

## Study of Antibiotic Susceptibility Pattern and Frequency of Extended Spectrum $\beta$ -lactamases Genes TEM and SHV in Urinary Tract Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Tabriz

Jalali Dizage L<sup>1</sup>, Nahaei MR\*<sup>2</sup>, Sadegi J<sup>3</sup>

1. Department of Genetics, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

2. Department of Microbiology and Laboratory Sciences, School of Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

3. Department of Microbiology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

\* **Corresponding author.** Tel: +984133364661, Fax: +984133364661, E-mail: nahaeim@yahoo.com

Received: Jun 20, 2019

Accepted: Aug 21, 2019

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Urinary tract infection (UTI) is one of the most common types of human infections and *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are the main causes of urinary tract infection among the gram negative bacteria. The prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) among these bacteria and hence resistant strains to  $\beta$ -lactam antibiotics have increased in recent decades. Several types of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, such as TEM, SHV and CTX-M have been identified, which are prominently present in the strains of *E. coli* and *K. pneumoniae*. The objective of this study was to determine the prevalence of TEM and SHV genes in *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates of urinary tract infections by using phenotypic and molecular (PCR) techniques in microbiology laboratory at medical school of Tabriz Islamic Azad University.

**Methods:** In this cross-sectional descriptive study, 50 isolates of *E. coli* and 50 isolates of *K. pneumoniae* collected from urinary tract infections from out-patients in Tabriz. Antibiotic sensitivity patterns of isolates were studied against 14 antibiotics by disk diffusion test (Kirby Bauer) and also confirmatory tests were performed using combined antibiotic tests. Finally TEM and SHV genes were investigated using molecular methods (PCR).

**Results:** Twenty five isolates (25%) out of 100 bacterial isolates were identified as ESBL-producing isolates of which 13 isolates (26%) were *E. coli* and 12 isolates (24%) were *K. pneumoniae*. The TEM and SHV genes were detected in 2% and 4% of *E. coli* and 0% and 2% of *K. pneumoniae* isolates, respectively.

**Conclusion:** The presence of these genes among our isolates confirmed ESBL genes in these medically important bacteria leading to resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics which are routinely used in their treatments. The low frequency of the studied genes could be because of the source of our isolates from out-patients which are not generally exposed to antibiotics.

**Keywords:** *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; Antibiotic Resistance; Urinary Tract Infection; Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase

# مطالعه الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف *SHV* و *TEM* در ایزوله‌های ادراری/شریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه در شهر تبریز

لیدا جلالی دیزجی<sup>۱</sup>، محمدرضا نهائی<sup>۲\*</sup>، جاوید صادقی<sup>۳</sup>

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

۲. گروه میکروب‌شناسی و علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

۳. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۱۳۳۶۴۶۶۱ فاکس: ۰۴۱۳۳۶۴۶۶۱ پست الکترونیک: nahaeim@yahoo.com

## چکیده

**زمینه و هدف:** عفونت دستگاه ادراری (UTI) یکی از شایع‌ترین انواع عفونت‌های انسانی بوده و اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه عوامل اصلی عفونت ادراری در بین باکتری‌های گرم منفی می‌باشند. شیوع گونه‌های باکتریایی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (*ESBLs*) و مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در دهه اخیر افزایش روزافزونی داشته است. انواع مختلفی از بتالاکتامازهای وسیع الطیف از قبیل *SHV*، *TEM* و *CTX-M* شناسایی شده‌اند که به‌طور برجسته در سویه‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه حضور دارند. هدف از این مطالعه مشخص کردن فراوانی ژن‌های *SHV* و *TEM* در باکتری‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه در ایزوله‌های بدست‌آمده از عفونت‌های ادراری با روش‌های فنوتیپی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) در آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد تبریز بود.

**روش کار:** در این مطالعه مقطعی-توصیفی، ۵۰ ایزوله اشریشیاکلی و ۵۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت‌های ادراری، از بیماران سرپایی در شهر تبریز جمع‌آوری گردید. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به ۱۴ آنتی‌بیوتیک مختلف با روش دیسک دیفیوژن تست (کربی بائر) شناسایی شد و تست تأییدی با دیسک ترکیبی انجام شد و نهایتاً ژن‌های بتالاکتامازی *SHV* و *TEM* با استفاده از روش مولکولی PCR مورد تجسس قرار گرفت.

**یافته‌ها:** بیست و پنج ایزوله (۲۵٪) از ۱۰۰ باکتری آزمایشی به‌عنوان ایزوله‌های مولد *ESBL* تأیید شدند که ۱۳ ایزوله (۲۶٪) اشریشیاکلی و ۱۲ ایزوله (۲۴٪) کلبسیلا پنومونیه بود. ژن‌های *SHV* و *TEM* در ایزوله‌های اشریشیاکلی به ترتیب ۲ و ۴ درصد و در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۰ و ۲ درصد مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** وجود ژن‌های یادشده مؤید حضور آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف در این دو جنس از باسیل‌های گرم منفی روده‌ای به‌عنوان باکتری‌های مهم پزشکی می‌باشد. اگرچه فراوانی ژن‌های یادشده پایین بود که این امر می‌تواند به دلیل اخذ نمونه‌های آزمایشی از بیماران سرپایی باشد که کمتر در معرض آنتی‌بیوتیک‌ها قرار دارند.

**واژه‌های کلیدی:** اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عفونت دستگاه ادراری، بتالاکتامازهای وسیع الطیف (*ESBLs*)

## مقدمه

عفونت دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریال بوده و موجب مراجعه به مراکز درمانی می‌شود. این عفونت به واسطه میکروارگانیسم‌های متعددی از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها ایجاد می‌شود که نوع باکتریال آن شایع است. *اشریشیاکلی* و *کلیسیلا پنومونیه* از عوامل ایجادکننده عفونت ادراری در تمامی گروه‌های سنی و در هر دو جنس و در بیماران با سیستم ایمنی ضعیف و دارای کاتترمی باشند و علت بیش از ۸۵ درصد عفونت دستگاه ادراری در زنان جوان و حامله که باعث سقط‌های مکرر جنینی می‌گردند، می‌باشد [۱].

*اشریشیاکلی* و *کلیسیلا پنومونیه* باسیل گرم منفی، دارای DNA حلقوی شکل که ORF<sup>۱</sup> هستند که نسبت بازهای AT به GT در آنها بالا می‌باشد [۲-۴]. این باکتری‌های با کسب شاخص‌های ژنتیکی مؤثر در بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی که توسط پلاسمیدهای R ایجاد می‌شود توانایی چسبیدن و تهاجم به سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه ادراری را پیدا می‌کنند [۵،۶].

جزایر بیماری‌زایی (PAI) از جمله عناصر ژنتیکی متحرک می‌باشند که با جابه‌جایی خود باعث ایجاد سویه‌های بیماری‌زا می‌شوند و برای اولین بار در سال ۱۹۹۰ در *اشریشیاکلی* شناخته شد و بعد در ژنوم باکتری‌های بیماری‌زای مختلف انسانی، حیوانی و گیاهی مشاهده شد [۷]. این جزایر بر روی پلاسمید و یا بر روی کروموزوم قرار دارند و توسط انتقال افقی ژن باعث گسترش بیماری می‌گردند و بسیاری از این ژن‌ها بر روی اپرون‌های خاصی از بیماری‌زا بودن را ایجاد می‌کنند. به مجموعه این اپرون‌ها جزایر بیماری‌زایی اطلاق می‌شود [۷،۸].

بتالاکتامازهای طیف گسترده یا ESBL به علت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام که از خانواده هیدرولیتیک هستند و در پاسخ به فشار انتخابی، مدام در حال موتاسیون در جایگاه ویژه آنزیم می‌باشند [۱،۹]. این بتالاکتامازها توسط پلاسمیدهایی منتقل می‌شوند که توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌های نسل سوم و مونوباکتام را دارند و اغلب به کاربائیم‌ها حساس و به سیپروفلوکساسین و سفپییم و مهارکننده‌های بتالاکتاماز متغیر می‌باشند و با افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها بویژه سفالوسپورین‌های نسل سوم مقاومت باکتریایی وابسته به بتالاکتامازها مشاهده و باعث گسترش باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع الطیف شده است [۱۰،۱۱].

تیپ‌های بتالاکتامازهای وسیع الطیف بر اساس عملکرد به چهار گروه (۴-۱) و بر اساس ساختار مولکولی و توالی اسیدآمینه به چهار گروه *A, B, C, D* طبقه‌بندی می‌شوند. بتالاکتامازهای *SHV* و *TEM* از آنزیم‌های شایع می‌باشند که ژن مسئول آن‌ها توسط پلاسمیدهای مقاومت به سویه‌های مختلفی از یک جنس یا بین جنس‌های مختلف آنتروباکتریاسه‌ها انتقال می‌یابند. موتاسیون در ژن‌های کلاسیک *SHV*، *TEM* با جایگزینی یک یا چند اسیدآمینه در ناحیه فعال آنزیم صورت می‌گیرد و *SHV-1*، *TEM-1*، *TEM-2* را ایجاد می‌کند. رایج‌ترین ژن‌های بتالاکتاماز گروه A: *SHV, TEM, CTX-M* می‌باشند. این مطالعه جهت بررسی ژن‌های بتالاکتامازی *SHV* و *TEM* در نمونه ادراری انجام شده تا حضور ژن‌های یاد شده در دو گونه شایع از باسیل‌های گرم منفی روده‌ای در ایجاد عفونت‌های ادراری شناسایی گردد [۱۱،۱۲].

<sup>1</sup> Open Reading Frame

## روش کار

در این مطالعه مقطعی- توصیفی در فاصله زمانی تیرماه تا شهریورماه ۱۳۹۷ تعداد ۱۰۰ ایزوله باکتریایی از عفونت‌های ادراری از بیماران سرپایی مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی تبریز جمع آوری شد. در این مطالعه از ۵۰ ایزوله /شریشیالکی و ۵۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه استفاده شد. جهت تعیین هویت باکتری‌های یادشده از روش‌های کشت در محیط کشت بلادآگار و مکانکی آگار و انجام تست‌های افتراقی IMVIC (شامل واکنش‌های باکتری در محیط‌های MR/VP، TSI، SIM، سیترات و اوره) استفاده شد. کلیه محیط‌های کشت مصرفی متعلق به شرکت Merck بود.

## آزمون تشخیصی بتالاکتاماز وسیع الطیف

طبق دستورالعمل ارائه شده از طرف CLSI شناسایی سویه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (*ESBLs*) به روش فنوتیپی در دو مرحله انجام شد [۱۳].

## مرحله اول: تست غربالگری اولیه

طبق دستورالعمل پروتکل CLSI انجام تست غربالگری اولیه برای باکتری کلبسیلا پنومونیه، /شریشیالکی به صورت زیر می‌باشد. از دیسک‌های آنتی بیوتیکی حاوی سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم) یا سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) یا سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم) برای غربالگری اولیه باکتری‌ها طبق روش دیسک دیفیوژن<sup>۱</sup> (کربی بائر)<sup>۲</sup>، آزمایش آنتی بیوگرام انجام شد [۱۴]. در ضمن جهت بررسی آنتی بیوتیکی: سفالکسین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۳۰ میکروگرم)، نورفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۱۰۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)،

اوفلوکساسین (۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۱۰۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم + کلاوولانیک اسید (۳۰+۱۰ میکروگرم)، سفتری زوکسیم (۳۰ میکروگرم)، ایملی پنم (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) استفاده شد. نمونه‌ها به صورت تصادفی ساده<sup>۳</sup> جمع آوری و نتایج آماری داده‌ها توسط نرم افزار SPSS-21 و آزمون آماری انجام گرفت و  $p < 0/05$  از نظر آماری معنی دار تلقی گردید.

## مرحله دوم: تست تأیید فنوتیپی

در این روش قطر هاله دیسک حاوی سفنازیدیم یا قطر هاله دیسک حاوی سفنازیدیم و کلاوولانیک اسید مقایسه شد. *CLSI* استفاده همزمان از هر دو نوع آنتی بیوتیک سفتری زوکسیم و سفوتاکسیم را پیشنهاد می‌کند افزایش ۵ میلی‌متر یا بیشتر از ۵ میلی‌متر در قطر هاله عدم رشد برای آنتی بیوتیک به تنهایی بیانگر تأیید حضور *ESBL* در سویه مورد بررسی می‌باشد. از سویه /شریشیالکی *ATCC ۲۵۹۲۲* و کلبسیلا پنومونیه *ATCC ۷۰۰۶۳* جهت کنترل کیفی آنتی بیوگرام استفاده شد. سویه‌های استاندارد یادشده از کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی و بیماری‌زا از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفلیزه تهیه شدند [۱۳]. استخراج DNA باکتری‌ها به روش SDS-NAOH جوشاندن انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده بوسیله دستگاه نانو دراپ محاسبه گردید که معادل ۱/۸ بود [۱۵].

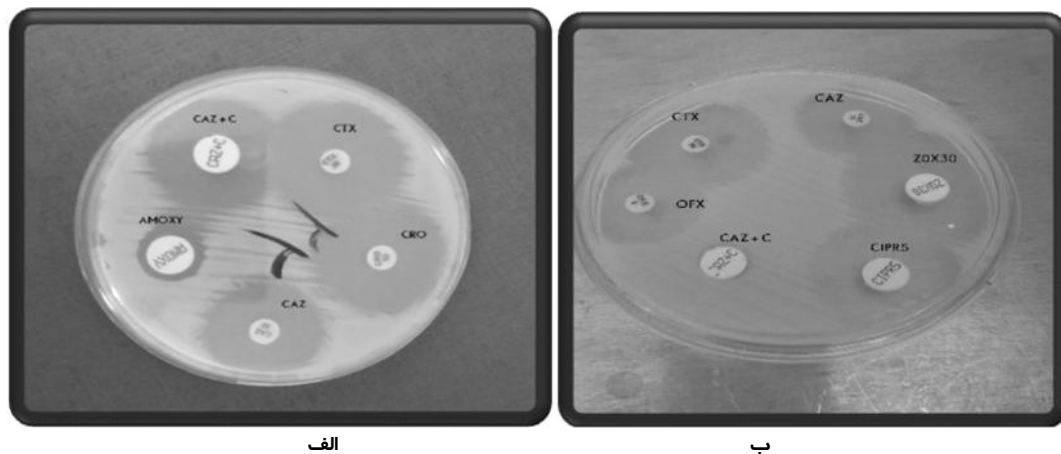
## انجام آزمایش PCR

۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سینا کلون ژن) و ۱ میکرولیتر از هر کدام پرایمرهای مربوطه که از شرکت سینا کلون ژن تهیه شده بود با ۳ میکرولیتر از DNA استخراج شده به ازاء هر نمونه مخلوط شده و سپس توسط آب دیونیزه شده استریل به حجم ۲۶ میکرولیتر

<sup>3</sup> Simple Random Sampling<sup>1</sup> Disk Diffusion<sup>2</sup> Kirby Bauer

رسانده شد. شایان ذکر است از Mster Mix آماده

استفاده شد [۱۵].



شکل ۱. نتایج تست فنوتیپی برای تأیید ایزوله‌های *اشریشیا کلی* (الف) و *کلبسیلا پنومونیه* (ب) مولد ESBL

برای مطالعه ژن‌های مورد تجسس در این مطالعه (*TEM* و *SHV*) از روش PCR استفاده شد و جهت مشاهده محصول PCR از ژل آگارز ۱/۱ استفاده گردید. پرایمرها به صورت لیوفلیزه با توالی‌های Forward و Reverse ذکر شده در جدول ۱ از شرکت سینا کلون ژن خریداری گردید و جهت مصرف طبق دستورالعمل شرکت

سازنده آن را در آب دیونیزه حل شده و غلظت ۱۰۰ میکرومولار تهیه شده و استفاده گردید. جهت بررسی و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۳ میکرولیتر از DNA استخراج شده از ایزوله‌های بالینی با آب دیونیزه مخلوط گردید و استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در واکنش PCR به ترتیب جدول ۱ بود [۱۳].

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

ژن	اندازه (bp)	توالی ۵ به ۳	دفرنس
<i>TEM</i>	۸۰۰	F-CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC R-CGTTTCATCCATAGTTGCCTGAC	(۱۶)
<i>SHV</i>	۷۳۰	F-AGCCGCTTGAGCAAATTAAC R-ATCCCGCAGATAAATCACCAC	(۱۶)

جدول ۲. مراحل انجام PCR

مراحل انجام آزمایش	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	مدت زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
First Denaturation	۹۴	۱۰	۱
Denaturation	۹۴	۱	۳۵
Annealing	۵۸	۳۰	۳۵
Extension	۷۲	۳۰	۳۵
Final extension	۷۲	۱۰	۱

## یافته‌ها

در این مطالعه ۵۰ ایزوله *اشریشیا کلی* و ۵۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* جداسازی شده از بیماران سرپایی مبتلا به عفونت ادراری مورد بررسی

قرار گرفتند که از ۵۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه*، تعداد ۴۶ ایزوله (۹۲٪) متعلق به بیماران مؤنث و ۴ ایزوله (۸٪) متعلق به بیماران مذکر بود و از ۵۰ ایزوله *اشریشیا کلی* تعداد ۴۵ ایزوله (۹۰٪) متعلق

به بیماران مؤنث و ۵ ایزوله (۱۰٪) متعلق به بیماران مذکر بود.

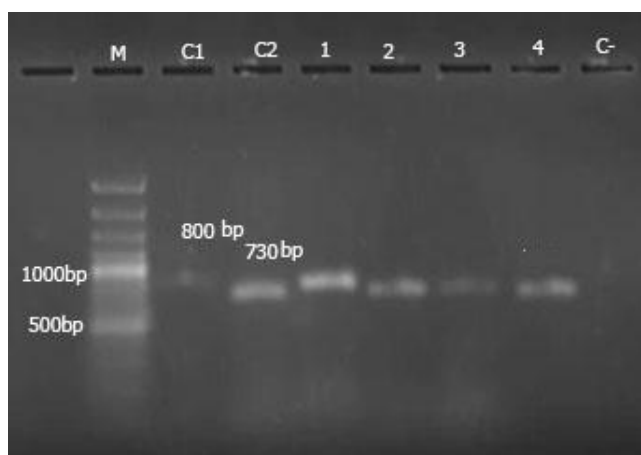
در ایزوله‌های /شریشیا کلی حساسیت به سفنازیدیم ۵۶ درصد، سفتریاکسون ۶۴ درصد، سفتری زوکسیم ۵۶ درصد، سفوناکسیم ۵۲ درصد، به کلاوالانیک اسید + سفنازیدیم ۸۰ درصد بود و بیشترین مقاومت به سیپروفلوکساسین ۳۶ درصد

مشاهده شد و در کلبسیلا پنومونیه حساسیت به سفنازیدیم ۵۲ درصد، سفتریاکسون ۶۴ درصد، سفتری زوکسیم ۵۶ درصد، سفوناکسیم ۵۲ درصد و به کلاوالانیک اسید + سفنازیدیم ۵۶ درصد بود و بیشترین مقاومت به سیپروفلوکساسین مشاهده شد (جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های مورد مطالعه

باکتری مورد مطالعه				
آنتی‌بیوتیک	I شریشیا کلی			p-value
	R	I	S	
سفنازیدیم	۸	۳۶	۵۶	۰/۲۸
سفتریاکسون	۸	۲۸	۶۴	۰/۶۴
سفتری زوکسیم	۱۶	۲۸	۵۶	۰/۴
سفوناکسیم	۲۰	۲۸	۵۲	۰/۵۲
سیپروفلوکساسین	۲۶	۲۸	۳۶	۰/۲۴
کلاوالانیک اسید - سفنازیدیم	۰	۲۰	۸۰	۰/۸
p-value	کلبسیلا پنومونیه			p-value
	R	I	S	
۰/۵۱	۱۶	۲۲	۵۲	۰/۲۸
۰/۶۶	۲۲	۴	۶۴	۰/۶۴
۰/۵	۲۲	۱۲	۵۶	۰/۴
۰/۵۵	۲۲	۱۶	۵۲	۰/۵۲
۰/۶۲	۶۴	۸	۲۸	۰/۲۴
۰/۵۱	۲۶	۱۶	۵۶	۰/۸

S, Sensitive ; I, Intermediate ; R , Resistant



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ برای تجسس ژن‌های TEM (۸۰۰ bp) و SHV (۷۳۰bp)

M: سایز مارکر ۱۰۰bp، C<sub>۱</sub>: کنترل مثبت TEM، C<sub>۲</sub>: کنترل مثبت SHV، ۱: ژن TEM یکی از ایزوله‌های آزمایشی، ۲-۴: ایزوله‌های حاوی ژن SHV، کنترل منفی (آب مقطر)

## بحث

عفونت ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های بیمارستانی در هر دو جنس بویژه زنان می‌باشد. اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه از رایج‌ترین عوامل میکروبی ایجادکننده عفونت ادراری

هستند. در مطالعه راعی در سال ۱۳۹۳ بر روی ۱۹۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه در تهران ۶۱/۹ درصد ژن bla TEM و ۴۷/۷ درصد ژن bla SHV شناسایی شد و در مطالعه حاضر در کلبسیلا پنومونیه ۲ درصد SHV شناسایی شد و TEM

مشاهده نگردید [۱۷]. در مطالعه احمدی و همکاران از ۲۰۰ ایزوله /شریشیاکلی ۹۱ درصد ایزوله *ESBL* تولید کرده و در بین آنها ۶۰ ایزوله دارای ژن *TEM* بود [۱۱]. در مطالعه حاضر از ۵۰ ایزوله /شریشیاکلی ۲۵ ایزوله *ESBL* تولید کرده و تنها یک ایزوله دارای ژن *TEM* بود. در مطالعه‌ای که از سال ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۶ توسط نیشا<sup>۱</sup> و همکاران صورت گرفت، از ۵۲۳ ایزوله /شریشیاکلی تقریباً ۳۷/۵ درصد *ESBL* مثبت و ۹۰ درصد حساس به سیپروفلوکساسین و ۵۶ درصد حساس به فلوروکینولون بودند و کمترین حساسیت به نیتروفرانتوئین، نتیل ماسین و ایمی پنم به ترتیب ۱۵/۳۵، ۸/۶، ۲ درصد مشاهده شد. از /شریشیاکلی‌هایی که آنزیم بتالاکتاماز تولید می‌کنند تقریباً ۸۵/۵ درصد آنها دارای ژن *CTX-M*، ۶۸/۴ درصد دارای ژن *TEM*، ۳/۱ درصد دارای ژن *SHV* بودند [۱۸] که به‌عنوان عامل خطری در بیمارانی که عفونت‌های ادراری دارند و آنتی بیوتیک خوراکی مصرف می‌کنند محسوب می‌شود و در مطالعه حاضر مقاومت به ایمی پنم ۲۳/۵۷ درصد در *کلپسیلا پنومونیه* مشاهده شد. بین مطالعه احمدی [۱۱] و میراعلمی [۱۹] از نظر فراوانی ایزوله‌های تولیدکننده بتالاکتاماز اختلاف وجود دارد که به ترتیب در ۶۰ ایزوله، ۲۶ ایزوله ژن *TEM* مشاهده شد و در هر دو مطالعه هیچ ژن *SHV* مشاهده نشد و در مطالعه حاضر حضور ژن *SHV* در تعداد کمی از ایزوله‌ها شناسایی شد.

در مطالعه آکیلا<sup>۲</sup> در پاکستان که بر روی /شریشیاکلی انجام گرفت میزان تولید آنزیم ۴۷/۳۷ درصد تشخیص داده شد [۲۰] و تفاوت قابل ملاحظه‌ای در تولید آنزیم *ESBL* که

کمیجانی<sup>۳</sup> در هند انجام گرفت و مقدار آن ۵۸/۹ درصد بود مشاهده شد [۲۱]. در مطالعه انجام گرفته توسط محققین مطالعه حاضر ۲۵ درصد تولید آنزیم *ESBL* تشخیص داده شد. در مطالعه انجام شده توسط کمیجانی و همکاران از ۴۹ ایزوله /شریشیاکلی، ۳۹ ایزوله (۴۵٪) تولیدکننده *ESBL* بودند که ۵ ایزوله (۵/۸٪)، ۱۴ ایزوله (۱۶/۲٪)، ۱۹ ایزوله (۲۲٪)، ۱۱ ایزوله (۱۲/۷٪) دارای ژن‌های *SHV*، *CTX-M*، *TEM*، *TEM+CTX-M* بودند و در مطالعه حاضر از ۲۵ ایزوله تولیدکننده *ESBL* تنها یک ایزوله در /شریشیاکلی حاوی ژن *TEM* بود و با توجه به اینکه ایزوله‌ها در این مطالعه از بیماران سرپائی جمع‌آوری شده بود، می‌تواند توجیه‌گر پایین بودن فراوانی ژن‌های تحت مطالعه و اختلاف موجود باشد.

نیشا و همکاران در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که از ۵۲۳ ایزوله /شریشیاکلی ۶۸/۸ درصد ژن *TEM* و ۳/۱ درصد دارای ژن *SHV* بودند [۱۸] و با مطالعه‌ای که کمیجانی و همکاران انجام دادند از ۸۸ ایزوله ۵۸ درصد دارای ژن *TEM* ۱۲/۱۱ درصد دارای ژن *SHV* بود [۲۱] تفاوت زیادی مشاهده می‌شود که احتمالاً مربوط به منطقه سکونت بیماران می‌باشد و نتایج این مطالعات نیز مؤید حضور هر دو ژن نسبت به منطقه تحت مطالعه حاضر بود.

در مطالعه‌ای که صالحی و همکاران بر روی ۲۰۹۷ ایزوله بالینی انجام دادند ۳۹ ایزوله *کلپسیلا پنومونیه* شناسایی شد که دارای ژن‌های *TEM* (۶۰٪) و *SHV* (۱۰۰٪) بود [۱۲] و با مطالعه‌ای که نیشا و همکاران در هند انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که از ۵۲۳ ایزوله /شریشیاکلی ژن *TEM* ۶۷/۴ درصد و ژن *SHV* ۳/۱ درصد ایزوله‌ها وجود داشت که ژن *TEM* به‌مراتب

<sup>۱</sup> Nisha<sup>۲</sup> Akila<sup>۳</sup> Komijani

بیشتر از مطالعه حاضر و ژن *SHV* همانند مطالعه حاضر در میزان کم شناسایی شد [۱۸]. در مطالعه تورپتی<sup>۱</sup> نیز که در هند بر روی *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* انجام گرفت ژن *bla TEM* ۴۸/۷ درصد و ژن *bla SHV* ۵/۱ درصد شناسایی شد [۱۵]. با مطالعه راعی که بر روی *کلبسیلا پنومونیه* در تهران انجام گرفت ۶۱/۹ درصد ژن *bla TEM* و ۴۷/۷ درصد *bla SHV* شناسایی شد [۱۷] اختلاف وجود داشت و مطالعه حاضر نشانگر سطح پایین این دو ژن می باشد.

در مجموع مطالب فوق نشانگر این مسئله است که فراوانی تولید آنزیم *ESBL* از کشوری به کشور دیگر و همچنین در یک کشور از شهری به شهری دیگر متفاوت می باشد که علت آن تفاوت در سیستم بهداشتی، کنترل عفونت ها، نحوه و شرایط زندگی در هر کشور، منطقه و شهر می باشد.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، ژن های مولد بتالاکتامازی *TEM* و *SHV* تنها جزئی از خانواده بزرگ بتالاکتاماز وسیع الطیف می باشد، در ایزوله های *اشریشیاکلی* ژن *TEM* در ۲ درصد مشاهده شد در حالی که در ایزوله های *کلبسیلا پنومونیه* این ژن شناسایی نشد و در مورد ژن *SHV* در ایزوله های *اشریشیاکلی* ۴ درصد

مشاهده شد در حالی که این ژن در ایزوله های *کلبسیلا پنومونیه* فقط در ۲ درصد شناسایی شد. این نتایج نشان دهنده حضور سایر ژن های بتالاکتامازی در ایزوله های این مطالعه می باشد که برای شناسایی ژن های محتمل به مطالعات دیگری نیاز است.

با توجه به اینکه نمونه های ادراری در این مطالعه از بیماران سرپایی جمع آوری شده بود، می تواند توجیه گر پایین بودن فراوانی ژن های تحت مطالعه باشد. جهت کسب آگاهی بیشتر از میزان شیوع دیگر ژن های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف در باکتری ها تحت مطالعه، بررسی های اپیدمیولوژیک و مولکولی بیشتری نیاز است.

### تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم گروه آموزشی میکروب شناسی دانشکده پزشکی آزاد تبریز که محققین را در انجام این پژوهش یاری نمودند و همچنین از خانم بیگی که در آزمایشگاه مرکزی استان تبریز همکاری های لازم را داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد. لازم به ذکر است که این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم لیدا جلالی دیزجی می باشد.

### ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در IR.TABZMED.REC به شماره مرجع ۸۰۲.۱۳۹۸ به تأیید رسیده است.

<sup>1</sup> Turpti

### References

- 1- Afrugh P, Mardaneh J, Kaidani A, Serajian AA, Abbasi P, Yahyavi M. Distribution and antimicrobial susceptibility pattern of gram negative bacteria causing urinary tract infection (UTI) and detection of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1) producing isolates in Ahwaz. Iran South Med J. 2015 Jan; 19(1): 15-26. [Full text in Persian]
- 2- Mclelland M, Florea L, Sanderson K, Clifton S, Parkhill J, Churcher C, et al. Comparison of the *Escherichia coli* K-12 genome with sampled genomes of *Klebsiella pneumoniae* and three

- Salmonella enterica serovar Typhimurium typhi and paratyphi*. [Nucleic acid sequences online]. 2000. 28(24): 4974-4986. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC115240>.
- 3- Knothe H, Shah P, Kremery V. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. J infect. 1983 Jun; 11(6): 315-17.
  - 4- Dale JW, Park SF. Molecular genetics of bacteria 5<sup>th</sup> ed. Surrey: NCBI, 2019: 117-202.
  - 5- Carroll KC, Morse SA, Mietzenr T, Miller S. Jawetz, Melnick & Adlberg s. Medical microbiology 27<sup>th</sup> ed. USA: NCBI, 2013: 105-11.
  - 6- Hasannejad R, Ghanbargpour R, Amini K, Nasr J. Detection of blaTEM, bla CTX-M and bla SHV in *Escherichia coli* isolated from poultry by multiplex pcr. Veterinary J. 2017 Oct; 29(4): 113: 25-30. [Full text in Persian]
  - 7- Rashki A, Shokohi M. Distribution of pathogenic islands in *Escherichia coli* isolates collected from female genital tract among patients attending Obstetrics and Gynecology clinics in Zabol-Iran by Multiplex-PCR. J Jiroft Univ Med Sci. 2017 Apr; 3(1): 12-22. [Full text in Persian]
  - 8- Flannery LE, Lona M, Mobilley HLT. Identification of a modular pathogenicity island that is widespread among urease-producing uropathogens and shares features with a diverse group of mobile elements. J infect Immun. 2009 Nov; 77(11): 4887-94.
  - 9- Holt EK, Wertheim H, Zadoks RN, Beker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. J Natl Acad Sci. 2015 Jul; 112(27): 3574-81.
  - 10- Shahcheraghi F, Nasiri S, Noveir H. The survey of genes encoding beta-lactamases, in *Escherichia coli* resistant to beta-lactam and non-beta-lactam antibiotics. Iran J Basic Med Sci. 2010 Jan; 13(1): 230-7.
  - 11- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966 Apr; 45(4): 493-96.
  - 12- Baharvand Ahmadi A, Goudarzi G. The occurrence of TEM gene among the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLs) producing uropathogenic *Escherichia coli* strain isolated from Khorramabad city. J Pejouhandeh. 2015 Apr; 20(1): 33-37. [Full text in Persian]
  - 13- Salehi Gatabi A, Zaboli F. Antibiotic resistance pattern and existence of beta-lactamase SHV, TEM, CTX-M genes in ESBL-producing *Klebsiella* strains in the clinical samples in Babol, Iran. J Yasuj Univ Med Sci. 2016 Apr; 21(1): 71-83. [Full text in Persian]
  - 14- Lina TT, Khajanchi BK, Azmi IJ, Islam MA, Belal M, Mahmuda A, et al. Phenotypic and molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Bangladesh. J Pone. 2014 Oct; 9(10): 1-11.
  - 15- Bajapi T, Pandey M, Varma M, Bhatambare GS. Prevalence of TEM, SHV and CTX M beta lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. Avicenna J Med. 2017 Oct; 7(1): 6-12.
  - 16- El Sayed Hamdy M, Fakhr AE, El Sayed MH, AlJohery SAEI, Ghani Hassanein WA. Spread of TEM, VIM, SHV and CTX-M  $\beta$ -lactamases in imipenem-resistant gram-negative bacilli isolated from Egyptian hospitals. Inter J Microbiol. 2016 Dec; 10(1): 1-15.
  - 17- Raei A, Eftekhari A, Feizabadi MM. Correlation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase phenotype with bla SHV, bla TEM and bla CTX-M gene carriage in urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Tehran. J Applied Biology. 2014 Jul; 27(1): 33-44. [Full text in Persian]
  - 18- Nisha KV, Veena SA, Rathika SD, Vijaya SM, Avinash SK. Antimicrobial susceptibility, risk factors and prevalence of bla cefotaximase, temoneira and sulfhydryl variable genes among *Escherichia coli* in community-acquired pediatric urinary tract infection. J Lab Physic. 2017 Jul-Sep; 9(3): 156-162.
  - 19- Miraalami GH, Parviz M, Khalajzadeh S. Evaluation of antibiotic resistance in extended-spectrum beta lactamase (ESBL) genes in the *E. coli* isolates of urinary infection. J Babol Univ Med Sci. 2015 Aug; 17(8): 19-26.
  - 20- Akila K, Senthamarai S, Anitha C, Sivasankari S, Kumudavathi, Muthulakshmi K. Prevalance of TEM and SHV genes among extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia*

- 
- coli* isolates from infected diabetic foot ulcers in a tertiary care hospital. Int J Curr Microbiol. 2017 Jan; 6(1): 645-48.
- 21- Komijani M, Bouzar M, Rahimi F. Detection of TEM, SHV and CTX-M antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolates from infected wounds. Med J Lab. 2017 Apr; 11(2): 30-35.