تحقیقی

دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

تعیین گروه فیلوژنتیکی و فراوانی ژن‌های bla_{CTX-M} و $bla_{CTX-M-15}$ در جدایه‌های *اشریشیاکلی* از عفونت‌های گوارشی و مجاری ادراری در کودکان زیر ۵ سال

فردوس مومنی
کارشناس ارشد باکتری شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران
رضا قنبرپور
استاد میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران
لیلا دولتشاه
کارشناس ارشد باکتری شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران
حسام علیزاده
دانشجوی دکتری باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

نویسنده مسئول: حسام علیزاده

پست الکترونیک:alizade.h2000@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۳۲۴۵۶۵۶۲

آدرس: مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

دریافت:۹۲/۱۱/۲۷
ویرایش پایانی:۹۳/۱/۱۸
پذیرش:۹۳/۱/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: *آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف نوع CTX-M، گروهی از آنزیم ها هستند که به طور چشمگیری به ویژه در اشریشیاکلی در حال افزایش هستند. گزارش های محدودی در مورد زمینه فیلوژنتیکی جدایه های اشریشیاکلی از نمونه های بالینی کودکان زیر ۵ سال در ایران وجود دارد. هدف از این مطالعه فیلوتایپینگ جدایه های اشریشیاکلی واجد ژن های bla_{CTX-15}و bla_{CTX-M}از کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال و عفونت مجاری ادراری بود.*

روش بررسی: *در مجموع ۱۲۱ جدایه اشریشیاکلی (۷۵ اسهالی و ۴۶ عفونت مجاری ادراری) از کودکان زیر ۵ سال جمع آوری گردید. جدایه ها براساس آزمایش باکتری شناسی استاندارد تشخیص داده شدند. استخراج DNA جدایه های اشریشیاکلی توسط روش هضم با سود صورت گرفت. آزمایش PCR به منظور فراوانی ژن‌های bla_{CTX-15}و bla_{CTX-M}در جدایه ها و همچنین به منظور تعیین گروه ها و تحت گروه های فیلوژنتیکی بوسیله شناسایی ژن‌های yjaA و chuA و قطعه TspE4.C2 مورد استفاده قرار گرفت.*

یافته‌ها: *جدایه‌ها متعلق به چهار گروه فیلوژنتیکی A (۴۸/۷۷ درصد)، B1 (۱۴/۰۴ درصد)، B2 (۱۱/۵۷ درصد) و D (۲۵/۶۲ درصد) بودند. در جدایه‌های اسهالی ۱۳/۳۷ درصد مثبت برای ژن bla_{CTX-M} و ۱۴/۰۴ درصد برای دو ژن bla_{CTX-15}و bla_{CTX-M}مثبت بودند. از ۴۶ جدایه عفونت مجاری ادراری نیز ۲۱/۷۳ درصد برای ژن bla_{CTX-M}و ۱۵/۲۱ درصد برای ژن‌های bla_{CTX-15}و bla_{CTX-M}مثبت بودند.*

نتیجه‌گیری: *فراوانی نسبتا بالایی از جدایه‌های اشریشیاکلی واجد ژن‌های bla_{CTX-15} و bla_{CTX-M}از کودکان زیر ۵ سال در شهرستان خرم آباد مشاهده گردید. فیلوتایپینگ جدایه‌های واجد ژن‌های bla_{CTX-15} و bla_{CTX-M}نشان می‌دهد که اغلب آن‌ها در گروه‌های فیلوژنی A و D تعلق داشتند.*

واژه های کلیدی: *اشریشیاکلی، گروه فیلوژنتیک، بتالاکتاماز وسیع الطیف*

آدرس مقاله:
مومنی ف، قنبرپور ر، دولتشاه ل، علیزاده ح" تعیین گروه فیلوژنتیکی و فراوانی ژن‌های bla_{CTX-M} و $bla_{CTX-M-15}$ در جدایه‌های *اشریشیاکلی* از عفونت‌های گوارشی و مجاری ادراری در کودکان زیر ۵ سال " مجله علوم آزمایشگاهی،تابستان ۱۳۹۳، دوره هشتم(شماره۲): ۳۳-۴۰

مقدمه

جدایه‌های *اشریشیاکلی* مولد اسهال از عوامل شایع عفونت اسهالی در کودکان به ویژه در کشورهای در حال توسعه می‌باشند (۱،۲). جدایه‌های *اشریشیاکلی* اروپاتوژنیک (Uropathogenic *Escherichia coli*) شایع‌ترین عامل عفونت مجاری ادراری در کودکان هستند (۴). مهمترین عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (Extended spectrum beta-lactamases) می باشند. آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف به عنوان یکی از مهمترین مکانیسم‌های مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتالام و همچنین بروز مشکلات جدی در درمان عفونت‌های مختلف به شمار می آیند. آنزیم CTX-M بیشترین فراوانی را در میان آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف در سراسر جهان دارا می باشد (۵ و ۶). این آنزیم ها جزء کلاس A بتالاکتامازهای وسیع الطیف هستند و بیشترین اثر را بر روی سفوتاکسیم ایفا می‌کنند. بعضی از ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$ از قبیل ژن‌های $bla_{\text{CTX-M-15}}$ و $bla_{\text{CTX-M-19}}$ نیز قادر به هیدرولیز سفتازیدیم نیز می‌باشند. در میان ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$، ژن $bla_{\text{CTX-M-15}}$ بیشترین فراوانی را دارد و از مناطق جغرافیایی مختلفی در سرتاسر جهان گزارش شده است (۶). از طرفی در سال‌های اخیر، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف در میان جدایه‌های بالینی، به ویژه باکتری *اشریشیاکلی* شیوع فراوانی یافته و به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله سفالوسپورین-های نسل سوم و چهارم مقاوم شده‌اند و این یکی از مشکلات بهداشتی درمانی جدی در سراسر دنیا به شمار می آید (۷). شناسائی گروه فیلوژنی جدایه‌های *اشریشیاکلی* به روش PCR، بواسطه تعیین حضور ژن‌های *chuA*، *yjaA* و همچنین قطعه‌ای از DNA تحت عنوان TspE4.C2 امکان پذیر می گردد. جدایه‌های *اشریشیاکلی* در چهار گروه فیلوژنتیکی A، B_1، B_2، D و شش تحت گروه A_0, A_1, $B2_1$, $B2_2$, $B2_3$, D_1, D_2 تقسیم‌بندی می‌شوند (۸). اغلب عفونت-های ایجاد شده توسط جدایه‌های بیماریزای خارج روده‌ای *اشریشیاکلی* عمدتاً در گروه فیلوژنی B2 و به نسبت کمتری در گروه D قرار دارند. از طرف دیگر گروه‌های A و B1 شامل جدایه‌هایی از باکتری است که اغلب به صورت کامنسال در دستگاه گوارشی حضور دارند در حالیکه گروه A، B_1 و D عامل عفونت‌های دستگاه گوارشی می باشند (۹). مطالعات گذشته نشان داده‌اند که جدایه‌های *اشریشیاکلی* متعلق به گروه فیلوژنتیکی B2 حساسیت بیشتری در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نسبت به سایر گروه‌های فیلوژنتیکی از خود نشان می‌دهند (۱۱،۱۰). با توجه به اهمیت بسزای آنزیم‌های بتالاکتاماز در ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و تفاوت گروه‌های فیلوژنتیکی در بروز بیماری‌زایی و پروفایل‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین با نظر به اینکه تعیین فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف به خصوص $bla_{\text{CTX-M}}$ در شهرستان خرم آباد در کودکان زیر ۵ سال به خوبی صورت نگرفته است. این مطالعه با هدف تعیین گروه‌ها و تحت گروه‌های فیلوژنتیکی و فراوانی ژن های $bla_{\text{CTX-M}}$ و $bla_{\text{CTX-M-15}}$ در جدایه‌های *اشریشیاکلی* از موارد عفونت‌های گوارشی و مجاری ادراری در کودکان زیر ۵ سال به روش مولتی پلکس PCR طراحی گردید.

روش بررسی

در این مطالعه ۱۲۱ جدایه *اشریشیاکلی* از نمونه‌های اسهال (۷۵ جدایه) و عفونت‌های مجاری ادراری(۴۶ جدایه) از کودکان زیر ۵ سال شهرستان خرم آباد جمع‌آوری شد. از جدایه‌های گرفته شده ۷۳ مورد پسر و ۴۸ مورد دختر بودند. نمونه‌ها جهت تایید *اشریشیاکلی*، پس از کشت در محیط‌های مک کانکی و EMB (Eosin Methylene Blue) با انجام آزمایشات استاندارد بیوشیمیایی و تعیین فرمول IMVIC مورد بررسی قرار گرفتند. از هر جدایه تایید شده، یک کلنی *اشریشیاکلی* انتخاب و تا زمان شروع آزمایش های ملکولی با افزودن ۳۰ درصد گلیسرول در محیط تریپتیک سوی براث (ایتالیا، میلان، Biolife Laboratory) در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در

آزمایش PCR ژن‌های bla_{CTX-15} و bla_{CTX-M} (آنزیم‌های تولید کننده بتالاکتاز وسیع الطیف) و همچنین ژن-های *chuA*، *yjaA* و TspE4.C2 (جهت تعیین گروه‌ها و تحت گروه‌های فیلوژنتیک) مورد بررسی قرار گرفتند(جدول۱). از روش هضم با NaOH نیم نرمال برای استخراج DNA جدایه‌ها استفاده شد (۱۲). برای انجام آزمایش مولتی پلکس PCR جهت شناسایی ژن‌های bla_{CTX-M} و bla_{CTX-15} از روش پیشنهادی Messai و همکاران و همچنین جهت شناسایی ژن‌های *chuA*، *yjaA* و TspE4.C2 از روش Clermont و همکاران استفاده گردید(۱۳،۷). از سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603به عنوان کنترل مثبت جهت شناسایی ژن‌های bla_{CTX-15} و bla_{CTX-M} و سویه استاندارد *اشریشیاکلی* ECOR62 جهت تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی استفاده شد. تعیین گروه‌ها و تحت گروه‌های فیلوژنی بر اساس حضور و یا عدم حضور ژن‌های *chuA*، *yjaA* و TspE4.C2 طبق روش های پیشنهادی محققین انجام گرفت (۱۳،۸). بطور خلاصه جدایه های فاقد هر سه ژن *chuA*، *yjaA* و TspE4.C2 و جدایه هایی که فقط دارای ژن *yjaA* بودند در گروه فیلوژنی A دسته بندی شدند (به ترتیب تحت گروه های A_0 و A_1). جدایه های واجد TspE4.C2 در گروه فیلوژنی B1 قرار داده شدند و جدایه‌هایی که دارای هر سه ژن *chuA*، *yjaA* و TspE4.C2 و یا فقط دارای ژن های *chuA* و TspE4.C2 بودند در گروه فیلوژنی B2 دسته بندی شدند (به ترتیب تحت گروه های $B2_3$ و $B2_2$). جدایه هائی که فقط دارای ژن *chuA* و یا واجد ژن های *chuA* و TspE4.C2 بودند در گروه فیلوژنی D تقسیم بندی شدند (به ترتیب تحت گروه های D_1 و D_2).

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمایش مولتی پلکس PCR برای تشخیص ژن‌های bla_{CTX-15} و bla_{CTX-M} نشان داد که ۲۳ جدایه (۱۹/۰۰ درصد) دارای ژن bla_{CTX-M} و ۱۷ جدایه (۱۴/۰۴ درصد) واجد هر دو ژن bla_{CTX-M} و bla_{CTX-15} بودند. از ۷۵ جدایه اسهال مورد بررسی، ۱۳ جدایه (۱۷/۳۳ درصد) واجد ژن bla_{CTX-M} و ۱۰ جدایه (۱۳/۳۳ درصد) دارای هر دو ژن bla_{CTX-M} و bla_{CTX-15} بودند و از ۴۶ جدایه عفونت مجاری ادراری ۱۰ جدایه (۲۱/۷۳ درصد) دارای ژن bla_{CTX-M} و ۷ جدایه (۱۵/۲۱ درصد) واجد هر دو ژن بودند. همبستگی نمونه های اسهالی و عفونت مجاری ادراری با ژن های مورد بررسی طبق نتایج آنالیز آماری معنی دار نبود. نتایج آزمایش فیلوتایپینگ نشان داد که ۱۲۱ جدایه اشریشیاکلی در چهار گروه فیلوژنتیکی A، B1، B2 و D قرار داشتند، که ۵۹ جدایه در گروه فیلوژنی A (۴۸/۷۷ درصد)، ۱۶ جدایه در گروه فیلوژنی B1 (۱۳/۲۲ درصد)، ۱۵ جدایه در گروه فیلوژنی B2 (۱۲/۳۹ درصد) و ۳۱ جدایه در گروه فیلوژنی D (۲۵/۶۲ درصد) انتشار داشتند. در این میان جدایه‌های ایزوله شده از نمونه‌های اسهالی در گروه فیلوژنی A با ۴۱ جدایه (۵۴/۶۶ درصد)، در گروه فیلوژنی B1 با ۸ جدایه (۱۰/۶۶ درصد)، در گروه فیلوژنی B2 با ۳ جدایه (۴/۰۰ درصد) و در گروه فیلوژنی D با ۲۳ جدایه (۳۰/۶۶ درصد) قرار داشتند. در جدایه‌های مربوط به عفونت مجاری ادراری ۱۸ جدایه (۳۹/۱۳ درصد) در گروه فیلوژنی A، ۸ جدایه (۱۷/۳۹ درصد) در گروه فیلوژنی B1، ۱۲ جدایه (۲۶/۰۸ درصد) در گروه فیلوژنی B2 و ۸ جدایه (۱۷/۳۹ درصد) در گروه فیلوژنی D حضور داشتند. بیشترین تحت گروه‌های فیلوژنتیکی در جدایه‌های مورد بررسی مربوط به تحت گروه A_0 (۳۲ جدایه) و D_1(۳۱ جدایه) بود(جدول۲). ارتباط گروه‌های فیلوژنتیکی با ژن‌های bla_{CTX-M} و bla_{CTX-15} در جدایه‌های مورد بررسی نشان داد که جدایه‌های مثبت از نظر ژن bla_{CTX-M} در گروه‌های فیلوژنی A (۱۵ جدایه)، B1 (۷ جدایه)، B2 (۱ جدایه) و D (۱۵ جدایه) قرار داشتند. جدایه‌های دارای هر دو ژن bla_{CTX-M} و bla_{CTX-15} در گروه‌های فیلوژنی A (۶ جدایه) و D (۱۱ جدایه) حضور داشتند (جدول۳).

جدول ۱-پرایمرهای اختصاصی و وزن ملکولی محصولات آزمایشات PCR

ژن	پر ایمر اختصاصی ('۳-'۵)	وزن محصول (جفت باز)
$bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$	CGCTTTGCGATGTGCAG ACCGCGATATCGTTGGT	550 bp
$bla_{CTX\text{-}M}$	CCAGAATAAGGAATCCCATG GCCGTCTAAGGCGATAAAC	947 bp
chuA	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279 bp
yjaA	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211 bp
TspE4.C2	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	152 bp

جدول ۲- انتشار جدایه‌های اسهال و عفونت مجاری ادراری در گروه‌ها و تحت گروه‌های فیلوژنی

فیلوژنتیک		جدایه‌های اسهالی		جدایه‌های عفونت ادراری	
گروه	تحت گروه	تعداد	(%)	تعداد	(%)
A		٤١	(٥٤/٦٦)	١٨	(٣٩/١٣)
	A_0	٢١	(٢٨/٠٠)	١١	(٢٣/٩١)
	A_1	٢٠	(٢٦/٦٦)	٧	(٩/٣٣)
B1		٨	(١٠/٦٦)	٨	(١٧/٣٩)
B2		٣	(٤/٠٠)	١٢	(٢٦/٠٨)
	$B2_2$	–	–	–	–
	$B2_3$	٣	(٤/٠٠)	١٢	(٢٦/٠٨)
D		٢٣	(٣٠/٦٦)	٨	(١٧/٣٩)
	D_1	٢٣	(٣٠/٦٦)	٨	(١٧/٣٩)
	D_2	–	–	–	–

جدول ۳ -گروه و تحت گروه‌های فیلوژنی واجد ژن‌های $bla_{CTX\text{-}M}$ و $bla_{CTX\text{-}15}$ در جدایه‌های اسهال و عفونت مجاری ادراری

ژن	جدایه‌های اسهالی							جدایه‌های عفونت مجاری						
	A_0	A_1	B1	$B2_2$	$B2_3$	D_1	D_2	A0	A1	B1	B22	B23	D1	D2
$bla_{CTX\text{-}M}$	٨	-	٣	-	-	١١	-	٣	٤	٤	١	–	٤	-
$bla_{CTX\text{-}15}$	٣	–	-	-	-	٧	-	٣	٣	-	–	–	٤	-
کل	١١	–	٣	-	-	١٨	-	٦	٧	٤	١	–	٨	-

بحث

در طی دهه گذشته جدایه‌های تولید کننده آنزیم‌های CTX-M بیشترین فراوانی را در باکتری *اشریشیاکلی* به عنوان یک میزبان مهم در سرتاسر دنیا داشته‌اند (۱۴). گرچه آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف نوع CTX-M در هند و چین مشاهده شده‌اند ولی بیشترین فراوانی از شیوع عفونت‌های ایجاد شده با این آنزیم‌ها در ژاپن، کره و تایوان گزارش شده است. با این حال می‌توان گفت غالب‌ترین آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف در آسیا آنزیم‌های CTX-M می‌باشند (۱۵). این آنزیم‌ها قادر به هیدرولیز سفالوسپورین های نسل سوم به خصوص سفوتاکسیم و سفتازیدیم می‌باشند و در طی سال‌های گذشته اپیدمی‌های متعددی از عفونت با باکتری‌های واجد این آنزیم‌های در سراسر دنیا مشاهده شده است که این پدیده تهدیدی بزرگ در استفاده از سفالوسپورین‌ها به شمار می‌آید (۱۶). این مطالعه با هدف شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف ($bla_{CTX\text{-}M}$ و $bla_{CTX\text{-}15}$) و همچنین ارزیابی زمینه فیلوژنتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* اخذ شده از نمونه‌های بالینی کودکان زیر ۵ سال در شهرستان خرم آباد صورت پذیرفت.

جدایه‌های *اشریشیاکلی* واجد ژن‌های bla_{CTX-M} و bla_{CTX-15} در نقاط مختلف جهان انتشار دارند و گزارشات متعددی در این زمینه به چاپ رسیده است در عین حال اطلاعات محدودی در مورد فراوانی این ژن‌ها از نمونه‌های بالینی در کودکان زیر پنج سال در ایران منتشر شده است. براساس نتایج بدست آمده از جدایه‌های مورد بررسی ۱۸/۱۸ درصد جدایه‌ها واجد ژن bla_{CTX-M} و ۱۴/۰۴ درصد از نظر ژن bla_{CTX-15} مثبت بودند که این نتایج در کودکان زیر پنج سال درصد قابل توجهی می‌باشد. مطالعه‌ای در تهران بر روی ۲۰۰ جدایه *اشریشیاکلی* از نمونه‌های بالینی شامل ادرار، مدفوع، کشت خون و ترشحات بدن انجام شد که ۴۴/۵۰ درصد از جدایه‌ها واجد آلل‌های گروه CTX-M-I بودند و هیچ کدام از جدایه‌ها واجد گروه‌های ۲ و ۹ CTX-M نبودند (۱۷). مطالعه مشابه دیگری در تهر روی ۱۶۰ جدایه *اشریشیاکلی* از نمونه‌های بالینی انجام گردید که ۳۴ جدایه برای گروه CTX-M-I (شامل ژن‌های $bla_{CTX-M-1}$، $bla_{CTX-M-3}$، $bla_{CTX-M-5}$، $bla_{CTX-M-10}$، $bla_{CTX-M-12}$، $bla_{CTX-M-15}$ و $bla_{CTX-M-22}$) مثبت بودند (۱۸). اکثر مطالعات بررسی‌های خود را بر روی افراد بزرگسال مبتلا به عفونت‌های *اشریشیاکلی* انجام داده‌اند و اطلاعات کمی در مورد فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف به خصوص ژن‌های bla_{CTX-M} در کودکان زیر ۵ سال در دسترس می‌باشد. در مطالعه حاضر فراوانی ژن bla_{CTX-M} در کودکان زیر ۵ سال ۱۸/۱۸ درصد می‌باشد که در مقایسه با بررسی که در کرمان بر روی افراد بزرگسال صورت گرفت فراوانی هر یک از ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} به ترتیب ۲۳/۴ درصد، ۶۳/۸ درصد و ۵۱ درصد بود که نشان دهنده تفاوت نسبتا کمی در ژن bla_{CTX-M} در جدایه‌های گرفته شده از نمونه‌های بزرگسال و کودکان در مطالعه حاضر بود (۱۹). همچنین در مطالعه‌ای در اسپانیا از ۱۰۵ جدایه *اشریشیاکلی* مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف ۵۷/۱ درصد واجد ژن $bla_{CTX-M-14}$، ۲۱/۹ درصد واجد ژن $bla_{CTX-M-15}$ و ۶/۷ درصد واجد ژن $bla_{CTX-M-32}$ بودند (۲۰). بررسی که توسط Piatti و همکاران در ایتالیا انجام شد نشان داد که احتمالا مناطق جغرافیایی در نقاط مختلف دنیا که جدایه‌های *اشریشیاکلی* از آن‌ها منشا می گیرند در انتشار زمینه فیلوژنتیکی، ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی و ژن‌های بیماری زا تاثیر گذار می‌باشند (۲۱) بنابراین با استفاده از روش‌های مختلف فیلوژنتیکی می‌توان فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین قرابت سویه‌های باکتریایی را در سراسر دنیا بدست آورد. بررسی‌های گذشته نشان داده‌اند که اغلب سویه‌های *اشریشیاکلی* موجد اسهال در گروه‌های فیلوژنی A، B1 و D حضور دارند (۹). مطالعه حاضر نیز نشان داد که بیشترین گروه‌های فیلوژنتیکی در جدایه‌های *اشریشیاکلی* اسهالی به ترتیب در گروه‌های A (۵۴/۶۶ ٪)، D (۳۰/۶۶ ٪) و B1 (۱۰/۶۶ ٪) قرار دارند. از طرف دیگر گروه‌های فیلوژنی B2 و به مقدار کمتری گروه D عامل عفونت‌های خارج گوارشی می‌باشند (۹) که در مطالعه حاضر بیشترین جدایه‌های مربوط به عفونت مجاری ادراری در گروه‌های A (۳۹/۱۳ ٪)، B2 (۲۶/۰۸٪)، B1 (۱۷/۳۹ ٪) و D (۱۷/۳۹ ٪) حضور داشتند. وجود فراوانی بیشتر گروه‌های فیلوژنی B2 و D در عفونت‌های مجاری ادراری شاید به علت وجود بیشتر ژن‌های بیماری زا در این گروه‌ها نسبت به سویه‌های نهفته باشد (۱۰). از آنجایی که گروه‌های فیلوژنتیکی A و B1 غالبا به صورت نهفته در دستگاه گوارشی قرار دارند(۹) بنابراین می‌توان گفت که شاید جدایه‌های واجد گروه‌های A و B1 در جدایه‌های عفونت مجاری ادراری از طریق جدایه‌های نهفته موجود در دستگاه گوارشی انتقال پیدا کرده‌اند که این حالت را در خانم‌ها به دلیل وضعیت آناتومیکی دستگاه ادراری-تناسلی می‌توان نسبت داد. احتمالا رعایت مسائل بهداشتی در ابتلا به این بیماری حائز اهمیت است که در این حالت *اشریشیاکلی* به عنوان یک باکتری عفونت زای فرصت طلب در این منطقه نقش ایفا می کند. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان سویه‌های *اشریشیاکلی* متعلق به گروه فیلوژنتیکی B2 کمتر از سایر گروه‌های فیلوژنتیکی است که شاید به علت وجود بیشتر ژن های بیماری زا در گروه فیلوژنی B2 بود(۱۰، ۱۱). در مطالعه حاضر نیز کمترین فراوانی ژن‌های bla_{CTX-M} مربوط

به گروه فیلوژنی B2 می‌باشد. در همین رابطه مطالعه‌ایی در اسپانیا نشان داد که بیشترین فراوانی ژن‌های $bla_{\text{CTX-M-14}}$، $bla_{\text{CTX-M-15}}$ و $bla_{\text{CTX-M-32}}$ در گروه فیلوژنی B2 است (۲۰) و بررسی دیگری در فرانسه گزارش کرد که جدایه-های *اشریشیاکلی* تولید کننده آنزیم CTX-M-15 دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین عوامل ویرولانس بالایی هستند، که این مطلب نشان دهنده این موضوع است که شاید انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مقابل ژن‌های واجد فاکتورهای بیماری زا به طور کامل تایید نشود (۲۲).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر بیشترین فراوانی مربوط به جدایه‌های *اشریشیاکلی* عفونت‌های گوارشی و ادراری در کودکان زیر ۵ سال را در گروه‌های A و D به عنوان گروه‌های فیلوژنتیکی غالب نشان داد. در این مطالعه گروه فیلوژنی B2 از گروه های غالب در عفونت های مجاری ادراری بود و همچنین گروه A بیشترین فراوانی را در جدایه های اسهالی داشت. ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$ و $bla_{\text{CTX-15}}$ فراوانی بالایی در کودکان زیر ۵ سال در این منطقه از خود نشان دادند که شاید به علت مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام باشد. با توجه به تفاوت‌های موجود در ارتباط با زمینه فیلوژنتیکی جدایه‌ها، به مطالعات ژنتیکی بیشتر در ارتباط با حضور ژن‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف در گروه‌های فیلوژنی نیاز است.

تشکر و قدرانی

این مطالعه به صورت طرح تحقیقاتی با حمایت مالی دانشگاه شهید باهنر کرمان با شماره ۱۳۹۲/۴ انجام گردید.

References

1.Hardegen C, Messler S, Henrich B, Pfeffer K, Würthner J, MacKenzie CR. *A set of novel multiplex Taqman real-time PCRs for the detection of diarrhoeagenic Escherichia coli and its use in determining the prevalence of EPEC and EAEC in a university hospital.* Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2010; 9: 5.

2. Franiczek R, Sobieszczanska B, Turniak M, Kasprzykowska U, Krzyzanowska B, Jermakow K, et al. *ESBL-producing Escherichia coli isolated from children with acute diarrhea–antimicrobial susceptibility, adherence patterns and phylogenetic background*. Adv Clin Exp Med. 2012; 21(2): 187–92.

3. Boisen N, Scheutz F, Rasko DA, Redman JC, Persson S, Simon J, et al. *Genomic characterization of enteroaggregative Escherichia coli from children in Mali*. J Infect Dis. 2012; 205(3): 431–44.

4. Houdouin V, Bonacorsi S, Mahjoub-Messai F, Mariani-Kurkdjian P, Bidet P, Sebag G et al. *Phylogenetic groups and virulence factors of Escherichia coli strains causing pyelonephritis in children with and without urinary tract abnormalities*. Clin Microbiol Infec. 2007; 13(7): 740-42.

5. Cullik A, Pfeifer Y, Prager R, von Baum H, Witte W. *A novel IS26 structure surrounds blaCTX-M genes in different plasmids from German clinical Escherichia coli isolates*. J Med Microbiol. 2010; 59(pt-5): 580–87.

6. Khalaf NG, Eletreby MM, Hanson ND. *Characterization of CTX-M ESBLs in Enterobacter cloacae, Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae clinical isolates from Cairo, Egypt*. BMC Infect Dis. 2009; 9: 84.

7. Messai Y, Benhassine T, Naim M, Paul G, Bakour R. *Prevalence of beta-lactams resistance among Escherichia coli clinical isolates from a hospital in Algiers*. Rev Esp Quimioter. 2006; 19(2): 144-51.

8. Escobar-Paramo PK, Grenet A, Menac'h AL, Rode L, Salgado E, Amorin C, et al. *Large-scale population structure of human commensal Escherichia coli isolates*. Appl Environ Microbiol. 2004; 70(9): 5698-700.

9. Alizade H, Ghanbarpour R, Aflatoonian MR, Abdollahi H. *Determination of phylogenetic background, fimbrial genes, and antibiotic susceptibility of Escherichia coli isolates from urinary tract infections in Bam region, Iran*. Comp Clin Pathol. 2013: DOI 10.1007/s00580-013-1771-z.

10. Kawamura–Sato K, Yoshida R, Shibayama K, Ohta M. *Virulence genes, quinolone and fluroqunolone resistance, and phylogenetic background of uropathogenic Escherichia coli strains isolated in Japan*. JPN J Infect Dis. 2010; 63(2): 113-15.

11. Horcajada JP, Soto S, Gajewski A, Smithson A, Jimenez de Anta MT, Mensa J. *Quinolone-resistant uropathogenic Escherichia coli strains from phylogenetic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts*. J Clin Microbiol. 2005; 43(6): 2962–64.

12. Klintschar M, Neuhuber F. *Evaluation of an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis.* J Forensic Sci. 2000; 45(3): 669–73.

13. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. *Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group*. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(10): 4555-8.

14. Deschamps C, Clermont O, Hipeaux MC, Arlet G, Denamur E, Branger C. *Multiple acquisitions of CTX-M plasmids in the rare D2 genotype of Escherichia coli provide evidence for convergent evolution*. Microbiology. 2009; 155(pt5): 1656–68.

15. Paterson DL, Bonomo RA. *Extended-spectrum beta-Lactamases: a clinical update*. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(4): 657–86.

16.Sanchez UM, Bello TH, Dominguez YM, Mella MS, Zemelman ZR, Gonzalez RG. *Transference of extended spectrum beta-lactamases from nosocomial strains of K. pneumoniae to other species of Enterobacteriaceae*. Rev Med Chil. 2006; 134(4): 415-20.

17.Najar Peerayeh S, Eslami M, Memariani M, Siadat SD. *High Prevalence of blaCTX-M-1 Group Extended-Spectrum β-lactamase Genes in Escherichia coli Isolates From Tehran*. JJM. 2013; 6(7): e6863.

18.Mirzaee M, Pourmand MR, Chitsaz M, Mansouri S. *Antibiotic resistance to third generation cephalosporins due to CTX-M-Type extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Escherichia coli.* Iranian J Publ Health. 2009; 38(1): 10-17.

19.Kalantar D, Mansouri S. *Emergence of multiple β-lactamases produced by Escherichia coli clinical isolates from hospitalized patient in Kerman, Iran*. JJM. 2010; 3(4): 137-45.

20.Blanco M, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Dahbi G, Mora A, Blanco JE, et al. *Molecular epidemiology of Escherichia coli producing extended-spectrum b-lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15*. J Antimicrob Chemother. 2009; 63(6): 1135–41.

21.Piatti G, Mannini A, Balistreri M, Schito AM. *Virulence factors in urinary Escherichia coli strains: phylogenetic background and quinolone and fluoroquinolone resistance*. J Clin Microbiol. 2008; 46(2): 480–87.

22.Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, et al. *The CTX-M-15-producing Escherichia coli diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup*. J Antimicrob Chemother. 2008; 61(5): 1024–28.

Summer 2014, Vol 8, No 2

Original Article

Determination of Phylogenetic Group and Prevalence of *bla*$_{CTX-M}$ and *bla*$_{CTX-M-15}$ Genes in *Escherichia Coli* Isolates from Intestinal and Urinary Tract Infections in under Five- Year-Old Children

Momeni, F. (MSc)
MSc of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

Ghanbarpour, R. (PhD)
Professor of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

Dolatshah, L. (MSc)
MSc of Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

Alizade, H. (MSc)
PhD Student of Bacteriology, Research Center for Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Corresponding Author: Alizade, H

Email: alizade.h2000@yahoo.com

Received: 16 Feb 2014
Revised: 7 Apr 2014
Accepted: 9 Apr 2014

Abstract

Background and Objective: CTX-M type extended spectrum beta-lactamases is a rapidly expanding group of enzymes encountered with increasing frequency, especially, in *Escherichia coli* (*E. coli*). There are a few reports on phylogenetic background of *E. coli* isolates from clinical sources of under five-year- old children in Iran. The purpose of this study was phylotyping of *E. coli* isolates having blaCTX$_{-M}$ and *bla*$_{CTX-M-15}$ genes from under five-year- old children with diarrhea and urinary tract infection (UTI).

Material and Methods: A total of 121 *E. coli* isolates (75 diarrheas and 46 UTI) were obtained and identified as *E. coli* based on standard bacteriological tests. DNA was extracted from *E. coli* isolates by alkaline lysis method. PCR assay was used because of high frequency of *bla*$_{CTX-M}$ and *bla*$_{CTX-M-15}$ genes in the isolates and also determination of phylogenetic group/subgroups by detection of *yjaA* and *chuA* genes and fragment TspE4.C2.

Results: The isolates belonged to four phylogenetic groups A (48.77%), B1 (14.04%), B2 (11.57%), and D (25.62%). In the diarrheic isolates,17.37% were positive for *bla*$_{CTX-M}$ and 14.04% of isolates possessed both *bla*$_{CTX-M}$ and *bla*$_{CTX-15}$genes.Out of 46 UTI isolates, 21.73% were positive for *bla*$_{CTX-M}$ and 15.21% for *bla*$_{CTX-M}$ and *bla*$_{CTX-M-15}$ genes.

Conclusion: A rather high prevalence of *E. coli* isolates with blaCTX$_{-M}$ and *bla*$_{CTX-M-15}$ genes was observed in fewer than five-year- old children in Khoramabad city. Phylotyping of isolates possessing blaCTX$_{-M}$ and *bla*$_{CTX-15}$genes showed that most of them belonge to A and D phylo-groups.

Keywords: *Escherichia Coli*, Phylogenetic Group, Extended-Spectrum Beta-Lactamase

This paper should be cited as: Momeni F, Ghanbarpour R, Dolatshah L, Alizade H. [Determination of Phylogenetic Group and Prevalence of *bla*$_{CTX-M}$ and *bla*$_{CTX-M-15}$ Genes in *Escherichia Coli* Isolates from Intestinal and Urinary Tract Infections in under Five- Year- Old Children]. MLJ. 2014; 8(2):33-40 [Article in Persian]