Archive of SID

مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۷، آبان ۱۳۹۷، ۷۵۸-۷۴۵

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 10:04 +0330 on Wednesday February 6th 2019

تشخیص مولکولی ژن‌های بتالاکتاماز bla_{TEM}، bla_{CTX} و bla_{SHV} در سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس جدا شده از نمونه‌های شیر خام و پنیر: یک مطالعه آزمایشگاهی

سیامک قضائی[۱]، آیدین عزیزپور[۲]

دریافت مقاله: ۹۶/۶/۳۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۶/۱۱/۲۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۴/۲ پذیرش مقاله: ۹۷/۴/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف (Extended spectrum β-lactamase; ESBLs) برای سیستم بهداشتی مشکلات زیادی ایجاد کرده است. علاوه بر این، این سویه‌ها باعث افزایش مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز شده است. لذا این مطالعه با هدف تعیین تشخیص مولکولی ژن‌های بتالاکتاماز bla_{TEM}، bla_{CTX} و bla_{SHV} در سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس جدا شده از نمونه‌های شیر خام و پنیر انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام و پنیر تهیه و کشت داده شد. کلونی‌های مشکوک به باسیلوس سوبتیلیس با روش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. برای سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. هم‌چنین حضور ژن‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف bla_{TEM}، bla_{CTX} و bla_{SHV} در سویه‌های ESBLs با استفاده از روش PCR **(**Polymerase chain reaction**)** مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون مجذور کای آنالیز و به‌صورت آمار توصیفی (تعداد و درصد) گزارش شد.

یافته‌ها: بالاترین میزان مقاومت در ایزوله‌هایی که قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند، مربوط به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین (۷۵ درصد) و کمترین مربوط به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۴۴/۶۰ درصد) و سفیکسیم (۴۶/۲۰ درصد) بود. از ۵۰ نمونه شیر خام، در ۲۱ نمونه، ژن TEM **(**Temoneira**)**، در ۱۶ نمونه، ژن CTX **(**Cephotaximase**)** و هم‌چنین در ۳ نمونه، ژن SHV **(**Sulfhydryl-variable**)** شناسایی شد. از ۵۰ نمونه پنیر، ۱۷ نمونه (۴۵/۹۴ درصد) حاوی ژن TEM، ۱۳ نمونه (۳۵/۱۳ درصد) ژن CTX و هم‌چنین در ۲ نمونه (۵/۴۰ درصد) ژنSHV شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج، در کنار استفاده از روش‌های فنوتیپی جهت تشخیص آنزیم‌های بتالاکتاماز، به کارگیری روش‌های مولکولی جهت تشخیص کامل این نوع مقاومت‌ها امری ضروری به‌نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس سوبتیلیس، شیر، بتالاکتاماز، آنتی‌بیوتیک‌ها، BelaCTX

۱- استادیار دانشگاه محقق اردبیلی، دپارتمان میکروبیولوژی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
تلفن: ۳۳۵۱۲۰۸۱-۰۴۵، دورنگار: ۳۳۵۱۰۸۱۱-۰۴۵، پست الکترونیکی: ***ciamakghazaei@yahoo.com***
۲- استادیار دانشگاه محقق اردبیلی، دپارتمان علوم دامی،دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 10:04 +0330 on Wednesday February 6th 2019

مقدمه

بتالاکتامازهای وسیع الطیف (Extended spectrum β-lactamase; ESBLs) اولین بار در سال ۱۹۳۸ شناسایی و تعریف شدند و به طور کلی عبارتند از بتالاکتامازهایی که قادر به هیدرولیز و غیر فعال کردن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام رایج از قبیل پنی‌سیلین، اکسی آمینو سفالوسپورین‌ها و سفالوسپورین‌های نسل یک، دو، سه، آزترئونام، منوباکتام، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم و حتی کارباپنم‌ها می‌باشد. اما سفامایسین‌ها را نمی‌توانند هیدرولیز کنند و اثر آن‌ها توسط مهار کننده‌های بتالاکتاماز از جمله کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌شوند [۱]. ژن‌های bla_{TEM} و bla_{CTX} رمز کننده این دسته از آنزیم‌های وسیع الطیف هستند. البته bla_{TEM-1}، bla_{TEM-2} و bla_{TEM-13} به طور استثناء طیف محدود (Narrow spectrum) دارند [۲]. ژن‌های مسئول بتالاکتامازها متنوع می‌باشند و می‌توانند به صورت اولیه بر روی کروموزوم قرار داشته باشند و یا در سطح پلاسمید قرار گیرند. بتالاکتامازها انواع مختلفی دارند که از آن جمله می‌توان به آنزیم‌های نوع SHV (Sulfhydryl-variable)، PER (Pseudomonas extended resistant)، CTX (Cefotaximase)، TEM (Temoneira) و AmpC (Ampc β-lactamase) اشاره نمود [۳].

در میان آنزیم‌های CTX-M (Cefotaximase hydrolysing capabilities) در مقایسه با بقیه اعضاء بر طیف وسیع‌تری از بتالاکتام‌ها مؤثر می‌باشد. اولین اندمی‌های *CTX-M* در آمریکای لاتین و اروپای شرقی گزارش شد، اما پس از سال ۲۰۰۰ گزارش فراوانی از گسترش این ژن به کشورهای اروپای غربی هم‌چون یونان، فرانسه، انگلستان و اسپانیا و حتی از مغولستان گزارش شد [۴]. سویه‌ای از *E.coli* را که مقاوم به سفوتاکسیم بوده و خصوصیات TEM و یا SHV مشاهده نشد را CTX-M-1 نام گذاری کرده که فعالیت هیدرولیتیک بر علیه سفوتاکسیم دارد [۵].

بتالاکتامازهای وسیع الطیف تیپ‌های TEM وSHV آنزیم‌های دخیل در بروز مقاومت می‌باشند. در حال حاضر ۱۷۴ ساب تیپ متفاوت از TEM و ۱۱۹ ساب تیپ از SHV گزارش شده است. آنزیم TEM اولین ESBL شناسایی شده می‌باشد که به طور وسیعی در خانواده انتروباکتریاسه گسترش یافته و به عنوان رایج‌ترین بتالاکتاماز شناخته می‌شود که حتی به هموفیلیس آنفلولانزا و نایسریا گنوره‌آ انتقال یافته است. اکثر بتالاکتامازهای وسیع الطیف (TEM و SHV) به واسطه جا به جایی در توالی آمینواسیدی TEM-1,2 و SVH-1 به وجود می‌آیند. بتالاکتامازهای SHV در بسیاری از این سویه‌ها ژن کد کننده این آنزیم بر روی کروموزوم قرار دارد، اما با گذشت زمان این ژن وارد پلاسمید شده و از این طریق به راحتی در میان سویه‌های باکتریایی منتشر شده است [۶].

در پی درمان‌های تجربی نامناسب، ارگانیسم‌های حساس نیز مقاوم می‌شوند که این امر به وسیله القاء تشکیل آنزیم‌های غیر فعال کننده آنتی‌بیوتیک‌ها و یا موتاسیون در ژن‌های کد کننده، کانال‌های دیواره سلولی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 10:04 +0330 on Wednesday February 6th 2019

(پورین‌های غشاء خارجی)، سیستم‌های تراوشی و یا از طریق انتقال پلاسمیدی صورت می‌گیرد [۷]. یکی از مشکل سازترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در رابطه با بتالاکتامازها می‌باشد. باکتری‌های مولد بتالاکتاماز با ایجاد موتان‌های جدید رو به افزایش می‌باشند (تاکنون بیش از ۴۰۰ نوع مختلف بتالاکتاماز در نمونه‌های بالینی تعریف شده‌اند) [۹-۸]. از آن‌جایی که ارگانیسم‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف از لحاظ درمانی بسیار با اهمیت هستند و به ویژه در سال‌های اخیر باکتری‌های تولید کننده این آنزیم‌ها در سراسر جهان شیوع فراوانی یافته‌اند [۲].

از طرفی یکی از مشکلات مهم در جوامع بشری آلودگی مواد غذایی به انواع باکتری‌های مختلف است که این مشکلات با افزایش جمعیت جهان بسیار گسترده تر شده است و در این بین آلودگی فرآورده‌های لبنی (پاستوریزه و یا غیر پاستوریزه) به ویژه شیر و پنیر که از یک شرایط محیطی کاملاً مساعد برای رشد و تکثیر عوامل باکتریایی برخوردار هستند و از طرفی بخش عمده مصارف غذایی را نیز در جامعه در بر می‌گیرند، به سویه‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، خطر انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به فلور باکتریایی روده مصرف کنندگان افزایش می‌دهد و باید به عنوان یک عامل خطر بیشتر مورد توجه قرار گیرد. همان‌گونه که مطالعات نشان می دهند مقاومت میکروبی، اغلب بر روی باکتری‌های جدا شده از موارد بیماری مورد ارزیابی قرار گرفته است و در این مورد کمتر بر روی باکتری‌های جدا شده از مواد غذایی بررسی شده است [۱۰]. لذا تحقیق مذکور به دلیل اهمیت موضوع و احتمال انتقال مقاومت از طریق سویه‌های موجود در مواد غذایی (فرآورده لبنی) به سایر سویه‌ها، طراحی شد تا با بررسی پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه باسیلوس سوبتیلیس جدا شده از فرآورده‌های لبنی، احتمال انتقال این مقاومت به سایر سویه‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد. این تحقیق به موضوع مهم بهداشتی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری باسیلوس سوبتیلیس می‌پردازد و محتوای تحقیق به اهمیت و نگرانی‌های مرتبط با موضوع می‌پردازد. لذا این مطالعه با هدف تعیین تشخیص مولکولی ژن‌های بتالاکتاماز bla_{TEM}، bla_{CTX} و bla_{SHV} در سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس جدا شده از نمونه‌های شیر خام و پنیر صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش آزمایشگاهی، تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام و پنیر (۵۰ نمونه شیر + ۵۰ نمونه پنیر) از مراکز تهیه و توزیع فرآورده‌های لبنی در سطح شهرستان اردبیل در سال ۱۳۹۵ در شرایط آسپتیک تهیه شد. در ابتدا نمونه‌ها به منظور حفظ اسپورها و حذف سلول‌های رویشی، با روش غنی سازی حرارتی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. سپس با استفاده از روش سریال رقت، رقت‌های متوالی از نمونه‌ها در آب مقطر استریل تهیه و میزان ۱ میلی‌لیتر از هر یک از سوسپانسیون‌های حاصله در پلیت استریل ریخته شد [۹].

پس از آن محیط کشت نوترینت آگار تهیه و تحت شرایط استریل به پتریدیش اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داری شد. کلنی‌های سفید

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 10:04 +0330 on Wednesday February 6th 2019

رنگ، مایل به کرم با قوام کره‌ای، سطحی خشن و حاشیه-ای مضرس انتخاب و طی کشت ۴ منطقه ای در محیط نوترینت آگار خالص سازی شدند. به منظور جدا سازی انحصاری سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس، بررسی‌های میکروسکوپی (مدل KF2 شرکت زایس آلمان) با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و مالاشیت گرین و تست‌های بیوشیمیایی شامل هیدرولیز لستین آزمون کاتالاز، تست ایندول، متیل رد، استفاده ازسیترات، حرکت، احیاء نیترات و تخمیر قندهای گلوکز، آرابینوز، مانیتول و زیلوز انجام گرفت [۱۱، ۹].

جهت بررسی فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌ها، در محیط کشت ۵۰ درصد Skim milk agar (مرک آلمان) کشت داده و به مدت زمان ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. وجود منطقه روشن در اطراف کلنی در محیط کشت نشان دهنده پروتئولیز کننده بودن باکتری است. فعالیت لیپولیتیکی بودن باکتری با انجام کشت باکتری در محیط کشت تری‌بوتیرین آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۳ روز و بررسی وجود هاله عدم رشد در اطراف کلنی مورد بررسی قرار گرفت [۱۱]. جهت تأیید تشخیص باکتری، با استفاده از رنگ آمیزی گرم و مالاشیت گرین و تست‌های بیوشیمیایی اقدام به شناسایی سویه‌های باکتری شد [۱۲].

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها با استفاده از تست دیسک دیفیوژن به روش کربی-بویر (روش استاندارد انتشار دیسک در آگار) براساس پروتکل (Clinical and laboratory tandard institue) CLSI تعیین و نتایج پس از ۱۸ ساعت با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد (از خط کش میلیمتری با دقت ۱۰۰ درصد استفاده شد) و مقایسه با جداول در دسترس، خوانده و ثبت شد [۱۴-۱۳]. برای این منظور از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی کوتریموکسازول، کلوکساسیلین، اریترومایسین، سفوتاکسیم، جنتامایسین، آگومنتین، کلرامفنیکل، استرپتومایسین، تتراسایکلین، پیپراسیلین، سفیکسیم، پنی‌سیلین و وانکومایسین (شرکت Mast انگلستان) استفاده شد [۱۴-۱۳].

مراحل کار بدین صورت بود که سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل کدورت لوله ۰/۵ مک فارلند ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$) باکتری تهیه شد، سپس به وسیله سوآپ استریل در محیط کشت جامد مولر هینتون آگار تلقیح گردید. با استفاده از یک پنس استریل دیسک‌ها در سطح محیط کشت قرار داده شد. پلیت در حرارت ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری شد. برای قرائت نتایج با استفاده از یک خط‌کش دقیق، قطر هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک بر حسب میلی متر اندازه گرفته شد و میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک گزارش شد [۱۴-۱۳].

بررسی شیوع آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده با روش‌های فنوتیپی دیسک ترکیبی (Combination disk) و روش دابل دیسک سینرژی (Double disk synergy) انجام شد [۲]. در این مطالعه دیسک‌های ترکیبی شامل دیسک‌های پنی‌سیلین (میکروگرم P:30)، پنی‌سیلین-کلاولانیک اسید (میکروگرم P:10)، وانکومایسین، وانکومایسین- کلاولانیک اسید (میکروگرم V:30)، تتراسایکلین، تتراسایکلین - کلاولانیک اسید (میکروگرم

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 10:04 +0330 on Wednesday February 6th 2019

T:30) خریداری شده از شرکت Mast انگلستان استفاده شد [۱۵-۱۳].

سوسپانسیون باکتریایی (کدورت معادل لوله ۰/۵ مک فارلند)، با سوآپ استریل در محیط مولر هینتون آگار تلقیح شد و دیسک‌های پنی‌سیلین، پنی‌سیلین- کلاولانیک اسید، وانکومایسین، وانکومایسین- کلاولانیک اسید، تتراسایکلین و تتراسایکلین- کلاولانیک اسید در محیط قرار داده شد. نتایج بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرائت شد. به این ترتیب که مواردی که قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک پنی‌سیلین- کلاولانیک اسید، وانکومایسین- کلاولانیک اسید و یا تتراسایکلین- کلاولانیک اسید بیش از پنج میلی‌متر نسبت به پنی‌سیلین، وانکومایسین و تتراسایکلین افزایش داشته باشد، به عنوان سویه تولید کننده ESBL در نظر گرفته شد [۱۵، ۱۳].

جهت جداسازی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{CTX} و bla_{SHV} ابتدا استخراج DNA تمامی سویه‌های تولید کننده با استفاده از روش جوشاندن (Boiling) انجام شد. بدین صورت که دو یا سه کلنی از کشت بیست و چهار ساعته باکتری را در ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل کرده و سپس سوسپانسیون در بن ماری جوش (مدل FG-WB22 ساخت شرکت فن آزما گستر ایران) به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. در ادامه پس از سانتریفیوژ (مدل HS 18500 R، ساخت شرکت فرزانه آرمان ایران) در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، از محلول رویی به عنوان DNA (Deoxyribonucleic acid) الگو استفاده شد [۱۶]. سپس ایزوله‌های تولید کننده ESBLs به ترتیب از نظر حضور ژن‌های با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش PCR (Polymerase reaction chain) بررسی شدند (جدول ۱).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در PCR ژن های blaTEM، blaCTX و blaSHV

طول محصول bp	نام پرایمر	توالی توکلئوتیدی	نام ژن شناسایی شده
۸۵۰	bla_{TEM}	5'-GAGTATTCAACATTTCCGTGTC-3'	TEM-A
	bla_{TEM}	5'-TAATCAGTGAGGCACCTATCTC-3'	TEM-B
۲۲۰	bla_{CTX}	5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3'	CTX-A
	bla_{CTX}	5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3'	CTX-B
۲۳۰	bla_{SHV}	5'-AAGATCCACTATCGCCAGCAG-3'	SHV-A
	bla_{SHV}	5'-ATTCAGTTCCGTTTCCCAGCGG-3'	SHV-B

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی‌مول در لیتر $MgCL_2$، ۰/۵ واحد آنزیم Taq و ۵۰ نانوگرم DNA الگو می‌باشد. شرایط تکثیر ژن‌های bla_{TEM}، bla_{CTX} و bla_{SHV} با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر (ساخت کشور آمریکا Applied biosystems) در جدول ۲ آمده است (جدول ۲). محصولات PCR از نظر حضور ژن‌های مورد نظر با انجام الکتروفورز (Bio-Rad ساخت کشور آمریکا) بر روی ژل آگار ۱ درصد و

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 10:04 +0330 on Wednesday February 6th 2019

حضور مارکر ۱۰۰bp (Ladder Fermentase) محصول کشور لیتوانی و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید نتایج با UV مشاهده شدند [۱۷].

جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC35218 به عنوان کنترل مثبت و از کنترل منفی (klebsiella pneumoniae ATCC 700603) استفاده شد. نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون مجذور کای به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ و از آمارهای توصیفی شامل جداول توزیع فراوانی، درصد فراوانی، درصد فراوانی تجمعی مورد استفاده قرار گرفت و نتایج و داده‌ها در جداول و نمودارها ارائه شدند.

جدول۲- شرایط انجام PCR ژن های blaTEM، blaCTX و blaSHV

ردیف	مراحل	درجه حرارت (سانتی گراد)			زمان		
		bla_{TEM}	bla_{CTX}	bla_{SHV}	bla_{TEM}	bla_{CTX}	bla_{SHV}
۱	**Initial Denaturation**	۹۴	۹۴	۹۴	۳ دقیقه	۳ دقیقه	۵ دقیقه
۲	**Denaturation**	۹۴	۹۴	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰ ثانیه	۴۵ ثانیه
۳	**Annealing**	۴۵	۶۳	۶۱	۱ دقیقه	۱ دقیقه	۱ دقیقه
۴	**Extension**	۷۲	۷۲	۷۲	۱ دقیقه	۱ دقیقه	۱ دقیقه
۵	**Final extension**	۷۲	۷۲	۷۲	۱۰ دقیقه	۱۰ دقیقه	۱۰ دقیقه
۶	**Cycle unmber**	۳۵					

نتایج

از کل ۱۰۰ ایزوله جمع‌آوری شده شیر خام (۵۰ ایزوله) و پنیر (۵۰ ایزوله) از مراکز تهیه و توزیع فرآورده‌های لبنی و پس از شناسایی و تأیید سوش‌های باکتری با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی، از بین ۵۰ نمونه شیر خام (غیر پاستوریزه) ۴۲ ایزوله (۸۴ درصد) حاوی باکتری باسیلوس سوبتیلیس بود و از بین ۵۰ نمونه پنیر، ۳۷ ایزوله (۷۴ درصد) حاوی باسیلوس سوبتیلیس بودند. هم‌چنین با بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنزیم بتالاکتاماز با استفاده از تست دیسک دیفیوژن (ترکیبی) به روش کربی– بویر (روش استاندارد انتشار دیسک در آگار) براساس پروتکل CLSI، ۳۱ ایزوله (۷۳/۸۰ درصد) شیر خام قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند و ۲۵ ایزوله (۶۷/۵۶ درصد) پنیر قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند.

نتایج این تحقیق در ۵۶ نمونه بتالاکتاماز مثبت (۱۰۰ نمونه کل) نشان می‌دهد که بالاترین میزان مقاومت در ایزوله‌هایی که قادر به تولید کردن آنزیم بتالاکتاماز بودند، مربوط به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین (۷۵ درصد) و کمترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۴۴/۶۰ درصد) و سفیکسیم (۴۶/۲۰ درصد) است (جدول۳).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 10:04 +0330 on Wednesday February 6th 2019

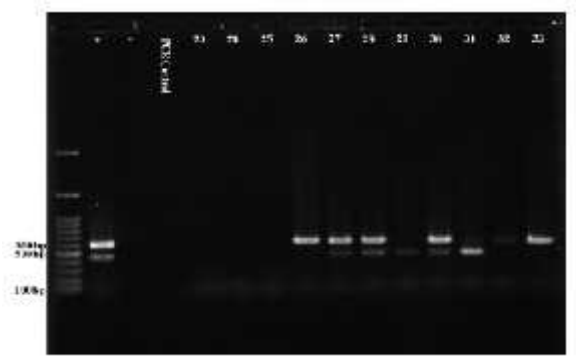
جدول ۳- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی ESBL مثبت در ایزوله های باسیلوس سوبتیلیس جدا شده از شیر خام و پنیر

	کوتریموکسازول	کلوکساسیلین	اریترومایسین	سفوتاکسیم	جنتامایسین	آگومنتین	کلرامفنیکل	تتراسیکلین	استرپتومایسین	پیپراسیلین	سیفیکسیم
باسیلوس سوبتیلیس	۶۲/۵۰	۶۶	۷۵	۴۴/۶۰	۴۶/۲۰	۵۶	۵۴/۲۰	۷۰	۵۴/۲۰	۵۶	۴۶/۲۰

ESBL (Extended –spectrum β lactamase)

از ۵۰ نمونه شیر خام مورد آزمایش، ۲۱ نمونه (۵۰/۱۲ درصد) واجد ژن TEM بوده و در ۱۶ نمونه (۳۸/۰۹ درصد) ژن CTX و هم چنین در ۳ نمونه (۷/۱۴ درصد) ژن SHV شناسایی شد. هم چنین از ۵۰ نمونه پنیر مورد آزمایش در این مطالعه، ۱۷ نمونه (۴۵/۹۴ درصد) واجد ژن TEM بوده و در ۱۳ نمونه (۳۵/۱۳ درصد) ژن CTX و هم‌چنین در ۲ نمونه (۵/۴۰ درصد) ژن SHV شناسایی شد. نتایج ژن‌های شناسایی شده (شکل ۱) و آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که ژن TEM دارای ارتباط معنی‌داری با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین دارد (P<۰/۰۵). با وجود این ژن، مقاومت باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک اریترومایسین بیشتر می‌باشد.

نتایج نشان داد که ژن CTX ارتباط معنی‌داری با آنتی‌بیوتیک‌ها ندارد (P>۰/۰۵). به عبارت دیگر وجود این ژن در نمونه‌های مورد آزمایش باعث افزایش مقاومت باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک نشده است. ارتباط معنی‌داری نیز بین ژن SHV با آنتی‌بیوتیک‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



شکل ۱- نتایج Multiplex PCR، به ترتیب از چپ به راست: مارکر ۱۰۰bp، کنترل مثبت، نمونه‌های شماره ۲۷، ۲۸، ۲۹ و ۳۰ واجد ژن TEM:۸۵۰ bp، نمونه‌های شماره ۲۶، ۲۷، ۲۸ و ۳۰ واجد ژن CTX-M:۲۲۰bp و نمونه‌های شماره ۳۱ و ۳۳ واجد ژن SHV:۲۳۰bp

بحث

ایزوله‌های مولد ESBL معمولاً نسبت به آزترئونام حساس می‌باشند. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله سفالوسپورین‌ها، عوامل ضد میکروبی هستندکه رایج‌ترین درمان برای عفونت‌های باکتریایی می‌باشند [۱۸]. از زمانی که پلاسمیدهای کد کننده ESBLs پدید آمدند، ارگانیسم‌های واجد آن‌ها تا حد زیادی در هیدرولیز و غیر فعال کردن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام نظیر پنی‌سیلین، سفالوسپورین‌ها و آزترئونام موفق بودند [۱۹]. تشخیص فنوتیپی صحیح ESBLs روش خوبی جهت افتراق بین سویه‌های مولد ESBLs و سویه‌هایی است که از دیگر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 10:04 +0330 on Wednesday February 6th 2019

مکانیسم‌ها جهت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام استفاده می‌کنند [۲۰].

از نظر آماری شیوع ESBLs در ایران نسبت به سایر کشورهای جهان و حتی آسیا چشم‌گیرتر می‌باشد. یکی از مهم ترین دلایل آن می‌تواند استفاده بیش از حد و ناصحیح از داروهای بتالاکتام مخصوصاً سفالوسپورین‌های وسیع الطیف باشد [۲۱]. در مطالعات انجام گرفته توسط Imani Fooladi و همکاران میزان مقاومت به جنتامایسین ۲۵/۵ درصد بود. می‌توان گفت که میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در کشورهای توسعه یافته نسبت به کشورهای در حال توسعه و کشورهای جهان سوم پایین‌تر است. این آمار بالا به‌نظر می‌رسد به دلیل ظهور باکتری‌های مقاوم غالب و مولد ESBLs و الگوی درمانی وابسته به سفالوسپورین‌های وسیع الطیف در مواجهه با بیماری‌ها منجر به افزایش باکتری‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف گردیده است [۲۲]. در مطالعه Miraalami و همکاران، ۸۹ درصد از سویه‌های اشریشیاکلی از گروه باکتری‌های تولید کننده ESBL شناسایی شدند. بر اساس این مطالعه بیش‌ترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و اریترومایسین به ترتیب با ۹۶ درصد و ۹۴/۵ درصد و بیش‌ترین میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و ایمی‌پنم با ۶۷/۲ درصد فراوانی در بین سویه‌های اشریشیا کلی گزارش شد [۲۳]. Tamberkar و همکاران بیش‌ترین میزان مقاومت را نسبت به آمپی سیلین (۸۷ درصد) و کوتریماکسازول (۹۱ درصد) و کمترین مقاومت را نسبت به نیتروفورانتوئین (۲۹ درصد) در بین سویه‌های اشریشیا کلی گزارش کردند [۲۳].

در مطالعه Tankhiwale و همکاران بر روی اشریشیا کلی بیش‌ترین مقاومت نسبت به کوتریماکسازول (۸۲ درصد) و آمپی سیلین (۷۹/۹ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتوئین (۳۸ درصد) و سفتی‌زوکسیم (۴۱/۳ درصد) گزارش شد [۲۴]. اختلاف مشاهده شده در این نتایج (نتایج مطالعات ذکر شده قبلی در ایران) با سایر کشورها مربوط به الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک، منطقه جغرافیایی، تفاوت در الگوی مقاومت در مناطق مختلف و مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک در کشورمان می‌باشد [۱۷].

از ۵۰ نمونه شیر خام مورد آزمایش، ۲۱ نمونه (۵۰/۱۲ درصد) واجد ژن TEM، ۱۶ نمونه (۳۸/۰۹ درصد) ژن CTX و در ۳ نمونه (۷/۱۴ درصد) ژن SHV شناسایی شد. هم‌چنین از ۵۰ نمونه پنیر، ۱۷ نمونه (۴۵/۹۴ درصد) واجد ژن TEM، ۱۳ نمونه (۳۵/۱۳ درصد) ژن CTX و در ۲ نمونه (۵/۴۰ درصد) ژن SHV شناسایی شد. نقش ژن CTX-M در مقاومت به بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سالیان اخیر به طور روزافزونی در حال افزایش است [۵]. اگرچه فراوانی آن در نقاط مختلف متفاوت است، ولی به نظر می‌رسد که توزیع کلی آن به نسبت سایر ژن‌های مسئول در حال افزایش باشد [۲۵]. آنزیم بتالاکتاماز SHV عمدتاً در کلبسیلاهای مقاوم و هم‌چنین در سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر دیده شده است [۲۶]. در مطالعه Eisner و همکاران در اتریش بر روی شیوع CTX-M، ۵۸ درصد از اشریشیاکلی‌ها تولید کننده CTX-M بودند [۲۷]. Monstein و همکاران در تحقیقات

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 10:04 +0330 on Wednesday February 6th 2019

خود میزان جداسازی ژن‌های TEM، CTX-M و SHV را به ترتیب ۳ نمونه، ۲ نمونه و ۱ نمونه گزارش کردند، هم چنین فراوانی هر سه ژن در یک نمونه و دو ژن TEM و CTX-M در ۱۳ نمونه شناسایی گردید [۲۸]. در مطالعه ای که در ترکیه بر روی نمونه‌های باکتری‌های روده ای به دست آمده از بیمارستان انجام شد، شیوع ژن TEM، ۵۲/۷ درصد برآورد گردید [۲۹] که با نتایج مطالعه حاضر در مورد میزان حضور این ژن در شیر خام مطابقت دارد.

در مطالعه Shahcheraghi و همکاران جهت شناسایی ژن SHV در ایزوله‌های اشریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا، شیوع این ژن به ترتیب ۶ درصد و ۲۸ درصد گزارش شد که با نتیجه تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد [۱۳]. در مطالعه Hujer و همکاران بر روی نمونه‌هایی که از بیمارستانی در آمریکا بر روی سربازان عراقی و افغانستانی انجام شده بود، ۴۰ درصد از نمونه‌ها حاوی bla_{TEM} بودند و میزان ایزوله‌های TEM مثبت در این مطالعه پایین تر (۱۲/۸ درصد) بود [۳۰].

در مطالعه دیگری که توسط Jin و همکاران در چین انجام شد، میزان نمونه‌های TEM مثبت در بین ایزوله‌های مقاوم ۸۱/۵ درصد گزارش شد که در مقایسه با مطالعه ما بسیار بالاتر است [۳۱]. بررسی Celenza و همکاران در آمریکای جنوبی نشان داد که میزان TEM مثبت و CTX مثبت به ترتیب ۲۶/۱ و ۳۰/۴ درصد بوده است [۳۲]. در مطالعه‌ای توسط Jain و Monal در هند، ۲۰/۳ درصد نمونه‌ها حاوی ژن SHV و ۴۸/۴ درصد دارای ژن TEM بودند [۳۳]. مقایسه این نتایج نشان می دهد که دلیل اختلاف در آن‌ها به جهت تفاوت میزان شیوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سویه‌های باکتریایی جدا شده از کشورهای مختلف و هم چنین در یک کشور از ناحیه‌ای با ناحیه دیگر متفاوت می باشد که این مسئله بستگی به سیستم کنترل عفونت، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و رژیم درمانی دارد [۳۴].

آلودگی مواد غذایی به سویه‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها خطر انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به فلور باکتریایی روده مصرف کنندگان افزایش می‌دهد و باید به عنوان یک عامل خطر بیشتر مورد توجه قرار گیرد. مدیریت صحیح مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و اتخاذ تدابیر لازم در رعایت استانداردهای مراقبت‌های بهداشتی می‌تواند باعث جلوگیری از گسترش مقاومت به دیگر بیماران بستری و یا وسایل بیمارستانی شود [۱۰]. از مهم‌ترین محدودیت‌ها و چالش‌های تحقیق، مشکلات مربوط به تشخیص ایزوله‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف و استفاده از روش‌های مختلف فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی است که هر کدام از این روش‌ها مزایا، مشکلات و معایب خاص خود را دارد [۳۵]. از طرفی اگرچه روش‌های جدید فنوتیپی و مولکولی برای تشخیص بتالاکتامازها مورد استفاده است، اما همیشه نیاز به تست‌های مطمئن و ساده‌تر است. هم چنین شناسایی سریع و ردیابی سویه‌های مولد این آنزیم‌ها و نیز بررسی سایر تیپ‌های بتالاکتاماز می‌تواند گامی‌مهم در درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها تلقی شده و باعث جلوگیری از گسترش آن‌ها شود. لذا پیشنهاد می‌شود انجام بررسی‌های مولکولی در کنار آزمون‌های فنوتیپی در تشخیص این مقاومت‌ها مؤثر می‌باشد و تأثیر مهم در درمان و پیش

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 10:04 +0330 on Wednesday February 6th 2019

گیری از این گونه عفونت‌ها و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و مناسب را دارد. متأسفانه پیدایش سویه‌های باکتریایی چند مقاومتی با پایداری نسبتاً بالای پلاسمیدهای کد کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف ESBL همراه است [۳۶]. بنابراین تحقیقات مشابهی در مناطق مختلف این کشور باید انجام گیرد تا به شناسایی ژنوتیپ‌های بتالاکتامازهای وسیع الطیف در یک ناحیه جغرافیایی خاص دست یافت.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که شیوع باکتری‌های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف و هم‌چنین میزان فراوانی ژن‌های TEM و CTX بالا می‌باشد و میزان سویه‌های مولد ESBLs و به ویژه ژن‌هایی که عامل بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در آن‌ها می‌شود، متفاوت بوده و به‌عنوان یک خطر بالقوه محسوب می‌شود. لذا با توجه به گسترش روز افزون و اهمیت این گروه از آنزیم‌ها به خاطر اعطای سطح بالای مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از اهمیت خاصی برخوردار بوده و با تعیین نوع و شیوع این ژن‌ها، می‌توان تمهیدات بهداشتی مختلفی را به منظور اجرای برنامه‌های درمانی، کنترل عفونت و جلوگیری از انتشار سویه‌های مقاوم اتخاذ نمود. برای این منظور استفاده از آزمون‌های فنوتیپی و انجام روش‌های مولکولی از قبیل PCR به دلیل حضور این ژن‌ها و سایر ژن‌های بتالاکتامازی ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر تأمین منابع مالی مورد نیاز و هم‌چنین از کارشناس آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به خاطر همکاری و مساعدت در انجام آزمایشات مولکولی این پروژه علمی- پژوهشی، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

.

References

[1] Abike TO, Olufunke OA, Temitope OO. Prevalence of extended spectrum-lactamases in multidrug resistant strains of Gram-negative bacteria. *Afr Microbiol Res* 2018; 12(7): 147-51.

[2] Overdevest IT, Willemsen I, Elberts S, Verhulst C, Kluytmans JA. Laboratory detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: evaluation of two screening agar plates and two confirmation techniques. *J clin microbiol* 2011; 49(2): 519-22.

[3] Juan C, Torrens G, González-Nicolau M, Oliver A. Diversity and regulation of intrinsic β-

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 10:04 +0330 on Wednesday February 6th 2019

lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens. *FEMS microbiol rev* 2017; 41(6): 781-815.

[4] Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(2): 165-74.

[5] Bonnedah J, Drobni M, Gauthier-Clerc M, Hernandez J, Granholm S, Kayser Y, et al. Dissemination of Esherichia Coli with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. *PLoS One* 2009; 4(6): e5958.

[6] Kasap M, Fashae K, Torol S, Kolayli F, Budak F, Vahaboglu H. Characterization of ESBL (SHV-12) producing clinical isolate of Enterobacter aerogenes from a tertiary care hospital in Nigeria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2010; 9: 1.

[7] Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006; 43: Issue Supple 2: 49-56.

[8] Church D, Essayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(2):403-34.

[9] Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad SH. Susceptibility patterns and crossresistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the south of Iran. *Burns* 2006; 32(3): 343-7.

[10] Bonyadian M, Ebrahimi A , Jamali M. Study on the antibiotic resistancisolated from raw milk and unpasteurized cheese and survey on resistance transmission to E.coli O2:K12. *J* Vet *Clin Sci* 2013; 7(1): 25-31. [Farsi]

[11] APHA. American Public Health Association in Standard Methods for the Examination of Dairy Products. (Ed. Elmer.H.Marth, Washington DC). 1978.

[12] Kim HK, Park SJ, Han JI, Lee HK. Microbially mediated calcium carbonate precipitation on normal and lightweight concrete. *Constr Build Mater* 2013; 38: 1073-82.

[13] Shahcheraghi F, Nikbin VS, Shooraj F, Shafiei M. Investigation of *blaIMP-1*, *blaVIM-1* and *blaSPM-1 MBL* Genes among Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Imam Khomeini Hospital Tehran, Iran. *Pajoohande* 2009; 14(2): 67-72. [Farsi]

[14] Haghi F, Zeighami H, Monazami A, Toutouchi F, Nazaralian S, Naderi G. Diversity of virulence genes in multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from burn wound infections. *Microb pathogen* 2018; 115: 251-6.

[15] Nadali S., Nayeb Aghaee S.M.,Noruzian H. Phenotypic and molecular detection of ESBL producing CTX-M genes in isolated from Escherichia coli poultry with colibacillosis in

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 10:04 +0330 on Wednesday February 6th 2019

Khorramabad city. *Yafte* 2018; 19(5): 61-70. [Farsi]

[16] Jemima SA, Verghese S. Molecular Charaterization of nosocomial CTX-M type beta-lactamase producing Enterobacteriaceae from a tertiary care hospital in south India. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26(4): 365-8.

[17] Yazdi M, Nazemi A, Mir inargasi M, Khataminejad MR, Sharifi S, Babaikochkaksaraei M. Prevalence of SHV/CTX-M/TEM (ESBL) Beta-lactamas Resistance Gene in Esherichia Coli Isolated from Urinary Tract Infections in Tehran, Iran. *Med Lab J* 2010; 4(1): 48-54. [Farsi]

[18] Colodner R. Extended – Spectrum β- lactamases: A Chaleenge for clinical microbiologists and infection control specialists. *J Clin Microbial Infect Dis* 2006; 25(1): 49-51.

[19] Kassim A, Omuse G, Premji Z, Revathi G. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. *Annals clin microbiol antimicrob* 2016; 15: 21.

[20] Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of Extended – Spectrum β-lactamase- production in Enterobacteriaceae: Review and bench guide. *Clin Microbial Infect* 2008; 14 Suppl 1: 90-103.

[21] Detsis M, Karanika S, Mylonakis E. ICU Acquisition Rate, Risk Factors, and Clinical Significance of Digestive Tract Colonization With Extended-Spectrum Beta-Lactamase–Producing Enterobacteriaceae: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit care med* 2017; 45(4): 705-14.

[22] Imani Fooladi AA, Rostami Z, Shapouri R. Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimen by phenotype and genotype methods. *J Ard Univ Med Sci* 2010; 10(3): 189-98. [Farsi]

[23] Miraalami Gh, Parviz M, Khalajzadeh S. Evaluation of Antibiotic Resistance in Extended-spectrum Beta-lactamase (ESBL) Genes in the E.coli Isolate of Urinary Infection. *J Babol Univ Med Sci* 2015; 17(9): 19-26.

[24] Tankhiwale SS, Jalgaonkar SV, Ahamad S, Hassani U. Evaluation of extended spectrum betalactamase in urinary isolates. *Indian J Med Res* 2004; 120(6): 553-6.

[25] Bonner R. Growing group of extended-spectrum β-lactamase-producing microorganisms in nosocomial patients and molecular characterization of shv type isolates. *Braz J of Microbiol* 2010; 41(2): 278-82.

[26] Bonnedah J, Drobni M, Gauthier-Clerc M, Hernandez J, Granholm S, Kayser Y, et al. Dissemination of Esherichia Coli with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 10:04 +0330 on Wednesday February 6th 2019

gulls in the south of France. *PLoS One* 2009; 4(6): e5958.

[27] Eisner A, Fagan EJ, Feierl G, Kessler HH, Marth E, Livermore D, et al. Emergence of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M extended-spectrum β-lactamase in Austria. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(2): 785-7.

[28] Monstein H, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplificatiob assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS* 2007; 115(12): 1400-8.

[29] Tasli H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM-and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based Enterobacteriaceaein Turkey. Jpn J Infect Dis. 2005; 58(3):162-7.

[30] Hujer K, Hujer A, Hulten E, Bajaksouzian S, Adams J, Donskey C, et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug resistant *Acinetobacter* sp. Isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(12): 4114-23.

[31] Jin H, Xu Xm, Mi Zh, Mou Y, Liu Pei. Drug-resistant gene based genotyping for *Acinetobacter baumannii* in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial setting. *Chinese Med J* 2009; 122(3): 301-6.

[32] Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of blaCTX-M-type genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(5): 975-8.

[33] Jain A, Monal R. TEM and SHV genes in extended spectrum β-lactamase producing *Klebsiella* species & their antimicrobial resistance pattern. *Indian J Med Res* 2008; 128(6): 759-64.

[34] Archin T, Afzalian E, Kargar M, Ghasemi Y. Molecular Identification of SHV, TEM, CTX-M β lactamases Genes and Antibiotics Resistance Pattern of k.pneumoniae Isolates Collected from ICU Patients of Namazi Hospital, Shiraz, Iran. *Armaghane danesh* 2014; 18(10): 816-25. [Farsi]

[35] Dallal MS, Sabbaghi A, Aghamirzaeie HM, Lari AR, Eshraghian MR, Mehrabad JF, et al. Prevalence of AmpC and SHV β-lactamases in clinical isolates of Escherichia coli from Tehran Hospitals. *Jundishapur J Microbiol* 2013; 6(2): 176-80.

[36] Lashgari N, Vand Yousefi J, Siadat SD, Shahcheraghi F, Khosravi M, Vakili H, et al. Identification of bla-CTX-M β-lactamase in Klebsiella pnumoniae clinical isolates by polymerase chain reaction. *Med Sci J Islam Azad Univ Tehran Med Branch* 2014; 24(3): 148-52.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 10:04 +0330 on Wednesday February 6th 2019

Molecular Detection of *blaTEM*, *blaCTX* and *blaSHV* beta-lactamase Genes in Bacillus Subtilis Strains Isolated from Samples of Raw Milk and Cheese: A Laboratory Study

C. Ghazaei[1], A. Azizpour[2]

Received: 21/09/2017 Sent for Revision: 14/02/2018 Received Revised Manuscript: 23/06/2018 Accepted: 03/07/2018

Background and Objectives: The presence of ESBLs (Extended spectrum β-lactamase) for the health system has many problems. Moreover, these strains have increased resistance to other antibiotics.The aim of this study was to determine the molecular detection of blaTEM, blaCTX and blaSHV beta-lactamase genes in Bacillus subtilis strains isolated from raw milk and cheese samples.

Materials and Methods: In this laboratory study, 100 samples of raw milk and cheese were prepared and cultured. The suspicious colonies of Bacillus subtilis were identified by biochemical methods. Disc diffusion method was used to measure antibiotic susceptibility. Also, the presence of blaTEM, blaCTX and blaSHV beta-lactamase genes in ESBLs strains was evaluated by PCR (Polymerase reaction chain) method. Data were analyzed using chi-square test and reported in the form of descriptive statistics (number and percentage).

Results: The highest resistance in isolates that were able to produce the β-lactamase enzyme was related to erythromycin antibiotics (75%) and the least was related to cefotaxime (44.60%) and cefixime (46.20%) antibiotics. Of the 50 raw milk samples, TEM ***(****Temoneira*) gene was identified in 21samples, CTX (Cefotaximase) gene in 16 and SHV (Sulfhydryl-variable***)*** gene in 3 samples. Of the 50 cheese samples, 17 (45.94%) samples contained TEM gene, 13 (35.13%) CTX gene and 2 (5.40%) SHV gene.

Conclusion: According to the results, the use of molecular methods along with phenotypic methods seems necessary to fully recognize these types of resistance.

Key words: Bacillus subtillis, Milk, Beta-lactamase, Antibiotics, BelaCTX

Funding: This research was funded by University of Mohaghegh Ardabili.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Mohaghegh Ardabili University approved the study.

How to cite this article: Ghazaei S, Azizpour A. Molecular Detection of *blaTEM*, *blaCTX* and *blaSHV* beta-lactamase Genes in Bacillus Subtilis Strains Isolated from Samples of Raw Milk and Cheese: A Laboratory Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018; 17 (8): 745-58. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Microbiology, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran, ORCID: 0000-0001-7802-879X
(Corresponding Author) Tel: (045) 33512081, Fax: (045) 33510811, Email: ciamakghazaei@yahoo.com
2- Assistant Prof., Dept. of Animal Sciences, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran, ORCID: 0000-0002-2834-2200

www.SID.ir