بررسی میزان فراوانی ژن SHV کدکننده‌ی ESBL در سویه‌های E.coli جدا شده از نمونه‌های ادراری مراجعه‌کنندگان به بیمارستان و مراکز درمانی شهرستان سمنان

علیرضا شعبانی [۱](Pharm. D Student)، علی‌اکبر شعبانی [۲*](Ph.D)، رضا نصر[۲](M.Sc)، مریم اردکانیان [۲](M.Sc)، سیما روایی [۳](B.Sc)، علیرضا افغان پرتابی [۳](B.Sc)، حسین عنانی [۳](B.Sc)، هدی شعبانی [۴](M.D)، علی ابوذری [۳](B.Sc)، مجید قربانی [۳](B.Sc)، فاطمه مهرجو [۳](B.Sc)

۱- گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲- گروه زیست فنآوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۳- کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۴- گروه اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۳۱۱۹۸۴ aashaebani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۵

چکیده

هدف: گزارشات متعددی، حاکی از شیوع مقاومت‌های چندگانه دارویی با واسطه انواع مختلف (ESBL Lactamases Extended Spectrum Beta) **از جمله آنزیم‌های حاصل از بیان ژن** SHV **در نقاط مختلف دنیا موجود می‌باشد، که یکی از معضلات عمده درمانی و پزشکی می‌باشد. امروزه، بررسی نقش باکتری اشریشیاکلی در انواع عفونت‌ها از جمله عفونت‌های بیمارستانی، میزان استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در درمان، با توجه به افزایش روزافزون مقاومت باکتری‌های عامل عفونت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها یک ضرورت است. هدف از اجرای این طرح پژوهشی، بررسی میزان شیوع ژن** SHV **به عنوان یکی از ژن‌های کدکننده** ESBL **در باکتری‌های مولد عفونت ازجمله در سویه‌های** *E. coli* **بود.**

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری و جداسازی اشریشیاکلی از نمونه‌های جمع‌آوری شده از مراجعین مشکوک به عفونت ادراری با استفاده از روش‌های استاندارد و آزمون آنتی‌بیوگرام با استفاده از روش دیسک- دیفیوژن بر روی آن‌ها انجام شد. به منظور تشخیص قطعی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) **با استفاده از زوج دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفوتاکسیم، و سفتازیدیم/ با و بدون کلاوولانیک اسید خریداری شده از شرکت** Mast **انگلیس مورد آزمون قرار گرفتند. با استخراج** DNA **از آن‌ها و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی، ارزیابی و تهیه شده برای ژن** SHV **و انجام** PCR **وجود و یا فقدان ژن** SHV **در سویه‌های فوق، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج با استفاده ازآزمون آماری مجذور کای** (χ^2، chi-square) **و نرم‌افزار** spss۱۶ **آنالیز گردید.**

یافته‌ها: سویه‌های باکتری E. coli **از ۱۵۱ نمونه ایزوله ادراری (۳۷/۷۵٪) جدا گردید. ایزوله‌های مقاوم به نیتروسفین، به عنوان سویه‌های احتمالی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف** (ESBLs) **تلقی شدند، نتیجه آزمون فنوتیپی تائیدی، بر روی سویه‌های** ESBL **مثبت (+) احتمالی، در ۳۳ مورد (۶۷/۴۷٪) آن‌ها مثبت بود. با انجام** PCR **با استفاده از زوج پرایمرهای طراحی و تهیه شده برای تشخیص و شناسایی ژن** SHV**، نتیجه این آزمایش نیز در ۹ مورد (۷۲/۷۲٪) آن‌ها مثبت بود.**

نتیجه‌گیری: به کارگیری روش‌های مولکولی در کنار روش‌های فنوتیپی جهت تشخیص دقیق عوامل عفونی، حتی فرم‌های زنده اما غیر قابل کشت آن‌ها (Viable but Nonculturable, VBNC) **و ژن‌های مقاومت، می‌تواند کارآئی روش‌های "اپیدمیولوژی مولکولی" در پیگیری و مبارزه با عفونت‌ها و از جمله عفونت‌های بیمارستانی را افزایش دهد.**

واژه‌های کلیدی: بتالاکتاماز وسیع الطیف، اشریشیاکلی، عفونت ادراری، ژن SHV

مقدمه

باکتری‌ها موجودات زنده و هوشمندی هستند که در برابر چالش‌های محیطی عکس‌العمل نشان می‌دهند. اغلب باکتری‌ها ذاتاً در برابر عوامل ضدمیکروبی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

حساس هستند، و زمانی که در مواجهه با آن‌ها قرار می‌گیرند، امکان بروز جهش و یا به بیان دیگر تغییر در اطلاعات ژنتیکی باکتری‌ها میسر می‌گردد. مقاومت به عوامل ضدمیکروبی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها مثل آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام‌ها (پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، منوباکتام‌ها و کارباپنم‌ها) که نه تنها داروهای مناسب، بلکه فراوان‌ترین و پرمصرف‌ترین داروهای تجویزی علیه میکروارگانیسم‌ها جهت درمان عفونت‌های باکتریایی می‌باشند، از جمله آن تغییرات می‌تواند باشد. به عبارت دیگر تغییرات ژنتیکی که در باکتری‌ها رخ می‌دهد، می‌تواند منجر به مقاوم شدن آن‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و ظهور باکتری‌های مقاوم به آن‌ها شود.

مقاومت‌های باکتریایی رو به تزاید در جهان امروز و عفونت‌های ناشی از آن‌ها، یکی از بحران‌های موجود در درمان این دسته از عفونت‌ها می‌باشند. انتقال و انتشار سریع میکروارگانیسم‌هایی که توانایی تولید آنزیم‌های فوق‌الذکر را دارند، باعث افزایش قابل توجه میزان عفونت‌های ناشی از آن‌ها و از جمله عفونت‌های بیمارستانی مربوطه در تمام جهان شده است.

آنتی‌بیوتیک‌هایی که در هسته مرکزی خود واجد حلقه بتالاکتام می‌باشند، در زمره مناسب‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی می‌باشند. مکانیسم‌های مقاومت اکتسابی باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، متفاوت می‌باشد. مکانیسم اصلی کسب مقاومت در باسیل‌های گرم منفی روده‌ای از جمله اشریشیاکولی در برابر عوامل ضد میکروبی واجد حلقه بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشد. پروتئین‌های کروی شکل بتالاکتاماز واجد ۱۱ مارپیچ (هلیکس) آلفا و ۵ صفحه بتا (β -sheet) می‌باشند. آنزیم بتالاماز با تاثیر سوء بر اتصال و پیوند آمیدی بتالاکتام باعث شکست و هضم هسته مرکزی و حلقه بتالاکتام آنتی‌بیوتیک‌های واجد آن و دکربوکسیلاسیون آن‌ها می‌شود که از بین رفتن اثرات و غیر فعال شدن آنتی‌بیوتیک‌ها را باعث می‌شوند، و در نهایت شکست درمان آنتی‌بیوتیکی را سبب می‌شوند.

امروزه باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف Extended Spectrum Beta (ESBL Lactamases) که توانایی هیدرولیز اکثر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را دارند، در سراسر جهان شیوع زیادی یافته‌اند و به عنوان یک مشکل اساسی در درمان عفونت‌های باکتریایی مطرح هستند [۲،۱]. با پیدایش آنزیم‌های بتالاکتاماز در میان باکتری‌ها پدیده مقاومت در بسیاری از آن‌ها، به‌خصوص باکتری‌های ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی در حال افزایش است. در نتیجه درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها را با مشکلات جدی روبرو ساخته است. بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف-β Spectrum (Extended ESBLs (lactamases و AmpC بتالاکتامازهایی هستند که سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف، سفامایسین‌ها و مونوباکتام‌ها را هیدرولیز می‌کنند.

الگوهای متفاوتی برای طبقه‌بندی آنزیم‌های بتالاکتاماز وجود دارد. روشی که بیش‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرد، طبقه‌بندی عملکردی می‌باشد که توسط Bush- Jacoby- Medeiros معرفی گردیده است. انواع سوبستراهای مورد استفاده این دسته از آنزیم‌ها، ممانعت‌کننده‌ها و خصوصیات فیزیکی آن‌ها مثل وزن ملکولی و نقطه ایزوالکتریک، مبنا و اساس طبقه‌بندی عملکردی بتالاکتامازها می‌باشد. بتالاکتامازها را به صورت مولکولی هم طبقه‌بندی می‌نمایند. طبقه‌بندی مولکولی توسط Ambler در سال ۱۹۸۰، زمانی که فقط سکانس چهار اسید آمینه از بتالاکتامازها شناسایی شده بود، ابداع و معرفی گردید. در طبقه‌بندی عملکردی (Bush- Jacoby- Medeiros)، بتالاکتامازها را بر اساس ساختار اولیه به چهار رده مولکولی A تا D تقسیم می‌نمایند.

رده A: هضم و شکست حلقه بتالاکتام پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها را باعث می‌شود.

رده B: متالوبتالاکتامازهای وابسته به روی (zn) که قادر به هیدرولیز کارباپنم‌ها می‌باشد و در باکتری‌های سراشیا مارسسنس و سودوموناس آئروژینوزا رویت شده‌اند. کلاس B بر اساس تفاوت اسیدهای آمینه جایگاه فعال این آنزیم‌ها، به ۳ زیر رده B3، B2، B1 تقسیم می‌شوند.

رده C AmpC: یکی از انواع مهم رده C بتالاکتامازها می‌باشد (بر اساس طبقه‌بندی Ambler)، که به وسیله مهارکننده‌های بتالاکتامازی مانند کلاوونات، سولباکتام و تازوباکتام مهار نمی‌شود؛ اما به وسیله فنیل بورونیک اسید و کلوگزاسیلین مهار می‌شود. AmpC بتالاکتامازهایی هستند که قادر به هیدرولیز سفالوسپورین‌های وسیع الطیف، سفامایسین‌ها و مونوباکتام‌ها می‌باشند.

رده D: بتالاکتامازهایی با قدرت هیدرولیز فراوان مثل اوکساسی لیناز علیه کلوکسازین‌ها و اکساسیلین‌ها هستند.

در طبقه‌بندی عملکردی Bush و .... (سال ۱۹۹۵) بتالاکتامازها بر اساس پروفایل سوبسترایی و پروفایل مهارکنندگی در سه رده و چندین زیر رده قرار می‌گیرند.

رده ۱: سفالوسپورینازهایی هستند که توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازی مانند کلاولانیک اسید مهار نمی‌شوند.

رده ۲: شامل پنی‌سیلینازها یا سفالوسپورینازها یا هر دو که توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازی مهار می‌شوند. بر اساس

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

سوبسترای خود به ۸ زیر رده ۲ f، ۲ e، ۲ d، ۲ c، ۲ br، ۲ be، ۲ b، ۲ a تقسیم می‌شوند.

رده ۳: متالوبتالاکتامازها (MBLs) گروه مهمی از آنزیم‌های بتالاکتاماز هستند که در گروه ۳ از طبقه‌بندی عملکردی Bush و کلاس B از طبقه‌بندی مولکولی Ambler قرار گرفته‌اند، و به کاتیون‌های دو ظرفیتی (مانند فلز روی) به عنوان کوفاکتور در جایگاه فعال خود برای فعالیت آنزیمی خود، تخریب و شکست حلقه بتالاکتام نیاز دارند. این آنزیم‌ها طیف سوبسترائی وسیعی دارند و قادر به هیدرولیز تمام بتالاکتام‌ها به جز منوباکتام (آزترئونام) هستند. متالوبتالاکتامازها می‌توانند کارباپنم‌ها را هیدرولیز کنند. آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم در درمان عفونت‌های ناشی از ارگانیسم‌های دارنده ژن‌های AmpC و ESBLs کاربرد دارند.

متالوبتالاکتامازها، داخل اینتگرون قرار گرفته و می‌توانند در پلاسمیدها یا کروموزوم ادغام شوند. لذا قابلیت انتقال به سایر سویه‌های سودوموناس، باکتری‌های دیگر از جمله انتروباکتریاسه‌ها را دارند. متالوبتالاکتامازها توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازی مهار نمی‌شوند. بلکه توسط شلاته کننده‌های فلزی از قبیل اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) و گروه تیول مهار می‌شوند [۳].

در ایران تعداد زیادی از ایزوله‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده AmpC و ESBLs هستند که عامل مقاومت به هر دو گروه سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم هستند؛ در حالی که به کارباپنم‌ها حساس باقی می‌مانند.

تشخیص وجود هم‌زمان انواع مختلف بتالاکتامازها مانند MBLs و AmpC، ESBLs در این ایزوله‌ها مشکل است زیرا آن‌ها با هم‌دیگر هم‌پوشانی دارند و باعث افزایش حداقل غلظت مهارکننده (MIC) آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌گردند [۴-۷].

بنابراین زمانی که ارگانیسم‌های تولیدکننده چندین بتالاکتاماز در یک عفونت وجود داشته باشند بتالاکتام درمانی شکست خواهد خورد. مطالعات انجام شده در ایران نشان‌دهنده شیوع بالای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به دلیل وجود آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشد.

گزارشاتی در مورد شیوع آنزیم‌های بتالاکتاماز و ژن‌های شایع آن نظیر VIM و TEM، SHV در مناطق مختلف ایران وجود دارد. برای شناسایی ژن‌های blaVIM و blaTEM, blaSHV از مجموع ۱۳۰ ایزوله بالینی (۴۵ ایزوله اشریشیاکلی و ۸۵ ایزوله کلبسیلا پنومونیه (جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های آموزشی منتخب شهر خرم‌آباد (استان لرستان)، ۱۴ (۱۳٪/۵) ایزوله‌ها تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBL) و ۷۳ (۸۲/۴٪) ایزوله‌ها تولیدکننده AmpC بودند. ژن‌های blaTEM و blaSHV نیز در ۲۴ (۱۸/۴٪) و ۲۳ (۱۷٪/۶) ایزوله‌های بالینی به ترتیب شناسایی گردید [۸].

SHV از جمله ژن‌های کدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف پلاسمیدی در باکتری‌های متعلق به خانواده انتروباکتریاسه و به خصوص در گونه *E.coli* می‌باشد، که نقش مهمی در مقاومت سویه‌های باکتری اشریشیاکلی به داروهای بتالاکتام دارد. حاصل فعالیت چنین ژن‌هایی، آنزیم‌هایی است که قادر به تخریب بتالاکتام‌ها از جمله سفالوسپورین‌های نسل سوم با طیف اثر وسیع مانند سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفتازیدیم و... می‌باشند [۹]، که در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری فوق کاربرد دارند. گزارشات متعددی، حاکی از شیوع مقاومت‌های چندگانه دارویی با واسطه انواع مختلف ESBL از جمله آنزیم‌های حاصل از بیان ژن SHV در نقاط مختلف دنیا موجود می باشد [۱۱،۱۰].

بررسی‌های انجام شده توسط منصوری و همکاران بر روی ۵۱۱ ایزوله اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بستری در سه بیمارستان شهر کرمان در سال‌های ۸۷-۱۳۸۶، نشان داد، که ۸۶ ایزوله (۷۴/۷۸٪) حداقل به سه آنتی‌بیوتیک از کلاس‌های مختلف مقاوم بودند که به عنوان ایزوله‌هایی با مقاومت چندگانه در نظر گرفته شدند. جمعاً ۷۶ ایزوله (۶۶٪) تولیدکننده ESBLs بودند. آزمایش PCR بر روی DNA پلاسمیدی و کروموزومی ۴۸ ایزوله (۴۱/۷٪) دارای ژن TEM و ۳۹ ایزوله (۳۳/۹٪) دارای ژن SHV و ۲۰ ایزوله (۱۷/۳۹٪) دارای هر دو ژن بودند. لازم به ذکر است که حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد برای آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش رقت در آگار تعیین شد و از روش دیسک ترکیبی برای شناسایی سویه‌های تولیدکننده ESBLs استفاده شد، DNA پلاسمیدی و کروموزومی جهت شناسایی ژن بتالاکتامازهای TEM و SHV با روش PCR استفاده شد [۱].

تعیین فراوانی ژن‌های مقاومت بتالاکتامازی blaSHV blaCTX-M و blaTEM کدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، در سویه‌های *E.coli* جدا شده از نمونه‌های ادراری شهر تهران در سال ۱۳۸۸ توسط خانم مهسا یزدی و همکاران مورد مطالعه قرار گرفت. از ۲۶۴ ایزوله مورد بررسی در سال ۸۸، ۱۰۹ ایزوله (۴۴/۳٪) مولد ESBL بودند. ژن blaSHV در ۴۰ (۳۶٪/۶) ایزوله‌های ESBL+ همراه با دو ژن دیگر، در ۶۸ ایزوله (۶۲/۳٪) همراه با ژن blaTEM، و در ۵۴ ایزوله (۴۹٪/۵) همراه با ژن blaCTX-M مشاهده گردید. با توجه به درصد بالای مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم، انجام دقیق آزمایش‌های آنتی‌بیوگرام قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک در

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

عفونت‌های ناشی از ارگانیسم‌های تولیدکننده ESBL، یک ضرورت اجتناب‌ناپذیر است [۱۲].

در مطالعه دیگری، حساسیت دارویی ۳۱۱ ایزوله اشریشیاکلی جدا شده از بیماران تهرانی در سال ۱۳۸۵ با استفاده از دیسک‌های نیتروسفین، حضور و یا عدم حضور بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در انواع مقاوم آن بررسی شد. در ۴۷ ایزوله (۴۱/۵٪)، وجود β (Extended Spectrum lactamases) ESBLs، با روش Double disc تایید شد، که لزوم توجه ویژه به مصرف سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف را خاطر نشان می‌سازد [۲].

از ۷۰ نمونه کلینیکی جمع‌آوری شده از بیماران مشکوک به عفونت ادراری شهرستان دامغان در سال ۱۳۹۰، ۲۷ ایزوله (۳۷٪/۵) مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز و (۵۷/۱۴٪) آن نمونه‌ها دارای ژن TEM-1 بودند [۱۳].

۲۰۰ سویه اشریشیاکلی از نمونه‌های ادرار، خلط، زخم، مایع مغزی–نخاعی جمع‌آوری شده از ۵ بیمارستان تهران در سال ۱۳۸۶ ایزوله شد، بخش اعظم نمونه‌های فوق (n=۱۷۸، ۹۸٪) مربوط به عفونت‌های ادراری بود. بیش‌ترین میزان مقاومت سویه‌ها در برابر کربنی سیلین n=۱۴۷، معادل ۷۳٪/۵ و بیش‌ترین میزان حساسیت آن‌ها در برابر ایمی پنم دیده شد n=۲۰۰ معادل ۱۰۰٪، n=۱۰۵ (۲۵٪/۵) ایزوله‌ها ESBL+بودند که بیش‌ترین میزان مقاومت این‌ها نیز در برابر کربنی سیلین دیده شد (۹۵٪)، n=۴۸ (۲۴٪) ایزوله‌های ESBL+ دارای ژن blaTEM بودند، و n=۲۱ (۶٪) ایزوله‌ها نیز دارای ژن blaSHV بودند [۵].

از ۱۹۲ نمونه ادرار میانی اخذ شده از مراجعین به مراکز درمانی شهرهای بابل و قائم‌شهر استان مازندران، توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) در ۵۴ ایزوله (۲۸/۱۲٪) سویه‌های *E.coli* مثبت بود.

آزمایش PCR بر روی ژن‌های مقاومت نشان داد که ژن blaSHV در ۴۵ (۲۰٪) سویه‌های *E.coli*، ESBL مثبت گزارش شد. علاوه بر آن مقاومت هم‌زمان به ژن‌های blaSHV و blaTEM، در n=۱۲ (۵٪) ایزوله‌ها و blaSHV, blaCTX-M blaTEM در ۳ ایزوله، n=۳ (۷٪)، از ۴۵ سویه *E. coli* ESBL مثبت نیز گزارش شد [۱۴].

نتیجه بررسی Alice Elena Ghenea و همکاران بر روی ۴۶ ایزوله باکتریایی (۱۴ سویه *E. coli* و ۳۲ سویه *K. pneumonia*) در کشور رومانی و در سال ۲۰۲۲ بدین شرح بود، سویه‌های *E. coli* مقاوم به سفالوسپورین‌های نسل سوم و نسبتاً مقاوم در برابر کینولون‌ها بودند. در حالی‌که سویه‌های *K.Pneumonia* در برابر پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و سولفامیدها مقاوم و در برابر کینولین‌ها و کرباپنم‌ها نسبتاً مقاوم بودند. زن blaCTX-M در ۱۵ سویه (از ۲۳ سویه) *K.Pneumonia*، ژن blaSHV-1 در تمامی سویه‌ها و ژن blaTEM-1 در ۱۴ سویه مثبت بود. اکثریت قریب به اتفاق سویه‌های (۱۳/۱۴) *E. coli* ژن blaCTX-M، یک سویه ژن blaSHV-1، و ۱۱ سویه ژن blaTEM-1 را با خود حمل می‌کردند [۱۵].

۳۲ نمونه فاضلاب (که یک منبع عمده آلودگی است)، از نواحی مختلف استان مازندران در شمال ایران مطالعه گردید.

شیوع *E. coli* (prevalence) در نمونه‌های فاضلاب ۱۰٪ بود، شیوع *E. coli* (prevalence) تولیدکننده ESBL بالا و رو به افزایش بوده است. تولید ESBL در ۱۴ مورد (۳۹٪/۳۴) مثبت بود. شیوع (prevalence) ژن blaSHV در ایزوله‌های *E. coli* تولیدکننده ESBL، (۳۹٪/۳۴) بود. بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *E .coli* تولیدکننده ESBL در مقابل ceftizoxime و acid nalidixic (۱۰۰٪)، gentamicin (۹۳٪/۳۴)، ceftazidime ciprofloxacin. Nitrofurantoin موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر ایزوله‌های *E. coli* با بیش‌ترین میزان حساسیت بود (۷۳/۳۴٪).

شیوع (prevalence) بالای ژن blaSHV در این ایزوله‌ها ممکن است، دلیلی بر بیماری‌زایی آنان و توانایی آنان در انتقال ژن‌های مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های متعدد باشد. فلذا نیاز به توسعه درمان مناسب‌تر و دفع سالم‌تر فاضلاب در استان مازندران باشد [۱۰].

از ۱۱۳۰۸ نمونه ادراری از بیماران و مراجعین سرپایی بیمارستان میلاد تهران در فاصله زمانی اسفند ۱۳۸۷ لغایت خردادماه ۱۳۸۸، کشت در ۱۰۲۰ نمونه (۹٪) موارد مثبت بود که از این تعداد در ۶۲۰ نمونه (۶۰/۷۸٪) اشریشیاکلی و در ۱۱۵ نمونه (۱۱/۲۷٪) کلبسیلا پنومونیه جدا شد. شیوع مقاومت بتالاکتامازی وسیع‌الطیف (ESBLs) نیز در ۱۲۳ نمونه (۱۲٪) سویه‌های اشریشیاکلی، و ۸۱ مورد (۱۵٪) سایر سویه‌ها مثبت بود. ۱۰۹ ایزوله (۱۴۴/۳٪) مولد ESBL بودند. ژن blaSHV نیز، در ۴۰ مورد (۳۶/۶٪) ایزوله‌ها مثبت بود، ۵۱ سویه *E. coli* و ۶۱ سویه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های ادراری مولد ESBLs و به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های متداول مقاوم بود. مقاومت به سفوتاکسیم در ۷۰ ایزوله (۳۱٪/۲) سویه‌های اشریشیاکلی مشاهده شد، که در ۶۲ ایزوله (۸۸٪/۶) تولید ESBLs نیز تایید شد و در ۶ مورد (۹/۷٪) نیز ژن blaSHV شناسایی شد [۱۱].

مقاومت‌های چندگانه دارویی باکتری‌ها یکی از معضلات عمده درمانی و پزشکی بوده و با توجه به نقش عمده باکتری

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

E. coli در انواع عفونت‌های بیمارستانی (عفونت ادراری، عفونت خون، و.....) و مصرف گسترده و فراوان آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، عوارض زیاد داروهای شیمیایی، و همچنین افزایش مقاومت باکتری‌های عامل عفونت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها [۱۴،۱۶] برآن شدیم تا به بررسی میزان انتشار و نقش ژن SHV در سویه‌های *E. coli* ایزوله شده از مراجعین به بیمارستان‌ها و مراکز درمانی شهرستان سمنان بپردازیم، امید آنکه با شناسایی نقش چنین ژن و یا ژن‌هایی، راه‌های انتقال و انتشار این ژن‌ها در سویه‌های مقاوم *E. coli* گامی باشد هر چند کوچک در جهت کمک به حل معضلات درمانی بیماری‌های واگیر در منطقه و کشور، و کاهش مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها که علاوه بر هزینه اقتصادی و تشدید وابستگی به خارج از کشور، سبب بروز مقاومت دارویی نیز شده، راه‌کارهایی برای کنترل و محدود نمودن انتقال ژن‌های مقاومت دارویی پلاسمیدی و سوش‌های مقاوم میکروبی نیز بیابیم.

مواد و روش‌ها

این طرح که با حمایت کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی سمنان (طرح تحقیقاتی شماره ۱۰۸) و کد سامانه سمات (A-10-56-10) و با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی سمنان (کد اخلاق ۶۳۱،۴۹۳۱) انجام شده است.

جامعه آماری در این مطالعه بیماران مشکوک به عفونت ادراری مراجعه‌کننده به بیمارستان‌ها و مراکز آموزشی–درمانی سطح شهرستان سمنان بودند، در این مطالعه که از نوع تجربی /Experimental بود، روش نمونه‌گیری و تعیین حجم نمونه بر اساس نتایج مطالعات و مقالات متعدد در خصوص نرخ شیوع ژن SHV و با اطمینان ۹۵٪ و دقت ۵٪ حجم نمونه از رابطه $n=\frac{Z^2_{1-\frac{\alpha}{2}}P(1-P)}{d^2}$ ۳۵۰ نمونه برآورد شد [۸–۶]، که با توجه به نوع نمونه‌گیری و همچنین همزمانی با مطالعات دیگر که حجم بیش‌تری از نمونه را طلب می‌کرد، عملاً ۴۰۰ نمونه از بیماران مشکوک به عفونت ادراری مراجعه‌کننده به بیمارستان‌ها و مراکز آموزشی–درمانی سطح شهرستان سمنان مورد بررسی قرار گرفت.

نمونه‌برداری و جداسازی اشریشیاکلی از نمونه‌های بیمارستانی جمع‌آوری شده از مراجعین مشکوک به عفونت ادراری با این باکتری در چندین بیمارستان و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان سمنان با استفاده از روش‌های استاندارد، بر اساس شکل، رنگ، و اندازه کلنی‌ها و کشت ایزوله‌های جدا شده بر روی پلیت‌های حاوی محیط‌های جامد نظیر EMB، MAC، کشت در محیط‌های افتراقی TSI، SIM، سیمون سیترات، اوره و همچنین از طریق کشت در محیط‌های MRVP، و با استفاده از آزمایشات تکمیلی مثل آزمون اندول و سایر آزمون‌های IMVIC، MR، VP، و ... انجام شد.

آزمون آنتی‌بیوگرام با استفاده از روش دیسک– دیفیوژن انجام شد، بدین‌صورت که در ابتدا از یک تک کلنی، باکتری در محیط کشت مایع مولر هینتون براث و یا نوترینت براث تلقیح می‌شد، سپس محیط کشت‌های فوق به مدت ۶–۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده می‌شدند، تا به کدورت مورد نظر برسند. سرانجام با استفاده از سواپ پنبه‌ای از این سوسپانسیون‌های انکوبه شده بر روی تمام سطح پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار برده و کشت داده می‌شد (روش بائر–کربی/ ژل– دیفیوژن)، و در نهایت دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی در جاهای مشخص شده بر روی پلیت قرار می‌گرفت. پس از انکوباتورگذاری پلیت‌ها، نتایج بر طبق جداول استاندارد آنتی‌بیوگرام با توجه به توصیه‌های شرکت‌های سازنده دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده ارزیابی، سنجش و تفسیر و در نهایت ثبت می‌گردید، به منظور شناسایی سویه‌های تولیدکننده بتا لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)، ایزوله‌های مقاوم به نیتروسفین [۵،۲] جهت بررسی حضور و یا فقدان ESBL (بتالاکتامازهای وسیع الطیف) با روش دیسک ترکیبی مورد آزمون قرار گرفتند.

شکل ۱: زوج دیسکهای آنتی بیوتیکی سفتازیدیم با و بدون کلاولانیک اسید CAZ 30mg /CA10mg ، سفوتاکسیم/ با و بدون کلاولانیک اسید CTX 30mg / CA10mg ، سفوتاکسیم/ با و بدون کلاولانیک اسید، و سفتازیدیم/ با و بدون کلاولانیک اسید)، خریداری شده از شرکت Mast انگلیس مورد استفاده جهت انجام آزمایش تولید آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) بروش فنوتیپی تائیدی (phenotypic confirmatory tests)

آنتی‌بیوگرام مجدد سویه‌های مقاوم به نیتروسفین، با دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی ذیل با کلاوولانیک اسید و بدون آن، خریداری شده از شرکت Mast انگلیس, (شکل ۱) انجام شد،

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

به عبارت دیگر آزمایش تولید آنزیم‌های بتالاکتاز وسیع الطیف (ESBLs) با استفاده از آزمایش فنوتیپی تائیدی (phenotypic confirmatory tests) انجام شد [۱۵،۱۴]. دیسک‌های مورد آزمایش شامل سفتازیدیم/ با و بدون کلاولانیک اسید CA10mg / CAZ 30mg، سفوتاکسیم/ با و بدون کلاولانیک اسید CA10mg / CTX 30mg سفوتاکسیم و سفتازیدیم/ با و بدون کلاولانیک اسید. بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد از طریق افزایش قطر هاله ممانعت از رشد، حداقل به اندازه ۵ میلی‌متر یا بیش‌تر در اطراف دیسک آنتی‌بیوتیکی-کلاولانیک اسید مثل سفتازیدیم – کلاولانیک اسید و یا سفوتاکسیم – کلاولانیک اسید، در مقایسه با همان دیسک آنتی‌بیوتیکی (به تنهایی خریداری شده از شرکت Mast انگلیس)، تولید ESBLs بر طبق ضوابط و شاخص‌های مورد نظر Clinical and Labaratory Standards Institute (CLSI) و در صورت امکان و عدم تزاحم شاخص‌های مد نظر (EUCAST) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing شناسایی گردید [۱۷،۸].

در مرحله بعدی، سویه‌های مقاوم اشریشیاکلی‌های کدکننده ESBLs بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت شد، پس از رشد از این باکتری‌ها، پلاسمید و یا DNA آن. با استفاده از روش‌های دستی سنتی به ویژه با استفاده از کیت‌های موجود در بازار که بر اساس اتصال تمایلی عمل می‌کرد، استخراج گردید و در ادامه با استفاده از پرایمرهای طراحی، ارزیابی و تهیه شده برای ژن SHV و انجام PCR و در نهایت با انجام الکتروفورز و تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از مارکرهای مولکولی، وجود و یا فقدان ژن SHV در سویه‌های فوق، اثبات و یا رد می‌گردید.

لازم به ذکر است که پرایمرهای مورد استفاده بر اساس نتایج مطالعات بانک‌های اطلاعاتی به ویژه در مورد ژن‌ها نظیر بانک اطلاعاتی ژن (Gene Bank) از زیر مجموعه NCBI طراحی و هم‌چنین بر اساس جست‌وجو در مقالات متعدد، ارزیابی و انتخاب گردید.

شرایط مورد استفاده در آزمایش PCR برای شناسایی ژن SHV به صورت خلاصه بدین شرح می‌باشد.

۱- دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به منظور باز شدن (First Denaturation)

۲- دمای ۹۵- ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱-۰/۵ دقیقه به منظور باز شدن (Denaturation)

۳- دمای ۶۲- ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه به منظور اتصال پرایمرها (Annealing)

۴- دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲-۱ دقیقه به منظور همانندسازی رشته دوم (Extension)

۵- تکرار مراحل ۴-۲ به همین ترتیب و پشت سر هم به تعداد ۳۰ دفعه

۶- در انتها هم دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه (Final (Last) extension).

نتایج

در این مطالعه، پلیت کشت ادرار ۴۰۰ نفر از افراد مظنون به عفونت ادراری از آزمایشگاه‌ها و مراکز درمانی سطح شهر که آماده همکاری بودند، جمع‌آوری و مورد آزمایشات تشخیصی و تاییدی مجدد قرار گرفت، در بیش از ۹۹٪ موارد، تشخیص قبلی ایزوله‌های فوق تایید شد. سویه‌های باکتری *E. coli* از ۱۵۱ نمونه ادراری (۳۷/۷۵٪) ایزوله گردید. پس از انجام آزمون آنتی‌بیوگرام بر روی سویه‌های فوق در برابر دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی و شناسایی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به ویژه سویه‌های مقاوم به نیتروسفین [۵،۲]، سفتازیدیم (CAZ) و سفوتاکسیم (CTX) به عنوان سویه‌های ESBL مثبت(+) احتمالی [۱۷،۸]، تعداد ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های فوق‌الذکر به ۴۳ مورد (۲۸٪/۴۸) رسید. درصد حساسیت سویه‌های *E. coli* در برابر جنتامایسین (۸۲٪)، آمیکاسین (۸۷٪)، نورفلوکساسین ۶۳٪، سفتریاکسون (۶۸٪)، سیپروفلوکساسین (۶۷٪)، کوتریموکسازول (۴۸٪)، آمپی‌سیلین ۱۱ نمونه ۷/۲۸٪ و نیتروفورانتوین ۵۴ سویه ۳۵/۷۶٪ بود. آزمون فنوتیپی تائیدی (confirmatory phenotypic tests) به منظور تشخیص قطعی تولید و یا عدم تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) با استفاده از زوج دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفتازیدیم، سفوتاکسیم، و سفتازیدیم/ با و بدون کلاولانیک اسید نیز بر روی سویه‌های ESBL مثبت (+) احتمالی، انجام شد. که نتیجه این آزمایش در ۳۳ مورد (۶۷/۴۷٪) آن‌ها و یا به بیان دیگر در ۱۲/۵۸٪ سویه‌های *E. coli* مثبت بود. سویه‌های ESBL مثبت(+) بیش‌ترین مقاومت را در برابر آمپی‌سیلین ۳۰ مورد (۹۰/۹۱٪) نشان دادند.

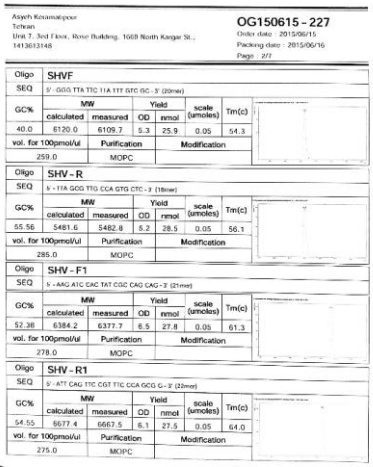
با جست‌وجو در مقالات متعدد و هم‌چنین مطالعه بانک اطلاعاتی ژن (Gene Bank) از زیر مجموعه NCBI، پرایمرهای طراحی، ارزیابی و انتخاب گردیده برای تشخیص وجود و یا فقدان ژن SHV در سویه‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) با انجام PCR، با بلاست نمودن پرایمرها و به‌دست آوردن سکانس ژن SHV و

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

مشخص نمودن محل اتصال پرایمرهای طراحی شده، سکانس و اندازه محصول PCR انجام شده، بر روی ژن SHV نیز تعیین و مشخص گردید. با انجام بلاست به صورت بر خط، علاوه بر تعیین ژن‌های مورد شناسایی با پرایمرهای طراحی شده، میزان مشابهت سکانس پرایمرهای تهیه شده با سکانس ژن SHV در محل‌های مکمل آن با هر کدام از پرایمرها نیز مشخص می‌شود. با انجام بلاست و تعیین بخش‌های مکمل ژن‌های مورد شناسایی با پرایمرهای طراحی شده، می‌توان سکانس ژن SHV (قطعه هدف PCR) را نیز به‌دست آورد.

انجام PCR جهت تشخیص ژن SHV

شکل ۲ نشان می‌دهد، برای تشخیص ژن SHV به روش PCR دو زوج پرایمر طراحی و تهیه شده بود، که جهت اختصار در این مقاله کار با یک زوج پرایمر توضیح داده می‌شود. پرایمر ریوارس یکی از زوج پرایمرهای طراحی و تهیه شده برای تشخیص و شناسایی ژن SHV مکمل موقعیت‌های نوکلئوتیدی ۹۳۸ الی ۹۶۱ و پرایمر فورووارد همان زوج پرایمر، مکمل موقعیت‌های نوکلئوتیدی ۳۴ الی ۵۳ رشته مکمل ژن می‌باشد، بنابراین انتظار داشتیم که با انجام PCR، یک باند ۹۲۸bp (موقعیت‌های نوکلئوتیدی ۹۶۱-۳۴) در نمونه‌های واجد ژن SHV داشته باشیم که عملاً نیز همان شد که انتظار داشتیم. نتیجه این آزمایش در ۹ مورد (۷۲٪/۷۲) آن‌ها مثبت بود. و باند مورد نظر در ژل آگاروز PCR آن‌ها رویت شد.


OG150615 - 227

Oligo	SHVF
SEQ	5'- GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC - 3' (20mer)

GC%	MW calculated	MW measured	Yield OD	Yield nmol	scale (umoles)	Tm(c)
40.0	6120.0	6109.7	5.3	25.9	0.05	54.3

vol. for 100pmol/ul: 259.0 | Purification: MOPC | Modification

Oligo	SHV - R
SEQ	5' - TTA GCG TTG CCA GTG CTC - 3' (18mer)

GC%	MW calculated	MW measured	Yield OD	Yield nmol	scale (umoles)	Tm(c)
55.56	5481.6	5482.8	5.2	28.5	0.05	56.1

vol. for 100pmol/ul: 285.0 | Purification: MOPC | Modification

Oligo	SHV - F1
SEQ	5' - AAC ATC CAC TAT CGC CAG CAG - 3' (21mer)

GC%	MW calculated	MW measured	Yield OD	Yield nmol	scale (umoles)	Tm(c)
52.38	6384.2	6377.7	6.5	27.8	0.05	61.3

vol. for 100pmol/ul: 278.0 | Purification: MOPC | Modification

Oligo	SHV - R1
SEQ	5' - ATT CAG TTC CGT TTC CCA GCG G - 3' (22mer)

GC%	MW calculated	MW measured	Yield OD	Yield nmol	scale (umoles)	Tm(c)
54.55	6677.4	6667.5	6.1	27.5	0.05	64.0

vol. for 100pmol/ul: 275.0 | Purification: MOPC | Modification

شکل ۲. پرایمرهای تهیه شده و مورد استفاده برای تشخیص وجود و یا فقدان ژن SHV در سویه های تولیدکننده آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف(ESBLsبا آزمایش PCR

بحث و نتیجه‌گیری

اشریشیاکلی از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی از جمله عفونت‌های ادراری است و مقاومت چندگانه در ایزوله‌های این باکتری، حداقل در عفونت‌های ادراری زیاد است. وجود مکانیسم‌های مختلف کسب مقاومت به ویژه بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) درمان عفونت‌های حاصله را با مشکل مواجه کرده است. شناسایی الگوی مقاومت و فراوانی ژن‌هایی مثل SHV که بتالاکتامازهای وسیع الطیفی را کد می‌نمایند، برای درمان مناسب عفونت‌های ناشی از این باکتری ضروری است.

استراتژی‌های مختلفی توسط باکتری‌ها به کار گرفته می‌شود تا از اثرات زیان‌بار آنتی‌بیوتیک‌ها مصون بمانند یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها، که در باکتری‌های گرم منفی علیه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به کار گرفته می‌شود تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز Beta-lactamase می‌باشد. آنزیم‌های بتالاکتاماز، با هیدرولیز هسته مرکزی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام باعث غیر فعال شدن آن‌ها می‌شوند. پیدایش آنتی‌بیوتیک‌های جدید از قبیل سفالوسپورین‌های وسیع الطیف، از ترئونام‌ها و رواج استفاده از آن‌ها در درمان بیماری‌های عفونی باکتریال منجر به بروز دسته جدیدی از آنزیم‌ها به نام بتالاکتامازهای وسیع الطیف شده است. آنزیم‌های بتالاکتامازی، مهم‌ترین عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام در میان باکتری‌های گرم منفی می‌باشند، و امروزه شاهد افزایش روزافزون عفونت‌های ناشی از آن‌ها در جهان هستیم. این امر یکی از مشکلات بهداشتی درمانی نوظهور در سطح دنیاست.

در این پژوهش سهم سویه‌های باکتری *E. coli* در ۱۵۱ نمونه از حدود ۴۰۰ ایزوله ادراری (۳۷/۷۵٪) بود، که قابل مقایسه با مطالعه بهروزی و همکاران ولی متفاوت با نتایج مطالعه علیپور و همکاران در مراجعین به مراکز درمانی از اسفند ماه سال ۸۷ لغایت خردادماه ۸۸ بود که *E. coli* در ۱۰۲۰ نمونه از ۱۱۳۰۸ ایزوله ادراری (۹٪) بود.

تعداد سویه‌های ESBL مثبت(+) احتمالی، در این پژوهش به ۳۳ مورد (۲۸/۴۸٪) رسید که قابل مقایسه با نتایج مطالعه مایا بابایی کوچکسرایی و همکاران می‌باشد، که در ۷۰ ایزوله (۳۱/۲٪) سویه‌های اشریشیاکلی گزارش نموده است.

شیوع مقاومت بتالاکتامازی وسیع الطیف (ESBLs) به عبارت دیگر تعداد سویه‌های ESBL مثبت(+) قطعی در این پژوهش، ۳۳ مورد (۲۱/۸۵٪) بود. که قابل مقایسه با نتایج مطالعه خانم بهروزی و همکاران [۱۱] در بیمارستان میلاد تهران از اسفند ماه سال ۷۸ لغایت خردادماه ۸۸ می‌باشد، که در ۱۳۲ نمونه (۲۱٪) سویه‌های اشریشیاکلی [۱۱] و مطالعه علیپور و همکاران [۱۵] در مراجعین به مرکز درمانی شهرهای قائم‌شهر و بابل در سال ۱۳۹۸ (۲۰۱۹ میلادی) در ۴۵ نمونه (۲۸٪/۱۲) سویه‌های اشریشیاکلی گزارش نموده است. اما متفاوت با مطالعه یزدی و همکاران [۲۱] که شیوع مقاومت بتالاکتامازی وسیع الطیف (ESBLs) در شهر تهران در سال ۱۳۸۸ در ۱۰۹ ایزوله (۴۴/۳٪)، مطالعه نور امیر مظفری و

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

همکاران [۲] که شیوع مقاومت بتالاکتامازی وسیع الطیف (ESBLs) در شهر تهران در سال ۱۳۸۵ در ۴۷ ایزوله (۴۱٪/۵)، سویه‌های اشریشیاکلی گزارش کرده، می‌باشد. هم‌چنین آنان گزارش نمودند که تنها در ۶۹/۷٪ ایزوله‌های ESBL مثبت از (۶۹/۱۴٪) ژن کدکننده آن کروموزومی بود، که این امر می‌تواند بیانگر اهمیت و نقش پلاسمید در انتشار ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها باشد.

گزارش‌های متفاوت پژوهشگران از شیوع مقاومت بتالاکتامازی وسیع الطیف (ESBLs) در شهر تهران [۷،۳،۲] می‌تواند متاثر از تفاوت زمان و مکان مطالعه باشد.

فراوانی ژن SHV نیز در پژوهش‌های مختلف، متفاوت گزارش شده است، ۳۳/۹٪ [۱]، ۳۶/۴٪ [۲]، (۲۰٪) ایزوله‌های ESBL مثبت، چنین مطالعاتی می‌توانند، در معرفی، بهینه‌سازی و افزایش کارآیی روش‌های بیولوژی مولکولی در تشخیص دقیق عوامل عفونی، حتی تشخیص فرم‌های زنده اما غیر قابل کشت عوامل عفونی (Viable but Nonculturable, VBNC) [۲،۱۸]، و درصد دائمی ژن‌های مسبب مقاومت‌های دارویی از جمله ژن SHV در عوامل عفونی شایع، کاربرد داشته باشند، همان‌گونه که شیوع کرونا، توانست تا حدود زیادی بستر اصلی، امکان استقرار و استفاده از آزمایش‌های مولکولی در شناسایی عامل اتیولوژیک و منبع عفونت، ردیابی روش‌های احتمالی انتقال عوامل عفونی را فراهم نماید. اطلاعات فوق در اتخاذ روش‌های مناسب برای جلوگیری و مهار عوامل عفونی نیز می‌تواند موثر واقع گردد. از مهم‌ترین محدودیت‌های چنین مطالعه‌ای می‌توان به گرانی تجهیزات و مواد مصرفی مورد نیاز جهت انجام آزمایشات مولکولی نام برد.

با استفاده از روش‌های مولکولی از جمله PCR در تشخیص عوامل عفونی، ژن‌های مقاومت و ... می‌توان پرایمرهای مختلف حتی بر اساس سکانس یک ژن خاص طراحی و در نهایت تهیه نمود، همان‌گونه که پژوهشگران پرایمرهای متفاوتی را برای ژن SHV طراحی نموده و آن‌ها را در مطالعات خود مورد استفاده قرار داده‌اند. بدیهی است که شرایط دمایی PCR و اندازه قطعه مورد انتظار برای محصول PCR در هر مورد متناسب با سکانس پرایمر و برخی شرایط دیگر، متفاوت خواهد بود.

لازم است که کارآیی پرایمرهای مختلف در شناسایی دقیق یک ژن خاص (ویژگی، Specificity) و شناسایی همه موارد حاوی ژن فوق (حساسیت Sensitivity را باید ارزیابی نمود تا بتوان بهترین و دقیق‌ترین پرایمرها را برای تامین هدف خاص طراحی و تهیه نمود. بدیهی است خصوصیات پرایمرهای مختلف، متفاوت می‌باشد، ویژگی‌های هر پرایمر را از طریق نرم‌افزارهای آفلاین و آنلاین نیز می‌توان برآورد نمود. از آن‌جایی که سکانس پرایمرها بر اساس ژن هدف‌گذاری شده، طراحی می‌شوند، اگر دقیق طراحی شوند، شرایط و برنامه ترموسیکلر که باید متناسب با سکانس پرایمرهای طراحی شده و... تنظیم گردد، برای انجام PCR با پرایمرهای مختلف چندان متفاوت نخواهد بود. بدیهی است که شرایط دمایی ترموسیکلر باید متناسب با سکانس پرایمرها و .... لحاظ گردد. شرایط متفاوت مورد استفاده توسط پژوهشگران مختلف در آزمایش PCR برای شناسایی ژن SHV گواهی بر این ادعا می‌باشد. فلذا بهینه‌سازی انجام آزمایشات و انتخاب مناسب‌ترین و بهترین سکانس پرایمر و روش انجام آزمایش نیازمند تکرار آزمایش و پرداخت هزینه‌های اضافی می‌باشد. سنتز پرایمرها، و سکانس نمودن محصولات PCR به ویژه که برخی از آن‌ها نیازمند همکاری با موسسات خارج از کشور می‌باشد نیز از دیگر محدودیت‌های مطالعه می‌تواند باشد. از مقایسه نتایج این تحقیق با پژوهش‌های مشابه که به برخی از آن‌ها اشاره شد به صورت قطعی و مسلم می‌توان نتیجه گرفت که:

الف- *E. coli* سهم عمده‌ای در ایجاد عفونت‌های مختلف، از جمله عفونت‌های بیمارستانی بالاخص عفونت‌های ادراری دارد.

ب- مقاومت سویه‌های *E. coli* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت‌های ناشی از آن در گستره زمان، روندی صعودی داشته و رو به افزایش می‌باشد، البته روند فوق در مناطق مختلف متناسب با شرایط مختلف، متفاوت می‌باشد.

ج- سویه‌های *E. coli* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، از مکانیسم‌های مختلف کسب مقاومت از جمله کسب ژن‌های مختلف مقاومت مثل SHV و توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) بهره می‌برند، روند مقاوم شدن آن‌ها با استفاده از مکانیسم‌ها فوق نیز رو به افزایش می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود فرض و لازم می‌دانند که از مساعدت‌های دانشگاه علوم پزشکی سمنان، کمیته تحقیقات دانشجویی، کارکنان گروه و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه و هم‌چنین آزمایشگاه‌های تابعه دانشگاه و تامین اجتماعی که نهایت همکاری را مبذول داشته‌اند سپاس‌گزاری نمایند.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

مشارکت و نقش نویسندگان

علی اکبر شعبانی ایده و طراحی مطالعه، آنالیز و تفسیر نتایج، علی ابوذری، مجید قربانی، و فاطمه مهرجو جمع‌آوری داده‌ها در رابطه با نقش ژن SHV، هدی شعبانی: جمع‌آوری داده‌ها در رابطه با نقش ژن NDM-1، سیما روایی، علیرضا افغان پرتابی، حسین عنانی جمع‌آوری داده‌ها در رابطه با نقش ژن‌های CTX-M و TEM-1 (چون این طرح‌های کمیته تحقیقات دانشجویی با هم‌دیگر در حال اجرا بود، اخذ نمونه‌ها و انتقال آن‌ها به آزمایشگاه، کشت مجدد و تایید تشخیص باکتری E.coli، انجام آنتی‌بیوگرام وآزمون تاییدی بیان و تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) به صورت مشترک و با هم‌دیگر انجام می‌دادند) ولی طراحی و انتخاب پرایمرها، استخراج DNA از سویه‌های (ESBL) مثبت و انجام PCR را هر گروه متناسب با ژن خاصی که در پروپوزال آن گروه آمده و در بالا لیست شده انجام می‌دادند. رضا نصر و مریم اردکانیان نظارت بر حسن اجرای طرح و انجام آزمایش‌ها و تدارکات، علیرضا شعبانی نگارش نسخه اول مقاله، همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نموده‌اند.

منابع

[1] Mansor MR, Ali Hasan Kashkool D, Safaa Abd Al-Ameer S, Akeel Al-Hasan B, Almulla AF. Molecular detection of bla(SHV-la) gene in Klebsiella pneumonia isolated from urinary tract infections, Najaf, Iraq. Arch Razi Inst 2022; 77: 1181-1184.

[2] Amir Mozaffari N, Forouhesh Tehrani H, Tavaf Langeroodi Z, Abdullahi A. A survey of drug resistance due to extended spectrum beta lactamases (ESBLs) in escherichia coli strains isolated from hospitalized patients. Razi J Med Sci 2008; 15: 39-46.

[3] Kazemian H, Heidari H, Ghanavati R, Ghafourian S, Yazdani F, Sadeghifard N, et al. Phenotypic and genotypic characterization of ESBL-, AmpC-, and carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli isolates. Med Princ Pract 2019; 28: 547-551. https://doi.org/10.1159/000500311 PMid:30995662 PMCid:PMC6944897

[4] Tafti A, Zandi H, Vakli M, Mousavi SM, Zarei M. Frequency of β-lactamase and metallo-β-lactamase in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn wounds in Yazd burn hospital during 2011-2012. Koomesh 2014; 18: 167-174. (Persian)

[5] Shahcheraghi F, Noveiri H, Nasiri S. Detection of bla TEM and bla SHVgenes among clinical isolates of E. coli from Tehran hospitals. Iran J Med Microbiol 2007; 1: 1-8.

[6] Miller R, Carson J, Dalsgaard I, Gaunt P, Gieseker C, Hawke J, Reimschuessel R, Smith P, Somsiri T, Wu C. CLSI performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isoloated from aquatic animals; second information supplement. CLSI document VET03/VET04-S2. Book Chapter 2014; 56.

[7] Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 969-976. https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09 PMid:19995920 PMCid:PMC2825993

[8] Delfani S, Kalantar-Neyestanaki D, Godarzi G, Soroush S, Rezaei F. Characterization co-existence of ESBLs, AmpC and MBLs in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates from Khorramabad Hospitals. Yafteh 2020; 22: 58-67.

[9] Shahcheraghi F, NS, Noiri H. Investigation the presence of blaSHV and blaTEM beta-lactamase genes. In antibiotic-resistant Escherichia coli strains isolated from clinical samples from Tehran hospitals. Iran J Med Microbiol 1386; 1: 1-8. (Persian)

[10] Tonekabony N, Izadi Amoli R, Gholami A, Oskoueiyan R. Prevalence of SHV gene and antibiotic resistance of extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli strains isolated from abattoir wastewater in Mazandaran Province, north of Iran. Caspian J Environ Sci 2021; 19: 11-17. (Persian)

[11] Behrouzi A, Rahbar M, Vand Yousefi J. The prevalence of Extended-Spectrum β-lactamase (ESBLs) producing Klebsiella pneumonia and Eschrrichia coli isolated in Milad hospital of Tehran in 2010. Iran J Med Microbiol 2010; 4: 36-41. (Persian)

[12] Yazdi M, Nazemi A. Prevaaence of SHV/CTX-M/TEM beta lactamase resistance genes in Escherichia coli isolated from UTI in Tehran city. 2001. (Persian)

[13] Shabani A, Ebrahimi VM, Agaei S, Nasr R. A survey frequency of TEM-1 gene in E. coli strains isolated from clinical specimens in Damqan city. 2012. (Persian)

[14] Alipour M, Jafari A. Evaluation of the prevalence of blaSHV, blaTEM, and blaCTX Genes in Escherichia coli isolated from urinary tract infections. Avicenna J Clin Microbiol Infect 2019; 6: 83-87. https://doi.org/10.34172/ajcmi.2019.15

[15] Ghenea AE, Zlatian OM, Cristea OM, Ungureanu A, Mititelu RR, Balasoiu AT, et al. TEM,CTX-M,SHV genes in ESBL-Producing escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from clinical samples in a county clinical emergency hospital romania-predominance of CTX-M-15. Antibiotics (Basel) 2022; 11. https://doi.org/10.3390/antibiotics11040503 PMid:35453254 PMCid:PMC9028254

[16] Samiei Abianeh H, Nazarian S, Hajizadeh A, Kordbach E. Expression, purification, and immunization of a chimeric protein containing immunogenic regions of flagellin and intimin proteins against E. coli O157: H7. Koomesh 2022; 24: 717-726. (Persian)

[17] Giske CG, Turnidge J, Cantón R, Kahlmeter G. Update from the European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). J Clin Microbiol 2022; 60: e0027621. https://doi.org/10.1128/jcm.00276-21 PMid:34346716 PMCid:PMC8925892

[18] Ahadi H, Attaran B, Mansour Ghanaie R, Ganji L, Fallah F, Karimi A, et al. Molecular investigation of Campylobacter spp. and salmonella infection in children with community acquired diarrhea. Koomesh 2022; 24: 684-690. (Persian)

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Koomesh -Volume 25, Issue 6 November and December 2023, 659- 667

Investigating the frequency of SHV gene encoding ESBL in *E.coli* strains isolated from urine samples of patients who were referred to hospitals and medical centers in Semnan city

Alireza Shabani (Pharm. D Student)[1], Ali Akbar Shabani (Ph.D) [*2], Reza Nasr (M.Sc)[2], Maryam Ardakanian (M.Sc)[2], Sima Ravai (B.Sc) [3], Alireza Afghan Pertabi (B.Sc)[3], Hossein Anani (B.Sc) [3], Hoda Shabani (M.D) [4], Ali Abu Zari (B.Sc) [3], Majid Qurbani (B.Sc) [3], Fateme Mehrjo (B.Sc) [3]

1- Dept. of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2 - Dept. of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
3- Student Research Committee, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
4- Dep .of Pediatrics, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁎ Corresponding author. +098 9123311984 aashaebani@yahoo.com Received:; 20 Aug 2023 Accepted: 26 Dec 2023

Introduction*:* Numerous reports indicate the spread of multiple drug resistances through different types of Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL), including enzymes resulting from SHV gene expression in different parts of the world, which is one of the major medical and therapeutic problems. Nowadays, investigating the role of Escherichia coli bacteria in various infections, including hospital infections, and the amount of use of different antibiotics in treatment, considering the increasing resistance of bacteria causing infection to antibiotics, is a necessity. The purpose of this research project was to investigate the prevalence of the SHV gene as one of the genes encoding ESBL in infectious bacteria including *E. coli* strains.

Materials and Methods*:* Sampling and isolation of Escherichia coli collected from clients suspected of urinary tract infection using standard methods and antibiogram test using disc-diffusion method were performed on them. To identify strains producing broad-spectrum beta-lactamases (ESBLs), nitrocephene-resistant isolates rechecked with the combined disc method to definitively detect the production of broad-spectrum beta-lactamase enzymes (ESBLs) with the use of pairs of ceftazidime, cefotaxime, cefotaxime, and ceftazidime antibiotic discs with and without clavulanic acid purchased from British Mast Company were tested. By extracting DNA from them using specific primers designed, evaluated, and prepared for the SHV gene, and performing PCR, the presence or absence of the SHV gene in the above strains was evaluated.

Results: *E. coli* strains were isolated from 151 urinary samples (37.75)%. Isolates resistant to nitrocephene were considered as possible strains producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), the result of the confirmatory phenotypic test on probable positive (+) ESBL strains, in 33 cases (67.47) % of them were positive. By performing PCR using a pair of specific primers designed and prepared to detect and identify the SHV gene, the result of this test was also positive in 9 cases (72.72) % of them.

Conclusion: Using molecular methods along with phenotypic methods to accurately diagnose infectious agents, even their VBNC (viable but non-culturable) forms, and resistance genes can make the effectiveness of "molecular epidemiology" methods in tracking and increasing the fight against infections, including hospital infections.

Keywords*:* ESBL, Escherichia coli, Urinary Tract Infection, SHV

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]