

## شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز در اشرشیاکلی جدا شده از زخم پای دیابتی به روش Multiplex PCR

نویسندگان:

مجتبی اگرمی<sup>۱</sup>، زهرا کارگر جهرمی<sup>۲\*</sup>، ژیلار رحمانیان<sup>۳</sup>، هدی حق شناس<sup>۴</sup>، ساناز رضائیان<sup>۴</sup>

- ۱- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران
- ۲- مرکز تحقیقات زئونوز، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران
- ۳- دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران
- ۴- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.16, No.3, Fall 2018

### چکیده:

**مقدمه:** زخم پای دیابتی، از عوارض دیابت شیرین است و با همراه شدن عفونت در زخم می تواند خطر قطع عضو و یا حتی مرگ را افزایش دهد. باکتری E.coli می تواند به وخامت وضعیت زخم منجر شود. مطالعه حاضر با هدف شناسایی ژن های بتالاکتاماز در اشرشیاکلی جدا شده از زخم پای دیابتی می باشد.

**روش کار:** در این مطالعه آزمایشگاهی، ۱۱۰ جدایه اشرشیاکلی از بیماران زخم پای دیابتی بستری در بخش عفونی بیمارستان های پیمانیه جهرم، علی اصغر و نمازی شیراز در سال ۱۳۹۶ جداسازی شد. تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی، شناسایی فنوتیپی سویه های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL)، سویه های تولید کننده متالوبتالاکتاماز (MBL) و سویه های تولید کننده کارباپنماز انجام شد. وجود ژن های کدکننده آنزیم های بتالاکتاماز bla TEM، bla SHV و bla OXA-1 با آزمایش Multiplex PCR بررسی گردید.

**یافته ها:** در این مطالعه ۳۵ جدایه اشرشیاکلی جداسازی شد. ۱۳ جدایه تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند. از نظر ژنتیکی ۱۹ جدایه دارای ژن TEM (۵۴/۲ درصد) و ۳ جدایه دارای SHV (۸/۵ درصد) که همزمان ۱ جدایه از ۳ جدایه که دارای SHV بود، ژن OXA-1 (۲/۸ درصد) را نیز داشت. بیشترین حساسیت باکتری اشرشیاکلی نسبت به مروپنم (۹۹ درصد) و کمترین حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به آمیکاسین (۳/۲ درصد) بود.

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج مطالعه حاضر و پایش مقاومت آنتی بیوتیکی در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی می توان درمان عفونت های ناشی از این عامل را تسهیل کرد.

**واژگان کلیدی:** زخم پای دیابتی، اشرشیا کلی، بتالاکتاماز

Pars J Med Sci 2018;16(3):10-16

### مقدمه:

ایسکمی همراه با زخم پا شایع ترین علل قطع عضوهای مرتبط با دیابت هستند [۳]. طبق دستورالعمل انجمن بیماری های عفونی آمریکا، شدت عفونت زخم پای دیابتی به چهار درجه تقسیم می شود: درجه اول، یک زخم بدون عفونت است. درجه دوم، یک عفونت خفیف است یعنی دو و یا بیشتر از نشانه های التهاب (چرک یا اریتم، درد، تندرینس، گرمی و سفتی) همراه با یکی از یافته های زیر: سلولیت، اریتم یا

از بین عوارض مزمن مختلفی که با دیابت شیرین مرتبط هستند، زخم پای دیابتی یکی از شایع ترین مشکلاتی است که پزشکان در بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس با آن سر و کار دارند. با توجه به وجود مواردی همچون عدم کنترل قند خون در دیابت، دوره طولانی بیماری و غیره، بیماران دیابتی مستعد عفونت های زخم پای دیابتی هستند که با مرگ و خطر قطع عضو همراه است [۸-۲]. عفونی شدن زخم، تاخیر در بهبود زخم، نوروپاتی و

\* نویسنده مسئول، نشانی: مرکز تحقیقات زئونوز، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران.

پست الکترونیک: Sima.kargar@yahoo.com

تلفن تماس:

پذیرش:

اصلاح:

دریافت:

## روش کار:

در این مطالعه آزمایشگاهی با روش نمونه‌گیری آسان در دسترس که از فروردین ماه تا اسفند ماه ۱۳۹۶ انجام گرفت، ۱۱۰ جدایه از بیماران بستری در بخش عفونی بیمارستان‌های پیمانیه چهارم، علی اصغر و نمازی شیراز با زخم پای دیابتی در مرحله سوم و چهارم (مراحل حاد)، طبق تعریف دستورالعمل انجمن بیماری‌های عفونی آمریکا وارد مطالعه شدند [۴].

در ابتدا زخم‌ها توسط آب اکسیژنه ۳٪ تمیز شدند و نمونه‌گیری از قسمت زخم پای دیابتی حاد انجام شد. از محیط تایوگلیکولات نیمه جامد، برای انتقال نمونه‌ها استفاده شد. سپس بر روی محیط کشت انتخابی مک کانکی آگار کشت داده شدند و پلیت‌ها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل لیزین دکربوکسیلاز، TSI، سیترات، اوره، SIM و IMVIC جهت شناسایی E.coli انجام شد. در تمامی مراحل از سوش استاندارد E.coli ATCC 25922 استفاده شد. کلنی‌های مربوط به ایزوله‌های مثبت E.coli در محیط Skim milk کشت داده شدند و تا زمان انجام آزمایشات مولکولی، در فریزر  $80^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شدند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های اشریشیاکلی به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، مروپنم، آمپی‌سیلین-سولباکتام، سفپییم، آمیکاسین، پیپراسیلین-تازوباکتام، جنتامایسین و سپیروفلوکسازین که طبق مطالعات انجام شده [۱۵-۱۶] از اهمیت بیشتری برای درمان عفونت زخم دیابتی برخوردار هستند، با روش دیسک دیفیوژن بر اساس استاندارد‌های ارائه شده توسط سازمان استاندارد‌های آزمایشگاهی و بالینی (CLSI 2018) مورد بررسی قرار گرفت. تشخیص سویه‌های کارباپنماز توسط آزمون تغییر یافته‌ها انجام شد. در این روش ابتدا تعلیق باکتری استاندارد E.Coli 25922 ATCC به غلظت نیم مک فارلند تهیه و به کمک سرم فیزیولوژی به غلظت یک دهم رسانده شد. سپس با استفاده از سوآپ در سطح محیط مولر هیتتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد و دیسک آنتی‌بیوتیکی ارتاپنم ۱۰ میکروگرم در مرکز محیط قرار داده شد. در مرحله بعد از باکتری‌های جدا شده مشکوک به وجود آنزیم کارباپنماز به کمک سوآپ از لبه دیسک ارتاپنم گذاشته شده در مرکز تا لبه پلیت به صورت یک خط مستقیم کشیده و در نهایت پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $35^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سویه‌های تولیدکننده آنزیم کارباپنماز باعث می‌شوند که هاله عدم رشد اطراف دیسک مرکزی به صورت مضرسی شکل درآید (نمای برگ شبدری) در حالی که سویه‌های منفی تغییری در این هاله به وجود نمی‌آورند و هاله اطراف آن‌ها یک دست باقی می‌ماند [۱۷-۱۸]. برای جداسازی و شناسایی سویه‌های تولیدکننده متالونبتالاکتاماز از روش دیسک دیفیوژن ترکیبی استفاده شد. در این روش ابتدا

گسترش کمتر از دو سانتیمتر در اطراف زخم و عفونت محدود به پوست و بافت زیر جلد بدون علائم سیستمیک موجود است. در دسته سوم، سلولیت با اندازه بیش از دو سانتیمتر در اطراف زخم همراه با لنفانژیت، ابتلا بافت زیر جلدی، آبسه، گانگرن، ابتلا تاندون، مفصل یا استخوان دیده می‌شود. در دسته چهارم، علائم سیستمیک مانند تب و لرز، تاکی کاردی، افت فشارخون، گیجی، اسیدوز متابولیک، ازتمی، هیپرگلیسمی شدید و لکوسیتوز به تابلوی مرحله سوم اضافه می‌شود [۴].

زخم پای دیابتی، معمولاً توسط کوکسی‌های گرم مثبت ایجاد می‌شود، اما زخم‌های عمیق یا مزمن اغلب حاوی باکتری‌های گرم منفی و باکتری‌های بی‌هوازی اجباری و یا اغلب فلورپلی میکروبی هستند [۵-۶]. هم‌چنین گزارش شده است که E.coli به عنوان یک باکتری گرم منفی در زخم‌های پای دیابتی عفونی شده غالب است [۷-۸]. از طرفی انتروباکتریاسه‌ها که عمدتاً شامل اشریشیاکلی، انتروباکترکلوآسه و کلبسیلا پنومونیا می‌باشند، جدایه‌های گرم منفی اصلی در عفونت زخم پای دیابتی هستند [۶]. با وجود این که مشکل مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک مشکل اساسی در سراسر جهان است، اما اثرات مضاعف و منفی نوروپاتی محیطی و ایسکمی در زخم پای دیابتی روی پاسخ‌های التهابی سیستمیک و موضعی، تشخیص عفونت پای دیابتی را در مراحل اولیه دشوار کرده و باعث افزایش خطا در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش شیوع ارگانیزم‌های مقاوم به چند دارو را ایجاد می‌کند [۹]. در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی، E.coli به فراوانی گزارش شده (۲۴/۲۰ درصد) و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این گونه‌ها بسیار گسترده است [۱۰-۱۱]. باکتری‌های گرم منفی مقاوم به چند دارو ممکن است با تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف مرتبط باشند [۱۲]. بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف قادرند اکسی‌ایمینوسفالوسپورین‌ها را هیدرولیز کنند و توسط بتالاکتامازها مهار می‌شوند [۱۳]. ESBL‌های نوع SHV bla و bla TEM و bla CTX-M شایع‌ترین آنزیم‌های جهان در دو دهه اخیر هستند [۱۴]. هم‌چنین در باکتری‌های مقاوم کارباپنم‌ها، هیدرولیز کارباپنم توسط آنزیم اگزاسیلیناز نیز صورت می‌گیرد. از این رو هدف از مطالعه حاضر تشخیص ژن‌های بتالاکتامازی bla SHV، bla TEM و bla OXA-1 در اشریشیاکلی جدا شده از زخم پای دیابتی با روش Multiplex PCR بود، تا پزشکان در حوزه کاری خود با جدایه‌های میکروبی شایع و الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی آشنا باشند و درمان ضد میکروبی بهینه انجام گیرد [۶].

باکتری‌ها بر روی محیط مولر هیتون کشت داده شده و دیسک ایمی پنم در مقابل دیسک ترکیبی ایمی پنم-EDTA قرار داده شد. افزایش قطر هاله مهاری کوچکتر مساوی هفت در مقابل دیسک ایمی پنم-EDTA نسبت به دیسک ایمی پنم به تنهایی به عنوان سویه MBLs در نظر گرفته شد [۱۹]. از روش DDST (Double disk synergy test) تعریف شده توسط CLSI ۲۰۱۸ برای شناسایی فنوتیپی سویه‌های تولیدکننده ESBL استفاده شد. مراحل انجام این آزمون عبارتند از: مرحله (۱) تهیه رقت ۰/۵ مک فارلند از باکتری مورد نظر در ۵ میلی‌لیتر محیط برات یا نرمال سالین. مرحله (۲) کشت شطرنجی از رقت تهیه شده بر روی محیط مولر هیتون آگار و اجازه خشک شدن به آن در طی ۳ تا ۵ دقیقه. مرحله (۳) قرار دادن دیسک سفوتاکسیم و سفوتاکسیم-کلاوولانیک و سفنازیدیم و سفنازیدیم-کلاوولانیک روی پلیت مولر هیتون آگار کشت داده شده. مرحله (۴) انکوباسیون در دمای  $35 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۲۴ ساعت. مرحله (۷) بررسی پلیت محیط کشت تشکیل از نظر تشکیل حاله عدم رشد. اگر تفاوت قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف هر دیسک به تنهایی در مقایسه با دیسک ترکیبی ۵ میلی‌متر یا بیشتر باشد؛ به

عنوان سویه مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف تلقی خواهد شد. از سویه E. coli ATCC 25922 به عنوان کنترل استفاده شد [۲۰]. در آزمایش multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی وجود ژن‌های کدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز شامل bla TEM و bla SHV و bla OXA-1 مورد مطالعه قرار گرفتند. در ابتدا ایزوله‌های تایید شده توسط آزمون‌های فنوتیپی بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۶-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس با استفاده از کیت استخراج DNA سیناژن، ژنوم باکتری‌ها استخراج شدند. نمونه‌های DNA استخراج شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز تایید شدند و تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در فریزر ۲۰- نگهداری شدند. آزمون multiplex PCR برای تکثیر ژن‌های مورد نظر (جدول ۱) به صورت زیر اجرا شد: مرحله واسرشت اولیه ۹۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه (۹۴ درجه به مدت ۴۰ ثانیه سپس ۶۰ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه) و در نهایت مرحله طولی‌سازی در ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. پس از آن نمونه‌ها الکتروفورز و نتایج بررسی شدند [۲۱].

جدول ۱: توالی پرایمرهای بتالاکتامازی در باکتری E. coli

نام پرایمر	توالی پرایمر	سایز محصول PCR
TEM-F	CATTTCCGTGTGCGCCCTTATTC	800bp
TEM-R	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	
SHV-F	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713bp
SHV-R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
OXA-1-F	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564bp
OXA-1-R	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	

## نتایج:

نشان داد که از ۳۵ جدایه باکتری E. coli، ۱۹ جدایه دارای TEM (۵۴/۲ درصد) و ۳ جدایه دارای ژن SHV (۸/۵۷ درصد) و که همزمان ۱ جدایه از ۳ جدایه دارای SHV، شامل ژن OXA-1 (۲/۸ درصد) نیز بود. از میان آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه، بیشترین حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری E. coli نسبت به مروپنم و ایمی پنم به ترتیب ۹۹ درصد و ۹۸ درصد و آمیکاسین با فراوانی ۳/۲ درصد دارای کمترین حساسیت آنتی بیوتیکی بود (جدول ۲).

این مطالعه بین سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶ روی تعداد ۱۱۰ نمونه زخم پای دیابتی از افراد مراجعه‌کننده به کلینیک‌های درمانی ذکر شده انجام گرفت. جدایه‌ها مورد بررسی فنوتیپی قرار گرفتند. ۳۵ جدایه E. coli تایید شد. ۱۳ جدایه مثبت از نظر فنوتیپ ESBL وجود داشت. ۱۸ جدایه تولیدکننده کاربامپناز و ۱۵ جدایه تولیدکننده متالوبتالاکتاماز بودند. نتایج بررسی‌های مولکولی multiplex PCR برای تشخیص ژن‌های OXA-1، SHV و TEM

جدول ۲: حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری E.coli جدا شده از زخم پای دیابتی

آنتی بیوتیک	فراوانی
ایمی پنم	۹۸ درصد
مروپنم	۹۹ درصد
آمی سیلین - سولباکتام	۶۱/۸ درصد
سفیم	۴۹/۷ درصد
آمیکاسین	۳/۲ درصد
پیپراسیلین - تازوباکتام	۴۸ درصد
جنتامایسین	۶۱ درصد
سیپروفلوکساسین	۵۴ درصد

## بحث:

با ظهور مقاومت های آنتی بیوتیکی، برخی عفونت ها از جمله عفونت زخم پای دیابتی به یکی از معضلات پزشکی نوین تبدیل شده است که لزوم بررسی شیوع عوامل مقاوم به آنتی بیوتیک در شرایط مختلف را خاطر نشان می کند. با توجه به فقدان اطلاعات کافی در خصوص فراوانی و الگوی ژنتیکی ژن های bla TEM، bla SHV و bla OXA-1 به عنوان عوامل شناخته شده مقاومت باکتری های E.coli نسبت به آنتی بیوتیک ها، در مطالعه حاضر به بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی ژن های بتالاکتامازی نمونه های اشرشیاکلی جدا شده از زخم پای دیابتی بیماران بستری در بیمارستان های پیمانیه چهارم، علی اصغر و نمازی شیراز پرداخته شد.

در مطالعه حاضر بیشترین شیوع ژن های ESBL مربوط به حضور ژن bla TEM (۵۴/۲ درصد) بود که در مقایسه با مطالعه حقیقت پناه و همکاران بر روی جدایه های بالینی اشرشیاکلی مولد ESBL در شهر رشت که (۳۲/۵ درصد) سویه های مولد ESBL واجد ژن bla TEM بودند، شیوع بیشتری را نشان می دهد [۲۲]. در مطالعه حسن نژاد و همکاران در سال ۱۳۹۴، ۲۸ جدایه دارای بتالاکتاماز TEM (۴۶/۶ درصد) بودند و هیچ جدایه ای بتالاکتاماز SHV را نداشتند، در مقابل در مطالعه حاضر ۱۹ جدایه (۵۴/۲ درصد) ژن TEM و ۳ جدایه (۸/۵ درصد) ژن SHV را داشتند [۲۳]. در مطالعه ای که زمان زاد و همکاران روی فراوانی ژن TEM در سویه های اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف ایزوله شده از نمونه های کلینیکی شهرکرد انجام دادند، ۵۴/۲ درصد دارای ژن مقاومت بتالاکتاماز TEM بودند که در ایزوله های اشرشیاکلی ۴۸/۷ درصد گزارش شد که این میزان به مطالعه حاضر بسیار نزدیک است [۲۴]. در تحقیقی که توسط صنا روی ۷۳ سوی اشرشیاکلی تولید کننده ESBL در شمال لبنان انجام شد، ژن OXA در 33 سویه، ژن TEM در ۱۶ سویه و ژن SHV در ۳ سویه تعیین شد، که این مطالعه از نظر فراوانی ژن TEM و SHV با مطالعه حاضر

همخوانی دارد [۲۵]. در تحقیق ریاحی و همکاران نیز با بررسی شیوع ژن های TEM و SHV در بین سوی های اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونی تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف مشخص شد حدود ۴۳/۴ درصد از سویه های اشرشیاکلی، تولید کننده ESBL می باشند و فراوانی TEM و SHV در میان آن ها به ترتیب ۲۰/۶ درصد و ۱۴/۴ درصد تعیین شد [۲۶]. در مطالعه حقیقت پناه و همکاران در سال ۱۳۹۳ فراوانی ژن TEM در ۲۷ سویه (۳۲/۵ درصد) دیده شد [۲۲]. در یک مطالعه روی سویه های E.Coli در ترکیه توسط بالی در سال ۲۰۱۰، فراوانی ژن TEM ۷۲ درصد و در بررسی مشابه دیگری توسط شارما در سال ۲۰۱۰ در هند این میزان ۳۰ درصد گزارش شد که نتیجه مطالعه حاضر به هیچ کدام نزدیک نیست [۲۷-۲۸].

در مطالعه حاضر ۳/۲ درصد از ایزوله های E.coli نسبت به آنتی بیوتیک آمیکاسین حساسیت نشان دادند. در مطالعه حیدری و همکاران نیز ۹ درصد از ایزوله های باکتری E.coli که از ادرار بیماران جدا شده بود نسبت به آمیکاسین حساسیت نشان دادند [۱۴]. با این حال در مطالعه ای دیگر هیچ کدام از ایزوله های جدا شده از بیماران با عفونت ادراری نسبت به این دارو مقاومت نشان ندادند [۲۹]. میزان مقاومت نسبت به آمپی سیلین در مطالعه فراهانی و همکاران ۸۰/۷ درصد [۳۰]، در مطالعه مولازاده و همکاران برابر ۱۰۰ درصد گزارش شد [۲۹]. در مطالعه کنونی نسبت به آنتی بیوتیک ایمی پنم مقاومت ۲ درصد نشان داده شده که با نتایج مطالعه کیخا و رواء، با گزارش درصد بسیار پایینی از مقاومت نسبت به ایمی پنم (۴/۵ درصد)، هم خوانی دارد [۱۵]. از ۳۵ ایزوله E.coli، ۱۳ نمونه (۳۷/۱ درصد) ژن های ESBL را می ساختند که در مقایسه با مطالعه شاهی و همکاران [۱۰] که ۷۵ درصد نمونه های گرفته شده از زخم پای دیابتی تولید کننده ESBL بودند، کمتر است. در واقع، طبق تجربه به دست آمده از مطالعات هند در این مورد، در موقعیت های مختلف جغرافیایی این کشور، تنوع بالایی از نظر درصد شیوع ژن های ESBL دیده

نیازمند مطالعات گسترده ای به منظور از بین بردن عفونت و جلوگیری از گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی است. این عمل در نهایت منجر به کاهش نرخ قطع عضو، کاهش مدت زمان بستری بودن در بیمارستان و کاهش فشار اقتصادی تحمیلی در جامعه می شود.

### تشکر و قدردانی:

نویسندگان این تحقیق، مراتب سپاس و قدردانی خود را از کارکنان بخش‌های عفونی بیمارستان‌های پیمانیه چهرم، علی اصغر و نمازی شیراز اعلام می دارند.

### تعارض منافع:

هیچ گونه تعارض منافی بین نویسندگان این مقاله وجود ندارد.

می‌شود [۱۶]؛ اما با توجه به این که در ایران مطالعات محدودی در این مورد انجام شده است، پیشنهاد می‌شود بررسی‌های فنوتیپی ESBL های زخم پای دیابتی در بخش‌های مختلف کشور با هدف کنترل مقاومت آنتی بیوتیکی و در نتیجه کنترل عفونت‌های ناشی از زخم‌های دیابتی انجام شود. با این حال در مطالعه منصوری و رمضان زاده [۳۱] که نمونه‌برداری از بخش‌های دیگری بجز زخم دیابتی از جمله دستگاه ادراری، خون و راه تنفسی انجام شده بود، در مجموع ۱۶/۸ درصد از نمونه‌ها، تولید کننده ESBL بودند که از شیوع گزارش شده در مطالعه کنونی کمتر می‌باشد که نشان می‌دهد احتمال وقوع مقاومت آنتی بیوتیکی در زخم‌های دیابتی بیشتر است.

### نتیجه گیری:

انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان عفونت‌ها از جمله عفونت زخم پای دیابتی با توجه به گسترش روزافزون سویه‌های مقاوم،

## References:

- Kang, W.-J., et al., Analysis on distribution, drug resistance and risk factors of multi drug resistant bacteria in diabetic foot infection. *Biomedical Research*, 2018. 28(22): p. 10186-10190.
- Velissaris, D., et al., Procalcitonin as a diagnostic and prognostic marker in diabetic foot infection. A current literature review. *Romanian Journal of Internal Medicine*, 2018. 56(1): p. 3-8.
- Aragón-Sánchez, J., The Role of Surgery in the Management of the Infected Diabetic Foot, in *The Diabetic Foot Syndrome*. 2018, Karger Publishers. p. 184-199.
- Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG, Embi JM, Joseph WS, Karchmer AW, et al. Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis*. 2004 Oct 1; 39(7):885-910
- E. M. Shankar, V. Mohan, G. Premalatha, R. S. Srinivasan, and A. R. Usha, "Bacterial etiology of diabetic foot infections in South India," *European Journal of Internal Medicine*, vol. 16, no. 8, pp. 567-570, 2005.
- Xie, X., et al., Bacterial Profile and Antibiotic Resistance in Patients with Diabetic Foot Ulcer in Guangzhou, Southern China: Focus on the Differences among Different Wagner's Grades, IDSA/IWGDF Grades, and Ulcer Types. *International journal of endocrinology*, 2017. 2017.
- Motta RN, Oliveira MM, Magalhaes PS, Dias AM, Aragao LP, Forti AC, et al. Plasmid-mediated extended-spectrum betalactamase-producing strains of Enterobacteriaceae isolated from diabetes foot infections in a Brazilian diabetic center. *Braz J Infect Dis*. 2003;7:129-34.
- Louie TJ, Bartlett JG, Tally FP, Gorbach SL. Aerobic and anaerobic bacteria in diabetic foot ulcers. *Ann Intern Med*. 1976; 85:461-3.
- Djahmi, N., et al., Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, 2013. 19(9).
- Shahi, S.K., V.K. Singh, and A. Kumar, Detection of *Escherichia coli* and associated  $\beta$ -lactamases genes from diabetic foot ulcers by multiplex PCR and molecular modeling and docking of SHV-1, TEM-1, and OXA-1  $\beta$ -lactamases with clindamycin and piperacillin-tazobactam. *PloS one*, 2013. 8(7): p. e68234.
- El-Badawy, M.F., et al., Iodometric and molecular detection of ESBL production among clinical isolates of *E. coli* fingerprinted by ERIC-PCR: the first Egyptian report declares the emergence of *E. coli* O25b-ST131 clone harboring bla<sub>GES</sub>. *Microbial Drug Resistance*, 2017. 23(6): p. 703-717.
- Jain, A., et al., Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative bacteria in septicaemic neonates in a tertiary care hospital. *Journal of Medical Microbiology*, 2003. 52(5): p. 421-425.
- Varaiya, A.Y., et al., Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in diabetic foot infections. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 2008. 51(3): p. 370.
- Heidari-soureshjani, E., M. Heidari, and A. Doosti, Epidemiology of urinary tract infection and antibiotic resistance pattern of *E. coli* in patients referred to Imam Ali hospital in Farokhshahr, Chaharmahal va

- Bakhtiari, Iran. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 2013. 15(2): p. 9-15.
15. Rava, M., Trend of antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in outpatient patients from Zahedan. Journal of Paramedical Sciences & Rehabilitation, 2017. 6(4): p. 73-78.
  16. Mathai D, Rhomborg PR, Bledenbach DJ, Jones RN (2002) Evaluation of the in vitro activity of six broad-spectrum beta-lactam antimicrobial agents against recent clinical isolates from India; A survey of ten medical center laboratories. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44: 367-377.
  17. Fazeli H, Norouzibarough M, Ahadi AM, Shokri D, Solgi H. Detection of New Delhi Metallo-Beta-lactamase-1 (NDM-1) in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university hospital in Iran. *Hippokratia* 2015; 19: 205-9.
  18. Sun Z, Li L, Zhu X, Ma Y, Li J, Shen Z, Jin S. Analysis on antimicrobial resistance of clinical bacteria isolated from county hospitals and a teaching hospital. *J Huazhong Uni Sci Technol Med* 2006; 26: 386-8.
  19. Owlia P, Azimi L, Gholami A, Asghari B, Lari AR. ESBL-and MBL-mediated resistance in *Acinetobacter baumannii*: a global threat to burn patients. *Infez Med* 2012; 20(3): 182-7.
  20. Owlia P, Azimi L, Gholami A, Asghari B, Lari AR. ESBL-and MBL-mediated resistance in *Acinetobacter baumannii*: a global threat to burn patients. *Infez Med* 2012; 20(3): 182-7.
  21. Caroline Dallenne<sup>1</sup>, Anaëlle Da Costa<sup>1</sup>, Dominique Decré<sup>1,2</sup>, Christine Favier<sup>3</sup> and Guillaume Arlet. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 490-495
  22. Haghghat panah, m., et al., Surveying of antibiotic resistance pattern and frequency rate of blaTEM in the ESBLs producing *E. coli* isolated in Rasht. *Journal of ilam university of medical sciences*, 2014. 22(4): p. 180-189.
  23. Hasannejad r, ghanbarpour r, amini k, nasr j. detection of bla tem, bla ctx-m and bla shv in *Escherichia coli* isolated from poultry by multiplex-pcr and determination of the strains susceptibility profile in kerman province. *veterinary journal (pajouhesh & sazandegi)*, 2015; 113 pp: 25-30.
  24. Zamanzad B, Daiham B, Nafisi M, Karimi A. Study of frequency TEM-1 gene in *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and enterobacter strains producing extended spectrum beta-lactamases in clinical sample shahrkord hospital with PCR. *Hamedan med J*. 2007; 14(4): 19-25.
  25. Moayednia R, Shokri D, Mobasherizadeh S, Baradaran A, Fatemi SM, Merikhi A. Frequency assessment of beta-lactamase enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates in patients with urinary tract infection. *J Res Med Sci* 2014; 19: S41 - S45.
  26. Goudarzi M, Sabzehali F, Tayebi Z, Azad M, Boromandi S, Hashemi A, et al. Prevalence of blaCTX-M Gene in Multi-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections, Tehran, Iran. *Novelty Biomed* 2014; 2(4): 107-13.
  27. Bali E, Acik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM-, CTX-M and extended-spectrum beta-lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. *Afr J Microbiol Res* 2010; 4: 650-4.
  28. Sharma J, Sharma M, Ray P. Detection of TEM & SHV genes in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary care hospital from India. *Ind J Med Res* 2010; 132: 332-6.
  29. Molazade, a., et al., Evaluation of Antibiotic Resistance Pattern of Isolated Gram-Negative Bacteria from Urine Culture of Hospitalized patients in Different Wards of Vali-Asr Hospital in Fasa During the Years 2012 and 2013. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 2014. 4(3): p. 275-283.
  30. Hamid-Farahani, R., et al., Antibiotic resistance pattern of *E. coli* isolated from urine culture in 660 Army clinical laboratory center in Tehran 2008. *Ann Mil Health Sci Res*, 2012. 10(1): p. 45-49.
  31. Mansouri, M. and R. Ramazanzadeh, Spread of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* clinical isolates in Sanandaj Hospitals. *Journal of biological sciences*, 2009. 9(4): p. 362-366.

## Identification of $\beta$ -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from diabetic foot ulcer by Multiplex PCR

Akrami Mojtaba<sup>1</sup>, Kargar Jahromi Zahra<sup>2\*</sup>, Rahmanian Zhila<sup>3</sup>, Haghshenas Hoda<sup>4</sup>, Rezaeian Sanaz<sup>4</sup>

Received:

Revised:

Accepted:

1. Faculty of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
2. Zoonoses Research Center, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
3. Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
4. Student Research Committee, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.16, No.3, Fall 2018

Pars J Med Sci 2018;16(3):10-16

### *Abstract:*

#### **Introduction:**

Diabetic foot ulcer is a complication of diabetes mellitus and can be associated with an increased risk of amputation or even death as a result of a wound infection. *E. coli* can lead to worsening of the condition of the wound. The aim of this study was to identify  $\beta$ -lactamase genes in *E. coli* isolated from diabetic foot ulcers

#### **Materials and Methods:**

In this experimental study, 110 isolates of *E. coli* from patients with diabetic foot ulcers hospitalized in the infectious ward of the in Peymanieh, Jahrom and Ali Asghar and Namazi, Shiraz, hospitals in 1396 were selected. Determination of antibiotic susceptibility, phenotypic identification of strains producing broad-spectrum beta-lactamases (ESBLs), strains producing MBL and strains producing Carbapenemas was done. The existence of genes encoding bla TEM, bla SHV and bla OXA-1 enzymes was investigated by multiplex PCR assay

#### **Results:**

In this study, 35 isolates of *Escherichia coli* were isolated. 13 isolates produced broad-spectrum beta-lactamases. Genetically, 19 isolates with TEM gene (54.2%) and 3 isolates with SHV (8.5%), which simultaneously had 1 isolate from 3 isolates with SHV, also had OXA-1 gene (2.8%). The highest susceptibility of *Escherichia coli* was to meropenem (99%) and the lowest antibiotic susceptibility to amikacin (3.2%).

#### **Conclusion:**

According to the results of this study and monitoring of antibiotic resistance in patients with diabetic foot ulcers, treatment of infections caused by this agent can be facilitated

**Keywords:** Diabetic foot ulcer, *E. coli*, Beta-lactamase

\* Corresponding author Email: Sima.kargar@yahoo.com