



بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی شیوع ژن‌های بتالاکتاماز طیف گسترده *SHV*, *TEM* و *CTX-M* در سویه‌های/شرشیاکلی جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در تهران به روش PCR

راضیه تارقلیزاده مرز رود^۱، پدram حیدری^{۲*}

^۱ گروه میکروبیولوژی واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه میکروبیولوژی واحد خوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی، ایران

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

چکیده

در سال‌های اخیر، افزایش سویه‌های/شرشیاکلی تولیدکننده‌ی بتالاکتامازهای طیف گسترده، منجر به محدود شدن گزینه‌های درمانی شده‌است. در این مطالعه ۱۱۰ ایزوله‌ی/شرشیاکلی در مدت ۳ ماه جمع‌آوری شد و حساسیت باکتری‌های جدا شده 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 *SHV*, *CTX-M* و *TEM* با روش PCR شناسایی و تعدادی از ایزوله‌ها به روش توالی‌یابی سنگر، تعیین توالی و در پایگاه داده NCBI، بلاست گردید. از ۴۲ ایزوله‌ی/شرشیاکلی جداسازی شده، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین، ایمپنم، نالیدیکسیک اسید، 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/شرشیاکلی، ۲۳ ایزوله (۵۴/۸ درصد) مولد بتالاکتاماز طیف گسترده بودند. در این میان ۷۸/۳٪ ایزوله‌ها دارای ژن *CTX-M*، ۷۳/۹ درصد ایزوله‌ها دارای ژن *TEM* و ۲۱/۷ درصد ایزوله‌ها دارای ژن *SHV* بودند. فراوانی بالای سویه‌های/شرشیاکلی مولد ESBL، در این مطالعه نشانگر این است که تولید ESBL و شیوع آن از شهری به شهر دیگر متفاوت است. بنابراین توصیه می‌شود 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: /شرشیاکلی، بتالاکتاماز طیف گسترده، دیسک دیفیوژن، ESBL

* Pe.HHeidari@iaau.ac.ir

مقدمه

خانواده انتروباکتریاسه، بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین باسیل‌های گرم منفی را شامل می‌شوند که از نمونه‌های بالینی جدا می‌شوند. در این بین، شرشیاکلی از شایع‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی بوده و با فراوانی بالا از عفونت‌های دستگاه‌ادراری و خون بدست می‌آیند (۱).

اعضای انتروباکتریاسه باسیل‌های گرم منفی 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 بی‌هوازی (بی‌هوازی اختیاری) رشد می‌نمایند (۲). /شرشیاکلی، یکی از شایع‌ترین عوامل باکتریایی است که از عفونت‌های انسانی جدا شده و باعث عفونت دستگاه‌ادراری، گوارشی و مننژیت در نوزادان می‌شود (۳).

به طور تبیین /شرشیاکلی، آزمون‌های اندول، لیزین دکربوکسیلاز و تخمیر مانیتول مثبت دارد و از گلوکز گاز تولید می‌کنند. نمونه باکتری جدا شده از ادرار، ایجاد پرگنه با جلای رنگین کمانی در محیط افتراقی نظیر اتوزین متیلن‌بلو آگار و آزمون نقطه‌ای اندول مثبت به سرعت به عنوان /شرشیاکلی قابل شناسایی است (۲).

این باکتری یکی از پاتوژن‌های فرصت طلب گرم منفی بوده که به علت اکتساب پلاسمیدهای کد کننده بتالاکتامازهای طیف گسترده (ESBLs)، به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتاماز از جمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مقاوم شده‌اند و از این رو 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)، که در 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 ناشی از باکتری /شرشیاکلی استفاده می‌گردد، به دلیل افزایش بروز مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها درمان عفونت‌ها به طور فزاینده‌ای بحث برانگیز شده است (۴).

یکی از رایج‌ترین مکانیسم‌های مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشد (۴). بتالاکتامازهای با طیف گسترده، آنزیم‌های هستند که علاوه بر ایجاد مقاومت به پنی‌سیلین‌ها، واسطه‌ای ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین‌های نسل سوم مثل سفنازیدیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم و منوباکتام‌ها مثل آرترونام می‌شوند (۱).

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

در سال ۱۹۸۳، اولین سویه تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs¹، 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 شده است (۵).

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

¹ Extended-spectrum beta-lactamases

گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد جهت انجام آزمایشات بعدی نگهداری و ذخیره سازی شدند.

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

جهت تعیین حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های /شرشیاکلی، از روش دیسک انتشار دیفیوژن (کری 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 مولر هیتون آگار به صورت کشت چمنی تلقیح شد.

سپس تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی نمونه ها نسبت به ۷ نوع آنتی بیوتیک (ساخت شرکت پادتن طب)، شامل سفنازیدیم ۳۰ میکروگرم، سفتریاکسون ۳۰ میکروگرم، ایمپنم ۱۰ میکروگرم، نالیدیکسیک اسید ۳۰ میکروگرم، سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم، جنتامایسین ۱۰ میکروگرم و آمپی سیلین ۱۰ میکروگرم انجام شد. دیسک های آنتی بیوتیک به فاصله ۲۵ میلی متر از یکدیگر قرار داده شدند و پس از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد باکتری در اطراف هر دیسک با خط کش اندازه گیری و تفسیر نتایج طبق دستورالعمل CLSI 2021، به صورت نمونه های مقاوم، نیمه حساس و حساس گزارش شد. از باکتری استاندارد /شرشیاکلی با ۲۵۹۲۲ ATCC به عنوان شاهد استفاده شد.

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

جهت انجام این آزمایش، ابتدا از ایزوله های /شرشیاکلی بعد از کشت ۲۴ ساعته، برابر استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد و به صورت چمنی بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد. سپس دیسک های سفنازیدیم و سفوتاکسیم با غلظت ۳۰ میلی گرم، به فاصله ۲۵ میلی متر از دیسک های حاوی سفنازیدیم - کلاوولانیک اسید و سفوتاکسیم - کلاوولانیک اسید با غلظت های ۳۰-۱۰ میلی گرم، بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار در شرایط استریل قرار داده شدند. ایزوله هایی که قطر هاله عدم رشد آن ها در اطراف

این توانایی، موجب بروز مقاومت های دارویی چندگانه، در بین ایزوله های مولد ESBL، می شود. میزان مرگ و میر در این گروه به طور قابل توجهی نسبت به عفونت های ناشی از باکتری های حساس به آنتی بیوتیک بالاتر است (۱).

باکتری ها یا پاتوژن های مقاوم به چند دارو (Multi Drug Resistant)، به انواعی از پاتوژن ها گفته می شوند که به چند داروی ضدمیکروبی مقاوم هستند (۵).

تنوع جغرافیایی در الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در اغلب پاتوژن ها مشاهده می شود و این امر در تنظیم استراتژی های مؤثر ضدمیکروبی در مراکز درمانی ضروری است (۵).

این مطالعه، با توجه به اهمیت مقاومت های آنتی بیوتیکی و گسترش روزافزون ژن های مولد ESBLs، اقدام به بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی شیوع ژن های مرتبط با بتالاکتامازهای با طیف گسترده نظیر SHV، CTX-M و TEM، در بین جدایه های /شرشیاکلی بدست آمده از بیماران بستری نموده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه ی توصیفی-مقطعی، در بازه زمانی فروردین تا خرداد ماه ۱۴۰۱، تعداد ۱۰۰ نمونه ی بالینی شامل نمونه های ادرار، خون، زخم و ترشحات از بیمارستان الغدیر تهران جمع آوری شد. (کد اخلاق با شماره IRIAU.TNB.REC.1403.008 دریافت شده است).

جهت جداسازی ایزوله های /شرشیاکلی، نمونه ها بر روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار و مک کانکی آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. نمونه ها از نظر رشد باکتری و تشکیل کلونی روی محیط های کشت بررسی شدند. بعد از مشاهده جلای فلزی کلنی های باکتری بر روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو، تست های شیمیایی افتراقی نظیر TSI، سیرات، اوره آز، تولید اندول و MR/VP مورد بررسی قرار گرفتند.

پس از تعیین هویت باکتری ها در آزمایشات کلاسیک، سویه های خالص شده در محیط BHI مایع حاوی ۳۰ درصد

پرایمرهای اختصاصی این ژن‌ها (ساخت شرکت متابیون آلمان) صورت گرفت (جدول ۱) برای انجام آزمایش PCR، از حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲ میکرولیتر مسترمیکس (ساخت شرکت پیشگام)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای پیشرو و معکوس، ۶ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل و ۵ میکرولیتر DNA، استفاده شد. برنامه‌ی دستگاه ترموسایکلر استفاده شده جهت تکثیر قطعات ژنوم در جدول ۲ آمده است. بعد از اتمام PCR و تکثیر ژن، برای بررسی محصولات PCR، از الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد. رنگ آمیزی محصولات PCR، با رنگ DNA safe stain انجام شد و برای مقایسه اندازه قطعات ژنوم از DNA ladder 50 bp استفاده شد.

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

بررسی ژنوتیپی ایزوله‌های مولد ESBLs

برای استخراج DNA، ایزوله‌های /شرشیاکلی، ابتدا کشت تازه از نمونه‌ها بر روی محیط کشت مولر هینتون براث در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام گردید. بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA سازنده شرکت (کیاژن-ایران) انجام شد. کمیت و کیفیت ژنوم استخراج شده از طریق ژل الکتروفورز ۲ درصد بررسی شد و ژنوم بدست آمده 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 /شرشیاکلی با

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

ژن هدف	(5' to 3') توالی پرایمر	شماره رفرنس (bp) ساینز
<i>CTX-M-F</i>	GCGATGGGCAGTACCAGTAA	392bp ^۳
<i>CTX-M-R</i>	TTACCCAGCGTCAGATTCCG	392bp ^۳
<i>SHV-F</i>	TTAGCGTTCCTCCAGTGCTC	846bp ^۳
<i>SHV-R</i>	GGTTATGCGTTATATTCGCC	846bp ^۳
<i>TEM-F</i>	TCGGGGAAATGTGCGCGG	972bp ^۳
<i>TEM-R</i>	TGCTTAATCAGTGAGGCACC	972bp ^۳

جدول ۲: شرایط PCR برای تکثیر ژن‌های *bla(CTX-M, SHV, TEM)*

مراحل واکنش	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)
ژن <i>blaCTX-M</i> <i>blaSHV</i> <i>blaTEM</i>		
دناتوراسیون اولیه	۹۴	۵
دناتوراسیون ثانویه	۹۴	۱
اتصال	۵۸	۱
طویل شدن	۷۲	۱
طویل شدن نهایی	۷۲	۵
کل سیکل	۳۶	

نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین با ۸۳/۳٪ و آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون با ۵۴/۸٪ گزارش شد (نمودار ۱).
در این مطالعه ۲۳ سویه معادل ۵۴/۸ درصد از کل نمونه‌ها تولیدکننده‌ی آنزیم بتا‌لاکتاماز مثبت بودند

نتایج شیوع ژن‌های مقاومت

مولکول DNA نمونه‌های ESBL مثبت با استفاده از کیت استخراج شرکت کیاژن استخراج گردید.
مولکول DNA نمونه‌های بتا‌لاکتاماز مثبت با استفاده از ۳جفت پرایمراختصاصی برای بررسی وجود ژن‌های (blaCTX-M, TEM, SHV) به روش واکنش PCR، تکثیر شد و نتایج واکنش PCR، از طریق الکتروفورز بر روی ژل الکتروفورز ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

در پژوهش حاضر مطابق نمودار ۲، ژن CTX-M با فراوانی ۷۸/۳ درصد، بیشترین شیوع ژن را دارا می‌باشد. افزایش شیوع این ژن در بیماران بستری بسیار نگران‌کننده می‌باشد (شکل ۱).

توالی‌یابی DNA به روش سنگر

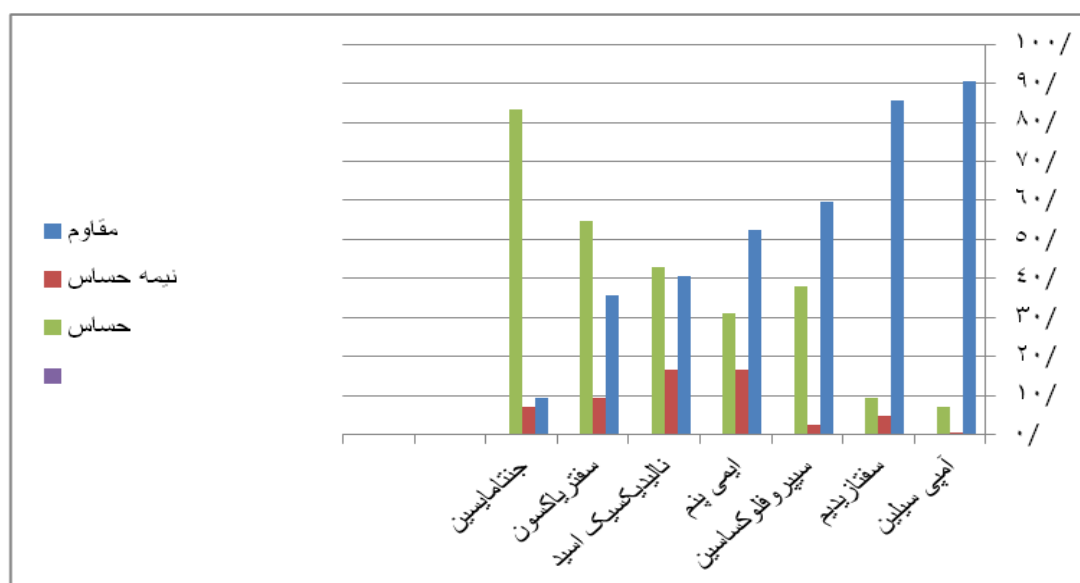
در این مطالعه، تعدادی از نمونه‌های حاوی ژن‌های بتا‌لاکتاماز مثبت، بعد از انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن‌های CTX-M، TEM و SHV و مشاهده باندهای موردنظر به روش الکتروفورز، جهت توالی‌یابی به روش سنگر توسط آزمایشگاه کدون توالی‌یابی گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی مشابه در برنامه MEGA-X، همردیف سازی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

تجزیه و تحلیل آماری ایزوله‌ها با آزمون SPSS انجام شد و نمونه‌های سطح معنی‌دار کمتر از $P\text{-value} < 0.05$ ، را نشان دادند

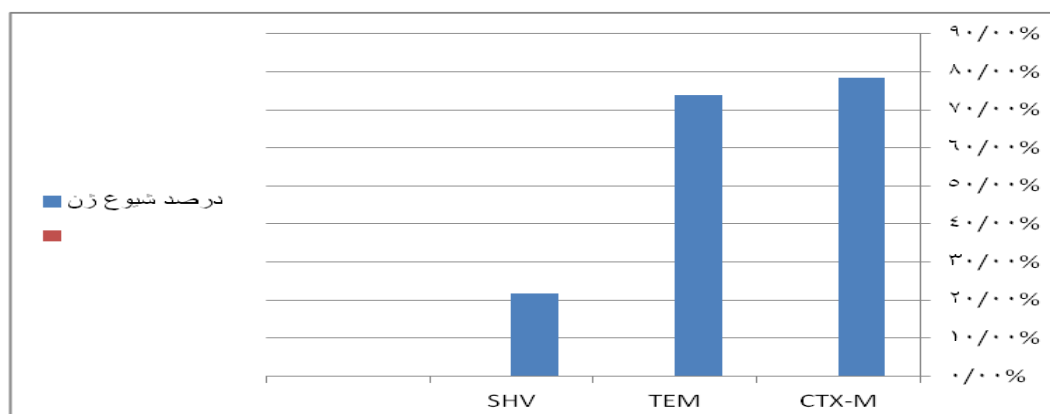
نتایج

در این مطالعه، از ۱۰۰ نمونه‌ی جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی بیماران، ۴۲ ایزوله‌ی /شرشیاکلی، تعیین هویت و شناسایی شدند. بر اساس تست مقاومت آنتی‌بیوگرام، ۵۳/۳ درصد ایزوله‌ها، مقاوم به چند دارو شناسایی شدند.

در این تحقیق، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های /شرشیاکلی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین با ۹۰/۵ درصد، آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم با ۸۵/۷ درصد، سیپروفلوکساسین ۹۵/۵ درصد و آنتی‌بیوتیک ایمی پنم با ۵۲/۴٪ می‌باشد و همچنین کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی

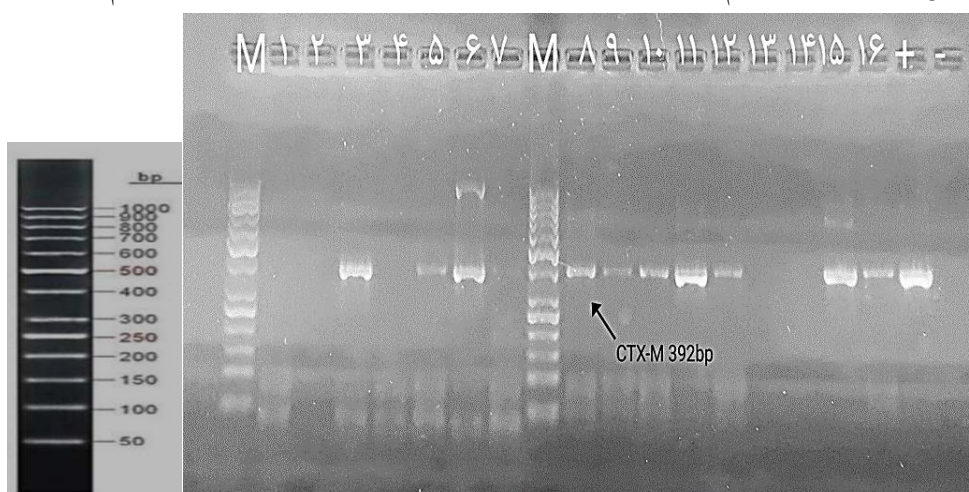


نمودار ۱: نمودار آزمون آنتی‌بیوگرام نمونه‌های /شرشیاکلی

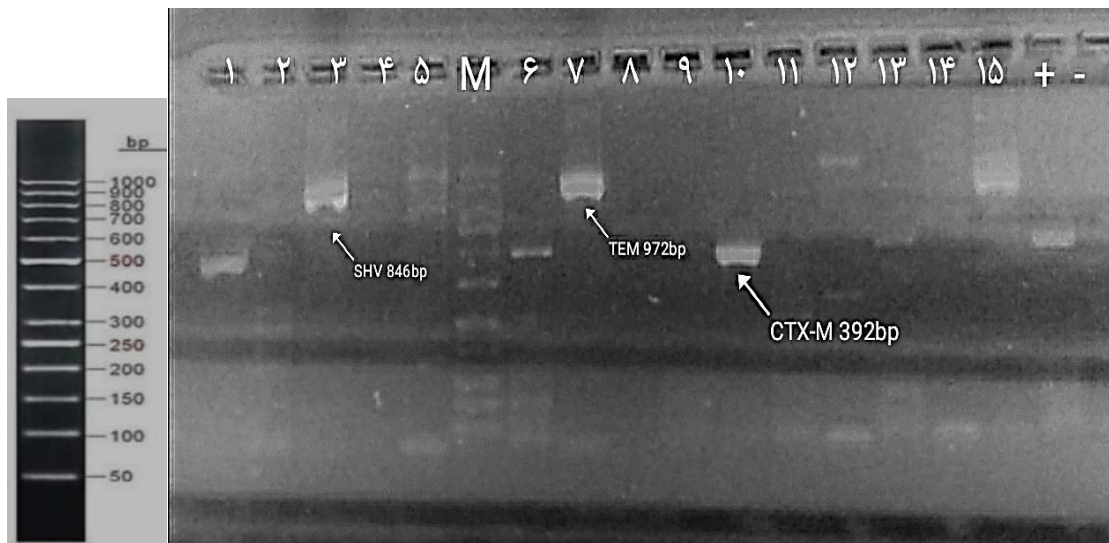


نمودار ۲: میزان شیوع ژن‌های ESBL مثبت ایزوله‌های/شرشیاکلی

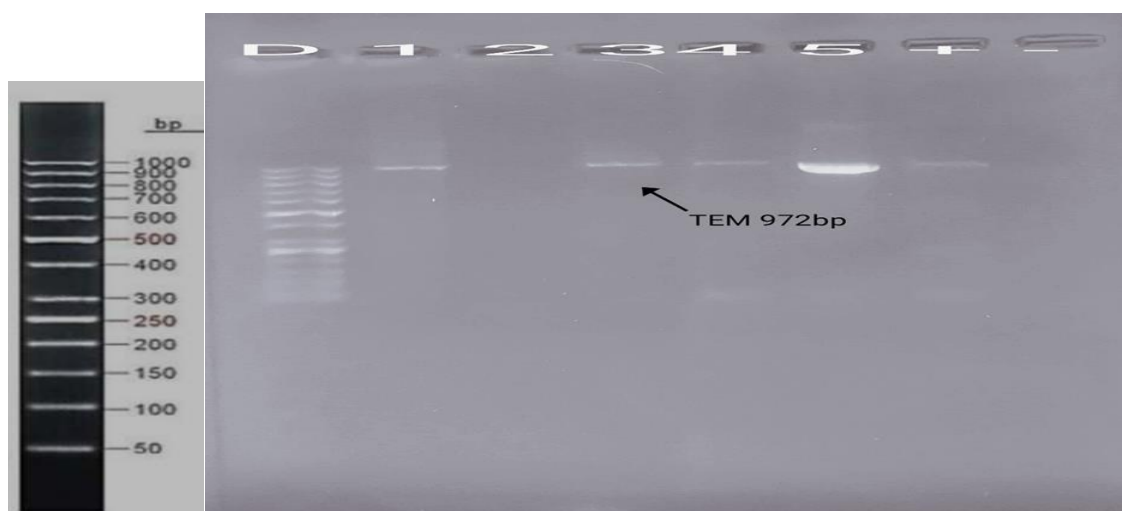
در مطالعه‌ی انجام شده بر روی شیوع ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی ESBL، ژن مقاومت TEM، به میزان ۷۳/۹ درصد گزارش شد که نشان از افزایش شیوع این نوع ژن در بررسی انجام شده می‌باشد که باعث بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز می‌شود (شکل ۲). در مطالعه‌ی انجام شده، ژن SHV نسبت به ژن‌های CTX-M و TEM، شیوع پایین‌تری دارد و در ۲۱/۷ درصد ایزوله‌ها (۵ ایزوله) یافت شد. در مطالعه‌ی انجام شده شیوع چند ژنی هم وجود داشت. ژن‌های TEM-CTX-M، در ۴۷/۸۲ درصد نمونه‌ها ژن‌های CTX-M - SHV، TEM در ۲۱/۷۳ درصد نمونه‌ها با هم بروز پیدا کردند.



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



شکل ۲: نمونه‌ای از الکتروفورز ژن SHV، TEM، CTX-M در ولتاژ ۸۰ ولت می‌باشد. چاهک ۱، ۶، ۱۰ و ۱۳ دارای نمونه‌های دارای ژن CTX-M، چاهک ۳ نمونه دارای ژن SHV می‌باشد.



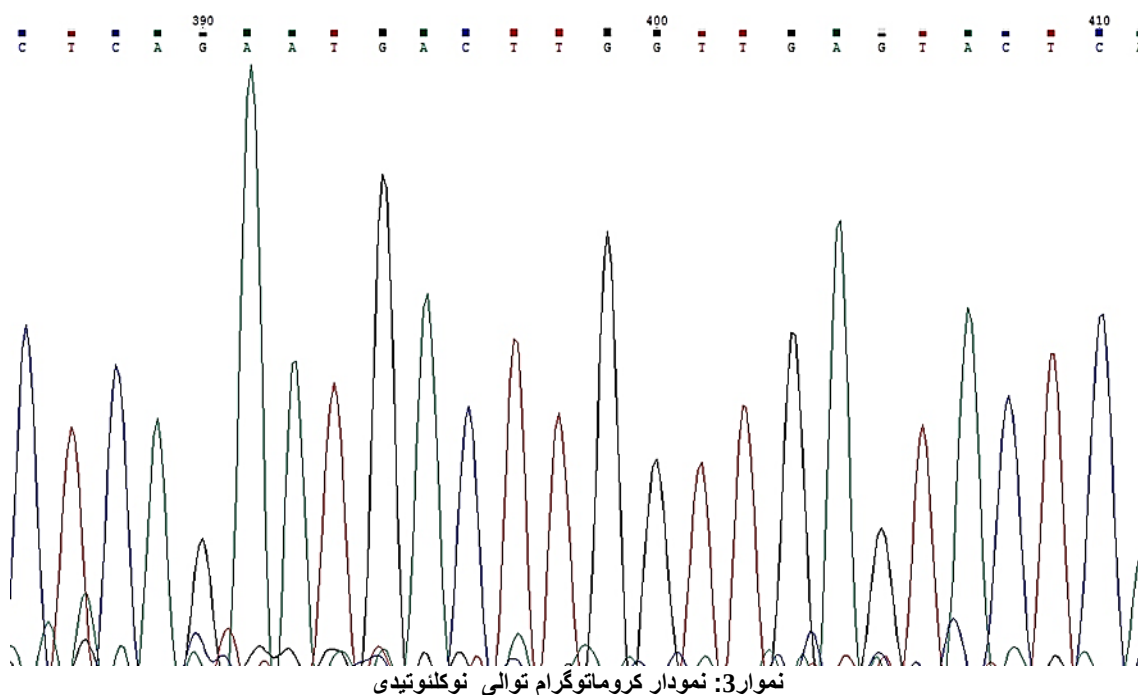
شکل ۳: نمونه‌ای از انجام الکتروفورز ژن های TEM 972bp می‌باشد. چاهک‌های ۱، ۳، ۴ و ۵، نمونه‌های دارای ژن‌های TEM و چاهک ۲، فاقد ژن TEM می‌باشد. دو چاهک آخر به ترتیب دارای نمونه کنترل مثبت *E.coli* ATCC 25922 و نمونهی کنترل منفی دارای کلبسیلا پنومونیه با ATCC 13883 می‌باشد.

نتایج توالی‌یابی به روش سَنگر

نمودارهای حاصل از توالی‌یابی نوکلئوتیدی نشان می‌دهد که کیفیت توالی‌های بدست آمده درست و فاقد noise می‌باشند و DNA استخراج شده‌ی نمونه‌های ESBL مثبت، به روش صحیح و شرایط دمایی درست PCR شده‌اند (نمودار ۳).

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

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



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 View								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Escherichia coli strain EMBWKHES1 TEM family beta-lactamase (blaTEM) gene, partial cds	Escherichia coli	1061	1061	99%	0.0	98.66%	635	MG200725.1
Escherichia coli strain UK_Dog_Liverpool plasmid pCABB35_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 AB_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

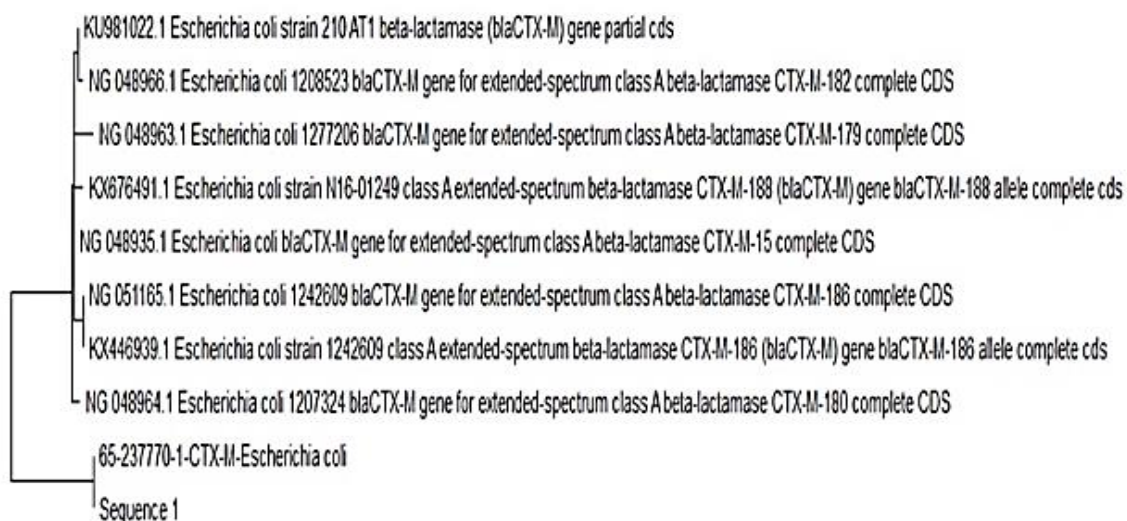
شکل ۴. نشان می‌دهد که طبق انتظار، توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مورد مطالعه، کاملاً مشابه به ژن‌های CTX-M و SHV/TEM /اشرشیاکلی مولد ESBL می‌باشد و با Query cover نزدیک به ۱۰۰ درصد، هم‌پوشانی (cover) بالایی دارد.



شکل ۵. نتایج حاصل از هم‌ردیف‌سازی توالی‌های نوکلئوتیدی ایزوله‌های *E. coli* در نرم‌افزار MEGA-x

تجزیه و تحلیل تکاملی در نرم‌افزار MEGA-X انجام شد و درخت فیلوژنی رسم شد.

در مطالعه‌ی انجام‌شده، طبق شکل‌های ۴ و ۵، هم‌ریف‌سازی ژن‌های مولد بتالاکتاماز در سویه اشرشیاکلی با سایر سویه‌های اشرشیاکلی در نرم‌افزار MEGA-X انجام شد و نتایج بدست‌آمده نشان از انجام صحیح کارهای مولکولی در این تحقیق می‌باشد.



شکل ۶. رسم درخت فیلوژنی توالی نوکلئوتیدی حاصل از ایزوله‌های مولد ESBL در اشرشیاکلی

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

بحث و نتیجه‌گیری

وسیع‌الطیف، به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مقاوم شده‌است (۳). این میکروارگانیسم شایع‌ترین عامل سببی سمی در اغلب بیمارستانها بوده و علاوه بر آن، عامل درصد قابل توجهی از موارد پنومونی بیمارستانی می‌باشد. همچنین این ارگانیسم از علل مهم مننژیت در نوزادان، عفونت ادراری، اسهال و سندروم اورمی همولیتیک به شمار می‌رود. در این میان، سویه‌های /شرشیاکلی تولیدکننده بتالاکتاماز با طیف وسیع به عنوان عامل مهمی در عفونت‌های بیمارستانی مطرح است (۳).

شناسایی و تشخیص به موقع بتالاکتامازهای با طیف وسیع (ESBLs) در باکتری‌های مقاوم به کاربپنم و سفالوسپورین‌ها، هم از لحاظ اپیدمیولوژیک و هم به منظور کمک به متخصصان در انتخاب داروی مناسب برای درمان موفق بیماران و نیز کنترل سویه‌های مقاوم به داروها و جلوگیری از انتشار چنین عفونت‌هایی در بیمارستان، ضروری به نظر می‌رسد (۳).

در مطالعه‌ی حاضر، با بررسی بر روی ۱۰۰ نمونه‌ی بالینی از ادرار، خون، ترشحات چرکی و.... بیماران بستری، ایزوله‌های /شرشیاکلی با روش‌های بیوشیمیایی از سایر ایزوله‌ها جداسازی شدند.

برای جداسازی ایزوله‌های مولد ESBL، از روش فنوتیپی دیسک ترکیبی بر روی ایزوله‌ها انجام شد و ۵۴/۸ درصد ایزوله‌ی /شرشیاکلی مولد ESBL، جدا گردید.

در مطالعه‌ی حاضر، سویه‌های /شرشیاکلی مولد ESBL، افزایش مقاومت به ایمی‌پنم را نسبت به سال‌های گذشته بادرصد فراوانی ۵۲/۴٪ را نشان دادند.

در مطالعه‌ای که توسط قانع در کرج در سال ۱۴۰۰ انجام شده‌است، بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم با ۶۰٪ گزارش شده‌است که همسو با این مطالعه‌است. در نتیجه افزایش مقاومت به این دارو نشان داده که این دارو به عنوان داروی آنتی باکتریال تجربی نمی‌تواند 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 /شرشیاکلی 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).

در مطالعه Mofolorunsh و همکارانش نیز درنایجریه (۲۰۲۱)، پاتوژن‌های /شرشیاکلی در برابر بیش از سه آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند (۴۱). در مطالعه‌ای در عراق نیز ۸۷/۵ درصد سویه‌ها (۲۹) و در بررسی Manandhar در نپال ۹۰/۱ درصد سویه‌های /شرشیاکلی مقاوم به چند دارو بودند (۲۳).

همچنین در مطالعه‌ی انجام شده توسط Gaviria در اسپانیا (۲۰۲۲)، تمام ایزوله‌های /شرشیاکلی مورد مطالعه به چند دارو مقاوم بودند (۳۱).

در مطالعه‌ی حاضر بیشترین حساسیت ایزوله‌های /شرشیاکلی مربوط به آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون با فراوانی ۵۴/۸٪ و جنتامایسین با فراوانی ۸۳/۳ درصد می‌باشد. در نتیجه باید از آنتی‌بیوتیکی برای بیماران بستری بخصوص در بخش مراقبت ویژه استفاده شود که به آن آنتی‌بیوتیک 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، بر روی نمونه‌های انتروباکتریاسه نیز کمترین مقاومت مربوط به کولیستین و سفتریاکسون بود (۸).

در مطالعه‌ی حاضر ۹۰/۵ درصد ایزوله‌های /شرشیاکلی 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.

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 آمپی‌سیلین 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، در میان ایزوله‌های /شرشیاکلی مولد ESBL، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در ۱۰۰ درصد نمونه‌ها، سفنازیدیم در ۹۸/۴۳ درصد نمونه‌ها و سفتریاکسیون در ۹۹/۱۶ درصد نمونه‌ها بود (۳۲).

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

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

میزان شیوع سویه‌های /شرشیاکلی تولیدکننده بتالاکتاماز طیف وسیع (ESBLs) در مطالعه ما ۵۴/۸ درصد بود که با مطالعات افشاری خواه در جیرفت (۱۴۰۲)، که میزان شیوع سویه‌های مولد ESBL در مطالعه‌ی آن‌ها 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 /شرشیاکلی مولد ESBL در مطالعات قانع با ۳۶ درصد مشاهده شد (۷).

در مطالعه‌ی حاضر، جهت شناسایی مولکولی ژن‌های مولد ESBL، در ایزوله‌های /شرشیاکلی، 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 ایزوله‌های مولد ESBL، به ترتیب با درصد شیوع ۸۹/۹۵ درصد و ۷۳/۹۱ درصد تأیید کرد (۳۶).

در بررسی انجام گرفته بر روی بیماران تالاسمی توسط پیشیوان در عراق، بیشترین شیوع ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف توسط ژن TEM با ۸۱ درصد در ایزوله‌ها یافت شد. شیوع ژن‌های CTX-M و SHV به ترتیب در ۳۴/۴ درصد و ۱۶/۲ درصد نمونه‌ها یافت شد (۲۷).

در مطالعه‌ای در یکی از بیمارستان‌های تهران توسط یاسبولاهی و همکارانش در سال ۱۴۰۰، بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم ۸۷/۶ درصد بود. شیوع ژن TEM (۵۹/۴ درصد)، ژن CTX-M (۴۶/۷ درصد) 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 نیتروفرانتونین فعال‌ترین آنتی‌میکروبیال بر علیه ایزوله‌های /شرشیاکلی مقاوم بودند. ژن CTX-M-14، ژن غالب در سویه‌های مولد ESBL بود، در این مطالعه نیز ژن غالب، ژن CTX-M می‌باشد (۲۴).

همچنین در مطالعه‌ی Ram Shankar در نپال، ژن‌های CTX-M از ۵۸/۴ درصد و ژن‌های TEM در ۴۱/۶ درصد از ایزوله‌ها جداسازی شدند (۲۶) که درصد شیوع ژن‌های مقاوم نسبت به مطالعه‌ی 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 ژن‌های TEM و SHV به ترتیب ۶۱/۸ درصد و ۱۷/۶ درصد

یافت شدند (۲۲) و همچنین تحقیق انجام شده در سال ۲۰۲۴ در پاکستان بر روی عفونت‌های مجاری ادرای توسط Riaz، ۲۸ درصد ایزوله‌های /شرشیاکلی مولد ESBL بودند (۲۸).

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

در این مطالعه بیشتر سویه‌های /شرشیاکلی ESBL مثبت از ژن‌های *TEM*, *CTX-M* منشأ گرفته و باعث مقاومت به آمپی‌سیلین، سفنازیدیم، همچنین سفالوسپورین‌های نسل سوم و کارباپنم‌ها شده‌است. وقتی موتاسیون در ژن‌های 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 ۳ کشور سودان، عربستان و مصر در سال ۲۰۲۱، ژن *CTX-M*، ژن غالب در تمامی جدایه‌ها بود (۱۰۰ درصد) در حالی که ژن *TEM* در ۶۶/۷ درصد جدایه‌ها شناسایی شد. نشان از افزایش شیوع ژن‌های ESBL است و پیشنهاد می‌کنند مقامات پزشکی فوراً نظارت ضد میکروبی 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 نشان داد که میزان شیوع ژن‌های *SHV* نسبت به ژن‌های *CTX-M* و *TEM* پایین‌تر است ولی نسبت به مطالعات گذشته در حال افزایش می‌باشد.

میزان شیوع ژن *SHV* در مطالعه‌ی فکری کهن در یکی از بیمارستان‌های رشت، ۸۹/۸ درصد می‌باشد که افزایش شیوع بالایی را در بین ایزوله‌های /شرشیاکلی 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 ژن‌های *TEM* و *SHV* به ترتیب در ۱۸/۴ درصد و ۱۷/۶ درصد ایزوله‌ها شیوع داشتند. در نتیجه در شهر خرم‌آباد شیوع ایزوله‌های ESBL نسبت به سایر مناطق ایران پایین‌تر بود (۱۹).

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

در مطالعه‌ی در نوارغزه توسط Nabil، نیز در ۸۵ درصد ایزوله‌ها و در بررسی باباحیدریان در ۴۹/۳ درصد بروز چند ژنی 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.

در این مطالعه توالی ژن‌های ایزوله‌های /شرشیاکلی مولد ESBL، به روش سنگر توالی‌یابی شد. توالی‌های مورد نظر با برنامه کروماس استخراج گردید.

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

مصرف سفالوسپورین‌های نسل سوم به شمار می‌رود. بنابراین استفاده از روش‌های مولکولی جهت مطالعات وسیع‌تر و شناسایی انواع آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف وسیع و ردیابی انواع ژن‌های ESBL، در جلوگیری از گسترش مقاومت‌ها می‌تواند تأثیرگذار باشد. در نتیجه، شیوع ایزوله‌های ESBL، در مناطق جغرافیایی مختلف در جهان و حتی در شهرهای مختلف ایران و متفاوت بودن شیوع آن از بیمارستانی به بیمارستان دیگر، مطالعات از این دسته بطور هر ساله ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پرسنل محترم بیمارستان الغدیر تهران، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد 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.

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 بدست آمده از این تحقیق، جور شدن بالایی را با توالی‌های نوکلئوتیدی دیگر نشان می‌دهد.

پارامتر E-valu بدست آمده از بلاست کردن توالی‌های نوکلئوتیدی، عدد کمتر از ۰/۰۱ را نشان داد که می‌توان با اطمینان بیشتری گفت که توالی‌های بدست آمده از ایزوله‌های /شرشیاکلی مولد ESBL، با توالی‌های نوکلئوتیدی ایزوله‌های /شرشیاکلی مشابهت دارد. و همچنین پارامتر Query cover بدست آمده از توالی‌یابی، درصد بالای ۹۹ درصد را نشان داد که نشان می‌دهد ایزوله‌های /شرشیاکلی مورد تحقیق به درستی جداسازی شده‌اند.

نتیجه گیری

فراوانی سویه‌های /شرشیاکلی مولد ESBL در این مطالعه نشانگر این است که تولید ESBL یک تهدید بزرگ در

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. Brooks, 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 Multiple 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 Integrins 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 Integrins 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.

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 Sri Lanka. *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 *blaTEM*, *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 Health*. 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.

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 Marzroud¹, **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