

# شناسایی ژن‌های مقاومت $qacF$ , $qacE$ , $qacG$ , $qacE\Delta 1$ در اشریشیاکلی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) به بنزالکونیوم کلراید

فروزان حدادی (MSc)، احسان‌الله غزنوی‌راد (PhD)، امیر الماسی حشینی (PhD)، حمید ابطی (PhD)\*

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۲- مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۳- مرکز تحقیقات طب سنتی و مکمل، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

دریافت: ۹۷/۱۱/۶، اصلاح: ۹۸/۲/۵، پذیرش: ۹۸/۴/۱۰

## خلاصه

**سابقه و هدف:** ژن‌های مقاومت ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی (QAC=Quaternary Ammonium Compounds) در ایجاد مقاومت باکتری‌های گرم منفی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL=Extended-spectrum beta-lactamase) به مواد گندزدا نقش مهمی ایفا می‌کنند. این مطالعه به منظور شناسایی ژن‌های مقاومت  $qacF$ ,  $qacE$ ,  $qacG$ ,  $qacE\Delta 1$  در اشریشیاکلی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) به بنزالکونیوم کلراید انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه مقطعی روی ۱۵۰ نمونه بالینی بیمارستان‌های منتخب اراک انجام شد. با استفاده از روش‌های فنوتیپی دیسک دیفیوژن و دیسک‌های ترکیبی و بررسی ژن‌های SHV, TEM, CTXM1، توسط روش‌های ژنوتیپی، سویه‌های ESBL شناسایی شدند. همچنین PCR برای تعیین ژن‌های مقاومت  $qacF$ ,  $qacE$ ,  $qacG$ ,  $qacE\Delta 1$  و الکتروفورز محصولات PCR و حداقل غلظت مهاری (Minimum inhibitory concentration - MIC) بنزالکونیوم-کلراید نسبت به اشریشیاکلی تولیدکننده ESBL انجام شد. الگوی آنتی‌بیوتیکی، اشریشیاکلی (ESBL)، ژن‌های مقاومت آمونیوم چهارظرفیتی و MIC بنزالکونیوم کلراید بررسی شدند.

**یافته‌ها:** ۶۰ درصد اشریشیاکلی‌ها، تولیدکننده ESBL بودند. ژن مقاومت  $qacE\Delta 1$  در همه آن‌ها مشاهده شد و ژن‌های مقاومت  $qacF$ ,  $qacE$ ,  $qacG$  در هیچکدام از سویه‌ها دیده نشد. در سویه‌ها حداقل غلظت مهاری بین ۳۲ تا ۶۴ میلی‌گرم در لیتر برای بنزالکونیوم کلراید بدست آمد. مقاومت به کارباپنم‌ها (۳۳/۳۳ درصد) مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که ژن مقاومت  $qacE\Delta 1$  و مقاومت به ماده گندزدا بنزالکونیوم کلراید افزایش یافته‌است همچنین افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در سویه‌های اشریشیاکلی ESBL مشاهده شد.

**واژه‌های کلیدی:** اشریشیاکلی، بتالاکتاماز، بنزالکونیوم کلراید، گندزدا.

## مقدمه

بتالاکتامازها آنزیم‌هایی هستند که با هیدرولیز حلقه بتالاکتام موجب بی‌اثرکردن این آنتی‌بیوتیک‌ها و در نتیجه سبب بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شوند. دسته جدیدی از این آنزیم‌ها به نام بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف هستند که ژن کدکننده آنها بر روی پلاسمیدهای بزرگ کونژوگه قابل انتقال قرار دارد و می‌تواند همزمان ژن‌های مقاومت به سایر عوامل ضدمیکروبی از جمله مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها را منتقل نماید (۴-۱). گزارش‌های متعددی از مناطق مختلف در کشور، شیوع ارگانیسم‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف را از ۴۰ تا ۸۰ درصد در بین باکتری‌های گرم منفی نشان می‌دهد (۷-۵) که این مسئله موجب نگرانی پزشکان شده است، به طوری که عفونت با این باکتری‌ها با میزان مرگ و میر بیشتر، افزایش مدت اقامت در بیمارستان و افزایش هزینه‌های درمانی

همراه بوده است (۸). اشریشیاکلی یکی از پاتوژن‌های شایع عفونت‌های بیمارستانی بوده که به علت اکتساب پلاسمیدهایی که کدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف هستند، به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله سفالوسپورین‌های با طیف وسیع مقاوم شده‌اند و سه ژن بتالاکتاماز TEM, SHV, CTXM1 اکثراً در اشریشیاکلی یافت می‌شوند (۹). در سال‌های اخیر تلاش‌های قابل توجهی در جهت ارتقا بهداشت و کنترل عفونت در بیمارستان‌ها و در جامعه صورت گرفته که منجر به افزایش مصرف گندزداها و ضدعفونی‌کننده‌ها شده است. به عنوان مثال ضدعفونی‌کننده‌های با پایه ترکیبات چهارتایی آمونیوم مانند بنزالکونیوم کلراید، به طور فراوان در بیمارستان‌ها جهت ضدعفونی کردن سطوح و جلوگیری از گسترش عفونت کاربرد دارند، زیرا این

این مقاله حاصل پایان نامه فروزان حدادی دانشجوی رشته میکروب شناسی پزشکی و طرح تحقیقاتی به شماره ۱۳۹۶.۲۹۴ دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

\* مسئول مقاله: دکتر حمید ابطی

آدرس: اراک، میدان بسیج، دانشگاه علوم پزشکی، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۰۸۶-۳۴۱۷۳۵۲۰

E-mail: abtahi@arakmu.ac.ir

**تعیین الگوی حساسیت ایزوله‌های اشریشیاکلی به روش انتشار دیسک در آگار (Disk diffusion agar):** سویه‌های اشریشیاکلی از نظر الگوی حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، به روش دیسک دیفیوژن (به روش کربی-بایر) و بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI ۲۰۱۸) بر روی محیط مولر هینتون آگار (Merck، آلمان) بررسی شدند. آنتی‌بیوتیک‌ها (Mast، انگلستان) شامل:

نیتروفوران‌توئین (۳۰۰ μg)، تری‌متوپریم سولفات/تاکسازول (۵ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg)، سفپیم (۳۰ μg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ μg)، آمیکاسین (۳۰ μg)، سفوتاکسیم (۳۰ μg)، سفازولین (۳۰ μg)، سفکسیم (۵ μg)، ایمپنم (۱۰ μg)، مروپنم (۱۰ μg)، تتراسیکلین (۳۰ μg)، سفوکستین (۵ μg)، سفتازیدیم (۳۰ μg)، سفتریاکسون (۳۰ μg) می‌باشد. همچنین از سویه *E. coli* 25922 به عنوان سویه کنترل استفاده گردید. پس از دیسک‌گذاری، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سپس قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک بر اساس جداول CLSI، ۲۰۱۸ تفسیر شد (۲۱).

**تایید فنوتیپی ایزوله‌های تولیدکننده ESBL:** جهت تایید فنوتیپی ایزوله‌های اشریشیاکلی ESBL، از روش دیسک ترکیبی (Combination disk method) استفاده شد. در روش فوق از دیسک‌های (Mast، انگلستان) سفتازیدیم (۳۰ μg)، سفتازیدیم-کلاوونیک‌اسید (۳۰-۱۰ μg)، سفوتاکسیم (۳۰ μg) و سفوتاکسیم-کلاوونیک‌اسید (۳۰-۱۰ μg) استفاده گردید. سوسپانسیون از باکتری معادل با نیم مک‌فارلند تهیه شد و بر روی محیط مولر هینتون آگار (Merck، آلمان) کشت داده شد. سپس دیسک‌ها روی محیط قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوبه در دمای ۳۷°C، قطر هاله عدم رشد در اطراف هر دیسک، اندازه‌گیری شد. چنانکه قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف دیسک ترکیبی، ۵ میلی-متر بیشتر از قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک منفرد همان آنتی‌بیوتیک باشد، باکتری واجد آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) بوده و نتیجه تست فنوتایپی باکتری مثبت تلقی می‌گردد. از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC 35218 به منظور کنترل کیفی ایزوله‌های ESBL استفاده شد (۲۱). سپس ایزوله‌های اشریشیاکلی ESBL در محیط لوریا برتانی برات (LBB)، حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰°C ذخیره شدند.

**شناسایی ژنوتیپی سویه‌های ESBL:** شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز SHV، TEM و CTXM1 توسط روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آماده مطابق (جدول ۱) انجام شد (۲۲).

ترکیبات فعالیت ضد میکروبی وسیع دارند (۱۰ و ۱۱). در باکتری‌های گرم منفی، ژن‌های qacE، qacEΔ1، sugE(P)، qacF و qacG کدکننده مقاومت به ترکیبات آمونیوم چهارتایی (ژن‌های QACs) هستند که بر روی عناصر ژنتیکی متحرک قرار گرفته اند (۱۴-۱۲). در اثر جهش حذفی بر روی qacE، ژن qacEΔ1 شکل گرفته است که مقاومت به گندزدهایی مانند ترکیبات چهارتایی آمونیوم را کد می‌کند. ژن qacF از لحاظ ژنتیکی شباهت زیادی (۶۸ درصد) به ژن qacE دارد (۱۵). در باکتری‌های گرم منفی ژن‌های qacE و qacEΔ1 نسبت به سایر ژن‌های QACs شیوع بسیار بالاتری دارند (۱۶ و ۱۷). در میان ایزوله‌های اشریشیاکلی ESBL جدا شده از نمونه‌های بالینی، بین حضور ژن‌های مقاومت qacE و qacEΔ1 با مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارتباط معنی‌داری دیده شده است (۱۸). همچنین اشریشیاکلی جدا شده از منابع بالینی، MIC بالایی را نسبت به ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی نشان داده است که با مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارتباط دارد (۱۹). مطالعه اندکی در مورد میزان فراوانی ژن‌های مقاومت به ترکیبات آمونیوم چهارتایی در اشریشیاکلی ESBL، انجام شده است. از آنجایی که کنترل بیماری‌های باکتریایی به استفاده از آنتی‌بیوتیک وابسته است، گسترش پدیده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها موجب افزایش نگرانی عمومی شده و به عنوان یکی از معضلات بهداشت عمومی محسوب می‌شود. مطالعه حاضر برای بررسی الگوی آنتی‌بیوتیکی، تعیین شیوع اشریشیاکلی ESBL، توزیع ژن‌های مقاومت qacE، qacG، qacF و qacEΔ1 در این باکتری و تعیین حداقل غلظت مهاری بنزالکونیوم کلراید نسبت به اشریشیاکلی ESBL جدا شده از نمونه‌های بالینی انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری نمونه‌ها:** این مطالعه مقطعی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک با کد IR.ARAK.MU.REC. ۱۳۹۶.۲۹۴ در سال ۱۳۹۷ بر روی ۱۵۰ نمونه بالینی (ادرار، خون، خلط و زخم) بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های آموزشی منتخب اراک، انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده از بیمارستان‌ها توسط محیط انتقالی استوارت به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه انتقال داده شدند. به منظور شناسایی باکتری، نمونه‌ها بر روی محیط‌های بلاد آگار و مک‌کانکی (Merck، آلمان) کشت داده شد. اشریشیاکلی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی از جمله رنگ‌آمیزی گرم، رشد بر روی محیط‌های VP، MR، SIM، OF، TSI، سیمون سیترا، اوره، لیزین دکربوکسیلاز تعیین هویت شدند (۲۰).

جدول ۱. ویژگی پرایمرهای ژن بتالاکتاماز مورد استفاده در PCR

| Primer | Sequence(5 to 3)                               | Amplicon Size(bp) | Annealing Temperature |
|--------|------------------------------------------------|-------------------|-----------------------|
| TEM    | ATGAGTATTCAACATTTCGG<br>CTGACAGTTACCAATGCTTA   | ۸۶۷               | ۵۸                    |
| SHV    | GATGAACGCTTTCCCATGATG<br>CGCTGTTATCGCTCATGTTAA | ۲۱۴               | ۶۱                    |
| CTXM1  | AAGACTGGGTGTGGCATTGA<br>AGGCTGGGTGAAGTAAGTGA   | ۶۷۰               | ۵۲                    |

منطبق با دستورالعمل CLSI ۲۰۱۸ انجام شد. در این روش رقت‌های سریالی از ماده ضدعفونی‌کننده تهیه شد.

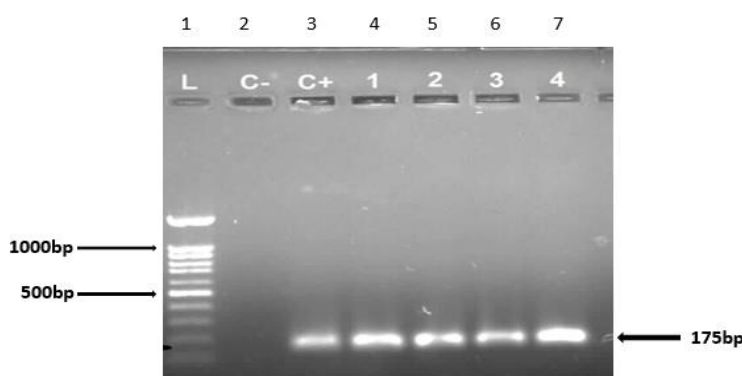
سوسپانسیون از باکتری معادل نیم مک فارلند تهیه شد. در نهایت در هر چاهک میکروپلیت غلظت باکتری معادل  $5 \times 10^5$  گردید. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  قرار داده شد. رقت‌های سریالی از  $1/2$  تا  $1/1024$  بدست آمد و محدوده غلظت برای تعیین MIC ماده ضدعفونی‌کننده  $0/125$  تا  $1024$  میلی گرم در لیتر بود. از *E. coli* ATCC 25922 به عنوان کنترل کیفیت استفاده شد (۲۱).

الگوی آنتی‌بیوتیکی، شیوع اشریشیاکلی ESBL، توزیع ژن‌های مقاومت *qacE*, *qacF*, *qacG* و *qacEΔ1* در این باکتری و حداقل غلظت مهاری بنزالکونیوم کلراید بررسی شدند و برای محاسبه تعداد و درصد از نرم افزار STATA ۱۳ استفاده شد.

**شناسایی ژن‌های *qacE*, *qacEΔ1*, *qacF* و *qacG* توسط واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR):** بعد از تهیه یک کشت تازه از ایزوله‌های اشریشیاکلی تولیدکننده ESBL ذخیره شده، استخراج DNA با استفاده از کیت (یکتا تجهیز آزما - ایران) انجام شد. توالی پرایمرها جهت ساخت تحویل شرکت ژن فن آوران (نمایندگی انحصاری شرکت TAG Copenhagen در ایران) گردید. سپس شناسایی ژن‌های *qacE*, *qacEΔ1*, *qacF* و *qacG* در ایزوله‌های اشریشیاکلی ESBL با کمک پرایمرهای اختصاصی آماده مطابق جدول ۲ انجام شد (۲۳).

**الکتروفورز محصولات PCR:** محصول PCR بدست آمده برای هر ژن، بوسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد شناسایی شد. سپس با استفاده از دستگاه UV ترانسلومیناتور و ژل داک، باندها مشاهده و عکس برداری شد (شکل ۱).

**تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی:** حداقل غلظت مهارکنندگی ایزوله‌های اشریشیاکلی ESBL نسبت به بنزالکونیوم کلراید ۴٪ به روش میکرودیالوژن برات



شکل ۱. نتایج PCR ژن *qacEΔ1* در سویه‌های اشریشیاکلی ESBL، ستون ۱: مارکر اندازه ۱۰۰ bp، ستون ۲: سویه کنترل منفی (فاقد ژن *qacEΔ1*)، ستون ۳: سویه کنترل مثبت (دارای ژن *qacEΔ1*)، ستون ۴ تا ۷: سویه‌های ژنوتیپ مثبت دارای ژن مقاومت *qacEΔ1*

جدول ۲. پرایمرهای *qac* مورد استفاده در این مطالعه

| Gene            | Sequence (5'-3')         | Annealing temperature(elongation time) | PCR product size (bp) | Accession no. |
|-----------------|--------------------------|----------------------------------------|-----------------------|---------------|
| <i>qacEΔ1</i>   | AATCCATCCCTGTCGGTGT      | $56^\circ\text{C}$ (۳۰s)               | ۱۷۵                   | JN596280      |
|                 | CGCAGCGACTTCCACGATGGGGAT |                                        |                       | JN566044      |
| <i>qacE</i>     | AAGTAATCGCAACATCCG       | $50^\circ\text{C}$ (۳۰s)               | ۲۵۸                   | X68232        |
|                 | CTACTACACCACTAACTATGAG   |                                        |                       | HQ875011      |
| <i>qacF/H/I</i> | GTCTGCGCAACTTCCGCACTG    | $60^\circ\text{C}$ (۳۰s)               | ۲۲۹                   | FJ160769      |
|                 | TGCCAACGAACGCCCACA       |                                        |                       | JN596279      |
| <i>qacG</i>     | TGCCAACGAACGCCCACA       | $56^\circ\text{C}$ (۳۰s)               | ۱۲۲                   | FJ950725      |
|                 | AACGCCGCTGATAATGAA       |                                        |                       | AF288045      |

## یافته ها

ژن SHV و تعداد ۵۵ ( $70/51$ ) ایزوله ژن TEM داشتند. بر اساس الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی اشریشیاکلی ESBL، کمترین مقاومت نسبت به نیتروفوراتوتین بود و مقاومت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش یافته بود از جمله کاربانم‌ها که  $33/33$  درصد بود (نمودار ۱). نتایج حساسیت ماده ضدعفونی‌کننده بنزالکونیوم کلراید نشان داد که مقدار MIC در سویه‌های اشریشیاکلی ESBL بین

نمونه‌های مورد بررسی شامل ۱۲۳ نمونه ادرار ( $82\%$ )، ۱۱ نمونه خون ( $7/3\%$ )، ۱۱ نمونه زخم ( $7/3\%$ )، ۵ نمونه خلط ( $3/4\%$ ) بودند. از ۱۵۰ نمونه مورد مطالعه ۱۳۰ نمونه اشریشیاکلی جداسازی شد. ۷۸ ایزوله ( $60\%$  درصد) از ۱۳۰ نمونه اشریشیاکلی مورد بررسی، ESBL مثبت بودند. نتایج تست ژنوتیپی مشخص کرد که همه اشریشیاکلی ESBL مثبت، دارای ژن CTXM1 بودند. تعداد ۴۵ ایزوله ( $57/69\%$ )

۱۲۸-۸ میلی گرم در لیتر گزارش شد (۲۳) در مطالعه Liu و همکاران نیز حداقل غلظت مهاری بنزالکونیوم کلراید برای اسیتوباکتر بومانی ۳۲-۸ میلی گرم در لیتر و برای کلبسیلا ۱۲۸-۳۲ گزارش شده است (۲۶). با توجه به افزایش غلظت مهاری ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی بنزالکونیوم کلراید در این مطالعه، ضرورت توجه بیشتر در انتخاب نوع ماده گندزدا و تحقیق گسترده تر در خصوص میزان مصرف آن را بیان می کند از طرف دیگر جهت اثر بخشی مواد ضد عفونی کننده لازم است از غلظت مناسب آنتی سبتیک ها و گندزداها در بیمارستان ها استفاده شود.

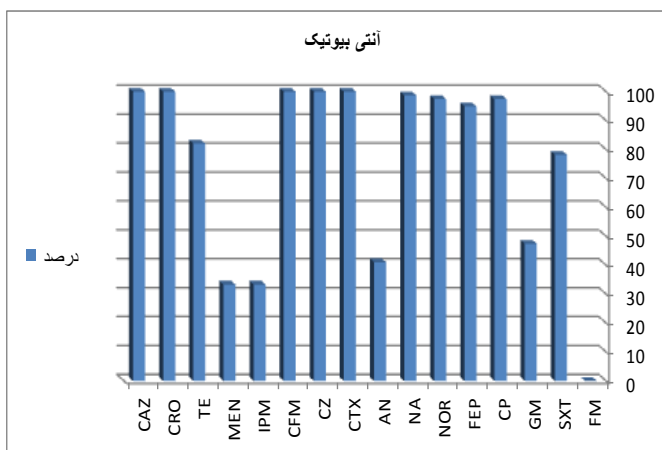
مطالعه حاضر نشان داد که موثرترین آنتی بیوتیک برای اشریشیاکلی ESBL، نیتروفوراتوتین است که با مطالعه Amiri و همکاران در سال ۲۰۱۵ و Ranjbaran و همکاران مطابقت داشت (۲۷و۵). همچنین مقاومت نسبت به کاربامپنم در مقایسه با مطالعات پیشین، افزایش یافته است (۲۸و۲۶) که نشان دهنده افزایش مصرف کاربامپنم در بیمارستان ها می باشد. قابل ذکر است کاربامپنم ها اغلب گزینه انتخابی برای درمان عفونت های باکتری های مولد ESBL و همچنین درمان عفونت های شدید کسب شده از بیمارستان نیز می باشند. بنابراین مصرف بی رویه، و تجویز غیر منطقی آنتی بیوتیک ها می تواند منجر به ایجاد پدیده مقاومت دارویی شود. بنابراین شیوع بالای اشریشیاکلی مولد ESBL و افزایش ژن های مقاومت qac در آنها، همچنین مقاومت به عوامل آنتی باکتریال وسیع الطیف (کاربامپنم ها) در باکتری های انتروباکتریاسه، از یافته های نگران کننده در این مطالعه می باشد، که نیاز به اقدامات کنترل عفونت جهت مدیریت منطقی مصرف آنتی بیوتیک ها و شناسایی سریع سویه های تولید کننده بتالاکتاماز دارد. جهت جلوگیری از افزایش مقاومت دارویی در مناطق مختلف پیشنهاد می شود تحقیقات مستمر در هر منطقه انجام شود. زیرا تجویز منطقی آنتی بیوتیک ها به اثربخشی فرآیند درمان کمک می کند. از طرفی افزایش حداقل غلظت مهاری در این مطالعه نشان می دهد جهت اثر بخشی مواد ضد عفونی کننده لازم است از غلظت مناسب گندزداها در بیمارستان ها استفاده شود.

استفاده از مواد گندزدا در غلظت هایی پایین تر از غلظت مهاری ممکن است باعث افزایش شیوع باکتری های مقاوم به مواد گندزدا گردد و این امر باعث گسترش عفونت در بیماران و جامعه می شود. با وجود شیوع ژن های مقاومت QAC در اشریشیاکلی، مکانیسم مقاومت مواد گندزدا و ارتباط بین ژن های مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی در ایزوله های اشریشیاکلی به درستی مشخص نشده است. بنابراین افزایش شناخت ژن های مقاومت ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی در اشریشیاکلی ESBL، استفاده مناسب از مواد گندزدا، همچنین بررسی الگوهای مقاومت میکروبی در این باکتری می تواند به اثربخشی فرآیند کنترل عفونت در بیمارستان ها کمک نماید.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک و پرسنل مرکز تحقیقات مولکولی و بیمارستان های آموزشی اراک که در انجام این مطالعه یاری نمودند، تقدیر و تشکر می گردد.

۶۴-۳۲ میلی گرم در لیتر بوده است که ۴۳/۶۴ درصد نمونه ها غلظت ۶۴ میلی گرم در لیتر و ۵۶/۳۶ درصد نمونه ها غلظت ۳۲ میلی گرم در لیتر داشتند. در همه ایزوله های اشریشیاکلی ESBL ژن qacEA1 مشاهده شد و در هیچکدام از ایزوله ها، ژن های qacF، qacE، qacG مشاهده نشد.



### نمودار ۱. توزیع فراوانی الگوی مقاومت ایزوله های اشریشیاکلی- ESBL نسبت

به آنتی بیوتیک های مورد بررسی

FM (نیتروفوراتوتین)، SXT (تری-متوپریم سولفونامیدازول)، GM (جتامایسین)، CP (سیروفلوکساسین)، FEP (سفتیم)، NOR (نورومایسین)، NA (نالدیکسیک-اسید)، AN (امیکاسین)، CTX (سفتواکسیم)، CZ (سفازولین)، CFM (سفتکسیم)، IPM (ایمی-پنم)، MEN (مروپنم)، TE (تراسیکلین)، CRO (سفترباکسون)، CAZ (سفتازیدیم).

### بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، ژن qacEA1 در همه ایزوله ها (۱۰۰ درصد) مشاهده شد. ژن های مقاومت qacE، qacF، qacG، qacEA1 بر روی پلاسمید و یا انتگرون کدگذاری شده اند که می توانند به واسطه پمپ افلاکس، مقاومت به QACs را ایجاد کنند (۱۵و۱۲). اشریشیاکلی ESBL با بیان ژن مقاومت به ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی مانند ژن qacEA1 قادر است میزان بیشتری از مواد گندزدا را تحمل کند. بنابراین استفاده بیش از حد از ماده ضد عفونی کننده نه تنها باعث حذف و از بین رفتن باکتری ها نمی شود بلکه می تواند به مقاومت باکتری های ESBL به مواد گندزدا منجر شود. در مطالعه Canal و همکاران ژن qacEA1 در همه ایزوله ها (۱۰۰ درصد) مشاهده شد (۲۴). Shafaati و همکاران فراوانی ژن qacEA1 را در میان ایزوله های اشریشیاکلی تولید کننده ESBL جدا شده از نمونه های ادراری ۹۴ درصد گزارش کردند (۱۸). Mahzonieh و همکاران فراوانی ژن مقاومت qacEA1 در باکتری گرم منفی را ۹۱/۵ درصد گزارش کردند (۲۵). در این مطالعه، همه سویه های اشریشیاکلی ESBL حداقل غلظت مهاری بین ۳۲ تا ۶۴ میلی گرم در لیتر برای بنزالکونیوم کلراید داشتند. در مطالعه Guo و همکاران حداقل غلظت مهاری سویه های اشریشیاکلی ESBL بین

# Detection of qacEΔ1, qacG, qacE, qacF resistance genes in *Escherichia coli* producing broad-spectrum beta-lactamases to benzalkonium chloride

F. Hadadi (MSc)<sup>1</sup>, E. Ghaznavi Rad (PhD)<sup>2</sup>, A. Almasi-Hashiani (PhD)<sup>3</sup>, H. Abtahi (PhD)<sup>\*2</sup>

1. Students Research Committee, Arak University of Medical Sciences, Arak, I.R.Iran

2. Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, I.R.Iran

3. Traditional and Complementary Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 286-92

Received: Jan 26<sup>th</sup> 2019, Revised: May 26<sup>th</sup> 2019, Accepted: July 1<sup>st</sup> 2019.

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** The resistance genes of quaternary ammonium compounds (qac) play an important role in the resistance of gram-negative bacteria producing broad-spectrum beta-lactamases to disinfectants. The aim of this study was detection of qacEΔ1, qacG, qacE, qacF resistance genes in *Escherichia coli* producing broad-spectrum beta-lactamases to benzalkonium chloride.

**METHODS:** This study cross sectional-descriptive was conducted on 150 clinical samples of selected hospitals in Arak. ESBL strains were identified by using phenotypic methods of disc diffusion and combinatory disc method and evaluating the SHV, TEM, CTXM1 genes by genotyping method. The PCR was performed to determine the resistance genes qacEΔ1, qacG, qacE and qacF. The electrophoresis of PCR products and the MIC of benzalkonium chloride were relative to *E. coli* producing ESBL. Antibiotic pattern of *Escherichia coli* (ESBL), quadruple ammonium resistance genes and benzalkonium chloride MIC were also investigated.

**FINDINGS:** This study showed that 60% of *Escherichia coli* were ESBL producer. The qacEΔ1 genes were observed in all of them and qacE, qacF, qacG genes were not found in any of the strains. The strains had MIC range from 32 to 64 mg/l for benzalkonium chloride. Resistance to carbapenems (33.33%) was observed.

**CONCLUSION:** This study showed that qacEΔ1 resistance gene and resistance to disinfectant benzalkonium chloride increased. Also increased resistance to the antibiotics studied were observed in *E. coli* ESBL strains.

**KEY WORDS:** *Escherichia Coli*, *Beta-Lactamase*, *Benzalkonium Chloride*, *Disinfectant*.

## Please cite this article as follows:

Hadadi F, Ghaznavi Rad E, Almasi-Hashiani A, Abtahi H. Detection of qacEΔ1, qacG, qacE, qacF resistance genes in *Escherichia coli* producing broad-spectrum beta-lactamases to benzalkonium chloride. J Babol Univ Med Sci. 2019;21: 286-92.

\*Corresponding Author: H. Abtahi (PhD)

Address: Department of Microbiology, University of Medical Sciences, Basij Sq., Arak, I.R.Iran

Tel: +98 86 34173530

E-mail: abtahi@arakmu.ac.ir

## References

1. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Global Infect Dis.* 2010;2(3):263.
2. Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T. Distribution of the antiseptic-resistance genes qacE and qacE  $\Delta$  1 in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;159(2):173-8.
3. Azadpour M, Nowroozi J, Goudarzi G, Mahmoudvand H. Presence of qacEA1 and cepA genes and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Iran. *Trop Biomed.* 2015;32(1):109-15.
4. Kong KF, Schnepfer L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS.* 2010;118(1):1-36.
5. Amiri P, Pournajaf A, Shavalipour A, Tayebi Z, Goudarzi H, Eslami G, et al. Evaluation of antimicrobial resistance in the beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection in the patients referring to taleghani hospital of tehran. *Tabari J Prevent Med.* 2015;1(2):11-9. [In Persian]
6. Mirzaee M, Eftekhari R, Taghizadeh N, Mehrabi MR. Relationship between presence of genes encoding ESBLs and antimicrobial susceptibility pattern in *Escherichia coli* clinical isolates. *Iran J Med Microbiol.* 2016;10(1):8-15. [In Persian]
7. Safari M, Shojapour M, Akbari M, Pourbabaee A, Abtahi H. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamase among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Markazi province, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2013;6(8): e7182.
8. Bhattacharjee A, Sen M, Prakash P, Gaur A, Anupurba S. Increased prevalence of extended spectrum  $\beta$  lactamase producers in neonatal septicaemic cases at a tertiary referral hospital. *Indian J Med Microbiol.* 2008;26(4):356-60.
9. Geyer CN, Hanson ND. Rapid PCR amplification protocols decrease the turn-around time for detection of antibiotic resistance genes in Gram-negative pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77(2):113-7.
10. Reverdy M, Bes M, Brun Y, Fleurette J. Evolution of resistance to antibiotics and antiseptics of hospital *Staphylococcus aureus* strains isolated from 1980 to 1991. *Pathol Biol.* 1993;41(9):897-904.
11. Russell A. Do biocides select for antibiotic resistance? *J Pharm Pharmacol.* 2000;52(2):227-33.
12. Bay DC, Turner RJ. Diversity and evolution of the small multidrug resistance protein family. *BMC Evol Biol.* 2009;9:140.
13. Kücken D, Feucht HH, Kaulfers PM. Association of qacE and qacE  $\Delta$ 1 with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;183(1):95-8.
14. Li D, Yu T, Zhang Y, Yang M, Li Z, Liu M, et al. Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(11):3444-51.
15. Zhao WH, Chen G, Ito R, Kimura S, Hu ZQ. Identification of a plasmid-borne blaIMP-11 gene in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol.* 2012;61(2):246-51.
16. Chung YJ, Saier MH. Overexpression of the *Escherichia coli* sugE gene confers resistance to a narrow range of quaternary ammonium compounds. *J Bacteriol.* 2002;184(9):2543-5.
17. Ploy M-C, Courvalin P, Lambert T. Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a class 1 integron with two new gene cassettes, cmlA2 and qacF. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(10):2557-63.
18. Shafaati M, Boroumand M, Nowroozi J, Amiri P, Kazemian H. Correlation between qacE and qacEA1 efflux pump genes, antibiotic and disinfectant resistant among clinical isolates of *E. coli*. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2016;11(2):189-95.
19. Zou L, Meng J, McDermott PF, Wang F, Yang Q, Cao G, et al. Presence of disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meats in the USA. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(10):2644-9.
20. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology, 8<sup>th</sup> ed. Elsevier Health Sciences; 2015.
21. Pfaller M, Diekema D. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):2846-56.
22. Bajpai T, Pandey M, Varma M, Bhatambare G. Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna J Med.* 2017;7(1):12-16.

23. Guo L, Long M, Huang Y, Wu G, Deng W, Yang X, et al. Antimicrobial and disinfectant resistance of *Escherichia coli* isolated from giant pandas. *J Appl Microbiol*. 2015;119(1):55-64.
24. Canal N, Meneghetti KL, Almeida CPd, Bastos MdR, Otton LM, Corção G. Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. *Braz J Microbiol*. 2016;47(2):337-44.
25. Mahzounieh M, Khoshnood S, Ebrahimi A, Habibian S, Yaghoubian M. Detection of antiseptic-resistance genes in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* spp. isolated from burn patients. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2014;9(2):e15402.
26. Liu WJ, Fu L, Huang M, Zhang JP, Wu Y, Zhou YS, et al. Frequency of antiseptic resistance genes and reduced susceptibility to biocides in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol*. 2017; 66(1):13-17.
27. Ranjbaran M, Zolfaghari M, Japoni-Nejad A, Amouzandeh-Nobaveh A, Abtahi H, Nejad M, et al. Molecular investigation of integrons in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2013; 23(105):20-7. [In Persian]
28. Safari M, Abtahi H, Shojapoor M, Akbari M, Poorbabayi A. Determination of the Pattern of Antibiotic Resistance and Investigation of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production of Enterobacteriaceae Isolates of Clinical Specimens. *Zahedan J Res Med Sci*. 2012 ; 14(8):e93266. Availabl from: <http://zjrms.com/en/articles/93266.html>