گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۸، دوره ۲۱، صفحه ۲۹۲-۲۸۶

# شناسایی ژن‌های مقاومت qacEΔ1، qacG، qacE، qacF در اشریشیاکلی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) به بنزالکلونیوم‌کلراید

فروزان حدادی (MSc)[۱]، احسان‌الله غزنوی‌راد (PhD)[۲]، امیر الماسی حشیانی (PhD)[۳]، حمید ابطحی (PhD)[۲*]

۱-کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی ارک، اراک، ایران
۲-مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۳-مرکز تحقیقات طب سنتی و مکمل، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران

دریافت: ۹۷/۱۱/۶، اصلاح: ۹۸/۳/۵، 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 qacEΔ1، qacG، qacE،qacF در *اشریشیاکلی* تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) به بنزالکلونیوم‌کلراید انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعهٔ مقطعی روی ۱۵۰ نمونه بالینی بیمارستان‌های منتخب اراک انجام شد. با استفاده از روش‌های فنوتیپی دیسک دیفیوژن و دیسک‌های ترکیبی و بررسی ژن‌های CTXM1، TEM، SHV، توسط روش‌های ژنوتیپی، سویه‌های ESBL شناسایی شدند. همچنین PCR برای تعیین ژن‌های مقاومت qacEΔ1، qacG، qacE،qacF 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 بنزالکونیوم‌کلراید بررسی شدند.

**یافته‌ها:** ۶۰ درصد اشریشیاکلی‌ها، تولیدکننده ESBL بودند. ژن مقاومت qacEΔ1 در همه آن‌ها مشاهده شد و ژن‌های مقاومت qacG، qacE،qacF در هیچکدام از سویه‌ها دیده نشد. در سویه‌ها حداقل غلظت مهاری بین ۳۲ تا ۶۴ میلی‌گرم در لیتر برای بنزالکلونیوم‌کلراید بدست آمد. مقاومت به کاربانپنم‌ها(۳۳/۳۳درصد) مشاهده شد.

**نتیجه گیری:** این مطالعه نشان داد که ژن مقاومت qacEΔ1 و مقاومت به ماده گندزدا بنزالکونیوم‌کلراید افزایش یافته‌است همچنین افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در سویه‌های اشریشیاکلی ESBL مشاهده شد.

**واژه های کلیدی: اشریشیاکلی، بتالاکتاماز، بنزالکلونیوم‌کلراید، گندزدا.**

## مقدمه

بتالاکتامازها آنزیم‌هایی هستند که با هیدرولیز حلقه بتالاکتام موجب بی اثرکردن 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 می تواند همزمان ژن‌های مقاومت به سایر عوامل ضدمیکروبی ازجمله 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 شده اند و سه ژن بتالاکتاماز TEM, SHV, CTXM1 اکثرا 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 بنزالکونیوم‌کلراید، 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 دانشجو رشته میکروب شناسی پزشکی و طرح تحقیقاتی به شماره ۱۳۹۶.۲۹۴ دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.
* مسئول مقاله: دکتر حمید ابطحی
آدرس: اراک، میدان بسیج، دانشگاه علوم پزشکی، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۳۴۱۷۳۵۲۰- ۰۸۶
E-mail: abtahi@arakmu.ac.ir

ترکیبات فعالیت ضدمیکروبی وسیع دارند(۱۱و۱۰). 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 گندزداهایی 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 (۱۷و۱۶). 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 بیماری-های 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 بنزالکونیوم‌کلراید 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 درسال 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 بلادآگار و مک‌کانکی(Merck، آلمان)کشت داده شد. اشرشیاکلی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی از جمله رنگ‌آمیزی گرم، رشد بر روی محیط‌های VP، MR، SIM ، TSI، OF، سیمون سیترات، اوره، لیزین دکربوکسیلاز تعیین هویت شدند (۲۰).

**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 مولرهینتون‌آگار(Merck،آلمان) بررسی شدند. آنتی‌بیوتیک‌ها (Mast، انگلستان) شامل:

نیتروفورانتوئین (۳۰۰µg)، تری‌متوپریم سولفامتاکسازول (۵µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، سفپیم (۳۰µg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفازولین (۳۰µg)، سفکسیم (۵µg)، ایمی‌پنم (۱۰µg)، مروپنم (۱۰µg)، تتراسیکلین (۳۰µg)، سفوکسیتین (۵µg)، سفتازیدیم (۳۰µg)، سفتریاکسون (۳۰µg) می‌باشد. همچنین از سویه *Ecoli 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 (۳۰µg)، سفتازیدیم–کلاوونیک‌اسید(۳۰-۱۰µg)، سفوتاکسیم(۳۰µg) و سفوتاکسیم–کلاوونیک‌اسید (۳۰-۱۰µg) استفاده گردید. سوسپانسیونی از باکتری معادل با نیم مک‌فارلند تهیه شد و بر روی محیط مولر هینتون آگار(Merck، آلمان) کشت داده شد. سپس دیسک‌ها روی محیط قرارداده 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 اشرشیاکلی ATCC 35218 به منظور کنترل کیفی ایزوله‌های ESBL استفاده شد(۲۱). سپس ایزوله‌های اشریشیاکلی ESBL در محیط لوریا برتانی براث (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 (جدول۱) انجام شد (۲۲).

**جدول ۱. ویژگی پرایمرهای ژن بتالاکتاماز مورد استفاده در PCR**

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

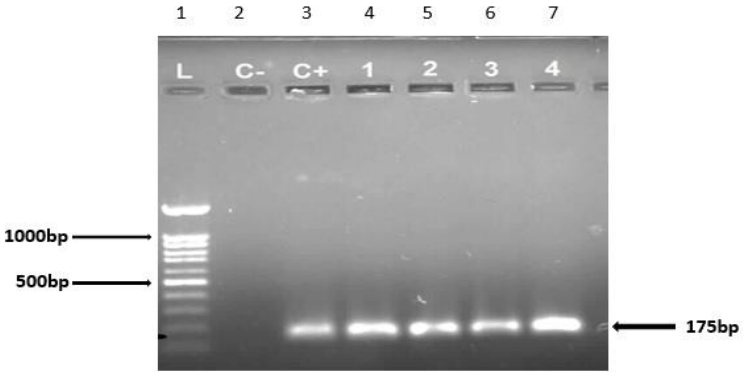
**شناسایی ژن‌های qacE، qacEΔ1، qacF و qacG توسط واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR):** بعد از تهیه یک کشت تازه از ایزوله‌های اشریشیاکلی تولیدکننده ESBL ذخیره شده، استخراج DNA با استفاده از کیت (یکتا تجهیز آزما – ایران) انجام شد. توالی پرایمرها جهت ساخت تحویل شرکت ژن فن آوران (نمایندگی انحصاری شرکت TAG Copenhagen در ایران) گردید. سپس شناسایی ژن‌های qacE، qacEΔ1، qacF و qacG در ایزوله‌های اشریشیاکلی ESBL با کمک پرایمرهای اختصاصی آماده مطابق جدول۲ 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 وعکس برداری شد (شکل ۱).

**تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی:** حداقل غلظت مهارکنندگی ایزوله‌های اشریشیاکلی ESBL نسبت به بنزالکونیوم‌کلراید ۴٪ به روش میکرودایلوشن براث 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 ۵×۱۰۵ گردید. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شد. رقت‌های سریالی از ۱/۲ تا ۱/۱۰۲۴ بدست آمد و محدوده غلظت برای تعیین MIC ماده ضدعفونی‌کننده ۰/۱۲۵ تا ۱۰۲۴ میلی‌گرم در لیتر بود. از *E. coli* ATCC 25922 به عنوان کنترل کیفیت استفاده شد (۲۱).

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




**شکل ۱. نتایج PCR ژن qacEΔ1 در سویه‌های *اشریشیاکلی* ESBL، ستون ۱: مارکر اندازه bp ۱۰۰، ستون۲: 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**

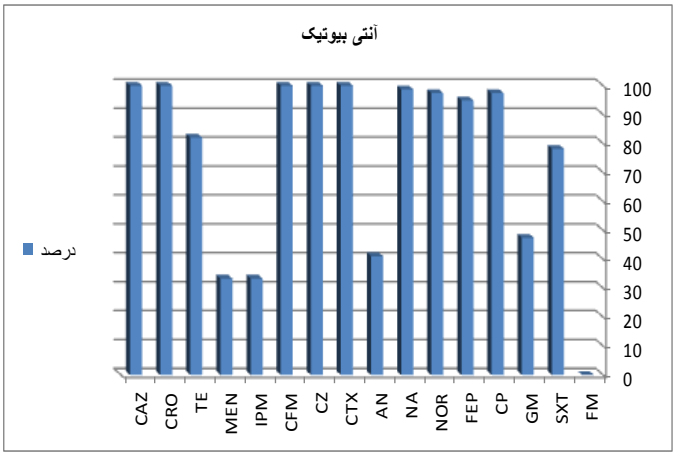
**جدول ۲. پرایمرهای qac مورد استفاده در این مطالعه**

| Gene | Sequence (5'-3') | Annealing temperature(elongation time) | PCR product size (bp) | Accession no. |
|---|---|---|---|---|
| qacEΔ1 | AATCCATCCCTGTCGGTGTT<br>CGCAGCGACTTCCACGATGGGGAT | ۵۶°C (۳۰s) | ۱۷۵ | JN596280<br>JN566044 |
| qacE | AAGTAATCGCAACATCCG<br>CTACTACACCACTAACTATGAG | ۵۰°C (۳۰s) | ۲۵۸ | X68232<br>HQ875011 |
| qacF/H/I | GTCGTCGCAACTTCCGCACTG<br>TGCCAACGAACGCCCACA | ۶۰°C (۳۰s) | ۲۲۹ | FJ160769<br>JN596279 |
| qacG | TGCCAACGAACGCCCACA<br>AACGCCGCTGATAATGAA | ۵۶°C (۳۰s) | ۱۲۲ | FJ950725<br>AF288045 |

## یافته ها

نمونه‌های مورد بررسی شامل ۱۲۳ نمونه ادرار (۸۲٪)، ۱۱ نمونه خون (۷/۳٪)، ۱۱نمونه زخم(۷/۳٪)، ۵ نمونه خلط(۳/۴٪) بودند. از ۱۵۰ نمونه مورد مطالعه ۱۳۰ نمونه اشریشیاکلی جداسازی شد. ۷۸ ایزوله (۶۰ 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 (۵۷/۶۹٪) ژن SHV و تعداد ۵۵ (۷۰/۵۱٪)ایزوله ژن TEM داشتند. بر اساس الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی اشرشیاکلی ESBL، کمترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتوئین بود و مقاومت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش یافته بود از جمله کارباپنم‌ها که ۳۳/۳۳ درصد بود (نمودار ۱). نتایج حساسیت ماده ضدعفونی‌کننده بنزالکونیوم‌کلراید نشان داد که مقدار MIC در سویه‌های اشریشیاکلی ESBL بین

۶۴-۳۲ میلی‌گرم در لیتر بوده است که ۴۳/۶۴ درصد نمونه‌ها غلظت ۶۴ میلی‌گرم در لیتر و ۵۶/۳۶ درصد نمونه‌ها غلظت ۳۲ میلی‌گرم در لیتر داشتند. در همه ایزوله-های *اشریشیاکلی*ESBL ژن qacEΔ1 مشاهده شد و در هیچکدام از ایزوله‌ها، ژن‌های qacG، qacE،qacF مشاهده نشد.




**نمودار ۱. توزیع فراوانی الگوی مقاومت ایزوله‌های *اشریشیاکلی*- ESBL نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی**

**FM (نیتروفورانتوئین)، SXT تری¬متوپریم سولفومتاکسازول)، GM (جنتامایسین)، CP (سیپروفلوکساسین)، FEP (سفپیم)، NOR (نورومایسین)، NA(نالیدیکسیک¬اسید)، AN (آمیکاسین)، CTX (سفوتاکسیم)، CZ (سفازولین)، CFM (سفکسیم)، IPM (ایمی¬پنم)، MEN (مروپنم)، TE (تتراسیکلین)، CRO(سفتریاکسون)، CAZ (سفتازیدیم).**

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، ژن qacEΔ1 در همه ایزوله‌ها (۱۰۰ درصد) مشاهده شد. ژن‌های مقاومت qacE، qacEΔ1، qacF، qacG بر روی پلاسمید و یا انتگرون کدگذاری شده‌اند که می‌توانند به واسطه پمپ افلاکس، مقاومت به QACsرا ایجاد کنند(۱۵و۱۳و۱۲). اشریشیاکلی ESBL با بیان ژن مقاومت به ترکیبات آمونیوم چهارظرفیتی مانند ژن qacEΔ1 قادر است میزان بیشتری از مواد گندزدا را تحمل کند. بنابراین استفاده بیش از حد از ماده ضدعفونی‌کننده نه تنها باعث حذف و از بین رفتن باکتری‌ها نمی‌شود بلکه می‌تواند به مقاومت باکتری‌های ESBL به مواد گندزدا منجر شود. در مطالعه Canal و همکاران ژن qacEΔ1 در همه ایزوله‌ها(۱۰۰ درصد) مشاهده شد (۲۴). Shafaati و همکاران فراوانی ژن qacEΔ1 را در میان ایزوله‌های اشرشیاکلی تولیدکننده ESBL جدا شده از نمونه‌های ادراری ۹۴ درصد گزارش کردند (۱۸). Mahzonieh و همکاران فراوانی ژن مقاومت qacEΔ1 در باکتری گرم منفی را ۹۱/۵ درصد گزارش کردند(۲۵). در این مطالعه، همه سویه‌های اشریشیاکلی ESBL حداقل غلظت مهاری بین ۳۲ تا ۶۴ میلی‌گرم در لیتر برای بنزالکلونیوم‌کلراید داشتند. در مطالعه Guo و همکاران حداقل غلظت مهاری سویه‌های اشریشیاکلی ESBL، بین ۱۲۸-۸ میلی‌گرم در لیتر گزارش شد (۲۳) در مطالعه Liu و همکاران نیز حداقل غلظت مهاری بنزالکونیوم‌کلراید برای اسنیتوباکتر بومانی ۳۲-۸ میلی‌گرم در لیتر و برای کلبسیلا ۱۲۸-۳۲ گزارش شده است (۲۶). با توجه به افزایش غلظت مهاری ترکیبات آمونیوم چهارظرفیتی بنزالکونیوم‌کلراید در این مطالعه، ضرورت توجه بیشتر در انتخاب نوع ماده گندزدا و تحقیق گسترده‌تر درخصوص میزان مصرف آن را بیان می‌کند از طرف دیگر جهت اثر بخشی مواد ضدعفونی‌کننده لازم است ازغلظت مناسب آنتی‌سپتیک‌ها و گندزداها در بیمارستان‌ها استفاده شود.

مطالعه حاضر نشان داد که موثرترین آنتی‌بیوتیک برای اشریشیاکلی ESBL، نیتروفورانتوئین است که با مطالعه Amiri و همکاران در سال ۲۰۱۵ و Ranjbaran و همکاران مطابقت داشت (۵و۲۷). همچنین مقاومت نسبت به کاربانپم‌ها در مقایسه با مطالعات پیشین ، افزایش یافته است(۲۸و۲۶و۷) که نشان-دهنده افزایش مصرف کاربانپم‌ها در بیمارستان‌ها می باشد. قابل ذکر است کاربانپم-ها اغلب گزینه انتخابی برای درمان عفونت‌های باکتری‌های مولد ESBL و همچنین درمان عفونت‌های شدید کسب شده از بیمارستان نیز می‌باشند. بنابراین مصرف بی‌رویه، و تجویز غیرمنطقی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند منجر به ایجاد پدیده مقاومت دارویی شود. بنابراین شیوع بالای اشریشیاکلی مولد ESBL و افزایش ژن‌های مقاومت qac در آنها، همچنین مقاومت به عوامل آنتی‌باکتریال وسیع الطیف( کاربانپم ها) در باکتری‌های انتروباکتریاسه، از یافته‌های نگران‌کننده در این مطالعه می‌باشد، که نیاز به اقدامات کنترل عفونت جهت مدیریت منطقی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و شناسایی سریع سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز دارد. جهت جلوگیری از افزایش مقاومت دارویی در مناطق مختلف پیشنهاد می‌شود تحقیقات مستمر در هر منطقه انجام شود. زیرا تجویز منطقی آنتی‌بیوتیک‌ها به اثربخشی فرآیند درمان کمک می‌کند. از طرفی افزایش حداقل غلظت مهاری در این مطالعه نشان می‌دهد جهت اثر بخشی مواد ضدعفونی‌کننده لازم است ازغلظت مناسب گندزداها در بیمارستان‌ها استفاده شود.

استفاده از مواد گندزدا در غلظت‌هایی پایین‌تر از غلظت مهاری ممکن است باعث افزایش شیوع باکتری‌های مقاوم به مواد گندزدا گردد و این امر باعث گسترش عفونت در بیماران و جامعه می‌شود. با وجود شیوع ژن‌های مقاومت QAC در اشریشیاکلی، مکانیسم مقاومت مواد گندزدا و ارتباط بین ژن‌های مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های 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 می‌تواند به اثربخشی فرآیند کنترل عفونت در بیمارستان‌ها کمک نماید.

## تقدیر و تشکر

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

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

**F. Hadadi (MSc)[1], E. Ghaznavi Rad (PhD)[2], A. Almasi-Hashiani (PhD)[3], H. Abtahi (PhD) *[2]**

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 26th 2019, Revised: May 26th 2019, Accepted: July 1st 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.

***Corresonding 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 β-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 Δ 1 in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett. 1998;159(2):173-8.
3.Azadpour M, Nowroozi J, Goudarzi G, Mahmoudvand H. Presence of qacEΔ1 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, Schneper 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 β 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 Δ1 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 qacEΔ1 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, 8th 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 E scherichia 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