دوره سوم/ شماره چهارم/ بهار ۱۴۰۳/ مقاله پژوهشی/صفحات: ۴۴-۳۱ https://www.qafj.iauk.ac.ir

ردیابی ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} در جدایه‌های *انتروباکتر کلوآکه*

الهه برزم دهکردی[۱]، الهه تاج‌بخش*[۲]، حسن ممتاز[۳]

۱- دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

* نویسنده مسئول: ee_tajbakhsh@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۸/۱۲، پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۳

چکیده

سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* با داشتن عوامل حدت مختلف و مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه، عمدتاً به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شوند. این مطالعه بر روی ۶۵ جدایه *انتروباکتر کلوآکه* صورت گرفت، مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های مورد بررسی و فراوانی ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به‌روش فنوتیپی مطابق دستورالعمل CLSI 2018 با استفاده از روش دیسک ترکیبی و ژنوتیپی، در حضور پرایمرهای اختصاصی بررسی شد. از ۶۵ جدایه *انتروباکتر کلوآکه* ۲۵ ایزوله (۳۸/۲۶ درصد) در بررسی فنوتیپی مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف تشخیص داده شدند که فراوانی ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} به ترتیب ۲۸ درصد، ۳۲ درصد و ۱۰ درصد گزارش گردید. در تجزیه‌وتحلیل آماری بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی و ژن‌های *bla* ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده نگردید. مطالعه حاضر حاکی از آن است که سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* مولد ESBL از شیوع نسبتاً بالایی برخوردارند. افزایش میزان این گونه‌ها غالباً ناشی از تجویز غیرمنطقی آنتی‌بیوتیک‌ها است که رفع این مشکل مستلزم به‌کارگیری عوامل ضدمیکروبی جدید و محدود نمودن استفاده غیرضروری از عوامل ضدمیکروبی و افزایش بهره‌گیری از ابزارهای کنترل عفونت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *انتروباکتر کلوآکه*، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

باکتری‌های موجود در خانواده انتروباکتریاسه به دلیل فراوانی بسیار بالا در جوامع مختلف دارای اهمیت بیش‌تری می‌باشند. از این میان دو جنس *اشریشیا کلی* و *انتروباکتر* به دلیل فراوانی بالا و ایجاد عفونت‌های مختلف دارای اهمیت ویژه‌ای هستند. *انتروباکتر* باسیل گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری به اندازه‌ی ۰/۶ تا ۲ میکرومتر می‌باشند و به‌واسطه دارا بودن فلاژل‌های پری‌تریش متحرک می‌باشند. *انتروباکتر کلوآکه* کومنسال معمول روده بزرگ در انسان و حیوانات است (۱). این باکتری عامل عفونت‌های بسیاری ازجمله آبسه‌های مغزی، پنومونی، مننژیت، سپتی‌سمی، باکتریمی، آرتریت، استئومیلیت، عفونت‌های دستگاه ادراری و عفونت‌های روده‌ای می‌باشد. اگرچه *انتروباکتر* به‌ندرت در افراد سالم ایجاد عفونت می‌کند، اما می‌توانند عامل مهم مرگ‌ومیر و بیماری در افراد مبتلا به نقص ایمنی باشند.

انتروباکتر کلوآکه مسئول ۶۵ تا ۷۵ درصد تمام عفونت‌های ناشی از جنس *انتروباکتر* است. (۲). علائم عفونت‌های *انتروباکتر* اختصاصی نبوده و در سایر باکتری‌های گرم منفی هم وجود دارد. *انتروباکتر* از گونه-های متعددی تشکیل شده است (*انتروباکتر آئروژنز*، *انتروباکتر آمنیجنوس*، *انتروباکتر کانسروجنوس*، *انتروباکتر کلوآکه*، *انتروباکتر کووانی*، *انتروباکتر جورجوریا*، *انتروباکتر اینترمدیوس*، *انتروباکترپیرینوس*). یکی از شایع‌ترین گونه‌های *انتروباکتر*، *انتروباکتر کلوآکه* است. عفونت ناشی از *انتروباکتر کلوآکه* به‌طور شایعی در میان قربانیان سوختگی، بیماران با نقص ایمنی و بیماران با بدخیمی مشاهده شده است (۳). هم‌چنین این باکتری به‌عنوان یکی از مهم‌ترین باکتری‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی به لحاظ وجود مقاومت‌های متقاطع و تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، AmpC بتالاکتاماز و کارباپنمازها در بین جدایه‌های بیمارستانی می‌باشند. روش‌های مولکولی در سال‌های اخیر به‌طور قابل‌توجهی به تشخیص جدایه‌های *انتروباکتر کلوآکه* کمک کرده است (۴). عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان ناشی از این باکتری‌ها ممکن است سبب ایجاد مشکلات درمانی احتمالاً به دلیل آن‌که برخی از این سویه‌ها می‌توانند بتالاکتامازهای مختلف مانند بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نظیر TEM، SHV و دیگر آنزیم‌ها را تولید نمایند. برخی سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* موجود در بیمارستان می-توانند با شرایط بیمارستانی خود را سازگار نموده و در این محیط‌ها زنده بمانند. شیوع بیماری‌های *انتروباکتر کلوآکه* به‌عنوان پاتوژنی فرصت‌طلب افزایش یافته است زیرا سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف در بالینی به‌طور وسیع استفاده می‌شوند و استفاده گسترده از بتالاکتام-های وسیع‌الطیف، آمینوگلیکوزیدها یا فلوروکینولون‌ها به‌عنوان فاکتور خطری برای طغیان‌های متعدد در *انتروباکتر کلوآکه* بوده است (۵). ازآنجاکه تاکنون تحقیقی در مورد میزان شیوع آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد صورت نگرفته است، بر آن شدیم تا به بررسی فراوانی این آنزیم‌ها بپردازیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی – مقطعی می‌باشد که در یک دوره یک‌ساله (از خردادماه ۱۳۹۸ تا خرداد ۱۳۹۹) در شهرستان شهرکرد با همکاری آزمایشگاه‌های تشخیص طبی انجام شده است. ۱۰۰۰ نمونه‌ی مشکوک به عفونت ادراری از مراجعه‌کنندگان به این آزمایشگاه طی یک دوره یک‌ساله جمع‌آوری و آزمایشات لازم جهت بررسی عفونت ادراری و تشخیص *انتروباکتر کلوآکه* انجام شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با کد IR.IAU.SHK.REC.1399.039 تأیید گردید. برای این منظور ۵ تا ۱۰ سی‌سی از نمونه ادرار میانی بیمار (بزرگسالان بالاتر از ۱۸ سال) در ظروف استریل توسط بیمار جمع‌آوری گردید و بلافاصله پس از نمونه‌گیری، نمونه‌های ادرار جهت انجام کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص نوع باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. معیارهای ورود به این مطالعه عدم مصرف آنتی‌بیوتیک خاص و عدم ابتلا به هر نوع بیماری عفونی یا بستری در بیمارستان در مدت دو هفته قبل از مراجعه به آزمایشگاه بود.

جداسازی باکتری

نمونه ادرار میانی گرفته شده در ظرف‌های استریل با استفاده از لوپ کالیبره ۰/۰۱ میلی‌لیتر، در شرایط استریل بر روی محیط بلاد آگار و مک‌کانکی آگار کشت داده شد. پس از انجام کشت به روش خطی، محیط‌های کشت داده شده به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. چنانچه در مدت۲۴ ساعت انکوباسیون رشدی در پلیت‌ها دیده نمی‌شد، ۲۴ ساعت دیگر انکوبه و در صورت عدم رشد، به‌عنوان کشت منفی ثبت می‌شدند. بعد از مدت انکوباسیون تعداد کل

باکتری‌های رشد کرده در نمونه ادرار را از طریق محاسبه CFU در محیط بلاد آگار به دست آورده شد و باسیل‌های گرم منفی ازنظر مورفولوژی در محیط‌های مک‌کانکی آگار و بلاد آگار مورد بررسی قرار گرفتند (۶) .نمونه‌های کشت داده شده ازنظر رنگ‌آمیزی گرم و تخمیر قند لاکتوز مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تشخیص بیوشیمیایی ایزوله‌های *انتروباکترکلوآکه* ، تست‌های بیوشیمیایی از قبیل تولید اندول، واکنش متیل رد، ووژس پروسکائر، سیترات، تولید سولفید هیدروژن، اوره، لایزین دکربوکسیلاز، آرژینین دهیدرولاز، اورنیتین دکربوکسیلاز، حرکت و تولید اسید در اثر تخمیر قندها انجام شد (۷).

شناسایی جدایه‌های *انتروباکتر کلوآکه* تولیدکننده‌ی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف

به‌منظور بررسی سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* تولیدکننده آنزیم‌های ESBL[1] آزمون دیسک ترکیبی[2] انجام شد. در این تست مهار فعالیت ESBLs توسط اسید کلاوولانیک ارزیابی می‌شود و دیسک‌های حاوی سفالوسپورین به تنهایی (سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفپیم) و در ترکیب با اسید کلاوولانیک استفاده می‌شود. هاله اطراف دیسک سفالوسپورین همراه با اسید کلاوولانیک با هاله اطراف دیسک سفالوسپورین به تنهایی مقایسه می‌شود. اگر قطر ناحیه مهاری اطراف دیسک‌های سفالوسپورین همراه با اسید کلاوولانیک بیش از ۵ میلی‌متر، از ناحیه مهاری اطراف دیسک‌های سفالوسپورین به تنهایی بزرگ‌تر باشد، نتیجه مثبت است. برای انجام این تست، مانند تست دیسک دیفیوژن عمل شد. ۲ الی ۳ کلنی از کشت کلنی(۲۴ ساعته) در سرم فیزیولوژی استریل حل شد و بعد از مقایسه با محلول استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، بر روی محیط مولرهینتون آگار کشت انجام شد. از یک دیسک سفتازیدیم (CAZ) (۳۰ میکروگرم) به تنهایی و یک دیسک سفتازیدیم در ترکیب با اسید کلاوولانیک (CAC) (۳۰/۱۰ میکروگرم) و دیسک سفوتاکسیم (CTX) (۳۰ میکروگرم) در کنار دیسک اسید کلاوولانیک (CAC) (۳۰/۱۰ میکروگرم) استفاده گردید. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کشت‌های باکتریایی بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت بررسی شدند و قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های سفالوسپورین همراه و بدون اسیدکلاوولانیک اندازه‌گیری و با هم مقایسه گردیدند. درصورتی‌که قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف هر دیسک به تنهایی در مقایسه با دیسک ترکیبی خود ۵ میلی‌متر یا بیش‌تر بود به‌عنوان سویه تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در نظر گرفته شد. از سویه *اشریشیا کلی* ATCC 25922 و *کلبسیلا پنومونیه* ATCC700603 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران جهت کنترل روش‌های آنتی‌بیوگرام و دیسک ترکیبی استفاده شد (۷).

تعیین هویت مولکولی

به‌منظور تشخیص مولکولی و تأیید جدایه‌های *انتروباکتر کلوآکه*، استخراج DNA با استفاده کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن)[3] و طبق دستور شرکت سازنده صورت گرفت. جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. به این منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده روی ژل یک درصد آگارز الکتروفورز گردید. برای تعیین غلظت DNA، استوک تهیه شده ۱:۱۰۰ رقیق شد. میزان جذب نوری در طول‌موج‌های ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. جذب نوری در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر بیانگر غلظت DNA در نمونه و جذب نوری در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر نشان‌دهنده غلظت پروتئین در نمونه می‌باشد. درصورتی‌که جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ باشد DNA دارای کیفیت خوبی جهت انجام PCR است. پس از خواندن جذب نوری نمونه‌ها، با استفاده از فرمول زیر غلظت DNA تعیین شد (۸).

[1] Extended spectrum beta lactamase (ESBL)
[2] Combination Disk Test (CDT)
[3] DNPTM (CinnaGen)

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

جهت تأیید قطعی وجود *انتروباکتر کلوآکه* در کلونی‌های رشد یافته، از آزمایش PCR جهت ردیابی ژن *hsp60* استفاده شد (۹). در این تحقیق از سویه استاندارد *انتروباکتر کلوآکه* ATCC 23355 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. توالی پرایمر مورد استفاده در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن *hsp60* *انتروباکتر کلوآکه*

ژن	توالی	اندازه محصول	منبع
hsp60	F: GGT AGA AGA AGG CGT GGT TGC R: ATG CAT TCG GTG GTG ATC ATC AG	۳۴۱	۹

جدول ۲- ترکیب اجزای PCR جهت ردیابی ژن *hsp60* *انتروباکتر کلوآکه*

مواد	غلظت نهایی	حجم نهایی
PCR Buffer 10 X	1X	۲/۵ میکرولیتر
dNTPs (10mM)	۰/۲میلی‌مول	۰/۵ میکرولیتر
Mgcl2 (50mM)	۱/۵ میلی‌مول	۰/۷۵ میکرولیتر
PrimerF (25µM)	۱ میکرومول	۱ میکرولیتر
PrimerR (25µM)	۱میکرومول	۱ میکرولیتر
Taq DNAPolymerase (5u/µl)	1U	۰/۲ میکرولیتر
DNA	۵۰ نانوگرم	۱ میکرولیتر
ddH2O	-	۱۸/۰۵ میکرولیتر
حجم نهایی واکنش	-	میکرولیتر

جدول ۳- برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *hsp60* *انتروباکتر کلوآکه*

دما	زمان	مراحل	
۹۵ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه	دناتوراسیون اولیه	
۹۴ درجه سانتی‌گراد	۴۵ ثانیه	دناتوراسیون	۳۰ سیکل
۵۷ درجه سانتی‌گراد	۴۵ ثانیه	اتصال	
۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱ دقیقه	طویل شدن	
۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱۰ دقیقه	تکثیر نهایی	

وجود قطعه ۳۴۱ جفت بازی تکثیر یافته از ژن *hsp60* در این مرحله نشان‌گر وجود قطعی *انتروباکتر کلوآکه* در ایزوله‌های مورد آزمایش بود. محصول PCR در این مرحله بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و از ژل حاصله در حضور نور UV تصویربرداری شد و ثبت گردید.

واکنش PCR جهت ردیابی ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV}

واکنش PCR برای ژن‌های *bla* به‌صورت جداگانه انجام شد. مواد مطابق با جدول (۴) مخلوط شده و واکنش PCR انجام شد (۱۰).

جدول ۴- دستورالعمل بهینه شده روش PCR جهت ردیابی ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV}

مواد	غلظت نهایی	حجم نهایی
PCR Buffer 10 X	1X	۲/۵ میکرولیتر
dNTPs(10mM)	۰/۲ میلی‌مول	۰/۵ میکرولیتر
Mgcl2 (50mM)	۱/۵ میلی‌مول	۰/۷۵ میکرولیتر
PrimerF (10µM)	۱ میکرومول	۳ میکرولیتر
PrimerR (10µM)	۱میکرومول	۳ میکرولیتر
(5u/µl) Taq DNAPolymerase	1.5U	۰/۳ میکرولیتر
ddH2O	-	۱۵/۰۵ میکرولیتر
DNA	۵۰ نانوگرم	۱ میکرولیتر
حجم نهایی واکنش	-	۲۵ میکرولیتر

جدول ۵- برنامه حرارتی برای تکثیر ژن‌های bla_{CTX-M}

دما	زمان	مراحل
۹۴ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه	دناتوراسیون اولیه
۹۵ درجه سانتی‌گراد	۷۰ ثانیه	دناتوراسیون
۵۸ درجه سانتی‌گراد	۶۵ ثانیه	اتصال
۷۲ درجه سانتی‌گراد	۹۰ ثانیه	طویل شدن
۷۲ درجه سانتی‌گراد	۷ دقیقه	تکثیر نهایی

۳۰ سیکل

جدول ۶- برنامه حرارتی برای تکثیر ژن bla_{SHV}

دما	زمان	مراحل
۹۴ درجه سانتی‌گراد	۶ دقیقه	دناتوراسیون اولیه
۹۵ درجه سانتی‌گراد	۷۰ ثانیه	دناتوراسیون
۵۵ درجه سانتی‌گراد	۶۰ ثانیه	اتصال
۷۲ درجه سانتی‌گراد	۹۰ ثانیه	طویل شدن
۷۲ درجه سانتی‌گراد	۸ دقیقه	تکثیر نهایی

۳۰ سیکل

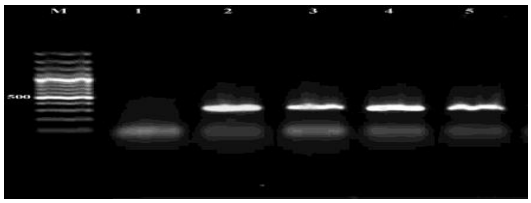
جدول۷- برنامه حرارتی برای تکثیر ژن bla_{TEM}

دما	زمان	مراحل
۹۴ درجه سانتی‌گراد	۶ دقیقه	دناتوراسیون اولیه
۹۵ درجه سانتی‌گراد	۷۰ ثانیه	دناتوراسیون
۵۹ درجه سانتی‌گراد	۶۵ ثانیه	اتصال
۷۲ درجه سانتی‌گراد	۹۰ ثانیه	طویل شدن
۷۲ درجه سانتی‌گراد	۸ دقیقه	تکثیر نهایی

۳۰ سیکل

نتایج

انتروباکتر کلوآکه باسیل گرم منفی لاکتوز مثبت متحرکی است که تست‌های اندول، متیل‌رد و لایزین دکربوکسیلاز در این باکتری منفی می‌باشد ولی تست-های وژس پروسکائر، سیترات، اوره آز، آرژینین دهیدرولاز و اورنیتین دکربوکسیلاز در این باکتری مثبت است. هم‌چنین این باکتری قادر به تولید سولفید هیدروژن نمی‌باشد ولی قادر به تخمیر قند سوربیتول می‌باشد. پس از کشت نمونه‌های ادرار، بر روی محیط بلاد آگار درنهایت ۳۰۰ نفر به‌عنوان افراد مبتلا به عفونت ادراری تشخیص داده شدند و پس انجام تست‌های تأییدی بیوشیمیایی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی ژن *hsp60*، ۶۵ جدایه *انتروباکتر کلوآکه* (۲۱/۶۶ درصد) جداسازی شد، که از این تعداد ۵۰ جدایه مربوط به بیماران زن (۷۶/۹۲ درصد) و ۱۵ جدایه (۲۳ درصد) مربوط به بیماران مرد مبتلا به عفونت ادراری بود.



شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز ژن *hsp60* ایزوله‌های *انتروباکتر کلوآکه*: ستون M مارکر، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت، ستون‌های ۳ تا ۵ : تعدادی از نمونه‌های مثبت مورد بررسی

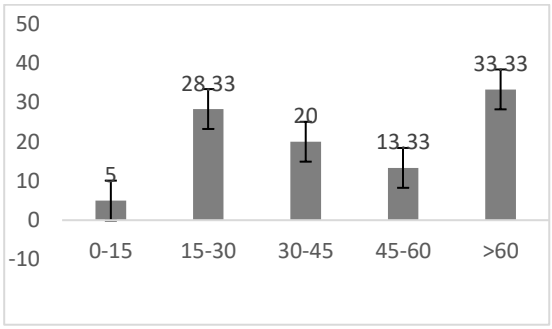
از تعداد ۶۵ جدایه *انتروباکتر کلوآکه* تأیید شده توسط تست‌های بیوشیمیایی، ۵۰ جدایه مربوط به بیماران زن (۷۶/۹۲ درصد) و ۱۵ جدایه مربوط به بیماران مرد (۲۳ درصد) مبتلا به عفونت ادراری بودند. در مطالعه حاضر بین جنسیت افراد و ابتلا به عفونت ادراری بر اساس آزمون مربع کای ارتباط معنی‌دار آماری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

جدول ۸- فراوانی *انتروباکتر کلوآکه* جدا شده از موارد عفونت ادراری بر اساس جنسیت

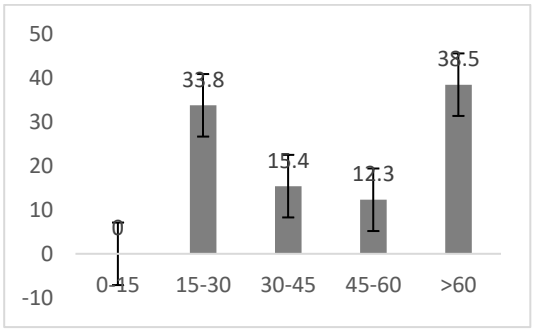
جنس	زن	مرد	کل
تعداد	۵۰	۱۵	۶۵
درصد	۷۶/۹۰	۲۳/۱	۱۰۰

در توزیع سنی بیماران مبتلا به عفونت ادراری بر اساس نمودار (۱) در افراد بالای ۶۰ سال فراوانی عفونت بیش‌تر از سایر سنین بود و هم‌چنین عفونت ادراری در سنین ۳۰ -۱۵ سالگی در رتبه بعد قرار داشت. در تجزیه‌وتحلیل آماری با آزمون مربع کای بین گروه سنی و عفونت ادراری رابطه معنی‌داری مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$). در گروه سنی ۳۰-۱۵ و ۶۰ سال بیشترین

میـزان آلـودگی بـه *انتروباکتر کلوآکـه* مشـاهده گردیـد (نمودار ۲).

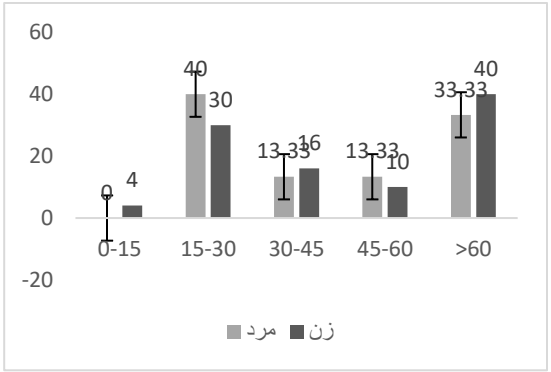


نمودار ۱- توزیع سنی بیماران مبتلا به عفونت ادراری



نمودار ۲- فراوانی آلودگی به *انتروباکتر کلوآکه* در گروه‌های سنی مختلف بیماران مبتلا به عفونت ادراری

ارتباط بین گروه سنی و آلودگی به *انتروباکتر کلوآکه* بـه تفکیک جنسیت و گروه سنی نشان داد که بین آلـودگی به این باکتری و جنسیت با گـروه سـنی ارتبـاط آمـاری معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰۵).



نمودار ۳- میزان آلودگی به *انتروباکتر کلوآکه* در گروه‌های سنی مختلف به تفکیک جنس

بررسی ارتباط بین سابقه ابتلا به دیابت و عفونـت ادراری و عفونت ادراری مجدد نشان می‌دهـد کـه بـین عفونـت ادراری و ابتلا به دیابت و عفونت ادراری مجـدد رابطـه‌ی معنی‌داری وجود دارد (جدل ۹ و ۱۰).

جدول ۹- ارتباط بین سابقه ابتلا به دیابت و عفونت ادراری

سابقه ابتلا به دیابت	تعداد	درصد
افراد مبتلا به دیابت	۳۵	۵۳/۸۴
افراد غیر دیابتی	۳۰	۴۶/۱۵
مجموع	۶۵	۱۰۰

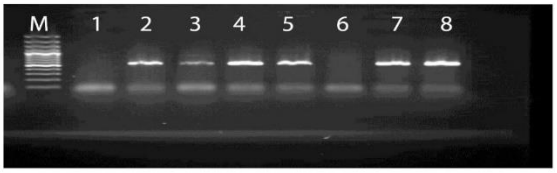
جدول ۱۰- بررسی ارتباط بین سابقه ابتلا به عفونت ادراری و عفونت ادراری مجدد

سابقه ابتلا به عفونت ادراری	تعداد	درصد
افراد بدون سابقه ابتلا به عفونت ادراری	۲۰	۳۰/۷۶
افراد با سابقه ابتلا به عفونت ادراری	۴۵	۶۹/۲۳
مجموع	۶۵	۱۰۰

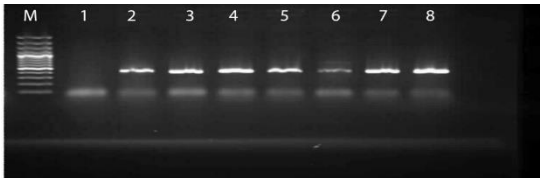
از ۶۵ ایزوله *انتروباکتر کلوآکه* جدا شده از موارد عفونـت ادراری ۲۵ ایزولـه (۳۸/۲۶ درصـد) در بررسـی فنـوتیپی مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف تشخیص داده شدند. در بررسی مولکولی ۷ ایزوله (۲۸ درصد) دارای ژن $bla_{\text{CTX-M}}$ ، ۸ ایزولـه (۳۲ درصـد) دارای ژن bla_{TEM} و ۱۰ ایزولـه (۴۰ درصد) دارای ژن bla_{SHV} بودند. بـه‌عـلاوه برخـی از ایزوله‌ها نیز بیش از یک ژن مقاومت داشتند، به‌طوری‌که شـیوع همزمـان ژن‌هـای bla_{TEM} و bla_{SHV} در ۱ ایزولـه (۴ درصد) و شیوع همزمان ژن‌هـای bla_{SHV} و $bla_{\text{CTX-M}}$ در ۲ ایزولـه (۸ درصـد) و فراوانـی ژن‌هـای $bla_{\text{CTX-M}}$ و bla_{TEM} در ۴ ایزوله (۱۶ درصد) گزارش گردید.

جدول ۱۱- فراوانی ژن‌های bla_{CTX-M} ، bla_{TEM} و bla_{SHV} در ایزوله‌های مورد بررسی

ژن بتالاکتاماز	bla_{CTX-M}	bla_{TEM}	bla_{SHV}
سفتریکسون	۳	۴	۵
	۴۲/۸۵ درصد	۵۰ درصد	۵۰ درصد
سفتازیدیم	۱	۱	۱
	۱۴/۲۸ درصد	۱۲/۵ درصد	۲۰ درصد
سفوتاکسیم	۲	۲	۳
	۲۸/۵۷ درصد	۳۷/۵ درصد	۶۰ درصد
سفالوتین	۱	۱	۱
	۱۴/۲۸ درصد	۱۲/۵ درصد	۲۰ درصد



شکل ۲- ژل الکتروفورز محصول PCR ژن bla_{CTX-M}, در ایزوله‌های *انتروباکتر کلوآکه*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت، ستون‌های ۵-۳ و ۷ و ۸ نمونه‌های مثبت واجد ژن bla_{CTX-M},



شکل ۳- ژل الکتروفورز محصول PCR ژن bla_{TEM}, در ایزوله‌های *انتروباکتر کلوآکه*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت، ستون‌های ۳ تا تعدادی از نمونه‌های مثبت

بحث

عفونت‌های باکتریایی به‌عنوان یک عامل تهدیدکننده جدی برای سلامت افراد جامعه محسوب می‌شود که سالانه میلیون‌ها نفر را درگیر می‌کند و در بیماران سرپایی و بیماران بستری در بیمارستان ایجاد می‌شود (۱۱). بر اساس آمار سازمان‌های جهانی، سالانه ۱۷ تا ۲۹ میلیارد دلار صرف هزینه درمان عفونت‌های بیمارستانی می‌شود که از این مبلغ ۳۹ درصد مربوط به هزینه‌های ایجاد شده ناشی از عفونت‌های ادراری می‌شود. 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، فشارخون، اورمی و زایمان زودرس در زنان باردار شود عفونت‌های دستگاه ادراری شامل سیستیت و پیلونفریت به‌طور رایج در بیمارستان وجود دارند. در میان پاتوژن‌های ایجادکننده عفونت‌های ادراری، *اشریشیا کلی* پاتوژن غالب بوده که نزدیک به ۸۰ درصد عفونت‌ها را ایجاد می‌کند. البته پاتوژن‌های دیگری نیز در عوارض ناشی عفونت‌های ادراری نقش دارند، که می‌توان به *سودوموناس آئروژینوزا*، *اسینتوباکتر*، *کلبسیلا پنومونیه*، *انتروکوکوس* و *انتروباکتر* اشاره کرد (۱۲). بررسی عوامل عفونت ادراری در هر منطقه به پزشک کمک می‌کند تا دانش خود را در زمینه شناخت عوامل مسبب عفونت ادراری و پروفایل حساسیت ضدمیکروبی آن‌ها به‌روز نموده و درمان تجربی مناسبی را انتخاب نماید. باکتری‌های موجود در خانواده انتروباکتریاسه به دلیل فراوانی بسیار بالا در جوامع مختلف دارای اهمیت بیشتری می‌باشند. از این میان دو جنس *اشریشیا کلی* و *انتروباکتر* دارای اهمیت ویژه‌ای هستند (۱۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از بین ۱۰۰۰ نمونه ادرار افراد مشکوک به عفونت ادراری کشت داده شده بر روی محیط مک‌کانکی و بلاد آگار که از آزمایشگاه تشخیص طبی مهر شهرستان شهرکرد جمع‌آوری شده بود، تعداد ۳۰۰ نمونه مبتلا به عفونت ادراری بودند، که از این میان ۶۵ نمونه به‌عنوان *انتروباکتر کلوآکه* شناسایی شدند و از ۶۵ جدایه ۵۰ جدایه (۷۶/۹۲ درصد) مربوط به بیماران زن و ۱۵ جدایه (۲۳ درصد) مربوط به بیماران مرد بود. در این راستا می‌توان به مطالعات زیر اشاره نمود. در مطالعه انجام شده توسط ترشیزی و همکاران در سال

۲۰۱۱، که بر روی ۳۲۵ نمونه انتروباکتریاسه جدا شده از نمونه‌های کلینیکی در شهرستان شهرکرد صورت گرفت، ۱۹۳ ایزوله (۵۹/۴ درصد) 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 دادند (۷). در مطالعه شاه‌صفی و همکاران در سال ۲۰۱۸، که به‌منظور بررسی شیوع و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های گرم منفی جدا شده از عفونت ادراری در بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه در شهرستان نکا در سال ۲۰۱۸ انجام شد، مشخص گردید جنس *انتروباکتر* عامل ۱۲ درصد موارد بروز عفونت ادراری می‌باشد (شاه‌صفی و همکاران، ۲۰۱۸). در تحقیقات متعدد عوامل شایع عفونت ادراری متفاوت گزارش شده است که می‌تواند به دلایل متعدد ازجمله موقعیت جغرافیایی، تعداد نمونه اخذ شده، جنسیت و سن بیماران، سابقه عفونت ادراری قبلی و یا حتی سابقه ابتلا به دیابت باشد (۱۴). در مطالعه حاضر، متغیرهای جنسیت، سن بیماران، سابقه عفونت ادراری و دیابت مورد بررسی قرار گرفت. آنالیزهای آماری در این مطالعه نشان دادند که تمام متغیرهای مورد بررسی ارتباط معنی‌داری با عفونت ادراری دارند. در مطالعه دادمنش و همکاران در سال ۲۰۰۸، مطالعه اثر فاکتورهای مختلف سن، جنس، وضعیت تأهل، استفاده از سوند، مدت‌زمان استفاده از سوند، سابقه عفونت دستگاه ادراری قبلی، مصرف سیگار، سابقه انسداد دستگاه ادراری و دستکاری مجاری ادرار در ایجاد عفونت مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۸۸ بیمار مورد بررسی قرار گرفت و از این میان ۴۶/۶ درصد مرد و ۵۳/۴ درصد زن با میانگین سنی ۶۴ سال بودند. نسبت افراد متأهل به مجرد ۸۹/۸ به ۱۰/۲ درصد و نسبت افراد مبتلا به دیابت به غیرمبتلا ۳۰/۷ به ۶۹/۳ درصد و نسبت افرادی که از سوند استفاده کردند ۷۹/۵ به ۲۰/۵ درصد گزارش شد. ۲۶/۱ درصد سابقه عفونت ادراری قبلی ۹/۱ درصد سابقه انسداد دستگاه ادراری و ۴ درصد سابقه دستکاری مجاری ادراری و ۱۰ درصد سابقه مصرف سیگار داشتند. میانگین روزهای استفاده از سوند ۱۲ روز بوده است. بین عفونت ادراری، وجود سوند، سابقه عفونت ادراری قبلی، دیابت، جنسیت، مدت‌زمان بستری و مدت‌زمان استفاده از سوند و سن رابطه معنی‌داری برقرار بود (۱۵). مطالعه ادوکی و همکاران در سال ۲۰۱۹، به‌منظور تعیین شیوع عفونت ادراری با جداسازی و شناسایی عوامل مختلف باکتریایی و ارزیابی عوامل مرتبط با عفونت ادراری طراحی شده است. این مطالعه نشان داد که سن بیش‌تر از ۱۹ سال، جنسیت زن، افراد متأهل، ناهنجاری‌های دستگاه تناسلی ادراری، دیابت، بستری شدن در بیمارستان، کاتتر ساکن کم‌تر از ۶ روز و کاتتر ساکن بیش از ۶ روز با عفونت ادراری ارتباط آماری معنی‌داری داشتند (۱۶). وجود مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در پاتوژن‌های بیمارستانی یکی از نگرانی‌های بزرگ و اساسی علم پزشکی است. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جدید و گسترش باکتری‌های مقاوم نه تنها بین بیماران بستری در بیمارستان بلکه در بین افراد جامعه از پیامدهای این معضل است (۱۷). بسیاری از باکتری‌های خانواده‌ی انتروباکتریاسه از عوامل شایع عفونت‌های ادراری بوده و مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در این باکتری‌ها شده است که مقاومت آن‌ها به بتالاکتام‌ها (مثل آمپی‌سیلین و سفوتاکسیم) و نیز سایر آنتی‌بیوتیک‌های دیگر مثل کوتریموکسازول و سولفونامیدها در بسیاری از مناطق دنیا گزارش شده است (۱۸). مطالعات نشان می‌دهد صرف‌نظر از الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند در ایجاد مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها نقش داشته باشند. در سال‌های اخیر استفاده از طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف ازجمله سفالوسپورین‌ها، کینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها از تدابیر درمانی مناسب به‌منظور کنترل بیماری‌های عفونی در افراد مختلف می‌باشد و به دلیل استفاده زیاد از داروهای آنتی‌میکروبی، شیوع و انتشار کلون‌های مقاوم و ژن‌های مقاومت در بیمارستان‌ها افزایش یافته است. بنابراین، بررسی الگوی مقاومت ضدمیکروبی باکتری

عامل عفونت‌های ادراری ضروری به نظر می‌رسد. در تحقیق مولازاده و همکاران در سال ۲۰۱۴ که بر روی ۲۴۸۴ نمونه‌ی کشت مثبت ادرار انجام شد، *اشریشیا کلی* در رتبه اول با فراوانی ۶۹/۱ درصد، کلبسیلا در رتبه‌ی دوم با فراوانی ۱۶/۲ درصد و انتروباکتر در رتبه سوم با فراوانی ۵/۶ درصد شناخته شدند. در ایزوله‌های انتروباکتر بالاترین حساسیت در برابر سیپروفلوکساسین (۸۰ درصد) و بیش‌ترین مقاومت نسبت به سفالوتین (۶۵/۱ درصد) بود (۱۹). در مطالعه‌ای که توسط بیانی و همکاران[1] در سال ۲۰۱۳ در شهرستان بابل بر روی ۳۰ ایزوله *انتروباکتر کلوآکه* انجام شد، در بین ایزوله‌های *انتروباکتر* بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به سفتازیدیم گزارش شد (۲۰). نتایج حاصل از تحقیق ما حاکی از آن بود که بیش از ۵۰ درصد نمونه‌ها دارای مقاومت چند دارویی (MDR) بودند. بیش‌ترین مقاومت نسبت به کوتریموکسازول در ۵۵ ایزوله (۸۴/۶۲ درصد) و کم‌ترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتئین در ۱۵ جدایه (۲۳/۸ درصد) گزارش شد. این نتایج با دیگر مطالعات کم‌وبیش هم‌خوانی دارد. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر اساس الگوهای درمانی که در مناطق مختلف صورت می‌گیرد، متفاوت است که می‌تواند به دلایل متعدد ازجمله موقعیت جغرافیایی، تعداد نمونه اخذ شده، منشأ نمونه و سلیقه تجویز پزشکان در یک منطقه خاص باشد. بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در دو دهه اخیر افزایش قابل‌ملاحظه‌ای داشته‌اند. این باکتری‌ها به علت غیرفعال‌سازی طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام به‌ویژه‌ی نسل سوم سفالوسپورین‌ها و مونوباکتام‌ها، مشکلات فراوانی را برای درمان ایجاد کرده‌اند (۲۱). پیدایش و انتشار این باکتری‌ها به نظر می‌رسد که غالباً ناشی از استفاده گسترده داروهای بتالاکتام وسیع‌الطیف در بخش‌های مختلف بیمارستان باشد به‌طوری‌که امروزه شاهد افزایش روزافزون باکتری‌های تولیدکنندهٔ ESBL هستیم. عفونت با پاتوژن‌های تولیدکننده ESBLs اغلب همراه با شکست درمان، طولانی‌تر شدن زمان بستری، نرخ بالای مرگ‌ومیر و هزینه‌های بالای درمان همراه است. به‌علاوه، همانند عفونت‌های بیمارستانی، در جامعه نیز انتشار وسیعی از انتروباکتریاسه‌های تولیدکننده ESBLs وجود دارد که نتیجه آن بحران سلامت جهانی است (۲۲). ژن‌های ESBLs اغلب روی پلاسمید قرار دارند و متعلق به بتالاکتامازهای گروه A هستند. ارگانیسم‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از لحاظ بالینی بسیار بااهمیت هستند، زیرا الگوی مقاومت دارویی گسترده‌ای از خود نشان می‌دهند و باعث افزایش مرگ‌ومیر بیماران به‌ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌ها می‌شوند. 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 بیش‌ترین میزان شیوع در مصر (۳۸/۵ درصد) و یونان (۲۷/۴ درصد) و تولید بتالاکتاماز بین ایزوله‌های *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و گونه‌های *انتروباکتر* به ترتیب ۵/۴، ۱۸/۲ و ۸/۸ درصد ذکر شده است.. در مطالعه‌ای که توسط بورورییس و همکارانش در سال ۲۰۱۳، بر روی ۸ جدایه *انتروباکتر کلوآکه* مقاوم به سفوتاکسیم برای بررسی حضور ژن $bla_{CTX-M-21}$ صورت گرفت، ۵ نمونه (۶۲/۵ درصد) دارای ژن bla_{OXA-1} بودند (۲۳). در مطالعه‌ای که روکوتورینیا و همکارانش[2] در سال ۲۰۱۳، در ماداگاسکار بر روی ۱۴ ایزوله *انتروباکتر کلوآکه* تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف که دارای مقاومت چند دارویی بودند صورت گرفت، ۲ ایزوله *انتروباکتر کلوآکه* (۱۴/۲۸ درصد) دارای ژن bla_{OXA-1} بودند (روکوتورینیا و همکاران، ۲۰۱۳). در تحقیق انجام شده توسط نادری‌فر و همکاران در سال ۲۰۱۲ که بر روی ۱۰۰ نمونه ادراری جمع‌آوری شده در مشهد صورت گرفت، گونه‌های باکتریایی شناسایی شده در میان ایزوله‌های انتروباکتریاسه عبارت بودند از: *اشریشیا کلی* ۶۵ درصد، *کلبسیلا پنومونیه* ۱۹ درصد، گونه‌های یرسینیا ۷ درصد، *انتروباکتر کلوآکه* ۵ درصد، گونه‌های

[1] Bayani et al

[2] Rakotonirina et al

پروتئوس ۵ درصد و سیتروباکتر دایورسوس ۲ درصد گزارش شدند که ۲۷ ایزوله (۲۷ درصد) تولیدکننده بتالاکتاماز بودند (نادرفر و همکاران، ۲۰۱۲). در مطالعه انجام شده توسط ترشیزی و همکاران در سال ۲۰۱۱، که بر روی ۳۲۵ نمونه انتروباکتریاسه جدا شده از نمونه‌های کلینیکی در شهرستان شهرکرد صورت گرفت، 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* (۱۹/۷درصد) بعد از آن در ایزوله‌های انتروباکتر و کلبسیلا به ترتیب ۱۵/۴ درصد و ۴ درصد به دست آمد (۷). در تحقیق انجام شده توسط اکبری و همکاران در سال ۲۰۱۴ که به‌منظور بررسی شیوع انتروباکتریاسه‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز با طیف وسیع در نمونه ادرار بیماران صورت گرفت، ۴۰۰ ایزوله انتروباکتریاسه با روش‌های معمول بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند. آزمون تأییدی برای تولید *ESBLs* توسط تست دیسک ترکیبی انجام شد. میزان تولید *ESBLs* در ایزوله‌های انتروباکتریاسه (۳۶/۷۵ درصد) گزارش گردید. در این تحقیق ۱۵ ایزوله انتروباکتر شناسایی شد و تولید *ESBLs* در ایزوله‌های انتروباکتر ۲/۷۲ درصد گزارش شد (۲۴). در مطالعه ما از مجموع ۶۵ ایزوله انتروباکتر کلوآکه مورد بررسی به روش دیسک ۲۵ ایزوله، (۳۸/۴۶ درصد) مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف تشخیص داده شدند. در مطالعاتی که در ایران و سراسر دنیا با روش مشابه صورت گرفته است، نتایج متفاوتی ازنظر میزان تولید *ESBLs* در انتروباکتریاسه‌ها را نشان داده است. میزان شیوع باکتری مولد *ESBLs* 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 (۲۵). تحلیل نتایج فوق نشان‌دهنده این مطلب خواهد بود که شیوع ژن‌های بتالاکتاماز در ایزوله‌های جدا شده از کشورهای مختلف و یا مناطق گوناگون متفاوت است و این امر مرتبط با سیستم کنترل درمانی و رژیم‌درمانی مورد استفاده در هر منطقه و بیمارستان نیز خواهد بود. امروزه بیش‌ترین تمرکز در مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر روی باکتری‌هایی است که از نمونه‌های بالینی (پزشکی و دامپزشکی) جدا می‌شوند. تحقیقات نشان می‌دهد که باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در همه جای طبیعت وجود دارند. به‌طوری‌که شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در فاضلاب‌های مراکز پزشکی، صنعتی و مراکز پرورش حیوانات گزارش شده است. این محیط‌ها اغلب حاوی غلظت بالایی از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد و انتقال افقی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این محیط‌ها به‌راحتی صورت می‌گیرد (۲۶). نگرانی بسیار مهم مربوط به انتقال ژن‌های مقاومتی به محیط‌زیست می‌باشند. تداوم و انتشار باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در محیط‌های آبی طبیعی ممکن است به افزایش عفونت پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کمک کند. با تداوم و انتشار این باکتری‌ها انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی به باکتری‌های دیگر صورت می‌گیرد. به این ترتیب انتقال ژن‌های مقاومت در پاتوژن‌ها به سهولت در حال افزایش می‌باشد. به نظر می‌رسد باکتری‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک در درجه اول از محیط‌هایی جداسازی می‌شوند که استفاده از آنتی‌بیوتیک در آن محیط‌ها مثل بیمارستان‌ها زیاد می‌باشد (۲۷).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر برای اولین‌بار در ایران به‌منظور ارزیابی میزان شیوع، خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های حدت و تایپینگ مولکولی سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* جدا شده از موارد عفونت ادراری انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* از شیوع نسبتاً بالایی در نمونه‌های ادرار برخوردار بودند که بسیار قابل‌توجه است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان، صمیمانه از زحمات معاونت محترم پژوهشی و جناب آقای مهندس منوچهر مؤمنی تشکر و قـدردانـی به عمل می‌آورند.

References

1. Medina M, Castillo-Pino E. An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. Therapeutic advances in urology. 2019; 11:1756287219832172.
2. Annavajhala MK, Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. Multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* complex emerging as a global, diversifying threat. Frontiers in microbiology. 2019; 10:44.
3. Ioannou P, Vamvoukaki R, Kofteridis DP. Infective endocarditis by *Enterobacter cloacae*: a systematic review and meta-analysis. Journal of Chemotherapy. 2022; 34(1):1-8.
4. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. Pathogens. 2021; 10(10):1310.
5. Aoki K, Harada S, Yahara K, Ishii Y, Motooka D, Nakamura S, Akeda Y, Iida T, Tomono K, Iwata S, Moriya K. Molecular characterization of IMP-1-producing *Enterobacter cloacae* complex isolates in Tokyo. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2018; 62(3):10-128.
6. Kaur J, Chopra S, Mahajan G. Modified double disc synergy test to detect ESBL production in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR. 2013; 7(2):229.
7. Torshizi R, Zamanzad B, Mokhtareyan K, Karimi A. Determination of CTX-M genes in enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase using PCR method. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences. 13(3): 9-17.
8. Klymus KE, Merkes CM, Allison MJ, Goldberg CS, Helbing CC, Hunter ME, Jackson CA, Lance RF, Mangan AM, Monroe EM, Piaggio AJ. Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. Environmental DNA. 2020; 2(3):271-82.
9. Hoffmann H, Roggenkamp A. Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. Applied and Environmental Microbiology. 2003; 69(9):5306-18.
10. Rizi KS, Peerayeh SN, Bakhshi B, Rahbar M. Prevalence of integrons and antimicrobial resistance genes among clinical isolates of *Enterobacter* spp. from hospitals of Tehran. Int J Enteric Pathog. 2015; 3(1): e22531.
11. Makabenta JM, Nabawy A, Li CH, Schmidt-Malan S, Patel R, Rotello VM. Nanomaterial-based therapeutics for antibiotic-resistant bacterial infections. Nature Reviews Microbiology. 2021; 19(1):23-36.
12. Amini FA, Vaziri SI, Karimpour HA, Hassani S, Mohamadi S, Azizi MO. Antibiotic resistance pattern of urinary tract infection pathogens in children of Kermanshah in 2015. Razi Journal of Medical Sciences. 24(155):20-27.
13. Magruder M, Edusei E, Zhang L, Albakry S, Satlin MJ, Westblade LF, Malha L, Sze C, Lubetzky M, Dadhania DM, Lee JR. Gut commensal microbiota and decreased risk for Enterobacteriaceae bacteriuria and urinary tract infection. Gut microbes. 2020; 12(1):1805281.
14. Zare F, Mohammadzadeh Rostami F, Shahsafi M. Prevalence and pattern of antibiotic resistance of gram-negative bacteria isolated from urinary tract infections in patients referring to Neka

Laboratories-Iran. International Journal of Biomedicine and Public Health. 2018; 1(1):30-6.
15. Dadmanesh M, Dormanesh B, Ghasemzadeh S, Ghorban KH, Zahirian SH. Evaluation of nosocomial urinary tract infection in the intensive care unit patients at Tehran 501 hospital during 2007. Journal of Annals of Military and Health Sciences Research.4:1407-10.
16. Odoki M, Almustapha Aliero A, Tibyangye J, Nyabayo Maniga J, Wampande E, Drago Kato C, Agwu E, Bazira J. Prevalence of bacterial urinary tract infections and associated factors among patients attending hospitals in Bushenyi district, Uganda. International Journal of Microbiology. 2019; 2019(1):4246780.
17. Yelin I, Snitser O, Novich G, Katz R, Tal O, Parizade M, Chodick G, Koren G, Shalev V, Kishony R. Personal clinical history predicts antibiotic resistance of urinary tract infections. Nature medicine. 2019; 25(7):1143-52.
18. Yang Q, Zhang H, Yu Y, Kong H, Duan Q, Wang Y, Zhang S, Sun Z, Liao K, Gu L, Jiang X. In vitro activity of imipenem/relebactam against Enterobacteriaceae isolates obtained from intra-abdominal, respiratory tract, and urinary tract infections in China: Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), 2015–2018. Clinical Infectious Diseases. 2020; 71(4): S427-35.
19. Molazade A, Shahi A, Gholami MS, Najafipour S, Mobasheri F, Jafari S, Ashraf Mansuri JA. The antibiotic resistance pattern of gram-negative bacilli isolated from urine cultures of adult outpatients admitted to ValiAsr Hospital of Fasa Clinical Laboratory in 2012-13. Pars Journal of Medical Sciences. 2022; 12(3):22-15.
20. Bayani M, Siadati S, Rajabnia R, Taher AA. Drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae* isolated from ICU, Babol, and Northern Iran. International Journal of Molecular and Cellular Medicine. 2013; 2(4):204.
21. Wang G, Zhu Y, Feng S, Wei B, Zhang Y, Wang J, Huang S, Qin S, Liu X, Chen B, Cui W. Extended-spectrum beta-lactamase-producing
Enterobacteriaceae related urinary tract infection in adult cancer patients: a multicenter retrospective study, 2015–2019. BMC Infectious Diseases. 2023; 23(1):129.
22. Ahn ST, Lee HS, Lee DH, Kim JW, Park MG, Park HS, Moon DG, Oh MM. What are the risk factors for recurrent UTI with repeated ESBL-producing Enterobacteriaceae? A retrospective cohort study. Journal of Infection and Chemotherapy. 2023; 29(1):72-7.
23. Bourouis A, Chihi H, Mahrouki S, Ayari K, Moussa MB, Belhadj O. Molecular characterization of a transferable blaCTX-M-28 gene in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. J Microbiol Antimicrob. 2013; 5(4):38-43.
24. Akbari M, Amir Mozaffari N, Peeri Dogaheh H. Prevalence of extended-spectrum beta lactamase in Entrobacteriaceae isolated from urinary tract infections in Ardabil, Iran. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2014; 14(3):285-91.
25. Khademi F, Vaez H, Neyestani Z, Sahebkar A. Prevalence of ESBL-Producing Enterobacter Species Resistant to Carbapenems in Iran: A systematic review and meta-analysis. International journal of microbiology. 2022; 2022(1):8367365.
26. Delory T, Gravier S, Le Pluart D, Gaube G, Simeon S, Davido B, Piet E,

Lepeule R, Lesprit P, Lafaurie M. Temocillin versus carbapenems for urinary tract infection due to ESBL-producing Enterobacteriaceae: a multicenter matched case-control study. International Journal of Antimicrobial Agents. 2021; 58(1):106361.

Al Mana H, Sundararaju S, Tsui CK, Perez-Lopez A, Yassine H, Al Thani A, Al-Ansari K, Eltai NO. Whole-genome sequencing for molecular characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae causing lower urinary tract infection among pediatric patients. Antibiotics. 2021; 10(8):972.

Vol.3/No.4/ Spring 2024/Pages: 31-44 https://www.qafj.iauk.ac.ir

Detection of *bla$_{CTX-M}$*, *bla$_{TEM}$* and *bla$_{SHV}$* genes in *Enterobacter cloacae* isolates

Elahe Barzam Dehkordi[1], Elahe Tajbakhsh*[2], Hasan Momtaz[3]

1. Ph.D., Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

*Corresponding Author: ee_tajbakhsh@yahoo.com

Received: 03/11/2023, Accepted: 24/12/2023

Abstract

Enterobacter cloacae strains, with having different virulence factors and multiple antibiotic resistances, are mainly considered as an opportunistic pathogen in nosocomial infections. The aim of this study was to determine the antibiotic resistance pattern of *Enterobacter aerogenes* isolates isolated from urinary tract infections in Shahrekord city and to detect broad-spectrum beta-lactamase *(SHV-CTX, TEM)* genes in these strains. In this study, 65 *Enterobacter cloacae* strains were studied. The antibiotic resistance of the isolates and the frequency of broad-spectrum beta-lactamase genes were studied phenotypically according to CLSI by instructions using a combined disk and genotypic method in the presence of specific primers. Out of 65 isolates of *Enterobacter cloacae*, 25 isolates (38.26%) were found to produce *ESBLs* in the phenotypic study, and the frequency *of bla$_{CTX}$-M, bla$_{TEM}$* and *bla$_{SHV}$* genes was reported as 28%, 32% and 10%, respectively. In the statistical analysis, no significant statistical relationship was observed between resistance to the antibiotics and *bla* genes. The present study indicates high prevalence *ESBLs* producing *Enterobacter cloaca*e strains. The present study suggests that *ESBL* producing *Enterobacter cloaca*e isolates have a high prevalence. The increase in the number of these species is often due to the irrational administration 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 cloacae*, ESBLs, Antibiotic resistance