مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره سی، شماره پنج، مرداد ۱۴۰۱
تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۷/۰۴
تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۰۹/۱۰

بررسی فراوانی آنزیم های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در ایزوله‌های انتروباکتر آئروژنز جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد

شیما شنتیائی[۱]، الهه تاج‌بخش[*۱]، حسن ممتاز[۱]

مقاله پژوهشی

مقدمه: تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه یکی از مشکلات بهداشتی و درمانی در سطح دنیاست. شیوع این آنزیم‌ها در نواحی جغرافیایی مختلف و با زمان تغییر می‌کند. با توجه به عدم مطالعه نسبت به شناسایی ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع الطیف $bla_{\text{SHV, }}bla_{\text{CTX-M, }}bla_{\text{TEM}}$ در ایزوله‌های انتروباکتر آئروژنز جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد، ژن‌های مذکور از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی مقطعی، الگوی حساسیت ضد باکتریایی ۵۰ ایزوله انتروباکتر آئروژنز به سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریکسون و سفالوتین با استفاده از روش انتشار دیسک مورد آزمایش قرار گرفت. سپس ایزوله‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های فوق به‌وسیله تست تاییدی دیسک‌های ترکیبی سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید و سفتازیدیم -کلاولانیک اسید بررسی شدند. سپس در سویه‌های مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف وجود ژن‌های $bla_{\text{SHV, }}bla_{\text{CTX-M, }}bla_{\text{TEM, }}$ در حضور پرایمرهای اختصاصی بررسی شد.

نتایج: از ۵۰ ایزوله انتروباکتر آئروژنز مورد بررسی در این مطالعه ۳۲ ایزوله (۶۴ درصد) در بررسی فنوتیپی مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف تشخیص داده شدند که فراوانی ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$ ، bla_{TEM} و bla_{SHV} به ترتیب ۳۰ درصد، ۲۰ درصد و ۱۴ درصد گزارش گردید. در تجزیه و تحلیل آماری بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفتریکسون و ژن $bla_{\text{CTX-M}}$ ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده گردید ($p <$ ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر حاکی از آن است که ایزوله‌های انتروباکتر آئروژنز مولد *ESBL* از شیوع نسبتا بالایی برخوردارند. افزایش میزان این گونه‌ها غالباً ناشی از تجویز غیر منطقی آنتی‌بیوتیک‌ها است که رفع این مشکل مستلزم به‌کارگیری عوامل ضد میکروبی جدید و محدود نمودن استفاده غیرضروری از عوامل ضدمیکروبی و افزایش بهره‌گیری از ابزارهای کنترل عفونت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: انتروباکتر آئروژنز، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

ارجاع: شنتیائی شیما، الهه تاج‌بخش، ممتاز حسن. **بررسی فراوانی آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در ایزوله‌های انتروباکتر آئروژنز جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد.** مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۱؛ ۳۰ (۵): ۹۶-۴۸۸۷.

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۳۱۸۴۱۰۱۲، پست الکترونیکی: ee_tajbakhsh@yahoo.com، صندوق پستی:۱۶۶

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-08-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i5.10163]

مقدمه

عفونت‌های مجاری ادراری یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین عفونت‌هایی است که در سنین مختلف روی می‌دهد و درمان نادرست آن می‌تواند منجر به بروز عوارض خطرناکی مانند اختلالات دستگاه ادراری، فشار خون، اورمی و زایمان زودرس در زنان باردار شود (۱،۲). هر چند عامل شایع ایجادکننده UTI در نقاط مختلف جهان باکتری اشریشیاکلی است، اما دیگر باکتری‌های گرم منفی به‌خصوص باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه و نیز کوکسی‌های گرم مثبت هم می‌توانند عفونت ادراری ایجاد کنند. باکتری‌های موجود در خانواده انتروباکتریاسه به‌دلیل فراوانی بسیار بالا در جوامع مختلف دارای اهمیت بیشتری می‌باشند. از این میان دو جنس اشرشیاکلی و انتروباکتر به‌دلیل فراوانی بالا و ایجاد عفونت‌های مختلف دارای اهمیت ویژه‌ای هستند (۳). جنس انتروباکتر یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد. علائم عفونت‌های انتروباکتر اختصاصی نبوده و در سایر باکتری‌های گرم منفی هم وجود دارد. دستگاه تنفسی و دستگاه ادراری، شایع‌ترین مکان عفونت انتروباکتر هستند. از میان اعضای این جنس انتروباکتر آئروژنز به عنوان یک بیماری‌زای فرصت طلب شناخته شده‌است. انتروباکتر آئروژنز کپسول کوچکی داشته و می‌تواند عفونت‌های ادراری و سپتسمی ایجاد نماید (۴،۵). همانند بسیاری از اعضای خانواده انتروباکتریاسه این ارگانیسم قادر به ایجاد عفونت‌های دستگاه ادراری و هم چنین عفونت‌های فرصت‌طلب در بیماران بستری شده در بیمارستان می‌باشد. شدت عفونت بستگی به هر دو عامل حساسیت میزبان و ویرولانس باکتری‌های عفونت‌زا دارد هم‌چنین بیمارانی که مشکلات پزشکی زمینه‌ای دارند یا به‌واسطه برخی اختلالات آناتومیک در مجاری ادراری مبتلا به اشکال در جریان ادرار هستند و یا درگیر مداخلات تشخیصی درمانی می‌باشند، مستعد کلونیزاسیون مجاری ادراری با باکتری هستند (۶). بتالاکتامازها مهم‌ترین آنزیم‌های تخریب کننده‌ای هستند که به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام حمله‌ور می‌شوند. این آنزیم‌ها یک اتصال آسیل کووالانت را ازطریق گروه کربوکسیل حلقه بتالاکتام به‌وجود می آورند که حاصل آن باز شدن حلقه بتالاکتام و غیرفعال شدن دارو می باشد. آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری‌ها متنوعند و در پاسخ به فشار انتخابی آنتی‌بیوتیک‌ها دائما در حال موتاسیون یا جایگزینی اسیدهای آمینه به‌ویژه در جایگاه فعال آنزیم هستند به طوری‌که باعث ظهور انواع جدیدی از بتالاکتامازهای با طیف وسیع شده است. بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف آنزیم‌هایی هستند که محدوده طیف اثر وسیعی بر روی پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها و آزترونام‌ها دارند اما این آنزیم‌ها تاثیری بر روی سفامایسین‌ها یا کارباپنم‌ها ندارند و توسط عوامل بازدارنده بتالاکتامازها همانند کلاوولانیک اسید و تازوباکتام بازداشته می‌شوند (۱۰-۷). اولین ایزوله‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سال ۱۹۸۳در آلمان گزارش گردید. اما امروزه پاتوژن‌های تولیدکننده *ESBL* عامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی همانند عفونت ادراری-عفونت‌های وابسته به کاتترها، مننژیت نوزادی، عفونت‌های دستگاه تنفسی و سپسیس بوده و به‌سرعت در حال افزایش هستند. درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های مولد این آنزیم‌ها بغرنج است و به‌صورت یک مشکل جهانی درآمده است زیرا از یک سو مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مشاهده می‌شود و از سوی دیگر ژن‌های *ESBL* بر روی پلاسمید بزرگی حمل می‌شوند که به راحتی در میان انتروباکتریاسه‌ها انتقال می‌یابد و تجمع ژن‌های مقاومت منجر به تولید سویه‌های پلاسمیدی با مقاومت‌های چندگانه می‌گردد که این امر با شکست درمانی عفونت‌ها و افزایش مرگ و میر بیماران و بالا رفتن بار مالی درمان رابطه دارد (۱۴-۱۱). با توجه به این‌که تاکنون گزارشی مبنی بر میزان شیوع آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف در ایزوله‌های انتروباکتر آئروژنز جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد وجود نداشت، لذا بر آن شدیم تا به بررسی فراوانی این آنزیم در ایزوله‌های انتروباکتر آئروژنز جدا شده از موارد عفونت در شهرستان شهرکرد بپردازیم.

روش بررسی

تحقیق حاضر یک مطالعه توصیفی- مقطعی می‌باشد که در سال ۱۳۹۹-۱۳۹۸ بر روی ۵۰ ایزوله انتروباکتر آئروژنز جدا شده از موارد عفونت‌های ادراری در شهرستان شهرکرد با

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-08-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i5.10163]

همکاری آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد صورت گرفت،

جستجوی باکتری

به‌منظور جداسازی باکتری نمونه‌های ادرار در محیط مک‌کانکی آگار کشت داده شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند. سپس نمونه‌های کشت داده شده از نظر رنگ‌آمیزی گرم و تخمیر قند لاکتوز مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تشخیص بیوشیمیایی ایزوله‌های انترو باکتر آئروژنز تست‌های بیوشیمیایی از قبیل تولید اندول، واکنش متیل رد، ووژس پروسکائر، سیترات، تولید سولفید هیدروژن، اوره، لایزین دکربوکسیلاز، آرژینین دهیدرولاز، اورنیتین دکربوکسیلاز، فنیل آلانین دآمیناز، حرکت و تولید اسید در اثر تخمیر قندها مورد بررسی قرار گرفتند. تست‌های اندول، متیل رد، ووژس پروسکائر، اوره آز، سولفید هیدروژن و فنیل آلانین دآمیناز در این باکتری منفی است. اما تست‌های آرژینین دهیدرولاز، حرکت، لایزین دکربوکسیلاز و اورنی تین دکربوکسیلاز در این باکتری مثبت می‌باشد (۱۵).

شناسایی باکتری‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف

به‌منظور شناسایی باکتری‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف در ابتدا آزمون غربالگری با روش دیسک دیفیوژن مطابق دستورالعمل CLSI (Clinical Laboratory Standard Institue) با استفاده از دیسک‌های آنتی بیوتیکی سفوتاکسیم (CTX 30µg)، سفتازیدیم (CAZ 30µg)، سفتریاکسون (CRO 30µg) و سفالوتین (CF 30µg) تهیه شده از شرکت پادتن طب انجام شد. ابتدا از ایزوله‌های مورد بررسی سوسپانسیونی برابر غلظت نیم مک فارلند تهیه شد و در محیط مولر هینتون آگار (ساخت شرکت مرک آلمان) به‌صورت گسترده کشت داده شد و سپس دیسک‌های مورد بررسی با فاصله حداقل ۲/۵ سانتی‌متر از هم روی پلیت قرار داده شد سپس به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از بررسی هاله عدم رشد، سویه‌های مقاوم به حداقل یکی از این آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان اسکرین مثبت تلقی شده و در مرحله بعد تحت آزمون فنوتیپی تاییدی قرار گرفتند (۱۱).

تایید فنوتیپی ایزوله‌های تولید کننده *ESBL*

آزمایش تاییدی جهت تایید فنوتیپ بتالاکتامازهای وسیع الطیف با روش آزمایش هم‌افزایی دیسک‌های دوگانه با استفاده از یک دیسک سفتازیدیم (CAZ) (۳۰ میکروگرم) به تنهایی و یک دیسک سفتازیدیم در ترکیب با اسیدکلاوولانیک (CAC) (۳۰/۱۰ میکروگرم) استفاده شد. هر دو دیسک بر روی یک محیط کشت مولر هینتون قرار داده شده و به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در صورتی‌که قطر هاله ی عدم رشد باکتری اطراف هر دیسک به تنهایی در مقایسه با دیسک ترکیبی خود ۵ میلی متر یا بیشتر بود به‌عنوان سویه تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف در نظر گرفته می‌شد (۱۱). از سویه اشریشیاکلی ATCC 25922 و کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران جهت کنترل روش‌های آنتی‌بیوگرام و دیسک ترکیبی استفاده شد.

آزمایشات مولکولی

استخراج DNA

برای به‌دست آوردن اسید نوکلئیک خالص، چربی‌ها و پروتئین‌ها به روش جوشاندن از نمونه‌ها حذف شدند. نمونه‌ها در پلیت‌های حاوی محیط کشت مغذی پپتون واتر کشت داده شدند و در دمای ۳۷-۳۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس ۱۲۰ میکرولیتر از محیط پپتون واتر که حاوی باکتری رشد یافته بود (هر نمونه به شکل جداگانه) را با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، مخلوط و سپس این سوسپانسیون میکروبی به‌مدت ۵ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شد. در مرحله بعد نمونه به‌مدت ۱۰ دقیقه در سرعت چرخش ۱۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید و فاز رویی حاوی DNA برداشته شد و در دمای ۲۰ -درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای تعیین غلظت DNA، استوک تهیه شده ۱:۱۰۰ رقیق شد. میزان جذب نوری در طول موج‌های ۲۸۰ و ۲۶۰

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-08-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i5.10163]

نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. نسبت میزان جذب نوری۲۶۰ به ۲۸۰ نشانگر کیفیت DNA نمونه است. جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر بیانگر غلظت DNA در نمونه و جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر نشان دهنده غلظت پروتئین در نمونه می‌باشد. در صورتی‌که جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ باشد DNA در کیفیت خوبی جهت انجام PCR قرار دارد. پس از خواندن جذب نوری نمونه‌ها، با استفاده از فرمول زیر غلظت DNA تعیین شد (۱۲).

غلظت DNA (ng/µl) = OD ۲۶۰ ng/µl × ۵۰× فاکتوررقت

ردیابی ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی

در راستای ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی شامل ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (*SHV-CTX,TEM*) استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های فوق در جدول (۱) و برنامه ی PCR در جدول (۲) نشان داده شده است (۱۳).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از کشت میکروبی، آزمایش PCR و ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS version 16 و مدل‌های آماری مربع کای و دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد آنالیز و ارتباط آماری بین فراوانی آلودگی به *انتروباکتر آئروژنز* در نمونه‌ها و توزیع انواع ژن‌های مورد مطالعه در ایزوله‌های جداشده از نمونه‌های ادرار در سطح $P\leq ۰/۰۵$ تعیین گردید.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تایید شده است (کد اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1399.039)

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های انتروباکتر آئروژنز

ژن‌های بتالاکتاماز	توالی پرایمر	اندازه ی محصول	منبع
bla_{SHV}	F: 5'-ATGCGTTATATTCGCCTGTG-3' R: 5'-TGCTTTGTTATTCGGGCCAA-3'	۷۴۷	۱۳
bla_{CTX-M}	F: 5'-ATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGC-3' R: 5'-TGGGTAAAGTAAGTGACCAGAATCAGCGG-3	۵۹۳	۱۳
bla_{TEM}	F: 5'-TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA-3' R: 5'-ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT-3	۴۴۵	۱۳

جدول ۲: حجم واکنش و برنامه PCR مورد استفاده برای ردیابی ژن‌های مورد بررسی

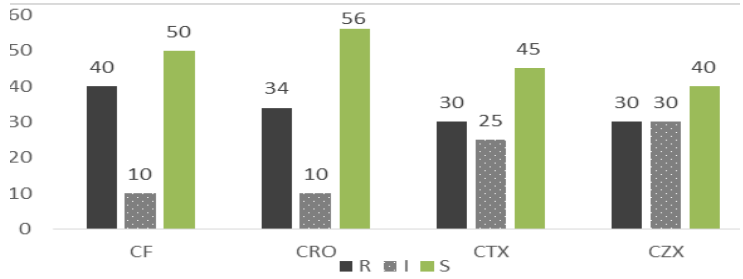
ژن	برنامه ی PCR	حجم واکنش PCR (۲۵ میکرولیتر)
bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, bla_{TEM},	۱ سیکل: ۹۵^{0C} ---------- ۶ دقیقه ۳۰ سیکل: ۹۴^{0C} ---------- ۶۰s ۵۵^{0C} ---------- ۶۰s ۷۲^{0C} ---------- 45s ۱ سیکل: ۷۲^{0C} ---------- 7 min	۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۲/۵ میلی مول کلرید منیزیم (فرمنتاس)، ۱۰۰ میکرومول Mix dNTP (فرمنتاس)، ۲ واحد آنزیم پلی مراز DNA پلی مراز (فرمنتاس)، ۲ میکرولیتر DNA مربوط به هر نمونه

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-08-01]

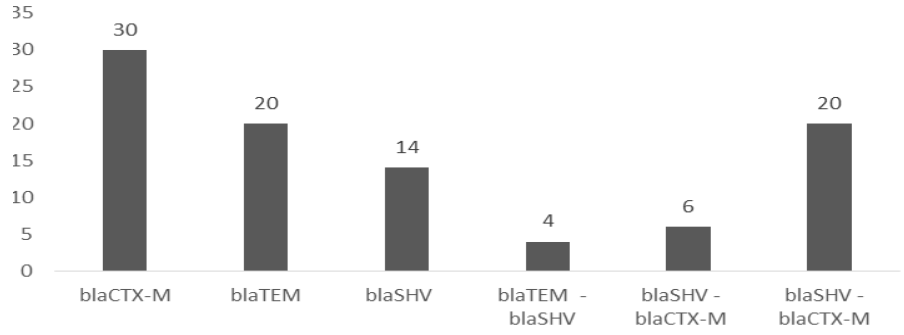
[DOI: 10.18502/ssu.v30i5.10163]

نتایج

نتایج مربوط به مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم (CTX)، سفتازیدیم (CAZ)، سفتریاکسون (CRO) و سفالوتین (CF) در نمودار ۱ نشان داده شده است. در این تحقیق مقاومت به سفالوتین در۲۰ ایزوله (۴۵ درصد)، مقاومت به سفتریکسون در ۱۷ ایزوله (۳۴ درصد)، مقاومت به سفوتاکسیم در و سفتازیدیم در ۱۵ ایزوله (۳۰ درصد) گزارش شد. از ۵۰ ایزوله انتروباکتر آئروژنز تحت بررسی در این مطالعه ۳۲ ایزوله (۶۴ درصد) در بررسی فنوتیپی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف تشخیص داده شدند که در بررسی مولکولی ۱۵ ایزوله (۳۰ درصد) دارای ژن $bla_{\text{CTX-M}}$، ۱۰ ایزوله (۲۰ درصد) دارای ژن bla_{TEM} و۷ ایزوله (۱۴ درصد) دارای ژن bla_{SHV} بودند. به‌علاوه برخی ازایزوله‌ها نیز بیش از یک ژن مقاومت داشتند، به طوری‌که شیوع هم زمان ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} در ۲ ایزوله (۴ درصد) و شیوع هم‌زمان ژن‌های bla_{SHV} و $bla_{\text{CTX-M}}$ در ۳ ایزوله (۶ درصد) و فراوانی ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$ و bla_{TEM} در ۱۰ ایزوله (۲۰ درصد) گزارش گردید. نتایج در نمودار ۲ نشان داده شده است. فراوانی ژن $bla_{\text{CTX-M}}$ در ایزوله‌های مقاوم به سفتریکسون، سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفالوتین به‌ترتیب ۵۸/۸۲ درصد، ۱۳/۳۳ درصد، ۱۳/۳۳ درصد و ۵ درصد گزارش گردید فراوانی ژن bla_{TEM} در ایزوله‌های مقاوم به سفتریکسون، سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفالوتین به‌ترتیب ۲۳/۵۳ درصد، ۲۶/۶۷ درصد، ۶/۶۷ درصد و ۵ درصد گزارش گردید. فراوانی ژن bla_{SHV} در ایزوله‌های مقاوم به سفتریکسون، سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفالوتین به‌ترتیب ۲۳/۵۳ درصد، ۱۳/۳۳ درصد، ۶/۶۷ درصد و ۰ درصد گزارش گردید. در تجزیه و تحلیل آماری براساس آزمون کای دو بین آنتی بیوتیک سفتریکسون و ژن bla_{CTXM} ارتباط معنادار آماری گزارش گردید ($p<۰/۰۵$) اما براساس آزمون دقیق فیشر بین سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$، bla_{TEM} و bla_{SHV} ارتباط معنادار آماری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). نتایج در نمودار ۳ نشان داده شده است.



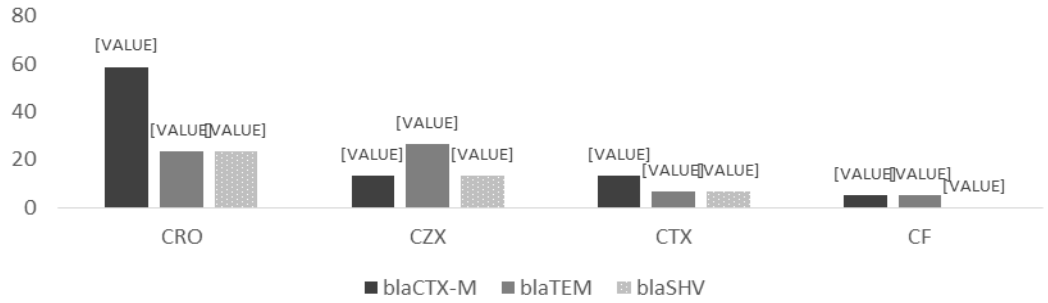
نمودار ۱: نتایج مربوط به مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفالوتین در ایزوله‌های انتروباکتر آئروژنز جدا شده از موارد عفونت ادراری



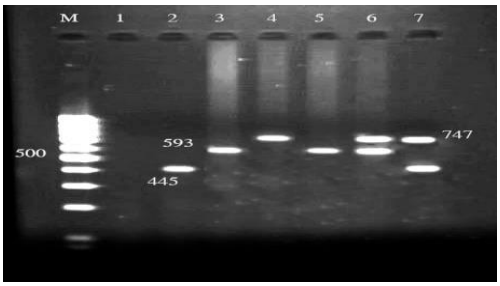
نمودار ۲: فراوانی ژن‌های $bla_{\text{CTX-M}}$، bla_{TEM} و bla_{SHV} در ایزوله‌های انتروباکتر ائروژنز جدا شده از موارد عفونت ادراری

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-08-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i5.10163]



نمودار ۳: فراوانی ژن‌های $bla_{\text{CTX-}}$، bla_{TEM} و bla_{SHV} در ایزوله‌های مورد بررسی



شکل ۱: ژل الکتروفورز محصول PCR ژن‌های $bla_{\text{CTX-}M}$ ، bla_{TEM} و bla_{SHV} در ایزوله‌های انتروباکتر آئروژنز. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل منفی، ستون‌های ۲ و ۵: نمونه واجد ژن bla_{TEM}، ستون ۳: نمونه واجد ژن $bla_{\text{CTX-}M}$ ، ستون ۴: نمونه واجد ژن bla_{SHV} ، ستون ۶: نمونه واجد ژن‌های $bla_{\text{CTX-}M}$ وbla_{SHV}، ستون ۷: نمونه واجد ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV}

بحث

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در دو دهه اخیر افزایش قابل‌ملاحظه‌ای داشته‌اند. این باکتری‌ها به علت غیر فعال سازی طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام به‌ویژۀ نسل سوم سفالوسپورین‌ها و مونوباکتام‌ها، مشکلات فراوانی را برای درمان ایجاد کرده‌اند. پیدایش و انتشار این باکتری‌ها به‌نظر می‌رسد که غالباً ناشی از استفادۀ گسترده داروهای بتالاکتام وسیع‌الطیف در بخش‌های مختلف بیمارستان باشد به‌طوری‌که امروزه شاهد افزایش روزافزون باکتری‌های تولیدکنندۀ *ESBL* هستیم. عفونت با پاتوژن‌های تولید کننده *ESBL* اغلب همراه با شکست درمان، طولانی‌تر شدن زمان بستری، نرخ بالای مرگ و میر و هزینه‌های بالای درمان همراه است. به‌علاوه، همانند عفونت‌های بیمارستانی، در جامعه نیز انتشار وسیعی از انتروباکتریاسه‌های تولید کننده *ESBL* وجود دارد که نتیجه آن بحران سلامت جهانی است. ژن‌های *ESBL* اغلب روی پلاسمید قرار دارند و اغلب متعلق به بتالاکتامازهای گروه A هستند. ارگانیسم‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از لحاظ بالینی بسیار با اهمیت هستند، زیرا الگوی مقاومت دارویی گسترده‌ای از خود نشان می‌دهند و باعث افزایش مرگ و میر بیماران به‌ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌ها می‌شوند (۱۶-۱۴). در تحقیق انجام شده توسط اکبری و همکاران که به‌منظور بررسی شیوع انتروباکتریاسه‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز با طیف وسیع در نمونه ادرار بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی (ره) اردبیل در سال ۲۰۱۵ صورت گرفت،۴۰۰ ایزوله انتروباکتریاسه با روش‌های معمول بیوشیمیایی مورد شناسائی قرار گرفتند. آزمون تأییدی برای تولید *ESBLs* توسط تست دیسک ترکیبی انجام شد. میزان تولید *ESBL* در ایزوله‌های انتروباکتریاسه (۳۶/۷۵درصد) گزارش گردید در این تحقیق ۱۵ ایزوله انتروباکترآئروژنز شناسایی شد و تولید *ESBL* در ایزوله‌های انتروباکتر آئروژنز ۲/۷۲ درصد گزارش شد (۱۷). در مطالعه ما از مجموع ۵۰ ایزوله انتروباکتر آئروژنز مورد بررسی به روش دیسک ۲۱ ایزوله، (۴۲ درصد) مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف تشخیص داده

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-08-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i5.10163]

شدند که از نتایج اکبری و همکاران بیشتر می‌باشد. در مطالعاتی که در ایران و سراسر دنیا با روش مشابه صورت گرفته است، نتایج متفاوتی از نظر میزان تولید *ESBL* در انتروباکتریاسه‌ها را نشان داده است. در مطالعه انجام شده توسط ترشیزی و همکاران که بر روی ۳۲۵ نمونه انتروباکتریاسه جدا شده از نمونه‌های کلینیکی در شهرستان شهرکرد صورت گرفت، ۱۹۳ ایزوله (۵۹/۴درصد) را جنس اشریشیا، ۹۹ ایزوله (۳۰/۴ درصد) را جنس کلبسیلا، ۲۶ ایزوله (۸ درصد) را جنس انتروباکتر و ۷ ایزوله (۲/۲ درصد) را جنس پروتئوس تشکیل می‌دادند که ۹۱ ایزوله (۲۸ درصد) مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بودند. در این بررسی ۴۶ ایزوله از ۹۱ سویه انتروباکتریاسه (۵۰/۵ درصد) مثبت واجد ژن *CTX-M* بودند. بیشترین فراوانی ژنوتیپ مزبور در ایزوله‌های اشریشیا کلی (۱۹/۷ درصد) بعد از آن در ایزوله‌های انتروباکتر و کلبسیلا به ترتیب (۱۵/۴ درصد) ۴ درصد به‌دست آمد. در تحقیق ما از مجموع ۵۰ ایزوله انتروباکتر آئروژنز مورد بررسی در ۱۵ ایزوله (۳۰ درصد) ژن *blaCTX-M* تشخیص داده شد که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد (۱۱). در تحقیق انجام شده توسط نادری و همکاران که بر روی ۱۰۰ نمونه ادراری جمع‌آوری شده در مشهد صورت گرفت، گونه‌های باکتریایی شناسایی شده در میان ایزوله‌های انتروباکتریاسه عبارت بودند از: اشریشیاکلی ۶۵ درصد، کلبسیلا پنومونیه ۱۹درصد، گونه‌های پرسینیا ۷ درصد، انتروباکتر کلوآکه ۵ درصد، گونه‌های پروتئوس ۵ درصد، سیتروباکتر دایورسوس ۲ درصد گزارش شدند که ۲۷ ایزوله (۲۷ درصد) تولید کننده بتالاکتاماز بودند (۱۸). در ژاپن درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بر اثر تولید بتالاکتاماز بسیار پائین و در بررسی انجام شده در ۱۹۶ مرکز درمانی واقع در این کشور مشخص گردید که کمتر از ۱ درصد باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه آنزیم بتالاکتاماز تولید می‌کنند (۱۹). در اروپا شیوع بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در میان ایزوله‌های انتروباکتریاسه از کشوری به کشور دیگر متفاوت است. در یک گزارش از ۱۷ کشور مختلف در سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۲ تولید بتالاکتاماز بین ایزوله‌های اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و گونه‌های انتروباکتریاسه به ترتیب ۵/۴، ۱۸/۲ و ۸/۸ درصد و میزان تولید آنزیم در میان انواع انتروباکتریاسه ۱۰/۵ درصد و بیشترین میزان شیوع در مصر (۳۸/۵ درصد) و یونان (۲۷/۴ درصد) ذکر شده است (۲۱،۲۰). میزان شیوع باکتری مولد *ESLB* بسته به ناحیه (حتی از بیمارستانی به بیمارستان دیگر) و زمان ممکن است متفاوت باشد. به‌خصوص هنگام وقوع همه‌گیری، شیوع در بین بیماران بستری در بیمارستان می‌تواند به‌طور ناگهانی افزایش یابد و از بیماران سرپایی به میزان قابل‌توجهی بیشتر (۲۲). در تحقیق انجام شده توسط موسویان و همکاران در سال که بر روی ۲۴۰ ایزوله انتروباکتریاسه از نمونه‌های کلینیکی بیمارستان‌های گلستان و امام خمینی اهواز صورت گرفت، ایزوله‌های انتروباکتریاسه مولد بتالاکتامازها از طریق تست تأییدی دیسک ترکیبی و بر اساس معیار CLSI شناسایی گردیدند. از میان آن‌ها اشریشیاکلی با ۷۱/۳ درصد، انتروباکتر با ۲۷/۱ درصد و کلبسیلا با ۱/۲درصد بیشترین ایزوله‌ها را تشکیل دادند. نتایج حاصل از تست‌های فنوتیپی نشان داد که از ۲۴۰ ایزوله انتروباکتریاسه ۱۰۸ ایزوله (۴۵ درصد) مولد بتالاکتاماز بودند. میزان مقاومت باکتری‌های اشریشیا کلی، انتروباکتر و کلبسیلا نسبت به سفتازیدیم و سفوتاکسیم به‌ترتیب ۴۳/۳ درصد و ۵۵/۸ درصد گزارش گردید (۲۳). در اکثر موارد به‌علت استفاده بی رویه و خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها شاهد موارد زیادی از مقاومت‌های دارویی در پاتوژن‌ها هستیم که این امر خود سبب عدم موفقیت در درمان می‌شود. مقاومت‌های دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در مناطق مختلف ایران و جهان به‌دلیل تغییرات ژنتیکی در ایزوله‌های ایجاد کننده و تفاوت در میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف و جدید متفاوت می‌باشند.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این مطالعه ژن‌های *ESBL* بیش از ۵۰درصد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف را در ایزوله‌های انتروباکتر آئروژنز کد می‌نماید. بنابراین توصیه می‌شود شناسایی این ژن در سویه‌های بیمارستانی این باکتری‌ها در مجموعه آزمایشات روتین

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-08-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i5.10163]

آزمایش‌های میکروبیولوژی قرار گیرد. این اقدام می‌تواند باعث تسریع در روند تشخیص و درمان بیماران گردد.

سپاس‌گزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان صمیمانه از حوزه پژوهشی و زحمات جناب آقای دکتر منوچهر مومنی در مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تشکر و قـدردانـی بـه‌عمل می‌آورند.

حامی مالی: ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

References:

1-Brown AC, Chen JC, Francois Watkins LK, Campbell D, Folster JP, Tate H, et al. ***CTX-M-65 Extended-Spectrum Betalactamase Producing Salmonella Enterica Serotype Infantis, United States.*** Emerg Infect Dis 2018; 24(12): 2284-91.

2-Alberto A, Lucia R, Francesco C, Eliana M, Francesca B, Giovanna AG. ***Antibiotic Resistance, Virulence Factors, Phenotyping, and Genotyping of Non-Escherichia Coli Enterobacterales from the Gut Microbiota of Healthy Subjects***. Int J Mol Sci 2020; 21(5): 1847.

3-Dielubanza ES, Schaeffer AJ. ***Urinary Tract Infections in Women the Medical Clinics of North America***. Med Clin North Am 2011; 95: 27-41.

4-Johann DDP, Laupland KB. ***Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: An Emerging Public-Health Concern***. Lancet Infect Dis 2018; 8(3): 159-66.

5-Antony B, Rajendra Prasad BPM. ***An Outbreak of Neonatal Septicaemia by Enterobacter Cloacae.*** Asian Pacific J Trop Dis 2011; 1(3): 227-29.

6-Conly J.. Johneston B. ***Antimicrobial Resistance in Canada.*** Can J Infec Dic 2012; 12(4): 215-17.

7-Stephen H. Gillespie, Peter M. Hawkey***. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2nd Ed*** 2016; 377-86.

8-Baasubramanian S, Kuppuswamy D, Padmanabhan S, Chandramohan V, Amperayani S. ***Extended-Spectrum Betalactamase-Producing Community-Acquired Urinary Tract Infections in Children: Chart Review of Risk Factors***. J Global Infect Dis 2018; 10(4): 222-5.

9-Jeong HS, Song W, Park JM, Kim HS, Bae IK, et al. ***Boronic Acid Disk Tests For Identification of Extended-Spectrum Lactamase Production in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae Producing Chromosomal Amp C Beta Lactamases***. Int J Antimicrob Agents 2008; 31(5): 467-71.

10-Chaudhary U, Aggarwal R. ***Extended Spectrum - Betalactamases (ESBL) - An Emerging Threat To Clinical Therapeutics***. Indian J Med Microbiol 2004; 22(2): 75-80.

11-Torshizi R, Zamanzad B, Mokhtareyan K, Karimi A. ***Determination of CTX-M Genes in Enterobacteriaceae Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamase Using PCR Method.*** J Shahrekord

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-08-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i5.10163]

Univ Med Sci. J Shahrekord Univ Med Sci 2011; 13(3): 9-17.[Persian]

12- Masoomi Jahandizi R, Aletaha M, Musavi MK. ***Evaluation of the Frequency of TEM beta-lactamase gene in patients with urinary tract infections in Bonab County.*** Iran J Bio 2020; 32(3): 438-48.[Persian]

13- Soroush Z, Ghane M. ***Molecular Identification of CTX-M, TEM and SHV B-Lactamases in Klebsiella pneumoniae Isolated from Respiratory System of Patients in the ICU of Educational Hospitals in Tehran***. Feyz 2017; 21 (3): 232-9.

14- Yezli S, Shibl AM, Memish ZA. ***The Molecular Basis of B-Lactamase Production in Gram-Negative Bacteria from Saudi Arabia***. J Med Microbiol 2015; 64(2): 127-36.

15- Anne Davin-Regli, Jean-Philippe Lavigne, b Jean-Marie Pagès. ***Enterobacter Spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance***. Clin Microbiol Rev 2019; 32(4): 1-19.

16- Lewis JS 2nd, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH. ***First Report of the Emergence of CTX-M-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamases (Esbls) as the Predominant ESBL Isolated In A U.S. Health Care System.*** Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(11): 4015-21.

17- Akbari M, Amir Mozaffari N, Peeri Dogaheh H. ***Prevalence of Extended-Spectrum Beta Lactamase in Entrobacteriaceae Isolated from Urinary Tract Infections in Ardabil, Iran***. J Ardabil Univ Med Sci 2014: 14(3); 285-91.

18- Naderifar S, Nakhaei Moghaddam M. ***Phenotypic and Molecular Detection of PER Extended Spectrum B- Lactamases in Urinary Enterobacteriaceae Isolates in Mashhad***. J North Khorasan Univ Med Sci 2012: 4(1): 87-94.

19- Yagi T, Krukawa H, Shibata N, Shibayama K, Arkawa YA. ***Preliminary Survey of Extended Spectrum Beta-Lactamases in Clinical Isolated of K, pneumoniae and E. Coli in Japan***. FEMS Microbiol Lett 2000; 184: 53-56.

20- AL-Jasser AM. ***Extended Spectrum Beta-Lactamases (Esbls): A Global Problem***. Kuwait Med J 2006; 38: 171-85.

21- Bouchillon SK, Johnson BM, Hoban DJ, et al**.** ***Determining Incidence of Extended Spectrum Blactamase Producing Enterobacteriaceae, Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium and Methicillin resistant Staphylococcus aureus in 38 Centres from 17 Countries: The PEARLS Study 2001 -2002.*** INT J Antimicrob Agents 2004; 24(2): 119-24.

22- Bradford PA. ***Extended-Spectrum Beta-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology and Detection of this Important Resistance Threat***. Clin Microbiol Rev 2001; 14(4): 933-51.

23- Seyed Mojtaba Mousavian, Nazanin Ahmad Khosravi, Saeid Shoja. ***Survey of Frequency in Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Enterobacteriaceae and Determination of the Antibiotic Resistant Pattern in Clinical Specimens in Teaching Hospitals of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences***. Jundishapur Sci Med J 2013; 13(2):191-9. [Persian]

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-08-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i5.10163]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 30| Nov 5 | Aug 2022

Received: 26 Oct 2021
Accepted: 1 Dec 2021

Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Enzymes in *Enterobacter Aerogenes* Isolated from Urinary Tract Infections in Shahrekord City

Shima Shantiaee[1], Elahe Tajbakhsh[†1], Hasan Momtaz[1]

Original Article

Introduction: Enterobacteriaceae produce the Extended-Spectrum Beta-Lactamases which is considered as an important resistant mechanism of beta-lactam antibiotics. The resistance to beta-lactam antibiotics is the main problem in the bacterial infections therapy. The prevalence of these enzymes changes in different geographical areas and with time. The present study aims to explore the frequency of the extended-spectrum bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, bla_{TEM}, in *Enterobacter aerogenes* isolated from urinary tract infections in Shahrekord City; the mentioned genes were investigated from the phenotypic and genotypic point of view.

Methods: In this cross-sectional descriptive study, antibacterial susceptibility patterns of *50 isolates of Enterobacter aerogenes* to Cefotaxim, Ceftazidim, Cefterixon and cephalotin were tested using disk diffusion (Kirby-Buer) method. In addition, confirmatory tests for detecting ESBLs phenotypes were performed using Ceftazidim-clavulanic acid and Cefotaxim- clavulanic acid combination disks. Then, the presence of bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, bla_{TEM}, genes in the broad-spectrum beta-lactamase producing strains was assessed in the presence of specific primers.

Results: Out of 50 isolates of *Enterobacter aerogenesis* investigated in this study, 32 isolates (64%) were identified to produce broad-spectrum β-lactamases in the phenotypic study of *ESBLS*, and the prevalence of bla_{CTX-M}, bla_{TEM} *and* bla_{SHV} was reported as 30%, 20% and 14%, respectively. In the statistical analysis, a statistically significant correlation was observed between resistance to the antibiotic ceftriaxone and the bla_{CTX-M}, gene ($p<0.05$).

Conclusion: The present study suggests that *ESBL* producing *Enterobacter aerogenes* isolates have a high prevalence. The increase in the number of these species is often caused due to the irrational prescription of antibiotics, which requires the use of new antimicrobial agents and limiting the unnecessary use of antimicrobial agents and increasing the use of infection control tools.

Keywords: *Enterobacter aerogenes*, Extended-Spectrum Beta-lactamases, Antibiotic resistance.

Citation: Shantiaee SH, Tajbakhsh E, Momtaz H. **Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Enzymes in Enterobacter Aerogenes Isolated from Urinary Tract Infections in Shahrekord City.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2022; 30(5): 4887-96.

[1]Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
***Corresponding author: Tel:** 09131841012**, email:** ee_tajbakhsh@yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-08-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i5.10163]