مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۱۷۸/هفته چهارم فروردین ماه ۱۳۹۱
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۱۴

فنوتیپ ازدیاد مقاومت در ایزوله‌های بالینی سالمونلا در نتیجه‌ی افزایش فعالیت آنزیم‌های بتا–لاکتاماز

مرسده تاجبخش[۱]، محمد یعقوبی آوینی[۱]، دکتر جهان علی خواجه[۲]، دکتر مسعود آل‌بویه[۳]، احسان ناظم‌الحسینی مجرد[۱]، دکتر محمدرضا زالی[۴]

چکیده

مقدمه: یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام تولید آنزیم بتالاکتاماز در باکتری‌ها است. هدف از مطالعه، بررسی نقش احتمالی میزان تنوع فعالیت آنزیم‌های بتالاکتاماز در بروز فنوتیپ‌های مقاومتی مختلف سویه‌های سالمونلای مولد بتالاکتاماز طیف گسترده (Extended-spectrum beta-lactamases یا ESBLs) بود.

روش‌ها: وجود فنوتیپ مقاومتی ESBLs در ۱۷۴ جدایه‌ی سالمونلای بالینی پس از غربال‌گری به روش دیسک دیفیوژن با روش دیسک مرکب و MIC (Minimal inhibitory concentrations) بررسی گردید. PCR (Polymerase chain reaction) جهت شناسایی ژن‌های کد کننده‌ی bla_{TEM}، bla_{CTX}، bla_{SHV} در DNA کروموزومی و پلاسمید جدایه‌های مزبور به کار رفت. میزان فعالیت آنزیمی پروتئین تام باکتری‌ها به روش بیولوژیک، یدومتری و اسپکتروفتومتری در حضور سوبسترای آنتی‌بیوتیکی مرتبط تعیین گردید.

یافته‌ها: ۴ درصد از کل ایزوله‌ها مولد ESBLs بودند. بررسی سطوح MIC مؤید تنوع ایزوله‌های مقاوم در غلظت‌های بالای سفالوسپورین‌ها بود. کلیه‌ی این ایزوله‌ها از نظر وجود ژن‌های bla_{TEM} و bla_{CTX} مثبت و bla_{SHV} منفی بودند. این آنزیم‌ها بر روی پلاسمید کد می‌شدند. نتایج بررسی فعالیت آنزیمی در بین این ایزوله‌ها نشان داد که سویه‌های با مقدار پروتئین تام یکسان، فعالیت هیدرولیتیکی متفاوتی بر روی سفالوسپورین‌ها داشتند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل، تفاوت در میزان مقاومت و هیدرولیز سفالوسپورین‌ها توسط سویه‌های مولد ESBL می‌تواند با میزان بیان پروتئین آن‌ها در ارتباط باشد. تنوع احتمالی زیر خانواده‌های آنزیمی بتالاکتاماز، حضور و بیان بیش از یک ژن در این ایزوله‌ها، دخیل بودن سایر مکانیسم‌های مقاومتی می‌توانند از عوامل مؤثر در بروز تنوع در میزان مقاومت این باکتری‌ها باشند.

واژگان کلیدی: فعالیت بتالاکتاماز، سالمونلا، مقاومت دارویی

مقدمه

سالمونلا یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در انسان و حیوانات است. انسان اغلب از طریق آب و غذای آلوده به این باکتری مبتلا می‌شود. از بین بیش از ۲۵۰۰ سروتایپ مختلف سالمونلا، تعداد محدودی از آن‌ها منجر به گاستروانتریت حاد (غیر تیفی) در انسان می‌شود (۱). مصرف آنتی‌بیوتیک در درمان گاستروانتریت غیر تیفی توصیه نمی‌شود؛ چرا که بیماری اغلب به صورت خود محدود شونده مهار می‌شود، اما در عفونت‌های شدید از قبیل منتژیت، باکتریمی و آرتریت در بالغین، افراد مسن و افراد با ایمنی سرکوب شده مصرف آن ضروری است (۲).

[۱] کارشناس ارشد، دایره‌ی بیماری‌های ناشی از غذا و اسهال‌های مزمن، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۲] استادیار، گروه بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
[۳] دکترای تخصصی، گروه باکتری شناسی، دایره‌ی بیماری‌های ناشی از غذا و اسهال‌های مزمن، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۴] استاد، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مسعود آل‌بویه
Email: masoud.alebouyeh@gmail.com

آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و سولفامتوکسازول داروهای درمانی منتخب در گذشته محسوب می‌شدند، اما با توجه به ظهور سویه‌های دارای مقاومت چندگانه در سراسر دنیا، فلوروکینولون‌ها و سفالوسپورین‌ها جایگزین آن‌ها گردیده‌اند.

سفالوسپورین‌های نسل سوم به دلیل تأثیر بهینه و مقاومت کم باکتری‌ها به آن‌ها به خصوص در کودکان و به دلیل محدودیت مصرف کینولون‌ها، اغلب برای درمان عفونت‌های شدید تجویز می‌شوند (۴-۳). مصرف بی‌رویه‌ی این داروها در سال‌های اخیر منجر به بروز سویه‌های مقاوم به بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف (Extended-spectrum beta-lactamases یا ESBLs) به خصوص در خانواده‌ی انتروباکتریاسه در سراسر دنیا شده است (۸-۵).

این آنزیم‌ها دارای توانایی تجزیه‌ی سفالوسپرین‌های وسیع‌الطیف نسل سوم مانند سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و داروهای منوباکتام (آزترونام) هستند، اما بر روی سفامایسین‌ها (سفوکسیتین و سفوتتان) و کرباپنم‌ها (ایمیپنم و مروپنم) بی‌تأثیر می‌باشند و فعالیت آن‌ها توسط کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌گردد (۹).

مکانیسم مقاومت به بتالاکتام در باکتری‌ها از طریق ایجاد موتاسیون در Penicillin binding proteins (PBP)، تغییر در نفوذپذیری غشا، بیان دسته‌های ژنی Efflux pump و تولید بتالاکتاماز صورت می‌پذیرد.

موقعیت بتالاکتامازها در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی متفاوت است. در باکتری‌های گرم مثبت این آنزیم‌ها اغلب به خارج از غشا ترشح می‌شوند و در باکتری‌های گرم منفی اغلب در فضای پری‌پلاسمی تجمع می‌یابند (۱۰).

معیارهای متفاوتی برای بررسی عملکرد بتالاکتامازها و تشخیص آن‌ها مطرح می‌شود. از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به ثابت ایزوالکتریک آنزیم (Isoelectric point یا PI)، سرعت هیدرولیز (V_{max})، وزن مولکولی پروتئین، ترکیبات اسید آمینه و توان اتصال پروتئین به سوبسترا (Km) اشاره نمود (۱۰). شناسایی بتالاکتامازها در نمونه‌های بالینی بر اساس طیف اثر، میزان تولید آنزیم و تنوع فعالیت آنزیمی در باکتری‌های حامل، اهمیت زیادی در درمان یا جلوگیری از شیوع آن‌ها در جامعه دارد. گزارش‌های متعددی از مقاومت سالمونلا به بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف در سراسر دنیا به ثبت رسیده است. طیف وسیعی از بتالاکتامازها شامل آنزیم‌های TEM، SHV، PER، OXA و CTX در گونه‌های مختلف سالمونلا شناسایی گردیده است (۱۴-۱۱).

در ایران نیز در سال‌های اخیر گزارش‌هایی از مقاومت سالمونلا به سفالوسپورین‌ها دیده شده است که علت آن را می‌توان به مصرف بی‌رویه و تجویز نادرست دارو توسط افراد و متخصصین، به ویژه در مواد غذایی حیوانات نسبت داد (۱۶-۱۵). مهم‌ترین مکانیسم مقاومت علیه این داروها، انتقال ژن های بارز کننده‌ی مقاومت از طریق پلاسمیدهایی می‌باشد که اغلب در باکتری‌های انتریک حضور دارند و فعالیت خود را از طریق آنزیم‌های متعدد بیان می‌کنند (۱۷). شناسایی سوبسترای مناسب دارویی برای این آنزیم‌ها از بروز سویه‌های مقاوم و شیوع آن‌ها، شکست درمان و صرف هزینه‌های کلان درمانی جلوگیری می‌نماید.

مطالعات مختلفی در ایران بر روی شیوع ژنومیک خانواده‌های آنزیمی بتالاکتاماز در گونه‌های مختلف باکتری‌های گرم منفی صورت گرفته است، اما تنوع

www.mui.ac.ir

عملکردی آن‌ها بر اساس سوبستراهای دارویی (فعالیت بیولوژیک) چندان مورد توجه قرار داده نشده است (۱۹-۱۸). هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی سویه‌های سالمونلا از نظر حضور فنوتیپ‌های مرتبط با خانواده‌ی آنزیمی ESBL با استفاده از روش آنتی‌بیوگرام و MIC (Minimal inhibitory concentrations)، بررسی تنوع ژن‌های کد کننده‌ی این فنوتیپ و بیان ژن‌های مربوط در نمونه‌های مولد ESBLs بود.

همچنین بررسی میزان بیان این ژن‌ها، توانایی آن‌ها در تجزیه‌ی سوبستراهای مختلف دارویی و ارزیابی فعالیت در مقایسه با مقادیر به دست آمده از آزمون تعیین MIC در مورد هر ایزوله، از موارد دیگر مورد توجه در این مطالعه بود.

روش‌ها

تعداد ۱۷۴ ایزوله‌ی سالمونلا از افراد مبتلا به گاستروانتریت در تهران طی دو سال و نیم (تیر ۱۳۸۶ تا آذر ۱۳۸۸) جمع‌آوری گردید. کلیه‌ی نمونه‌ها بر روی محیط‌های اختصاصی و انتخابی کشت شدند و پس از انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند.

کلنی‌های مشکوک توسط تست‌های استاندارد بیوشیمیایی سنجش و در نهایت ایزوله‌های تأیید شده به عنوان سالمونلا، با کمک روش‌های سرولوژی با استفاده از آنتی‌سرم‌های O و H (MAST Merseyside, UK) سروتایپ بندی شدند. برای تشخیص فنوتیپیک و تعیین ژن‌های مرتبط با ESBLs، آزمون تعیین حساسیت میکروبی با استفاده از روش استاندارد CLSI یا (Clinical and laboratory standards institute) انجام پذیرفت (۲۰). سویه‌های مقاوم با دیسک‌های مرکب سفتازیدیم ± کلاولانیک اسید، سفوتاکسیم ± کلاولانیک اسید و سفپودوکسیم ± کلاولانیک اسید (MAST Merseyside, UK) از نظر حضور ESBL مورد شناسایی قرار گرفتند.

جهت تأیید این سویه‌ها، آزمون MIC با استفاده از پودرهای سفالوتین، سفتازیدیم، سفتازیدیم ± کلاولانیک اسید، سفوتاکسیم، سفوتاکسیم ± کلاولانیک اسید و سفتری اکسون (Glaxo-SmithKline, Greenford, UK) در غلظت‌های استاندارد ارائه شده توسط CLSI و بالاتر تا ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر برای سفالوسپورین‌ها بدون ترکیب با کلاولانیک اسید انجام شد.

به منظور بررسی ژنی این آنزیم‌ها، DNA باکتری به روش جوشاندن استخراج گردید و PCR (Polymerase chain reaction) برای سه ژن کد کننده‌ی TEM، CTX و SHV انجام شد (۲۱). جهت ارزیابی وجود این ژن‌ها بر روی پلاسمید از کیت (Gene Jet plasmid miniprep ,Fermentase) جهت استخراج پلاسمید استفاده گردید و پس از تعیین الگوی پلاسمیدی هر ایزوله، PCR برای سه ژن ذکر شده روی نمونه‌های پلاسمیدی انجام شد.

به منظور جدا سازی مخلوط آنزیمی، بخش پروتئین پری‌پلاسمی در این باکتری‌ها با روش شوک اسمزی استخراج شد. باکتری‌ها ابتدا در محیط LB broth به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور با Shaker کشت داده شدند. پس از سانتریفیوژ، سلول‌های حاصل در ۴ میلی‌لیتر از محلول سوکروز شامل سوکروز ۳۰ درصد، Tris-HCl با غلظت ۲۰ میلی‌مولار و pH برابر ۸ و ۵ میلی‌مولار EDTA سوسپانسیون شدند و بعد از انکوبه شدن روی

www.mui.ac.ir

یخ توسط سانتریفیوژ رسوب‌گذاری شدند. رسوب باکتری در ۴ میلی‌لیتر از $MgCl_2$ (۰/۵ میلی‌مولار) حاوی مهار کننده‌ی پروتئاز (Roche, Germany) مخلوط شد و به دنبال انکوباسیون مجدد به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ و سانتریفیوژ، مایع رویی آن‌ها به عنوان پروتئین تام پری‌پلاسمیک جهت بررسی فعالیت بتالاکتامازی استفاده گردید (۲۲). میزان غلظت پروتئین‌های استخراج شده با روش استاندارد برادفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۳).

برای اندازه‌گیری فعالیت بیولوژیک مخلوط‌های آنزیمی تحت مطالعه از پروتئین تام استفاده شد. در این روش برروی محیط مولر هینتون آگار چهار عدد چاهک به تعداد آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد گردید و غلظت ۰/۵ McFarland از سویه‌ی E.coli 25922 در سطح پلیت کشت داده شد. سپس مقادیر مشخص از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سفوتا کسیم، سفتازیدیم و سفالوتین (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با ۵ میکروگرم از آنزیم مخلوط شد و حجم نهایی با بافر فسفات (۰/۱ مول با pH = ۷) به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد و درون چاهک مربوط تلقیح گردید. یکی از چاهک‌ها نیز به عنوان شاهد تحت تلقیح با پروتئین استخراج شده از E.coli HB101 تلقیح گردید. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه شد (۲۴).

به منظور بررسی فعالیت آنزیمی مخلوط‌های پروتئینی تحت مطالعه علیه سوبستراهای مختلف دارویی، مقدار ۵ میکروگرم از پروتئین تام پری‌پلاسمی با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۱ مول با pH = ۷)، ۰/۵ میلی‌لیتر مخلوط ید- نشاسته و ۰/۵ میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه مخلوط شد و تغییرات جذب نوری در طول موج ۶۲۰ نانومتر در فاصله زمانی متوالی طی ۵ دقیقه در دمای اتاق قرائت گردید. جذب اولیه‌ی مخلوط در حدود ۱/۲ بود و واحد آنزیم بر اساس میکرومول سوبسترای تجزیه شده بر دقیقه بر میلی‌لیتر از حجم کل واکنش با فرمول $0.3 \times (\Delta OD/min/1.2)$ محاسبه گردید (۲۵).

برای تعیین فعالیت بتالاکتامازی از اسپکتروفتومتری استفاده شد. در این روش فعالیت بتالاکتامازی بر آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سفوتا کسیم، سفتازیدیم و سفالوتین بر اساس تعیین میزان تغییرات جذب نوری به ازای هر دقیقه جذب نوری به ترتیب در طول موج‌های ۲۴۰، ۲۶۲، ۲۶۴ و ۲۶۰ نانومتر (ΔOD در دقیقه) اندازه‌گیری شد. پروتئین تام پری‌پلاسمی (۵ میکروگرم) با ۱ میلی‌لیتر از هر آنتی‌بیوتیک در غلظت ۱۲۵ میکرومول تهیه شد (در ۰/۱ مول بافر فسفات با pH = ۷) و تغییرات جذب نوری آن در مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرائت گردید.

یافته‌ها

از بین ۱۷۴ ایزوله‌ی تحت بررسی، ۷ ایزوله فنوتیپ مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم (سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفتریاکسون) را از خود نشان دادند که با تست‌های تکمیلی فعالیت بتالاکتامازی آن‌ها تأیید گردید. نتایج سروتایپینگ و MIC این ایزوله‌ها در جدول ۱ آورده شده است. بررسی ژنوتیپی نمونه‌ها نشان داد که کلیه‌ی نمونه‌ها حامل ژن bla_{CTX} و bla_{TEM} بودند و ژن bla_{SHV} در هیچ نمونه‌ای یافت نشد.

بررسی الگوی پلاسمیدی ایزوله‌ها نشان داد که پلاسمیدهایی با وزن مولکولی ۳/۷ کیلو و بالاتر از ۵۵ کیلو باز در همه‌ی سویه‌ها موجود بود. همچنین

www.mui.ac.ir

جدول ۱. نتایج سروتایپینگ و **MIC** (Minimal inhibitory concentrations) سویه‌های مولد بتالاکتاماز

سویه	سروتایپ	MIC (میکروگرم در میلی‌لیتر)					
		CRO	CP	CTX/CLV	CTX	CAZ/CLV	CAZ
۶۰	S. infantis	۱۰۲۴	۵۱۲	۱	۱۰۲۴	۲	۱۲۸
۶	S. havana	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۱	۱۰۲۴	۲	۱۲۸
۶۱	S. typhimurium	۵۱۲۵	۱۲۸	۱	۵۱۲	۲	۱۲۸
۲۰۲	S. enteritidis	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۱	۱۰۲۴	۲	۱۲۸
A-۷۰	S. infantis	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۱	۱۰۲۴	۲	۱۲۸
۴۱	S. bredeny	۲۵۶	۱۲۸	۲	۲۵۶	۲	۱۲۸
۴۲	S. infantis	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۲	۱۰۲۴	۲	۱۲۸

CAZ; Ceftazidime CAZ-CLV: Ceftazidime-Clavulanic acid
CTX; Cefotaxime CTX-CLV: Cefotaxime-Clavulanic acid
CP: Cephalothin. CRP:Ceftriaxone

نتیجه‌ی PCR روی نمونه‌های پلاسمیدی استخراج شده نیز مشابه نتایج DNA بود و بیانگر آن بود که ژن‌های بتالاکتاماز (bla_{TEM} و bla_{CTX}) در این نمونه‌ها بر روی پلاسمید کد شده است.

مقدار پروتئین‌ها بر اساس آزمون Bradford در سویه‌های شماره‌ی A-۷۰، ۶۰، ۶۱، ۴-۲۰۲، ۴۱ و ۴۲ به ترتیب معادل ۳۵۰، ۲۵۰، ۳۷۵، ۳۵۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد.

کلیه‌ی نمونه‌های تحت مطالعه در بررسی فعالیت بیولوژیک، توانایی تجزیه‌ی پنی‌سیلین، سفالوتین و سفوتاکسیم را از خود نشان دادند، اما قادر به تجزیه سفتازیدیم نبودند. قطر هاله‌ی عدم رشد در بیشتر نمونه‌ها مشابه یکدیگر و در حدود ۳۲-۳۰ میلی‌متر بود.

در بین سویه‌های مولد ESBL، سویه‌های ۴۲، ۶۱ و ۴۱ به ترتیب بیشترین فعالیت و سویه‌ی ۶۰ کمترین فعالیت را در تست اسپکتروفتومتری تجزیه‌ی سفالوسپورین‌ها از خود نشان دادند. با توجه به این نتایج، آنتی‌بیوتیک سفالوتین توسط این آنزیم‌ها بهتر از سفوتاکسیم تجزیه گردید، در حالی که هیچ فعالیتی روی سفتازیدیم مشاهده نشد. این یافته تأیید کننده‌ی نتایج به دست آمده از آزمون فعالیت بیولوژیک است. در این بررسی سویه‌های ۴۲، ۶۱ و ۴۱ به ترتیب با فعالیتی برابر ۱۴/۴، ۱۳/۹۷ و ۶/۸۱ در دقیقه بیشترین و سویه‌ی ۶۰ با فعالیتی معادل ۰/۹۸ در دقیقه کمترین مقدار را در تجزیه‌ی سفالوتین به خود اختصاص دادند. سفوتاکسیم نیز توسط سویه‌های مذکور به ترتیب قید شده در بالا با فعالیتی معادل ۴/۷۷، ۳/۲۳ و ۲/۶۱ در دقیقه هیدرولیز شد. کمترین فعالیت در سویه‌ی ۶۰ با مقدار برابر ۰/۸۶ در دقیقه بود. پنی‌سیلین با بیشترین فعالیت (۸/۲۶ در دقیقه) توسط سویه‌ی ۴۲ و کمترین فعالیت (۰/۹۷ در دقیقه) با سویه‌ی ۴-۲۰۲ هیدرولیز شد. سرعت تجزیه در آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین به مراتب بیشتر از سایر آنتی بیوتیک‌ها بود. این در حالی بود که آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم توسط هیچ یک از سویه‌ها هیدرولیز نگردید.

مشابه روش اسپکتروفتومتری، تست‌های یدومتری نیز نتایج قابل توجهی را از خود نشان دادند (جدول ۲). در این روش سرعت بی‌رنگ شدن مخلوط ید- نشاسته در واحد زمان متناسب با هیدرولیز آنتی‌بیوتیک است و طول موج جذبی در بین

www.mui.ac.ir

بتالاکتام‌های هیدرولیز شده و غیر هیدرولیزی متفاوت است (۲۵).

جدول ۲. میزان فعالیت آنزیمی‌سویه‌های مولد بتالاکتاماز (U) با روش یدومتری و تغییرات جذب نوری در طول موج ۶۲۰ نانومتر

نمونه	پنی‌سیلین G	سفالوتین	سفوتاکسیم	سفتازیدیم
A-۷۰	۰/۰۵۹	۰/۰۴۰	۰/۰۳۱	۰/۰۰۵
۶	۰/۰۶۲	۰/۰۴۸	۰/۰۴۰	۰/۰۰۹
۶۰	۰/۰۵۶	۰/۰۲۰	۰/۰۲۰	۰/۰۱۰
۲۰۲-۴	۰/۰۵۸	۰/۰۳۳	۰/۰۳۰	۰/۰۰۸
۶۱	۰/۰۵۸	۰/۰۵۵	۰/۰۵۰	۰/۰۰۸
۴۱	۰/۰۵۶	۰/۰۵۰	۰/۰۴۶	۰/۰۱۳
۴۲	۰/۰۵۸	۰/۰۵۴	۰/۰۶۲	۰/۰۱۶

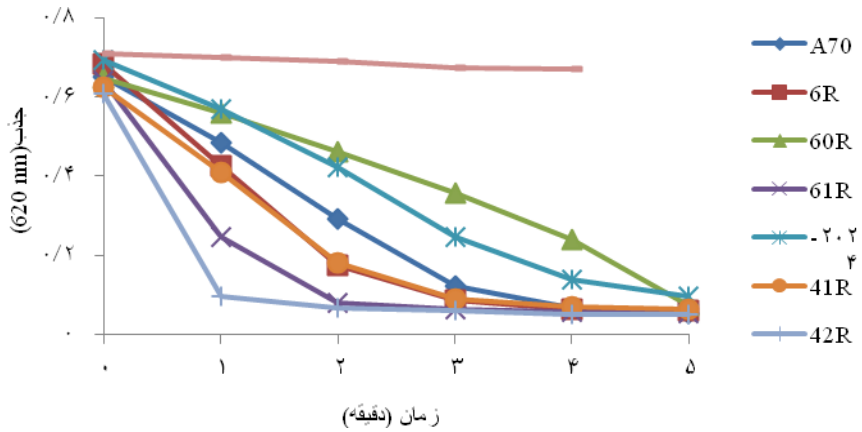
بر اساس این روش سفالوتین توسط سویه‌های ۴۲، ۶۱ و ۴۱ به سرعت تجزیه گردید. کمترین میزان فعالیت در سویه‌های ۶۰ و ۲۰۲-۴ مشاهده شد. نتایج حاصل از هیدرولیز سفوتاکسیم نیز مشابه تجزیه سفالوتین بود؛ به طوری که سویه‌ی ۴۲، ۶۱ و ۴۱ بیشترین میزان فعالیت را داشتند. کمترین فعالیت به سویه‌های ۶۰، ۲۰۲-۴، ۶ و A-۷۰ تعلق داشت.

سفتازیدیم به مقدار جزیی توسط سویه‌های موجود تجزیه شد. بیشترین میزان فعالیت به سویه‌های ۴۲ و ۴۱ تعلق داشت. سایر سویه‌ها به ترتیب فعالیت آنزیمی A-۷۰، ۶، ۶۰، ۶۱ و ۲۰۲-۴ بودند. این در حالی بود که سویه‌ی ۶۱ فعالیت بالاتری را در بین سایر نمونه‌ها در تجزیه‌ی سایر سفالوسپورین‌ها داشت (جدول ۲).

ایزوله‌های مولد بتالاکتاماز، پنی‌سیلین را در طی دو فاز تجزیه کردند. در فاز اولیه به سرعت شیب نمودار در واحد زمان کاهش یافت و سپس به حالت خطی تبدیل شد (نمودار ۱). متوسط این مقدار برای کلیه‌ی نمونه‌ها نزدیک به هم و میانگین آن‌ها در حدود U ۰/۰۵۸ بود.

بحث

در بین باکتری‌های مولد اسهال حاد، سالمونلا یکی از مهم‌ترین عوامل پاتوژن محسوب می‌شود. بر اساس پیشنهاد مرکز کنترل بیماری‌ها، انتخاب داروی مناسب جهت درمان سالمونلوز باید بر اساس تست‌های حساسیت میکروبی باشد. اگر چه این روش وقت‌گیر است، اما شناسایی دقیق آنتی‌بیوتیک مناسب برای بیمار هم از نظر ساختار دارویی و هم از نظر بالینی، از بروز سویه‌های مقاوم در جامعه‌ی میکروبی و متعاقب



نمودار ۱. تجزیه‌ی پنی‌سیلین (۱۲۵ میلی‌مولار) در روش یدومتری توسط سویه‌های مولد بتالاکتاماز

www.mui.ac.ir

آن افزایش مرگ و میر و هزینه‌های درمانی در جامعه جلوگیری به عمل می‌آورد (۲۶). داروهای سفالوسپورینی از جمله داروهایی هستند که در تجویز و مصرف آن باید دقت نظر داشت. امروزه بروز مقاومت به این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها در سراسر جهان مشاهده شده است و از آن جا که ژن‌های کد کننده‌ی این نوع از آنزیم‌ها در خانواده‌ی انتروباکتریاسه بر روی پلاسمید قرار دارند، از این‌رو قابلیت انتقال در بین جنس‌های مختلف را دارا هستند (۲۷).

در بین ۱۷۴ ایزوله‌ی سالمونلای تحت مطالعه، هفت سویه (۴ درصد) با تست‌های تأییدی به عنوان ایزوله‌های مولد بتالاکتاماز تشخیص داده شدند. در کشورهای منطقه نظیر عربستان و کویت ۲۸۷ و ۱۲۳ نمونه سالمونلا مورد بررسی قرار گرفت که به ترتیب ۴/۲ و ۳/۴ درصد به سفالوسپورین‌های نسل سوم مقاوم بودند. این مقدار، افزایش ۵ برابری مقاومت به سفالوسپورین‌ها را نسبت به تحقیق مشابه در سال ۱۹۹۸نشان داد (۱۲). این نتایج تأیید کننده‌ی نتیجه‌ی تحقیق اخیر در ایران و افزایش مقاومت سفالوسپورینی در سالمونلا نسبت به مطالعات گذشته در سال ۱۳۸۶ می‌باشد (۲۸).

نتایج حاصل از تشخیص مولکولی ژن‌های بتالاکتاماز در این نمونه‌ها با نتایج مطالعه‌ی رنجبر و همکاران مشابه بود؛ به طوری که در کلیه‌ی سویه‌ها ژن bla_{CTX} و bla_{TEM} شناسایی شدند (۱۶). تنوع الگوی پلاسمیدی ایزوله‌های مختلف و مقایسه‌ی زیر گونه‌های تحت مطالعه ارتباطی را با توجه به فنوتیپ‌های مقاومتی یا فعالیت‌های آنزیمی نشان ندادند.

از نتایج قابل تأمل در این بررسی ارتباط مقادیر پروتئین استخراج شده با میزان فعالیت آنزیم است؛ به طوری که در نمونه‌هایی با مقادیر بالای پروتئین (مشابه سویه‌های شماره‌ی ۶ و A-۷۰) در مقایسه با سویه‌های شماره‌ی ۴۱، ۴۲ و ۶۱، فعالیت بتالاکتامازی اندکی در تست‌های یدومتری و اسپکتروفتومتری دیده شد. دلیل آن می‌تواند به علت حضور کمتر آنزیم‌های بتالاکتاماز، بیان اندک آن‌ها و حضور بیش از حد سایر پروتئین‌های ترشحی در این نمونه‌ها یا رخداد موتاسیون ژنی مؤثر در فعالیت آنزیمی این سویه‌ها بدون توجه به مقدار تولیدی پروتئوم باشد.

بررسی آنزیمی نمونه‌ها در روش یدومتری مشابه نتایج Sykes و Nordstrom بود (۲۵)، به طوری که کلیه‌ی نمونه‌ها پنی‌سیلین را به سرعت در فاز اولیه تجزیه کردند و در فاز دوم که نمودار به صورت خطی در آمد، سرعت تجزیه به تقریب ثابت باقی ماند. سایر سفالوسپورین‌ها کندتر تجزیه شدند و جذب نوری مخلوط‌ها روند کاهشی تدریجی را نشان دادند (نمودار ۱).

تفسیر نتایج به دست آمده از پروتئین تام باکتری‌های مورد بررسی در این مطالعه در مورد سفالوسپورین‌ها، تنوع طیف اثر سوبستراهای این آنزیم‌ها را در بین آن‌ها نشان داد.

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف توانایی تجزیه‌ی پیوندهای حلقه‌ی بتالاکتام در سفالوسپورین‌ها را دارند. کاهش سرعت هیدرولیز در مورد این داروها، بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر در مقایسه با پنی‌سیلین، در صورتی که مربوط به ساختار خود آنزیم نباشد، می‌تواند مربوط به به وجود آمدن ترکیبات ناپایدار حاصل از تجزیه‌ی سفالوسپورین‌ها باشد؛ به طوری که سرعت بی‌رنگ شدن در سفالوسپورین‌های ساده بسیار سریع‌تر از سفالوسپوری‌های پیچیده‌تر بود. نتایج حاصل از این

روش مؤید مزیت روش یدومتری جهت غربال‌گری است؛ چرا که سریع و نسبت به مقادیر کم بتالاکتامازهای فعال حساس است و از آن می‌توان در کشت میکروبی نیز استفاده کرد (۲۵).

نتایج این مطالعه در مورد بررسی بیولوژیک فعالیت آنزیم، مشابه نتایج Piriz و همکاران بر روی نمونه‌های باکتروئیدز بود (۲۹). این روش برای بررسی انواع مقاومت بتالاکتامازی اعم از متالوبتالاکتامازها، کرباپنمازها و ESBLها قابل انجام است.

شیب نمودار معرف فعالیت آنزیم در بررسی اسپکتروفتومتری سویه‌ها است. تفاوت در این مقادیر می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع‌های مختلف آنزیم باشد که لزوم بررسی بیشتر سویه‌ها، شناسایی دقیق آنزیم‌ها و تعیین توالی آنزیم‌های موجود را ایجاب می‌کند. از آن جا که کلیه‌ی نمونه‌ها فعالیت جزیی روی سفتازیدیم داشتند، می‌توان به بیان بیشتر ژن bla_{CTX} در این سویه‌ها توجه داشت؛ چرا که فعالیت آن روی سفوتاکسیم بیشتر از سفتازیدیم است (۳۰). نتایج حاصل از بررسی تحقیق اخیر با نتایج Hall و همکاران روی سویه‌های سودوموناس (۳۱) و نیز Citri و همکاران اندکی مغایرت داشت (۳۲). یکی از دلایل آن را می‌توان تفاوت در باکتری مورد مطالعه و مکانیسم‌های رایج مقاومت در این دسته از باکتری‌ها شامل Efflux-pump و یا پمپ‌های پورینی و وجود توأم چند مکانیسم مقاومتی بیان کرد. بررسی الگوی بیان و تعیین میزان فعالیت آنزیمی بتالاکتامازهای ایزوله‌های بالینی در مقایسه با الگوهای ژنی مقاومت دارویی می‌تواند به عنوان راهکاری جهت هدفمند سازی تجویزهای دارویی و مصارف بالینی آن‌ها به منظور جلوگیری از بروز سویه‌های توانمند در تجزیه‌ی سطوح بالای داروهای مؤثر، در نظر گرفته شود. مطالعه‌ی هر چه بیشتر این آنزیم‌ها در سطح عملکردی به ویژه در مورد باکتری‌هایی همچون سالمونلا ضروری می‌نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از کلیه‌ی همکاران مرکز تحقیقات گوارش و کبد که در انجام این مطالعه نهایت همکاری را داشتند، اعلام می‌دارند. لازم به ذکر است که کلیه‌ی منابع مالی و اعتباری این طرح توسط مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تأمین گردیده است.

References

1. Bruun T, Sorensen G, Forshell LP, Jensen T, Nygard K, Kapperud G, et al. An outbreak of Salmonella Typhimurium infections in Denmark, Norway and Sweden, 2008. Euro Surveill 2009; 14(10).
2. Su LH, Wu TL, Chia JH, Chu C, Kuo AJ, Chiu CH. Increasing ceftriaxone resistance in Salmonella isolates from a university hospital in Taiwan. J Antimicrob Chemother 2005; 55(6): 846-52.
3. Hohmann EL. Nontyphoidal salmonellosis. Clin Infect Dis 2001; 32(2): 263-9.
4. Wedel SD, Bender JB, Leano FT, Boxrud DJ, Hedberg C, Smith KE. Antimicrobial-drug susceptibility of human and animal Salmonella typhimurium, Minnesota, 1997-2003. Emerg Infect Dis 2005; 11(12): 1899-906.
5. Harajly M, Khairallah MT, Corkill JE, Araj GF, Matar GM. Frequency of conjugative transfer of plasmid-encoded ISEcp1 - blaCTX-M-15 and aac(6')-lb-cr genes in Enterobacteriaceae at a tertiary care center in Lebanon - role of transferases. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2010; 9: 19.
6. Xiao YH, Giske CG, Wei ZQ, Shen P, Heddini A, Li LJ. Epidemiology and characteristics of antimicrobial resistance in China. Drug Resist Updat 2011; 14(4-5): 236-50.
7. Wollheim C, Guerra IM, Conte VD, Hoffman SP, Schreiner FJ, Delamare AP, et al. Nosocomial and community infections due to

class A extended-spectrum beta-lactamase (ESBLA)-producing Escherichia coli and Klebsiella spp. in southern Brazil. Braz J Infect Dis 2011; 15(2): 138-43.
8. Onnberg A, Molling P, Zimmermann J, Soderquist B. Molecular and phenotypic characterization of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum beta-lactamases with focus on CTX-M in a low-endemic area in Sweden. APMIS 2011; 119(4-5): 287-95.
9. Al-Zahrani AJ, Akhtar N. Susceptibility Patterns of Extended Spectrum ß-Lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated in a teaching hospital. Pakistan J Med Res 2005; 44(2).
10. Stratton CW. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. J Med Liban 2000; 48(4): 186-98.
11. Archambault M, Petrov P, Hendriksen RS, Asseva G, Bangtrakulnonth A, Hasman H, et al. Molecular characterization and occurrence of extended-spectrum beta-lactamase resistance genes among Salmonella enterica serovar Corvallis from Thailand, Bulgaria, and Denmark. Microb Drug Resist 2006; 12(3): 192-8.
12. Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, et al. bla(CTX-M) genes in clinical Salmonella isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(4): 1319-22.
13. Gonzalez-Sanz R, Herrera-Leon S, de la Fuente M, Arroyo M, Echeita MA. Emergence of extended-spectrum beta-lactamases and AmpC-type beta-lactamases in human Salmonella isolated in Spain from 2001 to 2005. J Antimicrob Chemother 2009; 64(6): 1181-6.
14. Rotimi VO, Jamal W, Pal T, Sonnevend A, Dimitrov TS, Albert MJ. Emergence of multidrug-resistant Salmonella spp. and isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Kuwait and the United Arab Emirates. Diagn Microbiol Infect Dis 2008; 60(1): 71-7.
15. Hamidian M, Tajbakhsh M, Walther-Rasmussen J, Zali MR. Emergence of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Salmonella enterica in Tehran, Iran. Jpn J Infect Dis 2009; 62(5): 368-71.
16. Ranjbar R, Giammanco GM, Aleo A, Plano MR, Naghoni A, Owlia P, et al. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing nontyphoidal Salmonella strains isolated in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis 2010; 7(1): 91-5.
17. Bradford PA, Yang Y, Sahm D, Grope I, Gardovska D, Storch G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an outbreak of Salmonella typhimurium in Latvia. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42(8): 1980-4.
18. Malekjamshidi MR, Shahcheraghi F, Feizabadi MM. Detection and PFGE analysis of ESBL-producing isolates of Proteus species isolated from patients at Tehran hospitals. Med Sci Monit 2010; 16(10): BR327-BR332.
19. Ghafourian S, Bin SZ, Sadeghifard N, Mohebi R, Kumari N, V, Maleki A, et al. The Prevalence of ESBLs Producing Klebsiella pneumoniae Isolates in Some Major Hospitals, Iran. Open Microbiol J 2011; 5: 91-5.
20. Wikler MA, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement. 16th ed. New York: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
21. Schlesinger J, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Hammer-Munz O, Leavitt A, Gold HS, et al. Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacter isolates obtained in Tel Aviv, Israel. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(3): 1150-6.
22. Neu HC, Heppel LA. The Release of Enzymes from Escherichia coli by Osmotic Shock and during the Formation of Spheroplasts. Biological Chemistry 1965; 240: 3685-92.
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
24. Edwards R, Hawkyard CV, Garvey MT, Greenwood D. Prevalence and degree of expression of the carbapenemase gene (cfiA) among clinical isolates of Bacteroides fragilis in Nottingham, UK. J Antimicrob Chemother 1999; 43(2): 273-6.
25. Sykes RB, Nordstrom K. Microiodometric determination of beta-lactamase activity. Antimicrob Agents Chemother 1972; 1(2): 94-9.
26. Roberts RR, Hota B, Ahmad I, Scott RD, Foster SD, Abbasi F, et al. Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implications for antibiotic stewardship. Clin Infect Dis 2009; 49(8): 1175-84.
27. Munday CJ, Boyd DA, Brenwald N, Miller M, Andrews JM, Wise R, et al. Molecular and kinetic comparison of the novel extended-spectrum beta-lactamases CTX-M-25 and CTX-M-26. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(12): 4829-34.
28. Amir Mozafari N, Forouhesh Tehrani H, Niakani M. Nalidixic Acid Resistance Rate in Typhoidal and Non-Typhoidal Salmonella Isolated from Hospitalized Patients During One Year Period (2005-2006). RJMS 2007; 14(56): 43-51.
29. Piriz S, Vadillo S, Quesada A, Criado J, Cerrato

R, Ayala J. Relationship between penicillin-binding protein patterns and beta-lactamases in clinical isolates of Bacteroides fragilis with different susceptibility to beta-lactam antibiotics. J Med Microbiol 2004; 53(Pt 3): 213-21.

30. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(1): 1-14.

31. Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37(8): 1637-44.

32. Citri N, Samuni A, Zyk N. Acquisition of substrate-specific parameters during the catalytic reaction of penicillinase. Proc Natl Acad Sci U S A 1976; 73(4): 1048-52.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 30, No 178, 4th week, April 2012 Received: 26.12.2011 Accepted: 4.3.2012

Increased-Resistance Phenotype Resulted from Elevated β-Lactamase Enzyme Activity in Salmonella Clinical Isolates

Mercedeh Tajbakhsh MSc[1], Mohammad Yaghoobi Avini MSc[1], Jahan Ali Khajeh PhD[2], Masoud Alebouyeh PhD[1], Ehsan Nazemalhosseini Mojarad MSc[1], Mohammad Reza Zali MD[3]

Abstract

Background: Beta lactamase enzymes are the most important agents involved in promoting antimicrobial resistance patterns in bacteria. The aim of the present study was to investigate probable roles of enzyme activity divergence in production of different phenotypic resistance patterns among extended-spectrum beta lactamase (ESBL) producing *Salmonella* clinical isolates.

Methods: Detection of ESBLs-related phenotypes was performed by initial screening and specific tests among 174 *Salmonella* isolates through disk diffusion, and combined disk and minimal inhibitory concentrations (MIC) methods. Polymerase chain reaction (PCR) was used to identify bla_{TEM}, bla_{CTX}, and bla_{SHV} on both chromosomal and plasmid DNA extracts. The enzymatic activity of each isolate was determined by iodometric, biological, and spectrophotometric assays on crude protein extracts in the presence of a specific substrate.

Findings: The frequency of ESBL producing isolates was 4%. MIC values for isolates showed differences at higher cephalosporin concentrations. All isolates were negative for bla_{SHV}, but were carriers of bla_{TEM} and bla_{CTX} genes on their plasmids. The enzyme activities on cephalosporins were diverse at constant concentration of protein extracts.

Conclusion: Diverse expression levels of ESBLs among beta-lactamase producing isolates could explain their different hydrolytic activities. Probable diversity among beta- lactamase subfamily members, existence and expression of more than one gene, and involvement of other resistant mechanisms can explain resistant phenotype variations in these bacteria.

Keywords: Beta-lactamase activity, Salmonella, Antimicrobial resistance

[1] Research Center for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran
[3] Professor, Research Center for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Masoud Alebouyeh PhD, Email: masoud.alebouyeh@gmail.com