudi Arabia. Healthcare Journal. 2022,10, 1778.

33.Sonda T; et al. Prevalence and risk factors for CTM-M gram-negative bacteria in hospitalized patients at a tertiary care hospital in Kilimanjaro, Tanzania. European Journal of Clinical Microbiology. 2018; 37:897-906.

.34. El Alia N.A, Laham N, Ayesh B. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase and molecular detection of *blaTEM, blaSHV* and *blaCTX-M* genotypes among Gram negative bacilli isolates from pediatric patient population in Gaza strip. BMC Infectious Diseases.2023; 23;99.

35. Abrar S; et al. Distribution of *blaCTX-M, TEM, SHV* and *OXA* genes in Extended-spectrum-B-lactamase-producing clinical isolated: A terr-year multi- center study from Lahore, Pakistan. Antimicrobial Resistance and Infection Control. 2019; 8:80.

36. Nkengkana O, A; et al. Phenotypic and genotypic characterization of multidrug resistant and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Entrobacterales* isolated from clinical from samples in the western region in Cameroon..BMC Infectious Disease. 2023; 23;819.

37. Azab K. S. M, et al. Distribution of Extended-Spectrum Beta-lactamase (ESBL)- Encoding Genes among Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens Collected from Tree Different Countries. Antibiotics Journal.2021;10;247.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]

Phenotypic and Genotypic Analysis of the Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Extended-Spectrum Beta-Lactamase Genes in *Escherichia coli* Strains Isolated from Clinical Samples of Hospitalized Patients in Tehran Using PCR

Raziyeh Taraghlizadeh Marzroud [1], **Pedram Heidari**[2*]

[1] Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[2] Department of Microbiology, Khoy Branch, Islamic Azad University, Khoy, Iran

Abstract

In recent years, the increase in *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) has limited treatment options. This study was conducted on 100 *E. coli* isolates over a period of 3 months. The sensitivity of the isolated bacteria to 7 types of antibiotics was determined using the disk diffusion method according to the CLSI 2021 standard guidelines. The strains were examined for the presence of ESBL enzymes using the combined disk test (CDDT). The CTX-M, SHV, and TEM genes were identified using PCR, and some isolates were sequenced using the Sanger method and blasted in the NCBI database. Among the 42 isolated *E. coli* strains, resistance to ampicillin, ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, nalidixic acid, ceftriaxone, and gentamicin was 90.5%, 85.7%, 59.5%, 52.4%, 40.5%, 35.7%, and 9.5%, respectively. Out of 23 isolates (54.8%) that were ESBL positive, 78.3% carried the CTX-M gene, 73.9% harbored the TEM gene, and 21.7% had the SHV gene. The prevalence of ESBL-producing *E. coli* strains in this study indicates that ESBL production and its prevalence vary from city to city. Therefore, the use of antibiogram methods, molecular diagnosis, and identification of different types of extended-spectrum beta-lactamase genes should be periodically performed in all healthcare centers and hospitals.

Keywords: *Escherichia coli*, Extended-Spectrum Beta-Lactamase, Disk diffusion, ESB

* Pe.HHeidari@iau.ac.ir

[Downloaded from amfi.ir on 2025-09-15]