

بررسی فراوانی ژن‌های *TEM*، *SHV* و *CTX-M* در جدایه‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه در کودکان با عفونت مجاری ادراری (UTI) در شهر رشت

شیرین فکری کهن^۱، محمد هدایتی^۲، زهرا شمسی بلسبنه^۳، شایان مجلسی^۴، نجمه رنجی^{۵*}

تاریخ دریافت ۱۴۰۱/۰۴/۱۱ تاریخ پذیرش ۱۴۰۱/۰۶/۰۲

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: عفونت مجاری ادراری (UTI) یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در کودکان است که به‌سرعت در حال کسب مقاومت‌های بیشتری نسبت به داروهای ضد میکروبی در سراسر دنیا است. هدف از این مطالعه ارزیابی فراوانی ژن‌های *TEM*، *SHV* و *CTX-M* در اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت مجاری ادراری در کودکان در بیمارستان ۱۷ شهریور رشت بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۴۹ سویه اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان ۱۷ شهریور از شهر رشت جداسازی و به کمک روش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. حساسیت و مقاومت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها به روش‌های کربی بور و برات دابلوشن تعیین گردید. برای ارزیابی فراوانی ژن‌های *TEM*، *SHV* و *CTX-M* در جدایه از روش PCR استفاده شد. برای آنالیز آماری از آزمون χ^2 با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ بهره برده شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، بیشترین مقاومت در جدایه‌های اشریشیاکلی به سفتریاکسون (۸۸/۹ درصد) و آمپی‌سیلین (۸۱/۵ درصد) و در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به آمپی‌سیلین (۹۵/۵ درصد)، سفتریاکسون (۷۷/۳ درصد) و مشاهده شد. از ۴۹ جدایه، ۸۹/۸ درصد جدایه‌ها دارای ژن *SHV*، ۸۹/۸ درصد جدایه‌ها دارای ژن *CTX-M* و ۱۰۰ درصد جدایه‌ها دارای ژن *TEM* بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که یکی از علل افزایش مقاومت چند دارویی در جدایه‌های بیمارستانی عفونت مجاری ادراری در رشت، افزایش انتقال ژن‌های پلاسمیدی بین این جدایه‌ها باشد.

کلیدواژه‌ها: اشریشیاکلی، *CTX-M*، کلبسیلا پنومونیه، *TEM*، *SHV*

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و سوم، شماره دوم، ص ۷۰-۸۰، اردیبهشت ۱۴۰۱

آدرس مکاتبه: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. کد پستی: ۴۱۳۳۵-۳۵۱۶، تلفن: ۱۳۳۳۴۲۴۰۸۰

Email: n_ranji@iaurasht.ac.ir

مقدمه

شیوع بالا، شدت عود و بازگشت، مرگ‌ومیر از جمله چالش‌های همراه با UTI است (۱). عفونت‌های مجاری ادراری هم به‌واسطه باکتری‌های گرم منفی و هم گرم مثبت ایجاد می‌شود. شایع‌ترین علت UTI اشریشیاکلی است و دومین عامل ایجاد آن کلبسیلا پنومونیه است (۴). در مطالعات مشخص شده که باکتری‌های مسبب عفونت ادراری اغلب در گروه مقاومت چند دارویی (MDR) یا مقاومت دارویی گسترده (XRD) قرار دارند (۵). باکتری‌ها یا پاتوژن‌های MDR به انواعی از پاتوژن‌ها گفته می‌شود که به چند

عفونت مجاری ادراری (UTI) یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی در کودکان محسوب می‌شود (۱) که حدود ۷ درصد از کودکان تا ۱۹ سالگی تجربه یک UTI را دارند (۲) و به علت گسترش پاتوژن‌های با مقاومت چند دارویی، باعث یک معضل مهم در درمان این افراد می‌شود (۳). این عفونت ممکن است بر مجرای ادراری تحتانی یا فوقانی تأثیر بگذارد. هرچند تشخیص این دو از هم ممکن است در کودکان یا نوجوانان پیچیده یا حتی غیرممکن باشد.

۱ دانشجوی دکتری، میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲ کارشناس ارشد، ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۳ کارشناس ارشد، زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۴ کارشناس ارشد، میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۵ استادیار، ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران (نویسنده مسئول)

داده شدند. در ادامه با انجام تست‌های بیوشیمیایی نظیر سیمون سیترات، ایندول، SIM، TSI و MR-VP تعیین هویت نمونه‌ها صورت گرفت. معیارهای ورود به مطالعه، شامل کودکان دچار عفونت ادراری و عدم مصرف هرگونه آنتی‌بیوتیک خوراکی و تزریقی بود. همچنین، افرادی که تحت درمان با آنتی‌بیوتیک بودند در این مطالعه شرکت داده نشدند.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار از دیسک (Disk diffusion):

پس از جداسازی نمونه‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی با انجام تست آنتی بیوگرام از طریق روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) و طبق استاندارد CLSI2021، با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی نیتروفوران‌توین (300µg)، آمیکاسین (30µg)، جنتامایسین (10µg)، مروینم (10µg)، سفتریاکسون (30µg)، آمپی‌سیلین (10µg)، سفپیم (30µg) و سیپروفلوکساسین (5µg) تعیین گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت پادتن طب (ایران) خریداری شد. به این منظور، بعد از کشت هر جدایه در محیط کشت مایع، سوسپانسیون باکتریایی با غلظت نیم مک فارلند تهیه گردید و این سوسپانسیون روی محیط مولر هینتون آگارمنتقل شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به با فاصله مناسب بوسیله پنس استریل بر سطح پلیت قرار داده شدند و بعد از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای 37°C، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و نتایج آن طبق استاندارد CLSI2021 ثبت گردید.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد:

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد Minimum Inhibitory Concentration (MIC) در جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، از روش برات دایلووشن استفاده شد. رقت باکتری به میزان نیم مک فارلند تهیه و به همراه رقت‌های مختلف سیپروفلوکساسین (۱-۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر) (شرکت روناک دارو، ایران) در لوله‌های آزمایش در دمای 37°C انکوبه گردید. بعد از گذشت ۱۸-۲۴ ساعت از انکوباسیون، اولین لوله‌ای که کدورت قابل مشاهده‌ای نداشت به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

استخراج DNA و انجام واکنش PCR:

در ابتدا جدایه‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه در محیط مولر هینتون برات به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. بعد از رسیدن به کدورت سلولی مناسب، از کیت CinnaPure-DNA (شرکت سینان، ایران) جهت استخراج DNA استفاده شد. برای تأیید استخراج، نمونه‌ها در ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس، اجزای واکنش PCR در حجم نهایی 120 µl با استفاده از کیت R Master Mix 2X (شرکت

داروی ضد میکروبی مقاوم‌اند. در حالیکه پاتوژن XRD پاتوژنی است که فقط به یک یا دو گروه داروی ضد میکروبی حساس است و به بقیه داروها در بقیه گروه‌ها مقاوم است (۶). تنوع جغرافیایی در الگوی حساسیت ضد میکروبی در اغلب پاتوژن‌ها مشاهده می‌شود و این امر در تنظیم استراتژی‌های مؤثر ضد میکروبی در مراکز درمانی ضروری است (۵).

رایج‌ترین داروهای ضد میکروبی علیه عفونت‌های ادراری در گروه بتالاکتام قرار دارند. رایج‌ترین بتالاکتام‌ها شامل آمینوپنی‌سیلین‌ها (آمی‌سیلین) و نسل اول سفالوسپورین‌ها (سفالوتین و سفالکسین) است (۷). تولید بتالاکتام‌های وسیع الطیف (ESBL extended spectrum β -lactamase) یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به بتالاکتام‌ها در انتروباکتریاسه محسوب می‌شود (۸). بتالاکتام‌ها به چهار گروه A، B، C و D تقسیم می‌شوند. انتروباکتریاسه دارای ژن‌های ESBL نسبت به گروه‌های فاقد این آنزیم‌ها عفونت‌زایی شدیدتری نشان می‌دهد (۹). از مهم‌ترین ژن‌های ESBL می‌توان به TEM و SHV اشاره نمود از سال ۱۹۹۸، انواع ژن‌های CTX-M به‌عنوان آنزیم‌های مولد بتالاکتام‌های وسیع الطیف (ESBL) نیز در اغلب نقاط دنیا افزایش یافته است (۱۰). این سه ژن از خانواده ESBL گروه A هستند که باعث هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها (به‌جز سفامایسین) و مونوباکتام‌ها می‌شوند. باکتری‌های دارای ژن SHV به انواع پنی‌سیلین‌های وسیع الطیف از جمله پایراسیلین و آمپی‌سیلین مقاوم‌اند. باکتری‌های دارای ژن TEM به انواع پنی‌سیلین‌ها و نسل اول سفالوسپورین (به‌جز اکسی‌ایمونوسفالوسپورین) مقاوم‌اند. آنزیم‌های خانواده CTX-M در هیدرولیز سفالوتین یا سفالوریدین موفق‌تر از هیدرولیز بنزیل پنی‌سیلین عمل می‌کنند (۹).

در این مطالعه با توجه به شیوع روزافزون مقاومت‌های دارویی، سعی شد میزان حضور چندین ژن‌های پلاسمیدی مؤثر در ایجاد مقاومت به بتالاکتام‌ها (TEM، SHV، CTX-M) در جدایه‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه در کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری در بیمارستان کودکان هفده شهریور شهر رشت مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه و شناسایی باکتری:

در این مطالعه، تعداد ۱۰۰ نمونه در بازه زمانی سه‌ماهه بهمن و اسفند ۱۴۰۰ و فروردین ۱۴۰۱ از کودکان دارای عفونت مجاری ادراری از بیمارستان تخصصی و فوق تخصصی کودکان ۱۷ شهریور شهر رشت جمع‌آوری گردید. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده ابتدا در محیط شکلات آگار و سپس در محیط کشت مک کانکی آگار کشت

در دمای 94°C بمدت ۳۰ ثانیه، 57°C (ژن SHV و TEM) یا 52°C (ژن CTX-M) به مدت ۴۵ ثانیه، 72°C بمدت ۱ دقیقه، و یک مرحله گسترش نهایی در دمای 72°C بمدت ۵ دقیقه. بعد از اتمام واکنش، محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند تا از حضور یا عدم حضور محصول ژنی اطمینان حاصل شود.

سینازن، ایران) با افزودن DNA، جفت پرایمر (20 pmol) و آب استریل به محلول PreMix (حاوی آنزیم، کوفاکتور و بافر مخصوص) آماده شد. سنتز پرایمرها توسط شرکت سینازن (تهران، ایران) صورت گرفت (جدول ۱). واکنش PCR طبق برنامه ذیل در دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad (امریکا) انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در 94°C بمدت ۳ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل به ترتیب

جدول (۱): مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR (۱۱)

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول PCR
TEM-F	5'-CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC-3'	800 bp
TEM-R	5'-CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC-3'	
SHV-F	5'-AGCCGCTTGAGCAAATTAAC-3'	713 bp
SHV-R	5'-ATCCCGCAGATAAATCACCAC-3'	
CTX-M-F	5'-GTTACAATGTGTGAGAAGCAG-3'	1018 bp
CTX-M-R	5'-CCGTTCCGCTATTACAAAC-3'	

شهریور جداسازی شد. توزیع سن و جنسیت در جدول ۲ ذکر شده است. عفونت ادراری به‌واسطه اشریشیاکلی در کودکان مؤنث ۷۴/۰۷ درصد بود و فراوانی قابل توجهی نسبت به کودکان مذکر نشان داد. در حالی که شیوع عفونت ادراری به‌واسطه کلبسیلا پنومونیه در کودکان مذکر، ۵۹/۰۹ درصد بود. دسته بندی کودکان از نظر سن طبق مطالعه یوسفی و همکاران صورت گرفت (۱۲). در کودکان یک سال یا کمتر شیوع عفونت ادراری به‌واسطه اشریشیاکلی، ۴۸/۱۴ درصد بود. در کودکان یک سال یا کمتر شیوع عفونت ادراری به‌واسطه کلبسیلا پنومونیه، ۸۱/۸۱ درصد بود (جدول ۲).

جهت بررسی معنی‌دار بودن نتایج تحقیق از جمله وضعیت حساسیت و مقاومت به دارو و حضور یا عدم حضور ژن، از آزمون آماری χ^2 بهره برده شد. سطح معنی‌دار بودن کمتر از ۰/۰۵، با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ بررسی شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۲۲ نمونه کلبسیلا پنومونیه و ۲۷ نمونه اشریشیاکلی از عفونت مجاری ادراری در کودکان بستری در بیمارستان ۱۷

جدول (۲): توزیع سن و جنس کودکان با عفونت مجاری ادراری

عفونت	جنسیت	تعداد (درصد)
اشریشیاکلی	زنان (درصد)	۲۰ (۷۴/۰۷)
	مردان (درصد)	۶ (۲۲/۲۲)
	تعیین نشده (درصد)	۱ (۳/۷)
کلبسیلا پنومونیه	زنان (درصد)	۹ (۴۰/۹)
	مردان (درصد)	۱۳ (۵۹/۰۹)
عفونت	سن (سال)	تعداد (درصد)
اشریشیاکلی	≤ 1	۱۳ (۴۸/۱۴)
	$1 < \leq 6$	۷ (۲۵/۹۲)
	$6 < \leq 12$	۷ (۲۵/۹۲)
کلبسیلا پنومونیه	≤ 1	۱۸ (۸۱/۸۱)
	$1 < \leq 6$	۳ (۱۳/۶۳)
	$6 < \leq 12$	۱ (۴/۵۴)

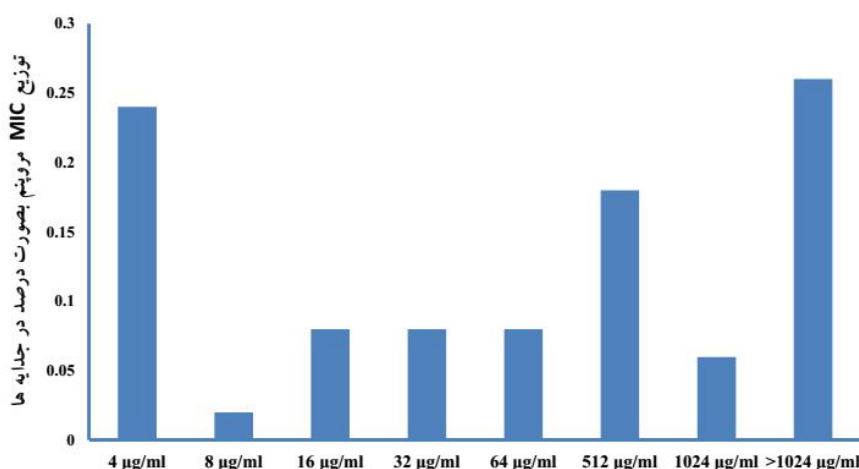
جنتامایسین به ترتیب با فراوانی ۷۰ درصد و ۶۳ درصد در جدایه‌های اشریشیا کلی مشاهده شد. در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه، حساسیت به سیپروفلوکساسین با فراوانی ۵۹ درصد و نیتروفوران‌توئین با فراوانی ۵۰ درصد گزارش شد (جدول ۳). نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت جدایه‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه در عفونت مجاری ادراری نسبت به ۸ آنتی‌بیوتیک نشان داد که تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) از نظر فراوانی بین نمونه‌های مقاوم، نیمه حساس و حساس وجود دارد.

در مطالعه حاضر، در جدایه‌های اشریشیا کلی بیشترین مقاومت به سفتریاکسون (۸۸/۹ درصد) و آمپی‌سیلین (۸۱/۵ درصد) و سفپیم (۶۶/۶ درصد) و در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه بیشترین مقاومت به آمپی‌سیلین (۹۵/۵ درصد)، سفتریاکسون (۷۷/۳ درصد) و سفپیم (۵۹/۲ درصد) مشاهده شد. بیشترین حساسیت در هر دو گروه جدایه‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه به مروپنم (۱۰۰ درصد) مشاهده شد. همچنین حساسیت به آمیکاسین و

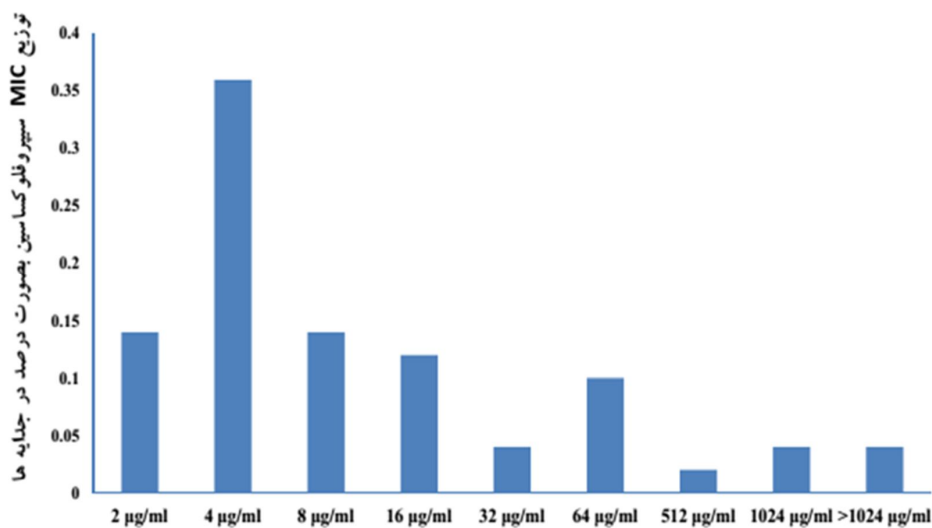
جدول (۳): الگوی حساسیت جدایه‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های عفونت ادراری نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در روش انتشار از دیسک بر طبق CLSI 2021

سیپروفلوکساسین	سفپیم	آمپی‌سیلین	سفتریاکسون	مروپنم	جنتامایسین	آمیکاسین	نیتروفوران‌توئین	حساسیت	باکتری
۱۱ (۴۰/۷)	۲ (۷/۴)	۵ (۱۸/۵)	۳ (۱۱/۱)	۲۷ (۱۰۰)	۱۷ (۶۳)	۱۹ (۷۰)	۱۳ (۴۸/۲)	حساس (درصد)	حساس
۹ (۳۳/۳)	۷ (۲۶)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱ (۳/۷)	۶ (۲۲/۲)	نیمه حساس (درصد)	اشریشیا کلی
۷ (۲۵/۹)	۱۸ (۶۶/۶)	۲۲ (۸۱/۵)	۲۴ (۸۸/۹)	۰ (۰)	۱۰ (۳۷)	۹ (۳۳/۳)	۸ (۲۹/۶)	مقاوم (درصد)	مقاوم
۱۳ (۵۹)	۸ (۳۶/۳)	۱ (۴/۵)	۵ (۲۲/۷)	۲۲ (۱۰۰)	۱۰ (۴۵/۴)	۱۰ (۴۵/۴)	۱۱ (۵۰)	حساس (درصد)	حساس
۵ (۲۲/۷)	۱ (۴/۵)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱ (۴/۶)	۱ (۴/۶)	۳ (۱۳/۶)	نیمه حساس (درصد)	کلبسیلا پنومونیه
۸ (۱۸/۳)	۱۳ (۵۹/۲)	۲۱ (۹۵/۵)	۱۷ (۷۷/۳)	۰ (۰)	۱۱ (۵۰)	۱۱ (۵۰)	۸ (۳۶/۴)	مقاوم (درصد)	مقاوم

در این مطالعه جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از روش برات دایلوژن استفاده شد و مشخص شد که همه جدایه‌ها مقاوم به مروپنم ($MIC \geq 4 \mu g/ml$) (نمودار ۱) و سیپروفلوکساسین ($MIC \geq 1 \mu g/ml$) بودند (نمودار ۲).



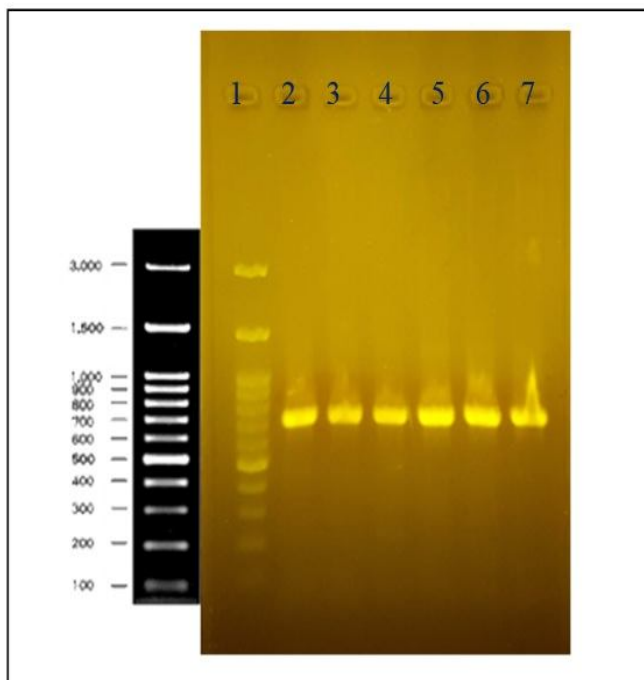
نمودار (۱): توزیع میزان MIC (به صورت درصد) در عفونت‌های مجاری ادراری مقاوم به مروپنم



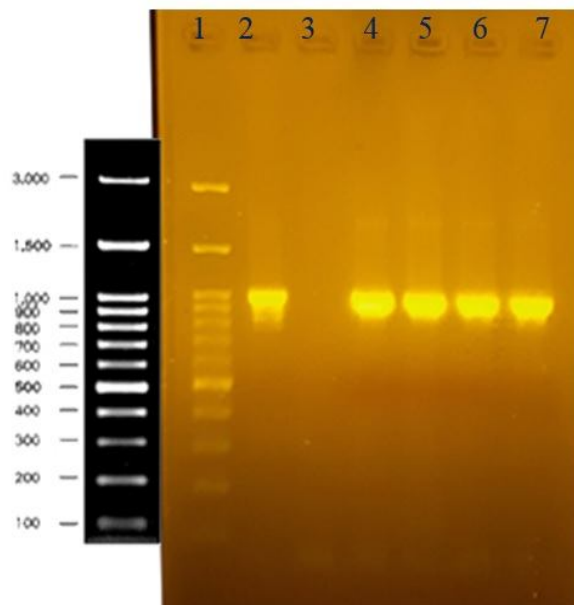
نمودار (۲): توزیع میزان MIC (به صورت درصد) در عفونت‌های مجاری ادراری مقاوم به سیپروفلوکساسین

دارای ژن *SHV* (شکل ۱)، ۸/۸۹ درصد موارد دارای ژن *CTX-M* (شکل ۲) و ۱۰۰ درصد موارد دارای ژن *TEM* (شکل ۳) بودند (جدول ۴).

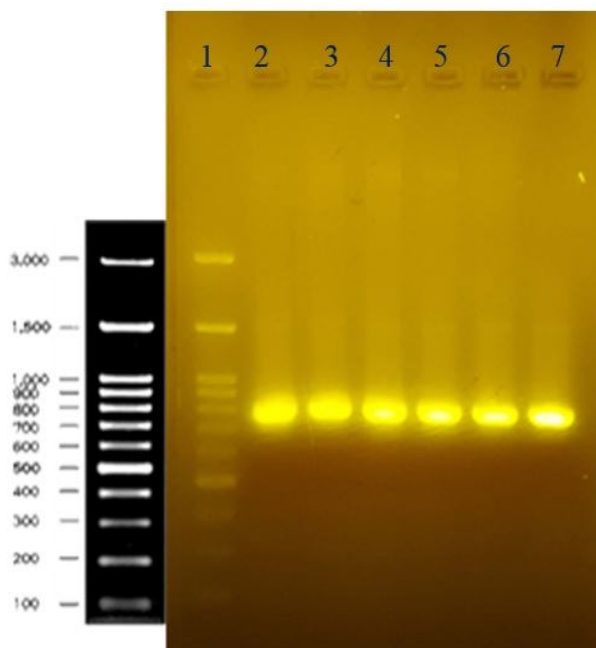
در ۲۷ نمونه اشریشیاکلی و ۲۲ نمونه کلبسیلا پنومونیه حضور یا عدم حضور ژن‌های *SHV*، *TEM* و *CTX-M* نشان داد که در مجموع از بین ۴۹ مورد عفونت باکتریایی، ۸۹/۸ درصد موارد



شکل (۱): الکتروفورز محصولات PCR ژن *SHV* روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. نمونه‌ها به ترتیب اولین چاهک از سمت چپ (DNA لدر ۱۰۰ bp) و چاهک‌های ۲ تا ۷ مربوط به شش نمونه دارای باند مربوط به ژن *SHV* با طول ۷۱۳ bp.



شکل (۲): الکتروفورز محصولات PCR ژن *CTX-M* روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. نمونه‌ها به ترتیب اولین چاهک از سمت چپ (DNA لدر ۱۰۰۰ bp و چاهک‌های ۲ و ۴ تا ۷ مربوط به پنج نمونه دارای باند مربوط به ژن *CTX-M* با طول ۱۰۱۸bp و چاهک ۳ مربوط به نمونه فاقد ژن *CTX-M*)



شکل (۳): الکتروفورز محصولات PCR ژن *TEM* روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. نمونه‌ها به ترتیب اولین چاهک از سمت چپ (DNA لدر ۱۰۰۰ bp و چاهک‌های ۲ تا ۷ مربوط به شش نمونه دارای باند مربوط به ژن *TEM* با طول ۸۰۰ bp)

جدول (۴): توزیع ژن‌های پلاسمیدی مؤثر در ایجاد مقاومت به بتالاکتامها

نام ژن	فراوانی در اشریشیا کلی (درصد)	فراوانی در کلبسیلا پنومونیه (درصد)	فراوانی (درصد)
SHV	۲۲ (۸۱/۵)	۲۰ (۹۰/۹)	۴۴ (۸۹/۸)
TEM	۲۷ (۱۰۰)	۲۲ (۱۰۰)	۴۹ (۱۰۰)
CTX-M	۲۵ (۹۲/۶)	۱۹ (۸۶/۴)	۴۴ (۸۹/۸)

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت مجاری ادراری یکی از شایعترین بیماری‌های عفونی در دنیا است (۱۳) و اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونی از مهم‌ترین موارد مسبب UTI با مقاومت چند دارویی محسوب می‌شوند (۱۴). مطالعات اپیدمیولوژی نشان می‌دهد الگوی مقاومت دارویی در نواحی مختلف جهان متغیر است (۱۳). در این مطالعه توزیع مقاومت چند داروی آنتی‌بیوتیک و توزیع حضور ژن‌های ایجاد کننده مقاومت به بتالاکتامها (SHV، TEM و CTX-M) به‌واسطه انتقال افقی (پلاسمیدی) در جدایه‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه جدا شده از ادرار کودکان با عفونت ادراری در بیمارستان ۱۷ شهریور شهر رشت مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه جبرالدینی و همکاران در شهرستان گراش در استان فارس در سال ۱۳۹۶ از ۱۰۸ جدایه UTI، ۵۰/۹ درصد جدایه‌های اشریشیا کلی در جنس مذکر و ۴۹/۱ درصد در جنس مؤنث مشاهده شد. کلبسیلا پنومونیه در ۳۷/۵ درصد موارد متعلق به جنس مذکر و ۶۲/۵ درصد موارد مربوط به جنس مؤنث بود (۱۵). در مطالعه بزرگر و همکاران در سال‌های ۲۰۱۷ تا ۲۰۱۸ در اردبیل به ترتیب ۶۵/۶ درصد و ۳۴/۴ درصد سویه‌های اشریشیاکلی از UTI، مربوط به زنان و مردان بود (۱۶). در مطالعه سرخی و همکاران در سال ۲۰۲۲ در یک مطالعه ۹ ساله در شهر امیرکلا (مازندران) مشخص شد که ۸۹/۷ درصد موارد UTI مربوط به کودکان مؤنث و ۱۰/۳ درصد موارد مربوط به کودکان مذکر بود (۱۷). در مطالعه حاضر مشابه با دیگر مطالعات، عفونت ادراری به‌واسطه اشریشیا کلی در کودکان مؤنث فراوانی بیشتری (۷۴/۰۷ درصد) نسبت به کودکان مذکر نشان داد. با این حال برخلاف دیگر مطالعات، شیوع عفونت ادراری به‌واسطه کلبسیلا پنومونیه در کودکان مذکر فراوانی بیشتری (۵۹/۰۹ درصد) داشت ($P < 0.05$).

در مطالعه اسلامی و همکاران در سال ۱۳۹۴ در نمونه‌های ادراری کودکان مراجعه‌کننده به بیمارستان بوعلی ساری، بالاترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به کاربامپنها (۶۶ درصد) و آمیکاسین (۵۸ درصد) مشاهده شد (۱۸). در مطالعه دوستی و همکاران در سال ۱۳۹۴، بیشترین مقاومت به آمپی‌سیلین (۹۵/۷۸ درصد)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۶۲/۱۰ درصد) و نیتروفورانتونین

(۴۱/۱۰ درصد) و بیشترین حساسیت به سیپروفلوکساسین (۴۶/۳۱ درصد) و سفتریاکسون (۴۴/۲۱ درصد) در جدایه‌های اشریشیا کلی از عفونت‌های ادراری در زنان و کودکان در شهرستان فارس (استان چهارمحال و بختیاری) گزارش شد (۱۹). در مطالعه میراعلمی و همکاران در سال ۱۳۹۴ در استان تهران، بیشترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و اریترومایسین به ترتیب ۹۶ درصد و ۹۴/۵ درصد و بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و امپی‌پنم (۶۷/۲ درصد) در نمونه‌های ادراری گزارش شد (۲۰). در مطالعه حاضر، در جدایه‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه بیشترین مقاومت به سفتریاکسون و آمپی‌سیلین و سفپیم و بیشترین حساسیت به مروپنم به روش انتشار از دیسک مشاهده شد. هرچند نتایج MIC مقاومت صددرصدی جدایه‌ها را به دو آنتی‌بیوتیک مروپنم و سیپروفلوکساسین نشان داد. علت اختلاف فاحش بین نتایج انتشار از دیسک و MIC می‌تواند دقت بالاتر روش برات دایلووشن در تعیین MIC باشد. لذا با توجه به اینکه روش معمول در مراکز درمانی برای تعیین مقاومت و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها جهت تعیین استراتژی‌های درمانی برای بیماران، روش انتشار از دیسک است، لازم است برای کاهش هزینه‌های درمانی و رسیدن به نتایج مطلوب در زمان کوتاهتر، از استراتژی‌های دقیق‌تری جهت تعیین مقاومت و حساسیت در جدایه‌ها استفاده شود. هرچند باکتری‌ها در محیط‌های درمانی و بیمارستانی به دلیل انتقال افقی بشدت در زمان کوتاهی قادر به کسب مقاومت‌های جدید هستند و تغییر استراتژی‌های تعیین مقاومت و حساسیت به تنهایی کارساز نخواهد بود. در مقایسه با مطالعات دیگران، در مطالعه حاضر نیز تفاوت فراوانی پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده شد که توانمندی بسیار زیاد باکتری‌های بیماری‌زا را در کسب مقاومت‌های جدید از طرق مختلف نشان می‌دهد.

در مطالعه ملکی و همکاران در بیمارستان الزهرا اصفهان در سال ۲۰۱۸ از ۲۵ جدایه کلبسیلا پنومونیه، ۹۲ درصد ژن CTX-M و ۷۶ درصد ژن TEM داشتند (۱۳). در مطالعه دهشیری و همکاران در یاسوج در سال ۲۰۱۸ از ۶۲ جدایه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه ادراری، ۸۵/۵ درصد دارای ژن SHV-1، ۱۶/۱ درصد دارای ژن TEM-1، ۲۷/۴ درصد ژن CTXM-1، ۸/۱ درصد ژن CTXM-

۹۲/۶ درصد از جدایه‌های اشریشیا کلی و در ۸۶/۴ درصد جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه ژن *CTX-M* حضور داشت. این مشاهدات در بیمارستان کودکان از انتقال سریع این ژن‌ها به واسطه انتقال افقی (به واسطه پلاسمید) و بی‌اثر شدن بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها خبر می‌دهد و امید است برای رفع و پخش بیشتر این عوامل عفونی بخصوص در مراکز درمانی و بیمارستان‌ها، از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثرتری استفاده شود.

پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی، حضور دیگر ژن‌های مؤثر در ایجاد مقاومت چند دارویی در عفونت ادراری در کودکان مورد ارزیابی قرار گیرد تا بتواند راهگشای انتخاب داروهای مناسب‌تر جهت درمان باشد. از مشکلات این تحقیق، تعداد کودکان مورد مطالعه بود که محدودیت زمانی مانع بررسی جمعیت بزرگ‌تر شد. همچنین برای بررسی ژن‌های دیگر مؤثر در ایجاد مقاومت نیاز به صرف هزینه و زمان بیشتری است که از موانع این تحقیق بود.

در این مطالعه در کودکان با عفونت مجاری ادراری در بیمارستان فوق تخصصی ۱۷ شهریور رشت مشخص شد شیوع مقاومت چند دارویی بشدت بالا بوده و از دلایل افزایش چنین مقاومت‌هایی می‌توان به وجود ژن‌های پلاسمیدی اشاره نمود که به واسطه انتقال افقی توانسته‌اند به سویه‌های دیگر منتقل و باعث ایجاد سویه‌های مقاوم در این مرکز درمانی شوند.

۲/۵ درصد ژن *CTXM-3* داشتند (۲۱). در مطالعه صادقی و همکاران در بیمارستان رازی رشت در سال ۲۰۲۲، از ۲۶۳ اشریشیا کلی جدا شده از ادرار، ۱۲۱ جدایه ESBL مثبت بودند و به ترتیب ۳۴/۷ درصد، ۳۶/۴ درصد و ۳۸/۸ درصد دارای ژن‌های *SHV*، *TEM* و *CTX-M* بودند (۲۲). در مطالعه رضایی و همکاران در ساری در سال ۲۰۱۵، ۳۰/۵ درصد نمونه‌ها ESBL مثبت بودند. ژنوتایپینگ باکتری‌های مولد ESBL نشان داد ژن‌های *SHV*، *TEM* و *CTX* به ترتیب در ۴۹ درصد، ۴۴ درصد و ۲۸ درصد جدایه‌ها حضور داشتند (۲۳). در مطالعه میراعلمی و همکاران در استان تهران، از مجموع ۵۵ نمونه مورد بررسی، ۲۶ نمونه دارای ژن *TEM* و ۴۱ نمونه دارای ژن *CTX-M* بودند و در هیچ یک از نمونه‌ها ژن *SHV* گزارش نشد (۲۰). در مطالعه اسلامی و همکاران در سال ۱۳۹۴ در نمونه‌های ادراری کودکان در ساری، شیوع ژن *TEM*، ۴۹ درصد و ژن *CTX*، ۲۸ درصد از عفونت اشریشیا کلی گزارش شد (۱۸). در مطالعه دوستی و همکاران در سال ۱۳۹۴، از میان ۹۵ نمونه ادراری دارای عفونت اشریشیا کلی، ژن *TEM* در ۶۲/۱۰ درصد موارد، ژن *CTX-M* در ۳۳/۶۸ درصد موارد و ژن *SHV* در ۸/۴۲ درصد موارد گزارش شد (۱۹). در مطالعه حاضر در مقایسه با دیگر مطالعات، فراوانی هر سه ژن بالاتر بود. بطوریکه در همه موارد عفونی، ژن *TEM* حضور داشت و در ۸۱/۵ درصد از جدایه‌های اشریشیا کلی و ۹۰/۹ درصد از جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه ژن *SHV* و

References:

1. Leung AKC, Wong AHC, Leung AAM, Hon KL. Urinary Tract Infection in Children. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov 2019;13(1):2-18.
2. Delbet JD, Lorrot M, Ulinski T. An update on new antibiotic prophylaxis and treatment for urinary tract infections in children. Expert Opin Pharmacother 2017;18(15):1619-25.
3. Mahony M, McMullan B, Brown J, Kennedy SE. Multidrug-resistant organisms in urinary tract infections in children. Pediatr Nephrol 2020;35(9):1563-73.
4. Hyun M, Lee JY, Kim HA, Ryu SY. Comparison of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae Acute Pyelonephritis in Korean Patients. Infect Chemother 2019;51(2):130-41.
5. Iqbal Z, Mumtaz MZ, Malik A. Extensive drug-resistance in strains of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from paediatric urinary tract infections. J Taibah Univ Med Sci 2021;16(4):565-74.
6. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012;18(3):268-81.
7. Marchisio M, Porto A, Joris R, Rico M, Baroni MR, Di Conza J. Susceptibility to β -lactams and quinolones of Enterobacteriaceae isolated from urinary tract infections in outpatients. Braz J Microbiol 2015;46(4):1155-9.
8. Wachino J-i, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, et al. Nosocomial spread of ceftazidime-resistant Klebsiella pneumoniae strains producing a

- novel class a beta-lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(6):1960-7.
9. Komijani M, Bouzari M, Rahimi F. Detection of TEM, SHV and CTX-M Antibiotic Resistance Genes in Escherichia coli Isolates from Infected Wounds. *Med Lab J* 2017;11(2):30-5.
 10. Jena J ,Sahoo RK, Debata NK, Subudhi E. Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M genes of extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli strains isolated from urinary tract infections in adults. *Biotech* 2017;7(4):244.
 11. Salah FD, Soubeiga ST, Ouattara AK, Sadji AY, Metuor-Dabire A, Obiri-Yeboah D, et al. Distribution of quinolone resistance gene (qnr) in ESBL-producing Escherichia coli and Klebsiella spp. in Lomé, Togo. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019;8(1):104.
 12. Yousefi P, Cyrus A, Moghaddasi Z, Dorreh F, Aravand A. The Frequency of Recurrence of Urinary Tract Infection (UTI) in 1- Month to 12- Year-Old Children without Congenital Abnormalities Referred to Arak Amir Kabir Hospital. *J Adv Med Biomed Res* 2011;19(76):66-76.
 13. Maleki N, Tahanasab Z, Mobasherizadeh S, Rezaei A, Faghri J. Prevalence of CTX-M and TEM β -lactamases in Klebsiella pneumoniae Isolates from Patients with Urinary Tract Infection, Al-Zahra Hospital, Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res* 2018;7:10.
 14. Behzadi P, Behzadi E, Yazdanbod H, Aghapour R, Akbari Cheshmeh M, Salehian Omran D. A survey on urinary tract infections associated with the three most common uropathogenic bacteria. *Maedica* 2010;5(2):111-5.
 15. Jabrodini A, Heidari F, Taghavi SF, Shokouh MR. The Investigation of Frequency and Antibiotic Resistance Pattern of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae Isolated From Urinary Tract Infection in Outpatients Referred to Amirmomenin Ali Hospital in Gerash City in 2017: A Short Report. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018;17(1):75-84.
 16. Barzegar S, Arzanlou M, Teimourpour A, Esmaelizad M, Yousefipour M, MohammadShahi J, et al. Prevalence of the Integrons and ESBL Genes in Multidrug-Resistant Strains of Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infections, Ardabil, Iran. *Iran J Med Microbiol* 2022;16(1):56-65.
 17. Sorkhi H, Shahhoseini F, Hajiahmadi M, Pournajaf A, Halaji M, Mohammadi M. A Nine-Year Follow-Up of Antimicrobial Resistance Profile in Children with Urinary Tract Infection in Northern Iran. *Iran J Med Microbiol* 2022;16(1):43-8.
 18. Eslami G, Rezaie MS, Salehifar E, Rafiei A, Langaie T, Rafati MR, et al. Epidemiology of Extended Spectrum Beta Lactamases Producing E. coli Genes in Strains Isolated from Children with Urinary Tract Infection in North of Iran. *J Maz Univ Med Sci* 2016;25(132):270-9.
 19. doosti a, Daryousi M, Barza R, Pasand M. Antibiotic resistance and distribution of beta-lactamase resistance genes in Escherichia coli strains isolated from urinary tract infection in women and children in the city Farsan. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2016;17(6):53-61.
 20. Miraalami G, Parviz M, Khalajzadeh S. Evaluation of Antibiotic Resistance in Extended-spectrum Beta-lactamase (ESBL) Genes in the E. coli Isolates of Urinary Infections. *J Babol Univ Medical Sci* 2015;17(8):19-26.
 21. Dehshiri M, Khoramrooz SS, Zoladl M, Khosravani SA, Parhizgari N, Motazedian MH, et al. The frequency of Klebsiella pneumonia encoding genes for CTX-M, TEM-1 and SHV-1 extended-spectrum beta lactamases enzymes isolated from urinary tract infection. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2018;17(1):4.

22. Sadeghi M, Sedigh Ebrahim-Saraie H, Mojtahedi A. Prevalence of ESBL and AmpC genes in *E. coli* isolates from urinary tract infections in the north of Iran. *New Microbes New Infect* 2021;45:100947.
23. Rezai MS, Salehifar E, Rafiei A, Langae T, Rafati M, Shafahi K, et al. Characterization of Multidrug Resistant Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* among Uropathogens of Pediatrics in North of Iran. *Biomed Res Int* 2015;2015:309478.

INVESTIGATION OF *SHV*, *TEM*, AND *CTX-M* GENES FREQUENCY IN *ESCHERICHIA COLI* AND *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLATES IN CHILDREN WITH UTI IN RASHT CITY, IRAN

Shirin Fekri Kohan¹, Mohammad Hedayati², Zahra Shamsi Balasbaneh³, Shayan Majlesi⁴, Najmeh Ranji^{5*}

Received: 02 July, 2022; Accepted: 24 August, 2022

Abstract

Background & Aims: Urinary tract infection (UTI) is one of the common infections in children which is rapidly acquiring more and more resistance to antimicrobial drugs in the worldwide. The aim of this study was to evaluate the frequency of SHV, TEM and CTX-M genes in Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae strains isolated from UTI in children in 17 Shahrivar hospital from Rasht city, Iran.

Materials & Methods: In this descriptive cross-sectional study, 49 strains of Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae were isolated from 17 Shahrivar hospital from Rasht city and identified by biochemical tests. The resistance and susceptibility of the strains to antibiotics was determined by both Kirby Bauer and Broth dilution methods. To evaluate frequency of SHV, TEM, and CTX-M genes in the isolates, the PCR method was used. To statistical analysis, χ^2 test was used with SPSS software version 19.

Results: In this study, the most resistance was observed to Ceftriaxone (88.9%) and ampicillin (81.5%) in Escherichia Coli and to ampicillin (95.5%) and Ceftriaxone (77.3%) in Klebsiella Pneumoniae. Of 49 isolates, 89.8% had SHV gene, 89.8% had CTX-M gene, and 100% had TEM gene.

Conclusion: We concluded that one of the reasons of increasing multi drug resistance in nosocomial isolates of UTI in Rasht may be an increase in horizontal transfer of plasmid genes between these isolates.

Keywords: Escherichia Coli, CTX-M, Klebsiella Pneumoniae, SHV, TEM

Address: Najmeh Ranji, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran. P.O.Box:3516-41335.

Tel: +98 1333424080

Email: n_ranji@iaurasht.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2022; 33(2): 80 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2022 Studies in Medical Sciences

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

¹ PhD student, Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

² MSc, Genetics, Gilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

³ MSc, Cell & Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

⁴ MSc, Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran. (Corresponding Author)