ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۸، شماره ۶، بهمن و اسفند۱۴۰۲(شماره پی در پی ۱۶۱)

**مقاله پژوهشی**

# فراوانی نسبی حضور ژن بتالاکتاماز *bro* و ارتباط آن با مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *موراکسلا کاتارالیس* جداسازی شده از نمونه‌های کلینیکی

**مجید باصری صالحی [۱*]، حدیث اسحقی [۲]**

[۱]گروه میکروب شناسی، موسسه آموزش عالی زند، شیراز، ایران، [۲]گروه میکروب شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۲/۰۳/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۳

**چکیده**

**زمینه و هدف:** *موراکسلا کاتارالیس* با استفاده از دو مکانیسم، فعالیت آنزیم بتالاکتاماز وپمپ افلاکس به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهد. امروزه *موراکسلا کاتارالیس* به عنوان یک باکتری عامل ایجاد عفونت‌های تنفسی محسوب می‌شود. لذا هدف از این مطالعه تعیین فراوانی نسبی حضور ژن بتالاکتاماز *bro* و ارتباط آن با مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *موراکسلا کاتارالیس* جداسازی شده از نمونه‌های کلینیکی بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی که در سال های ۱۴۰۰-۱۳۹۹ در بیمارستان دنای شیرازنجام شد، ۱۳۶ نمونه کلینیکی از بیماران با عفونت تنفسی جمع‌آوری شد و باکتری *موراکسلا کاتارالیس* از این نمونه‌ها جدا و با استفاده از روش فنوتیپی و ژنوتیپی(16S rRNA) شناسایی شد. سپس حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها در این جدایه‌ها با استفاده از تست های دیسک دیفیوژن و دیسک ترکیبی ارزیابی و وجود ژن‌های بتالاکتاماز *bro* در سویه‌های مقاوم ارزیابی شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون آماری تی دانشجویی تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** در این تحقیق از ۱۰ سویه *موراکسلا کاتارالیس* جدا شده ۷ جدایه MDR بودند. این باکتری ها بیشترین مقاومت را به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، آمیکاسین، پنی‌سیلین G، آموکسی‌سیلین، سفتازیدیم، سفازولین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، سیپروفلوکسا سین (۷۰ درصد) و کمترین مقاومت را به آنتی‌بیوتیک تری متوپریم بر سولفامتاکسازول و تتراسیکلین نشان دادند. تمامی ۱۰ سویه به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین مقاوم و به آنتی‌بیوتیک‌های آزیترومایسین، اریترومایسین، کلاریترومایسین و کوآموکسی کلاو حساسیت(۱۰۰ درصد) نشان دادند. ژن *bro* در تمامی این سویه‌های MDR مشاهده گردید(۵ سویه دارای ژن - *bro* 1 و ۲ سویه دارای ژن 2- *bro*).

**نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق نشان داد که سویه‌های *موراکسلا کاتارالیس* مقاوم چند دارویی دارای ژن‌های بتالاکتاماز می‌باشند. بنابر این آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتم برای درمان عفونت ناشی از این باکتری توصیه نمی‌شود. اگرچه نتایج این تحقیق استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های آزیتومایسین، اریترومایسین، کلاریترومایسین و کوآموکسی کلاو را به عنوان داروهای انتخابی جهت درمان عفونت ناشی از *موراکسلا کاتارالیس* پیشنهاد می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** *موراکسلا کاتارالیس*، بتالاکتاماز، ژن *bro* ، مقاومت چند دارویی

***نویسنده مسئول: مجید باصری صالحی،** شیراز، موسسه آموزش عالی زند، گروه میکروب شناسی

**Email:majidbaserisalehi682@gmail.com**

**مقدمه**

*موراکسلا کاتارالیس* به عنوان یک باکتری غیربیماری‌زای مستقر در گلو و بینی شناخته می‌شود(۲ و۱). این باکتری از نظر ساختاری دیپلوکوک گرم منفی، فاقد پیگمان و همولیز، هوازی اختیاری، بدون کپسول و غیر متحرک است(۳). باکتری *موراکسلا کاتارالیس* از نظر خصوصیات متابولیکی قابلیت تخمیر قند را ندارد، اگرچه دارای واکنش اکسیداز و کاتالاز می‌باشد(۴). *موراکسلا کاتارالیس* قابلیت ایجاد عفونت‌های دستگاه تنفسی فوقانی و عفونت‌های تنفسی تحتانی مانند پنومونی و برونشیت حاد را دارد(۵). امروزه گزارش‌هایی در ارتباط با بیماری‌های *موراکسلا کاتارالیس* و سندرم‌های بالینی گوناگون در افراد بزرگسال وجود دارد که نشان دهنده تأکید بر ایجاد عفونت‌های مهلک ناشی از این باکتری می‌باشد(۶). امروزه حضور جدایه‌های مقاوم میکروبی به خصوص باکتری‌های مقاومت چند دارویی (MDR)[1] که مقاومت به ۳ کلاس از آنتی‌بیوتیکی نشان می‌دهند یکی از موانع اصلی در درمان بیماری‌های عفونی و تنفسی باکتریایی می‌باشد. مقاومت دارویی باکتری *موراکسلا کاتارالیس* که موجب افزایش بیماری‌زایی این باکتری شده است می‌تواند با دو مکانیسم عمده تولید آنزیم بتالاکتاماز و فعالیت پمپ افلاکس انجام می‌گیرد(۷). اخیراً اثبات شده است که باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به واسطه هیدرولیز بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مشکلات فراوانی را در درمان عفونت‌های باکتریایی به وجود آورده‌اند(۸). بتالاکتامازهای وسیع الطیف(ESBLs) گروه ویژه‌ای از آنزیم‌های بتالاکتاماز هستند که در سال ۱۹۸۳ برای اولین بار به علت هیدرولیز آنتی‌بیوتیک سفالوسپورین‌های نسل سوم شناسایی و نام‌گذاری گردیدند. این آنزیم‌ها که در برابر مهارکننده‌های بتالاکتاماز(به ویژه کلاولانیک اسید) حساس می‌باشند، باعث القای مقاومت باکتری در برابر پنی سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های نسل اول، دوم، سوم و آزترونام(به غیر از سفامایسین و کارباپنم‌ها)می‌شوند(۹). هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به وسیله آنزیم‌های بتالاکتاماز شایع‌ترین مکانیسم مقاومت باکتریایی در باکتری‌های گرم منفی است، چرا که پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها جزوی از دسته داروهای درمان‌گر ترجیحی برای بسیاری از بیماری‌های عفونی می‌باشند. حضور و توصیف این آنزیم‌ها نقش حیاتی در انتخاب درمان مناسب بازی می‌کند. تولید بتالاکتاماز به طور گسترده‌ای در بیشتر جدایه‌های باکتری‌های گرم منفی هم‌چون *موراکسلا* که مقاومت به بتالاکتام آنها ثابت شده است مورد شک می‌باشد. امروزه پژوهش‌ها نشان داده است که *موراکسلا کاتارالیس* دارای دو نوع بتالاکتاماز *bro*-1 و *bro* -2 می‌باشد(تفاوت بین بتالاکتاماز *bro* -1 و *bro*-2 به علت تغییر در یک آمینواسید می‌باشد) هر دو آنزیم مرتبط به غشا بوده و این آنزیم‌ها به وسیله ژن‌های کروموزومی یا پلاسمیدی رمزگذاری شده و

می‌توانند به راحتی با کنژوگاسیون، از سلولی به سلولی دیگر انتقال یابند(۱۰). در مقایسه *bro*-1 رایج‌تر از *bro*-2 بوده و در ۹۰ درصد سویه‌های بتالاکتاماز- مثبت وجود دارد(۱۱). لذا هدف از این پژوهش تعیین فراوانی نسبی حضور ژن بتالاکتاماز *bro* و ارتباط آن با مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *موراکسلا کاتارالیس* جداسازی شده از نمونه‌های کلینیکی بود.

**روش بررسی**

این یک مطالعه توصیفی می‌باشد که از ۱۳۶ نمونه کلینیکی سوآپ حلق دهانی، حلق حنجره(۴۶ نمونه)، ترشحات چرکی گوش میانی( نمونه۲۷) و خلط (۶۳ نمونه) از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان دنای شیرار طی ۶ ماه از بهمن ۱۳۹۹ تا شهریور ۱۴۰۰ به صورت تصادفی نمونه گرفته شد(لازم به ذکر است تمامی بیماران دارای مشکل تنفسی بودند). سپس نمونه‌ها در طی مدت ۲ ساعت به آزمایشگاه انتقال و با استفاده از محیط آگار خون‌دار و آگار شکلاتی(مرک ـ آلمان) مورد آنالیر میکروب‌شناسی قرار گرفتند. کلنی باکتری‌های رشد کرده بر روی محیط‌های فوق پس از ارزیابی میکروسکوپی مورد شناسایی فنوتیپی با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی مانند؛ اکسیداز، کاتالاز، دی‌ان‌آز ، تخمیر قندهای مختلف(گلوکز ،ساکاروز، لاکتوز، مالتوز و فروکتوز)، احیای نیترات و هاکی پاک قرار گرفتند(۱۲).

در تحقیق حاضر جدایه‌های *موراکسلا کاتارالیس* مورد ارزیابی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها بااستفاده از روش انتشار دیسک کربی ـ بائر قرار گرفتند(۱۳). برای انجام این تست از محیط مولر هینتون و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین G، آموکسی سیلین، سفازولین، سفتازیدیم، آمیکاسین، آزیترومایسین، کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، کلاریترومایسین، اریترومایسین، جنتامایسین،تتراسایکلین، تری متوپریم ـ سولفامتاکسازول و کوآموکسی کلاو(پادتن طب ـ ایران) استفاده شد، تعیین شد. بدین گونه که جدایه‌ها پس از شناسایی و خالص‌سازی بر روی محیط مولر هینتون کشت سطحی داده شد و به صورت منظم دیسک آنتی‌بیوتیک‌ها با فواصل ۲۴ میلی‌متر بر روی محیط قرار گرفتند. پلیت‌های به دست آمده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه‌گذاری شدند و پس از ۲۴ ساعت قطر ناحیه عدم رشد در اطراف هر دیسک اندازه گیری و حساس، نیمه حساس و مقاوم بودن جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها بر طبق CLSI ۲۰۲۱ مورد ارزیابی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که این آزمون در سه تکرار انجام گرفت.

نیتروسفین آنتی‌بیوتیک سفالوسپورین رنگزا می‌باشد که برای هیدرولیز حلقه بتالاکتام و شناسایی حضور آنزیم بتالاکتاماز تولید شده به وسیله باکتری‌هایی، مانند خانواده *انتروباکتریاسه* و گروهی از باکتری‌های گرم منفی هم‌چون موراکسلا کاتارالیس مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش دیسک نیتروسفین با ۲۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل مرطوب شده و سپس با لوپ از کلنی‌های تازه کشت

داده شده *موراکسلا کاتارالیس* برداشته و بر روی دیسک اضافه می‌گردد. ایجاد رنگ قرمز پس از ۱۰ تا ۶۰ دقیقه نشان دهنده مثبت و عدم تغییر رنگ بیانگر تست منفی می‌باشد(۱۴).

در این تحقیق فراوانی تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف(ESBL) در جدایه‌های *موراکسلا کاتارالیس* با استفاده از روش دیسک‌های ترکیبی ارزیابی شد. جهت ارزیابی فعالیت آنزیم بتا لاکتامازهای وسیع‌الطیف از آموکسی‌سیلین به تنهایی و با آموکسی‌سیلین +کلاولانیک اسید و همین طور سفتازیدیم به تنهایی و سفتازیدیم+ کلاولانیک اسید استفاده شد. بدین گونه که چند کلنی از کشت خالص باکتری را در لوله حاوی محیط کشت مایع مغذی(مرک ـ آلمان) کشت و با گرمخانه‌گذاری در حرارت ۳۷ درجه سلسیوس غلظت کدورت به لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند رسانده و با استفاده از سوآب استریل سوسپانسیون باکتری را بر روی محیط مولر هینتون آگار(مرک ـ آلمان) کشت داده شد. سپس برای انجام تست دیسک سفتازیدیم را در مجاورت سفتازیدیم/کلاولانیک اسید(به فاصله ۲۰ تا ۳۰ میلی‌متری) بر روی محیط مولر هینتون آگار قرار داده شد. سپس پلیت دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. در صورتی که قطر هاله عدم رشد در کنار دیسک سفتازیدیم بر کلاولانیک اسید ۵ میلیمتر بیشتر از قطر هاله عدم رشد سفتازیدیم به تنهایی باشد مولد بتالاکتاماز طیف وسیع در نظر گرفته می‌شود. در روش دوم برای تأیید تولید بتا لاکتاماز وسیع‌الطیف از دیسک حاوی آموکسی‌سیلین به تنهایی و دیسک‌های آموکسی‌سیلین بر کلاولانیک اسید همانند آزمون دیسک ترکیبی استفاده شد. در این آزمون پلیت‌های حاوی دیسک‌ها در گرمخانه دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده و پس از ۲۴ ساعت ایجاد قطر در اطراف دیسک‌های تکی و عدم مشاهده هاله در اطراف دیسک‌های ترکیبی نشان دهنده فعالیت آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف می‌باشد(۱۶ و ۱۵).

در تحقیق حاضر واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت آشکارسازی ژن‌های *bro*-1 و *bro*-2 در جدایه‌های *موراکسلا کاتارالیس* مقاوم چند دارویی با استفاده از پرایمر اختصاصی(جدول۱) انجام گرفت. باید توجه داد که طول محصول PCR برای ژن‌های *bro*-1 و *bro*-2 به ترتیب BP ۱۶۵ و BP ۱۴۴می‌باشد. برای انجام این آزمون DNA جدایه‌ها با استفاده از کیت یکتا تجهیز ـ ایران استخراج شدند. سپس خلوص DNA با استفاده از طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ مورد ارزیابی و پس از اطمینان و کسب عدد ۱/۹ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده ۱۲/۵ ماکرولیتر مستر میکس(بافر(۱X)، آنزیم تک پلی‌مراز(۱میکرولیتر)، MgCl2 (۱میکرولیتر)، dNTP( ۱۰۰ میکرو لیتر)، ۲/۵ لاندا پرایمر، ۴ لاندا از DNA استخراج شده( برای هر نمونه) و ۶ لاندا آب مقطر استریل(حجم نهایی ۲۵ ماکرولیتر) انجام گردید. برنامه دمایی مورد استفاده ۹۵ درجه سیلسیوس به مدت ۵ دقیقه بر روی تنظیم گردید. سپس دمای واسرشت ۹۵ درجه سیلسیوس به مدت

۴۵ ثانیه، دمای هم سرشت ۵۶ درجه سیلسیوس برای ۴۵ ثانیه و دمای طویل سازی ۷۲ درجه سیلسیوس برای ۴۰ ثانیه در نظر گرفته شد. در نهایت به مدت ۵ دقیقه نیز عمل طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سیلسیوس اجرا گردید. در انتها محصول واکنش زنجیره پلی‌مراز برای بررسی نهایی بر روی ژل آگارز ۲ درصد انتقال یافته و با استفاده از دستگاه ژل داک(Hidolgh – آلمان) باندهای تشکیل شده مشاهده گردید(۱۷).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری تی دانشجویی (t-student) تجزیه و تحلیل شدند.

**جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت ارزیابی وجود ژن بتالاکتاماز bro موراکسلا کاتارالیس**

| منبع | توالی '5 به'3 | پرایمرها | ژن |
|---|---|---|---|
| ۹ | 5'-TGTGAAGTGATTTTTTG-3' | F | bro |
| | 5'-GCAATTTATTAACTGGATG TA-3' | R | |

## یافته‌ها

از ۱۳۶ نمونه کلینیکی مورد بررسی ۱۰ جدایه *موراکسلا کاتارالیس* تشخیص داده شد. فراوانی جدایه‌های *موراکسلا کاتارالیس* به تفکیک نمونه‌های بالینی در جدول ۲ مشاهده می‌شود. خلط بیماران حاوی بیشترین و سوآپ حلق دهانی و حلق حنجره‌ایی کمترین تعداد باکتری *موراکسلا کاتارالیس* بوده است.

نتایج به دست آمده نشان داد که از ۱۰ سویه *موراکسلا کاتارالیس* جدا شده ۷ جدایه MDR بودند. این باکتری‌ها بیشترین مقاومت را به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، آمیکاسین، پنی‌سیلین G، آموکسی‌سیلین، سفتازیدیم، سفازولین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین(۷۰ درصد) و کمترین مقاومت را به آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم بر سولفامتاکسازول و تتراسیکلین نشان دادند. تمامی ۱۰ سویه به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین مقاوم و به آنتی‌بیوتیک‌های آزیترومایسین، اریترومایسین، کلاریترومایسین و کوآموکسی کلاو حساسیت(۱۰۰ درصد) نشان دادند(جدول ۳).

به منظور ارزیابی فنوتیپی بتالاکتاماز با استفاده ازدیسک نیتروسفین نشان داده شد که از ۱۰ جدایه مشخص شده با تست‌های بیوشیمیایی موراکسلا کاتارالیس ۷ جدایه مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، همگی دارای بتالاکتاماز بودند. همان گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است دیسک قرمز تغییر رنگ نشان دهنده وجود تولید آنزیم بتالاکتاماز می‌باشد.

سویه های *موراکسلا کاتارالیس* که تست نیتروسفین را مثبت نشان دادند، برای تعیین فراوانی تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف به روش دابل دیسک و دیسک‌های ترکیبی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان داد که از ۷ جدایه مقاوم مورد بررسی همگی قابلیت تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف را داشتند(شکل۲).

در تحقیق حاضر ژن بتالاکتاماز در جدایه‌های *موراکسلا کاتارالیس* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی BRO ارزیابی گردید. همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد ۷ سویه مقاوم همگی دارای ژن *bro* بودند. باید توجه داشت که تفاوت ژن *bro*-1 و *bro*-2 در یک آمینو اسید است به گونه‌ایی که ژن*bro*-1 ۱۶۵bp و ژن *bro*-2 ۱۴۴bp دارا می‌باشند. بنابراین بر اساس نتایج به دست آمده از ۷ جدایه‌های موراکسلا کاتارالیس ۵ جدایه حاوی ژن *bro*1 و ۲ جدایه حاوی ژن *bro*-2 بودند(شکل ۳). در این شکل ستونc، مارک، ستون‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۵ و۶ دارای باند در ناحیه ۱۶۵bp(*bro*-1) و ستون‌های ۴ و۷ دارای باند در ناحیه ۱۴۴bp(*bro*-2) می‌باشد(شکل ۴).

نتایج به دست آمده از آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که رابطه معنی‌داری با $p<0/05$ بین وجود ژن بتالاکتاماز bro و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های مورکسلا کاتارالیس جدا شده از نمونه‌های کلینیکی وجود دارد.

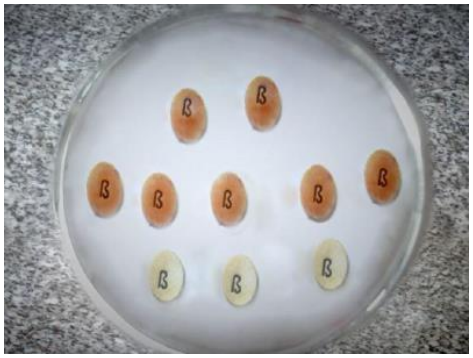
**جدول۲: فراوانی جدایه‌های موراکسلا کاتارالیس به تفکیک نمونه‌های بالینی**

| نمونه های کلینیکی | تعداد نمونه ها | جدایه | درصد |
|---|---|---|---|
| سوآپ حلق دهانی(اوروفارنکس) وحلق حنجره ایی (هیپوفارنکس) | ۴۶ | ۲ | ۴/۳ |
| سوآپ ترشحات چرکی گوش میانی | ۲۷ | ۲ | ۷/۴ |
| خلط | ۶۳ | ۶ | ۹/۵ |
| تعداد کل | ۱۳۶ | ۱۰ | ۷/۳ |

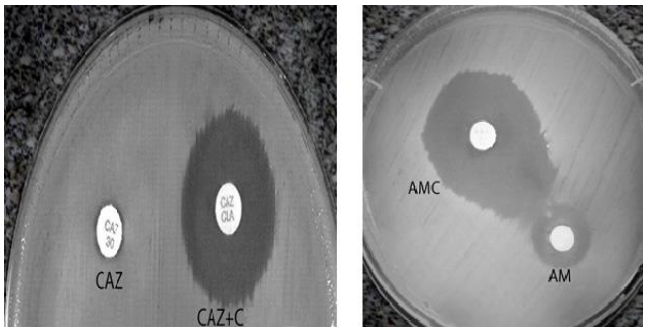
**جدول ۳ : تعیین حساسیت سویه‌های *مورکسلا کاتارالیس* به آنتی‌بیوتیک‌ها**

| آنتی بیوتیک ها<br>جدایه های<br>موراکسلا<br>کاتارالیس | جنتامیسین | آموکسی سیلین | پنی سیلین | آمپیکاسین | سفتازیدیم | سفازولین | تتراسایکلین | کلرامفنیکل | سیپروفلوکساسین | تری متوپریم - سولفامتاکسازول | آزیترومایسین | اریترومایسین | کلاریترومایسین | کوآموکسی کلاو |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| M۱ | *۱۶±۲ | ۱۶±۲ | ۱۰±۲ | ۱۸±۱ | ۱۶±۲ | ۱۵±۲ | ۱۸±۲ | ۲۰±۲ | ۳۸±۲ | ۱۸±۲ | ۲۰ ±۲ | ۲۸±۲ | ۳۵±۲ | ۲۸±۱ |
| M۲ | ۱۶±۱ | ۲۰±۲ | ۱۲±۱ | ۱۲±۱ | ۲۲±۱ | ۱۶±۱ | ۲۲±۱ | ۱۶±۱ | ۱۶±۱ | ۱۹±۱ | ۱۹±۱ | ۲۴±۱ | ۳۳±۱ | ۲۹±۱ |
| M۳ | ۱۷±۲ | ۱۸±۲ | ۱۱±۲ | ۱۷±۲ | ۲۲±۲ | ۱۷±۲ | ۲۳±۲ | ۱۷±۲ | ۱۷±۲ | ۲۰±۲ | ۱۹±۲ | ۲۳±۲ | ۳۲±۲ | ۲۹±۲ |
| M۴ | ۱۶±۲ | ۱۶±۱ | ۱۳±۲ | ۲۰±۲ | ۲۲±۲ | ۱۶±۲ | ۲۴±۲ | ۱۸±۲ | ۳۳±۲ | ۱۸±۲ | ۲۳±۲ | ۲۲±۲ | ۳۴±۲ | ۲۴±۱ |
| M۵ | ۱۶±۱ | ۱۶±۱ | ۱۲±۱ | ۱۶±۲ | ۱۷±۱ | ۱۶±۱ | ۲۲±۱ | ۱۶±۱ | ۱۶±۱ | ۱۷±۱ | ۲۲±۱ | ۲۵±۱ | ۳۵±۱ | ۲۵±۱ |
| M۶ | ۱۷±۲ | ۱۷±۲ | ۱۱±۱ | ۱۶±۲ | ۱۸±۲ | ۱۷±۲ | ۱۹±۲ | ۱۷±۲ | ۱۷±۲ | ۱۶±۲ | ۲۷±۲ | ۲۶±۱ | ۳۵±۲ | ۲۶±۲ |
| M۷ | ۱۶±۲ | ۱۶±۱ | ۱۱±۲ | ۱۳±۲ | ۱۶±۲ | ۱۷±۲ | ۲۵±۱ | ۱۶±۲ | ۳۲±۲ | ۲۰±۱ | ۲۲±۱ | ۲۵±۱ | ۳۴±۲ | ۲۷±۱ |
| M۸ | ۱۶±۱ | ۲۰±۱ | ۱۲±۱ | ۱۹±۱ | ۱۹±۱ | ۱۶±۱ | ۱۹±۲ | ۱۶±۱ | ۱۶±۱ | ۱۶±۲ | ۲۳±۲ | ۲۸±۱ | ۳۲±۲ | ۲۸±۱ |
| M۹ | ۱۶±۲ | ۱۶±۲ | ۱۰±۱ | ۱۸±۱ | ۱۶±۲ | ۱۵±۲ | ۱۸±۲ | ۲۰±۲ | ۳۲±۲ | ۱۸±۲ | ۲۰±۲ | ۲۸±۱ | ۳۵±۲ | ۲۸±۱ |
| M۱۰ | ۱۶±۱ | ۲۰±۲ | ۲۰±۱ | ۱۲±۱ | ۲۲±۱ | ۱۶±۱ | ۲۲±۱ | ۱۶±۱ | ۱۶±۱ | ۱۹±۱ | ۱۹±۱ | ۲۴±۱ | ۳۳±۱ | ۲۹±۲ |

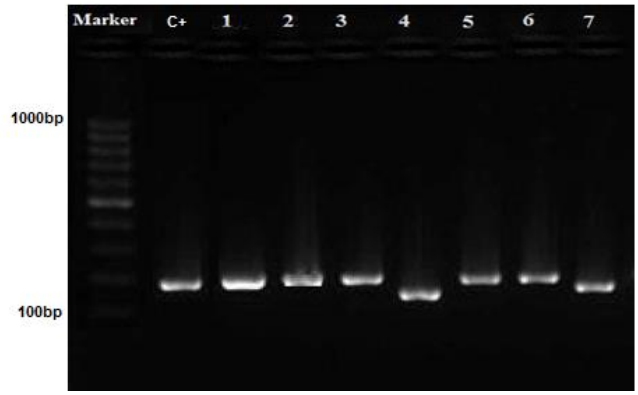
*اعداد مندرج در حدول میانگین سه تکرار می باشد



**شکل ۱: تست نیتروسفین(تست مثبت: دیسک‌های قرمز، تست منفی: دیسک‌های زرد)**




**شکل۲: تست‌های تأییدی جهت شناسایی سویه‌های *موراکسلاکاتارالیس* مولد**ESBL




**شکل ۳:** PCR **تشخیصی ژن***bro1* **و***bro2* ***موراکسلا کاتارالیس*** **جدا شده از نمونه‌ها**

## بحث

موراکسلا کاتارالیس یک باکتری مستقر در گلو و بینی است که از نظر ساختاری دیپلوکوک گرم منفی، فاقد رنگدانه و غیر متحرک است(۱۸). *موراکسلا کاتارالیس* قابلیت ایجاد عفونت‌های دستگاه تنفسی فوقانی و عفونت‌های تنفسی تحتانی مانند پنومونی و برونشیت حاد را دارد. این باکتری با استفاده از دو مکانیسم، فعالیت آنزیم بتالاکتاماز وپمپ افلاکس به

آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهد. امروزه موراکسلا کاتارالیس به علت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از عوامل مهم عفونت‌های تنفسی محسوب می‌شود(۲۰ و ۱۹). هدف از این مطالعه تعیین فراوانی نسبی حضور ژن بتالاکتاماز *bro* و ارتباط آن با مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *موراکسلا کاتارالیس* جداسازی شده از نمونه‌های کلینیکی بود.

در این مطالعه باکتری *موراکسلا کاتارالیس* از نمونه‌های کلینیکی جدا و شناسایی شد. در انتها حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها در این جدایه‌ها مورد ارزیابی و وجود ژن‌های بتالاکتاماز *bro* در سویه‌های مقاوم ارزیابی گردید. در این ارتباط مقاومت روز افزون باکتری‌های بیماری‌زا به دنبال مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها موجب افزایش ظهور سویه‌های مقاوم باکتری‌ها از جمله *موراکسلا کاتارالیس* گردیده است(۲۱). پژوهش‌ها نشان داده است که این باکتری‌ها با تولید بتا لاکتاماز وسیع‌الطیف نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتم از جمله؛ سفالوسپورین، پنی‌سلین وسیپروفلوکساسین مقاومت نشان می‌دهد(۱۸). بنابر این وجود ژن کدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز و انتقال آن در بین باکتری‌ها می‌تواند تهدید بزرگی برای بیمارهای عفونی محسوب گردد. در پژوهش حاضر از مجموع ۱۳۶ نمونه کلینیکی از بیماران با عفونت‌های تنفسی، جمعاً ۱۰ سویه *موراکسلا کاتارالیس* جداسازی گردید که بیشترین میزان از خلط بیماران بوده است.

در مطالعه‌ای که به وسیله غزنوی و همکاران بر روی ۲۰۰ بیمار انجام گرفت، ۱۷ سویه *موراکسلا کاتارالیس* جداسازی گردید(۱۳)، ناوا وهمکاران توانستند ۴۲ سویه *موراکسلا کاتارالیس* را از ۲۲۲ نمونه کلینیکی جدا کنند(۲۲) که میزان جدا سازی باکتری *موراکسلا کاتارالیس* از نمونه‌های کلینیکی در تحقیق‌های فوق تا حدودی با نتایج این تحقیق هم‌خوانی داشت. در تحقیق حاضر نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، آمیکاسین، پنی سیلین G، آموکسی سیلین، سفتازیدیم، سفازولین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین وجود دارد، اگرچه این سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های آزیترومایسین، اریترومایسین، کلاریترومایسین و کوآموکسی کلاو کاملاً حساسیت داشتند. در این ارتباط شی و همکاران نشان دادند که همهٔ سویه‌های *موراکسلا کاتارالیس* جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین بر کلاولانیک اسید، اریترومایسین و کلاریترومایسین حساس بودند(۲۳). این نتایج با یافته‌های به دست آمده از مطالعه حاضر در ارتباط با ۱۰۰ درصد حساس بودن جدایه‌ها به کوآموکسی‌کلاو و ماکرولیدها مطابقت دارد. عبدالله و همکاران و گوئیتور و رایت نشان دادند که از سویه *موراکسلا کاتارالیس* جداسازی شده۹۲/۳ درصد مقاوم به آمیکاسین و ۱۰۰ درصد حساس به کوآموکسی کلاو بودند(۲۴ و۱۶). در مطالعه دوو و

همکاران سویه‌های *موراکسلا کاتارالیس* را کاملاً حساس به کو آموکسی کلاو گزارش کردند(۲۵). باید توجه داشت که باکتری *موراکسلا کاتارالیس* فلور طبیعی دستگاه تنفسی انسان می باشد اگرچه، قابلیت تولید بتالاکتاماز های وسیع الطیف در این باکتری به وسیله تحقیق حاضر اثبات می‌گردد که این پتانسیل می‌تواند تبعات منفی برای سلامتی انسان در نظر گرفته شود.

از طرف دیگر اقبالی و همکاران وجود ژن‌های *bro* 1 و*bro2* در درصد بالایی از سویه‌های *موراکسلا کاتارالیس* جدا شده از نمونه‌های کلینیکی بیمارانی با عفونت‌های تنفسی اثبات نمودند که نشان دهنده قابلیت این باکتری جهت تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف می‌باشد(۶). نتایج به دست آمده از تحقیق فوق نشان داد که سویه‌های *مورکسلا کاتارالیس* که تمام سویه‌های MDR(۷ سویه) قابلیت تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف را دارند که تأییدی بر نتایج اقبالی و همکاران می‌باشد. اگرچه بر اساس یافته های این تحقیق استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های آزیترومایسین، اریترومایسین، کلاریترومایسین و آموکسی کلاو جهت درمان عفونت ناشی از *موراکسلا کاتارالیس* پیشنهاد می‌شود، اما چنین نتایجی باید به وسیله تحقیقات دیگر در آینده مورد تایید قرار گیرد. بنابر این لزوم پژوهش‌های بیشتر در این زمینه به وسیله محققین ضروری به نظر می‌رسد.

## نتیجه‌گیری

*موراکسلا کاتارالیس* به علت فلور نرمال بودن دستگاه تنفسی می‌تواند در نمونه‌های کلینیکی گرفته شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های تنفسی وجود داشته باشد. با توجه به این که عفونت بودن این باکتری مطمناً با درصد بالایی به وضعیت سیستم ایمنی میزبان بستگی دارد؛ بنابر این *موراکسلا کاتارالیس* دارای ویژگی باکتری‌های فرصت‌طلب می‌باشد که وجود ژن‌های مقام به آنتی‌بیوتیک‌ها در این باکتری می‌تواند زنگ خطری برای افزایش میزان عفونت‌های تنفسی در نظر گرفته شود. بر اساس نتایج این تحقیق اکثر سویه‌ها ی جدا شده دارای ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتم بودن که بی اثر بودن تجویز این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها را برای درمان عفونت‌های تنفسی نشان می‌دهد.

## تقدیر و تشکر

این مقاله بر گرفته از پایان نامه مقطع .کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی با کد اخلاق IR.IAU.KAU.REC.1401.072 از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز است و منابع مالی این تحقیق به وسیله نویسندگان تأمین شده است.

## REFERENCES

1.issanayake E, Brockman-Schneider RA, Stubbendieck RM, Helling BA, Zhang Z, Bochkov YA, et al. Rhinovirus increases Moraxella catarrhalis adhesion to the respiratory epithelium. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2023; 12: 1060748.
2.Spaniol V, Bernhard S, Aebi C. Moraxella catarrhalis AcrAB-OprM efflux pump contributes to antimicrobial resistance and is enhanced during cold shock response. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2015; 59(4): 1886-94.
3.Mohammad Shafiei P, Baserisalehi M, Mobasherizade S. Investigating the Antibiotic Resistance Prevalence and Phenotypic and Genotypic Evaluation of AcrAB-OprM Efflux Pump in Multidrug-resistant in Clinical Isolates of Moraxella catarrhalis in Kazerun City, Iran. Iranian Journal of Medical Microbiology 2020; 14(5): 388-407.
4.Goldstein EJ, Murphy TF, Parameswaran GI. Moraxella catarrhalis, a human respiratory tract pathogen. Clinical Infectious Diseases 2009; 49(1): 124-31.
5.Maleki A, Mirnaseri Z, Kouhsari E, Taherikalani M, Pakzad I, Mohammadi J, Sadeghifard N. Asymptomatic carriers of Neisseria meningitidis and Moraxella catarrhalis in healthy children. New Microbes and New Infections 2020; 36: 100691.
6.Eghbali M, Baserisalehi M, Ghane M. Distribution of virulence genes in moraxella catarrhalis isolated from clinical samples in the north of Iran. Iranian Red Crescent Medical Journal 2019; 21(1): 1-7.
7.Szamosvári D, Schuhmacher T, Hauck CR, Böttcher T. A thiochromenone antibiotic derived from the Pseudomonas quinolone signal selectively targets the Gram-negative pathogen Moraxella catarrhalis. Chemical Science 2019; 10(27): 6624-8.
8.Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VH, Takebayashi Y, Spencer J. β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century. Journal of Molecular Biology 2019; 431(18): 3472-500.
9.Tang P, Shi W, Zeng HL, Ding W, Wang C, Yao KH, Wen DN. Prevalence of Moraxella catarrhalis in the nasopharyngeal specimen from 1 082 hospitalized children with respiratory infection and the drug resistance of the isolates. Zhongguo Dang dai er ke za zhi= Chinese Journal of Contemporary Pediatrics 2016; 18(8): 707-12.
10.Khan MA, Northwood JB, Levy F, Verhaegh SJ, Farrell DJ, Van Belkum A, Hays JP. bro β-lactamase and antibiotic resistances in a global cross-sectional study of Moraxella catarrhalis from children and adults. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2010; 65(1): 91-7.
11.Yamada K, Arai K, Saito R. Antimicrobial susceptibility to β-lactam antibiotics and production of BRO β-lactamase in clinical isolates of Moraxella catarrhalis from a Japanese hospital. Journal of Microbiology immunology and infection 2017; 50(3): 386-9.
12.Kownani M, Baserisalehi M, Bahador N. Frequency of Extended Spectrum β-Lactamase Genes in Pseudomonas Aerugionsa Isolates from Shiraz Hospital, Iran. Journal of Isfahan Medical School 2013; 31(243); 1007- 1017.
13.Ghaznavi Rad A, Zarei R, Jafari A, Palizwan MR, Jourabchi A, Moeini L, Rafiei M. Prevalence of moraxella catarrhalis and risk factors for it in patients with respiratory infections referred to Valiasr and Amirkabir hospitals in Arak. Yafte 2005; 7(4): 117-22.
14.Sillanpää S, Oikarinen S, Sipilä M, Kramna L, Rautiainen M, Huhtala H, et al. Moraxella catarrhalis might be more common than expected in acute otitis media in young Finnish children. Journal of Clinical Microbiology 2016; 54(9): 2373-9.
15.Versi A, Ivan FX, Abdel-Aziz MI, Bates S, Riley J, Baribaud F, Yasinska V. Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis in sputum of severe asthma with inflammasome and neutrophil activation. Allergy 2023; 78(11): 2906-20.
16.Abdullah FE, Ahuja KR, Kumar H. Prevalence and emerging resistance of Moraxella catarrhalis in lower respiratory tract infections in Karachi. J Pak Med Assoc 2013; 63(11): 1342-4.
17.Quiñones D, Llanes R, Toraño G, Pérez M. Nasopharyngeal colonization by Moraxella catarrhalis and study of antimicrobial susceptibility in healthy children from Cuban day-care centers. Archives of Medical Research 2005; 36(1): 80-2.
18.Denham JD, Nanjappa S, Greene JN. Moraxella species bacteremia in cancer patients: a case series and review of the literature. Infectious Diseases in Clinical Practice 2018; 1;26(4): 188-90.

19.Nawa M, Mwansa J, Mwaba J, Kaonga P, Mukubesa AN, Simuyandi M, et al. Microbiologic and virulence characteristics of Moraxella catarrhalis isolates from Zambian children presenting with acute pneumonia. Pediatric Pulmonology 2022; 57(12): 3084-93.
20.Lobb B, Lee MC, McElheny CL, Doi Y, Yahner K, Hoberman A, et al. Genomic classification and antimicrobial resistance profiling of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae isolates associated with paediatric otitis media and upper respiratory infection. BMC Infectious Diseases 2023; 23(1): 596.
21.Hare KM, Seib KL, Chang AB, Harris TM, Spargo JC, Smith-Vaughan HC. Antimicrobial susceptibility and impact of macrolide antibiotics on Moraxella catarrhalis in the upper and lower airways of children with chronic endobronchial suppuration. Journal of Medical Microbiology 2019; 68(8): 1140-7.
22.Nawa M, Mwansa J, Mwaba J, Kaonga P, Mukubesa AN, Simuyandi M, et al. Microbiologic and virulence characteristics of Moraxella catarrhalis isolates from Zambian children presenting with acute pneumonia. Pediatric Pulmonology 2022; 57(12): 3084-93.
23.Shi W, Wen D, Chen C, Yuan L, Gao W, Tang P, et al. β-Lactamase production and antibiotic susceptibility pattern of Moraxella catarrhalis isolates collected from two county hospitals in China. BMC microbiology 2018; 18: 1-6.
24.Guitor AK, Wright GD. Antimicrobial resistance and respiratory infections. Chest 2018; 154(5): 1202-12.
25.Du Y, Zhou H, Wang F, Liang S, Cheng L, Du X, et al. Multilocus sequence typing-based analysis of Moraxella catarrhalis population structure reveals clonal spreading of drug-resistant strains isolated from childhood pneumonia. Infection, Genetics and Evolution 2017; 56(1): 117-24.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

# Relative Frequency of Existence of Bro Gene and its Relation to Antibiotic Resistant *Moraxella Catarrhalis* Isolated From Clinical Samples

**Baserisalehi M[1*], Eshaghi H[2]**

[1]Department of Microbiology, Zand institute of high education, Shiraz, Iran, [2]Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shiraz branch, Shiraz, Iran

Received: 24 May 2023 Accepted: 04 Des 2023

## Abstract

**Background & aim:** *Moraxella catarrhalis* shows resistance to antibiotics by using two mechanisms, beta-lactamase enzyme activity and efflux pump. Currently, *Moraxella catarrhalis* is considered as a bacterium that causes respiratory infections. Therefore, the aim of the present study was to determine the relative frequency of bro beta-lactamase gene and its relationship with antibiotic resistance in *Moraxella catarrhalis* isolated from clinical samples.

**Methods**:The present descriptive study was conducted at Dena hospital of Shiraz from 2020-2021 In total, 136 clinical samples were collected from pulmonary infectious patients and *Moraxella catarrhalis* was isolated and identified by phenotypic and Genotypic (16S rRNA) methods. At that point, antibiotic susceptibility of the isolates was determined by disk diffusion and combination disk methods. In addition the relative frequency of existence of bro gene was evaluated in them. The collected data were statistical analysis usint t-student test.

**Results**: In the present study, out of 10 strains of *Moraxella catarrhalis*, seven strains were MDR. These bacteria were resistant to Gentamicin, Amikacin, PenicillinG, Amoxicillin, Cefazolin , Ceftazidime, Tetracyclin, Chloramphinicol and Ciproflaxacin (70%). In addition, these strains slowed less resistant character to Azithromycin, Erythromycin, Clarithromycin and Co-amoxiclav (100%). *bro* genes were observed in all MDR strains ( 5 strains had *bro*-1 and 2 strains had *bro*-2 genes).

**Conclusion**: The results indicated that *Moraxella catarrhalis* strains with MDR character carried bro genes. Therefore, based on our finding prescription of beta lactam antibiotics for treatment of *Moraxella catarralis* infections could not recommend; however, Azotomycin, Erythromycin clarithromycin and Co-amoxiclav could be suggested.

**Key words:** *Moraxella catarrhalis*, Beta lactamase *bro* gene, Multi Drug Resistance

***Corresponding autjor: Baserisalehi M,** Department of Microbiology, Zand Institute of Higher Education, Shiraz, Iran.
**Email:** majidbaserisalehi682@gmail.com

**Please cite this article as follows:** Baserisalehi M, Eshaghi H. Relative Frequency of Existence of Bro Gene and its Relation to Antibiotic Resistant Moraxella Catarrhalis Isolated From Clinical Samples. Armaghane-danesh 2024; 28(6): 870-881.