مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ٤٥١/هفته‌ی سوم آذر ماه ١٣٩٦

تاریخ دریافت: ١٣٩٦/٧/١١
تاریخ پذیرش: ١٣٩٦/٨/٥

بررسی فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی AmpC در جدایه‌های Escherichia Coli مولد عفونت ادراری جدا شده از بیماران بستری در بخش داخلی بیمارستان‌های شهر یزد در سال ١٣٩٤

علی منصوری[١]، اکرم آستانی[٢]، هنگامه زندی[٣]، سحرسادات عمادی[٤]، علیرضا ترکی[٥]، محمود وکیلی[٦]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بتالاکتام‌ها، امروزه از رایج‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی به شمار می‌آیند. از طرف دیگر، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز از جمله انواع AmpC، یکی از دلایل بروز مقاومت Escherichia coli نسبت به بتالاکتام‌ها می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی فراوانی ژن‌های تولید کننده‌ی بتالاکتامازهای نوع AmpC در جدایه‌های Escherichia coli مولد عفونت ادراری در بخش داخلی بیمارستان‌های شهر یزد بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی توصیفی- مقطعی، تعداد ٧٥ جدایه‌ی Escherichia coli از نمونه‌ی ادرار بیماران دارای عفونت ادراری بستری در بخش داخلی بیمارستان‌های شهر یزد جمع‌آوری گردید. پس از کشت نمونه و تعیین هویت جدایه‌ها با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی، سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با روش انتشار دیسک Kirby-Bauer طبق استاندارد Clinical and Laboratory Standards Institute 2016 (CLSI 2016) انجام شد. فراوانی ژن‌های AmpC توسط آزمون Polymerase chain reaction (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، بیشترین و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب نسبت به آموکسی‌سیلین و ایمی‌پنم مشاهده شد. از ٧٥ جدایه‌ی مورد بررسی، تعداد ١٩ جدایه (٢٥/٣ درصد) تولید کننده‌ی ژن‌های AmpC بودند و ١٣ جدایه (١٧/٤ درصد) دارای ژن bla_{CITM} و ٢ جدایه (٢/٧ درصد) دارای ژن bla_{DHAM} بودند. ژن bla_{FOXM} در هیچ یک از جدایه‌ها یافت نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان از وجود ژن‌های AmpC در نمونه‌های مولد بتالاکتاماز دارد که این امر، تهدیدی جدی در مصرف سفالوسپورین‌های نسل سوم به شمار می‌آید. به منظور جلوگیری از شیوع این مقاومت‌ها، باید مطالعات مبتنی بر روش‌های مولکولی جهت شناسایی رایج بتالاکتامازهایی مانند AmpC انجام شود.

واژگان کلیدی: Escherichia coli، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بتالاکتاماز، AmpC

ارجاع: منصوری علی، آستانی اکرم، زندی هنگامه، عمادی سحرسادات، ترکی علیرضا، وکیلی محمود. **بررسی فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی AmpC در جدایه‌های Escherichia Coli مولد عفونت ادراری جدا شده از بیماران بستری در بخش داخلی بیمارستان‌های شهر یزد در سال ١٣٩٤.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ١٣٩٦؛ ٣٥ (٤٥١): ١٤٥١-١٤٤٤

مقدمه

Escherichia coli شایع‌ترین عامل عفونت ادراری در جهان به شمار می‌آید؛ به طوری که عامل بیش از ٨٠ درصد موارد عفونت‌های دستگاه ادراری اکتسابی از جامعه و بیمارستان‌ها می‌باشد. شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در Escherichia coli جدا شده از عفونت ادراری رو به افزایش است. این باکتری، به علت اکتساب پلاسمیدهای کد کننده‌ی بتالاکتامازهای با طیف وسیع، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم شده است (١). تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز از جمله راه‌کارهای ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که این

١- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
٢- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
٣- استادیار، مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا و گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
٤- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
٥- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
٦- استادیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: هنگامه زندی
Email: hengameh_zandi@yahoo.com

فرایند، از طریق هیدرولیز حلقه‌ی بتالاکتام قبل از این که آنتی‌بیوتیک به Penicillin-binding proteins (PBPs) در غشای سیتوپلاسمی برسد، صورت می‌گیرد (۲).

بتالاکتامازها بر اساس ساختار اولیه به چهار گروه مولکولی A، B، C و D تقسیم می‌شوند. گروه A بتالاکتامازهای با طیف وسیع و گروه C بتالاکتامازهای AmpC را در بر می‌گیرد که با هیدرولیز کردن سفالوسپورین‌ها، باعث مقاومت به بتالاکتام‌ها می‌شوند (۳). بتالاکتامازهای AmpC، دارای ۶ خانواده‌ی اصلی CIT، ACC، MOX، FOX، EBC و DHA می‌باشند. به طور معمول، این ژن‌ها در حد کمی بیان می‌شوند، مگر این که باکتری‌ها حمل کننده‌ی ژن bla_{AmpC} بوده یا در معرض بعضی از بتالاکتام‌های القا کننده مانند آموکسی‌سیلین و ایمی‌پنم قرار گیرند که در این صورت بیان این ژن افزایش می‌یابد (۴). این آنزیم‌ها به واسطه‌ی پلاسمید در میان بسیاری از جدایه های بالینی به ویژه خانواده ی انتروباکتریاسه منتشر شده و علاوه بر تأثیر در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، معضلات وافری را در جهت شناسایی آنزیم‌های بتالاکتامازی با طیف وسیع از طریق پوشاندن اثر آن ها در آزمون فنوتیپی تأییدی، اعمال می کنند (۵). احتمال می‌رود یکی از مواردی که می‌تواند بر تولید بتالاکتامازهای جدید توسط باکتری‌ها مؤثر باشد، مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌های جدید جهت درمان و فشار انتخابی آنتی‌بیوتیک‌ها باشد (۶).

امروزه، تولید بتالاکتامازهای با طیف وسیع، تهدید بزرگی برای مصرف آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین به شمار می‌رود. از طرف دیگر، ژن‌های این آنزیم‌ها می‌توانند با ایجاد مقاومت چندگانه به دیگر داروها ارتباط پیدا کنند؛ به طوری که بروز و انتشار ژن‌های مختلف این آنزیم‌ها می‌تواند مقاومت‌ها را افزایش و استفاده از داروهای ضد میکروبی مفید را کاهش دهد (۶). با توجه به این که مطالعات کمی نسبت به ژن‌های AmpC در ایران صورت گرفته است، بررسی فراوانی این ژن‌ها می‌تواند در به دست آوردن نتایج دقیق‌تر و کنترل شیوع آن‌ها کمک کننده باشد. از این رو، هدف از انجام این مطالعه، بررسی فراوانی ژن‌های تولید کننده‌ی بتالاکتامازهای نوع AmpC در جدایه‌های Escherichia coli مولد عفونت ادراری از بیماران بستری در بخش داخلی بیمارستان‌های شهر یزد بود. این مطالعه، اولین گزارش از شیوع آنزیم‌های AmpC در استان یزد بود.

روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و تعیین هویت باکتری‌ها: در این مطالعه‌ی توصیفی- مقطعی در سال ۱۳۹۵ به مدت ۸ ماه، تعداد ۷۵ جدایه‌ی Escherichia coli از نمونه‌ی ادرار بیماران دارای عفونت ادراری بستری در بخش داخلی سه بیمارستان شهر یزد جدا شد. بدین ترتیب که پس از کشت بر روی محیط ائوزین متیلن‌بلو (Merck, Germany) و گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، پلیت‌های حاوی کلنی‌های لاکتوز مثبت به آزمایشگاه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد منتقل شد. کلنی‌های لاکتوز مثبت با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل تخمیر قندهای گلوکز و لاکتوز، هیدرولیز اوره، تولید اندول و حرکت، آزمایش‌های Methyl red (MR) و Voges-Proskauer (VP) و استفاده از سیترات تعیین هویت شدند. تعیین هویت ایزوله‌ها با استفاده از پرایمرهای یونیورسال 16S rRNA نیز از نظر مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی: سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها طبق شیوه‌نامه‌ی CLSI 2016 (۷) به روش انتشار دیسک Kirby-Bauer و با استفاده از سوسپانسیون باکتریایی معادل کدورت لوله‌ی ۰/۵ McFarland بر روی محیط Muller-Hinton agar (Merck, Germany) نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (MAST, England) سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، آموکسی‌سیلین، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفپیم، سفوکسیتین، جنتامایسین، ایمی‌پنم و کوتریموکسازول انجام شد. از سویه‌ی استاندارد Escherichia coli ATCC25922 به عنوان شاهد استفاده شد. جدایه‌های مقاوم به سفالوسپورین‌های نسل سوم، از طریق آزمون تأییدی Combined disk، با استفاده از دیسک‌های ترکیبی سفتازیدیم + کلوگزاسیلین و سفوتاکسیم + کلوگزاسیلین (Rosco, Denmark) جهت تأیید سویه‌های مولد AmpC سنجیده شد (۸). در این روش، اگر هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک حاوی کلوگزاسیلین بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر نسبت به قطر هاله‌ی آنتی‌بیوتیک فاقد کلوگزاسیلین باشد و اثر بتالاکتامازی آن‌ها توسط مهار کننده‌های بتالاکتاماز مهار نشود، به عنوان مولدین AmpC در نظر گرفته می‌شود.

آزمون‌های مولکولی جهت تکثیر ژن‌های AmpC استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA به شماره‌ی DN8115C (سیناکلون، ایران) بر اساس شیوه‌نامه‌ی شرکت سازنده صورت گرفت. سنجش کمی و کیفی DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۰/۷ درصد انجام شد.

تکثیر ژن‌های 16S rRNA، bla_{CITM}، bla_{DHAM} و bla_{FOXM} به روش Polymerase chain reaction (PCR) انجام شد. جهت تکثیر ژن‌های 16S rRNA، bla_{CITM}، bla_{DHAM} و bla_{FOXM} از پرایمرهای اختصاصی که در جدول ۱ آمده است، استفاده شد (۹).

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده

منبع	اندازه‌ی محصول PCR (جفت باز)	توالی نوکلئوتیدی (`5-`3)	پرایمر
Perez-Perez و Hanson (۹)	۴۶۲	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	CITM -F
		TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	CITM -R
Perez-Perez و Hanson (۹)	۴۰۵	AACTTTCACAGGTGTGCTGGG	DHAM-F
		TCCGTACGCATACTGGCTTTGC	DHAM-F
Perez-Perez و Hanson (۹)	۱۹۰	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	FOXM-F
		CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	FOXM-R
Sauer و همکاران (۱۰)	۷۰۹	GTGTAGCGGTGAAATGCG	UNI-OL-F
		ACGGGCGGTGTGTACAA	UNI-OL-R

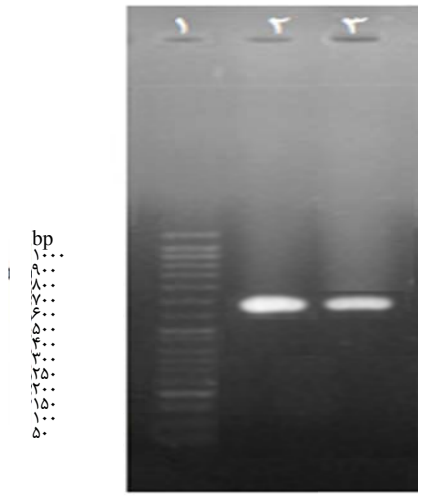
PCR: Polymerase chain reaction

غلظت نهایی ترکیبات واکنش PCR برای هر سه ژن bla_{CITM}، bla_{DHAM} و bla_{FOXM} در حجم ۲۰ میکرولیتر عبارت از ۶ آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها با غلظت ۴ پیکومول، ۱۰ میکرولیتر Mastermix (Ampliqon, Denmark) و ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شد. غلظت نهایی ترکیبات واکنش PCR برای ژن 16S rRNA در حجم ۲۰ میکرولیتر عبارت از ۵ میکرولیتر آب‌مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها با غلظت ۴ پیکومول، ۱۰ میکرولیتر mastermix (Ampliqon, Denmark) و ۳ میکرولیتر از DNA استخراج شده بود.

برنامه‌ی تکثیر برای سه ژن bla_{CITM}، bla_{DHAM} و bla_{FOXM} در دستگاه ترموسایکلر (Convergent, Malaysia) شامل واسرشت اولیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشت در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمرها برای هر سه ژن در دمای ۵۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود و برنامه‌ی تکثیر برای ژن 16S rRNA شامل واسرشت اولیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۲۰ چرخه شامل واسرشت در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، اتصال پرایمرها برای هر سه ژن در دمای ۵۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. از سویه‌ی استاندارد Escherichia coli ATCC25922 به عنوان شاهد و از نمونه‌ی شاهد مثبت موجود در بخش میکروب‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد استفاده شد. بررسی محصولات تکثیر شده با استفاده از ژل آگارز الکتروفورز ۱/۵ درصد و در کنار DNA ladder با اندازه‌ی ۵۰ bp انجام و قطعات تکثیر شده جهت تعیین توالی ارسال گردید نتایج توالی‌ها بلاست شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون χ^2 مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی، تعداد ۷۵ جدایه‌ی Escherichia coli شناسایی شد. شکل ۱، الکتروفورز محصول PCR برای ژن 16S rRNA را نشان می‌دهد. ۳۴ جدایه (۴۵/۳ درصد) از نمونه‌ی ادرار مردان و ۴۱ جدایه (۵۴/۷ درصد) از زنان جدا شد.



شکل ۱. تکثیر ژن 16S rRNA جهت تأیید مولکولی تعیین هویت Escherichia coli

ستون ۱: DNA ladder (۵۰ bp)، ستون‌های ۲ و ۳: جدایه‌های دارای ژن 16S rRNA (۷۰۹ bp)

بیشترین و کمترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین (۸۵/۴ درصد) و سفوکسیتین (۹/۳ درصد) و مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم سفتریاکسون و سفتازیدیم به ترتیب ۶۴/۰ و ۳۴/۷ درصد مشاهده شد (جدول ۲). از ۷۵ ایزوله‌ی مورد بررسی با روش دیسک ترکیبی،

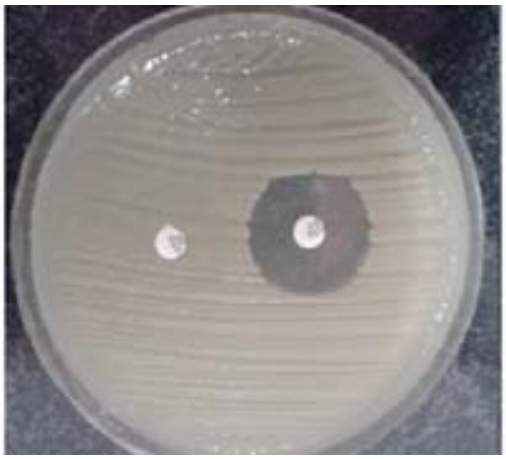
تعداد ۱۹ ایزوله (۲۵/۳ درصد) تولید کننده‌ی ژن‌های AmpC بودند (شکل ۲). بر اساس نتایج ژن‌های bla_{CITM} و bla_{DHAM} به ترتیب در ۱۳ مورد (۱۷/۴ درصد) و ۲ مورد (۲/۷ درصد) ایزوله‌ها یافت شد (شکل‌های ۳ و ۴)، اما ژن bla_{FOXM} یافت نشد.

جدول ۲. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های Escherichia coli

آنتی‌بیوتیک	مقاومت تعداد (درصد)	نیمه‌حساس تعداد (درصد)	حساس تعداد (درصد)
ایمی‌پنم	۷۵ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)
تری‌متوپریم/سولفامتوکسازول	۵۵ (۷۳/۳)	۰ (۰)	۲۰ (۲۶/۷)
سیپروفلوکساسین	۳۰ (۴۰/۰)	۰ (۰)	۴۵ (۶۰/۰)
نالیدیکسیک اسید	۴۸ (۶۴/۰)	۱ (۱/۴)	۲۶ (۳۴/۶)
آموکسی‌سیلین	۶۴ (۸۵/۴)	۰ (۰)	۱۱ (۱۴/۶)
جنتامایسین	۱۶ (۲۱/۳)	۰ (۰)	۵۹ (۷۸/۷)
سفپیم	۴۰ (۵۳/۴)	۰ (۰)	۳۵ (۴۶/۶)
سفتریاکسون	۴۸ (۶۴/۰)	۲ (۲/۷)	۲۵ (۳۳/۳)
سفوتاکسیم	۵۰ (۶۶/۷)	۲ (۲/۷)	۲۳ (۳۰/۶)
سفتازیدیم	۲۶ (۳۴/۷)	۹ (۱۲/۰)	۴۰ (۵۳/۳)
سفوکسیتین	۷ (۹/۳)	۲ (۲/۷)	۶۶ (۸۸/۰)

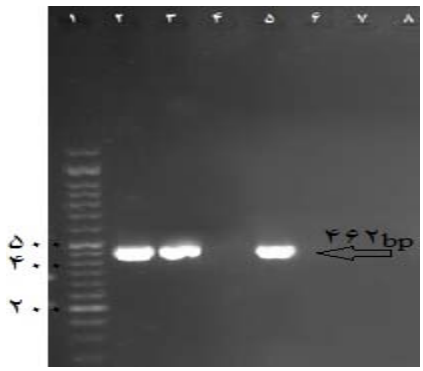
بحث

مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به عنوان یک معضل که منجر به ایجاد مشکلاتی در درمان می‌شوند، سلامت جامعه را به خطر می‌اندازند؛ به طوری که در دهه‌ی گذشته، با وجود تولید آنتی‌بیوتیک های جدید، انواع جدیدی از آنزیم‌های بتالاکتامازی مانندAmpC ظاهر شده‌اند که این آنزیم‌ها می‌توانند به باکتری‌های دیگر منتقل شوند و باعث افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کاهش دارو و در نتیجه عفونت‌های جدی شوند (۱۱).



شکل ۲. بررسی جدایه‌ی تولید کننده‌ی AmpC به روش دیسک ترکیبی

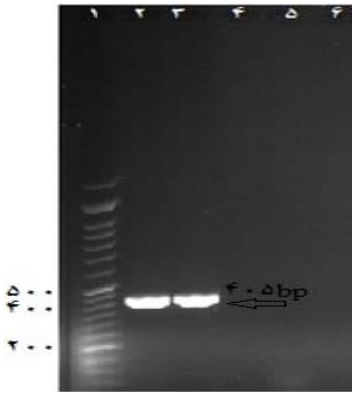
در مطالعه‌ی حاضر، تعداد ۷۵ جدایه‌ی Escherichia coli بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان‌های شهر یزد مورد بررسی قرار گرفتند.



شکل ۳. بررسی محصول تکثیر ژن bla_{CITM} توسط آگارز ژل الکتروفورز

ستون ۱: DNA ladder (۵۰ bp)، ستون‌های ۲ و ۳: جدایه‌های دارای ژن bla_{CITM} (۴۶۲ bp)، ستون‌های ۴ و ۵: به ترتیب شاهد منفی و مثبت برای bla_{CITM}

جدایه‌های مورد بررسی، کمترین مقاومت را به ترتیب نسبت سفوکسیتین (۵/۸ درصد)، جنتامایسین (۱۶/۷ درصد)، سفتازیدیم (۲۳/۳ درصد)، سیپروفلوکساسین (۳۵/۰ درصد)، سفپیم (۳۸/۳ درصد)، سفتریاکسون (۴۵/۸ درصد)، سفوتاکسیم (۴۸/۳ درصد)، نالیدیکسیک اسید (۵۶/۷ درصد)، تری متوپریم- سولفامتاکسازول (۶۳/۳ درصد) و آموکسی‌سیلین (۷۸/۳ درصد) نشان دادند. شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعات مختلف متفاوت است. حسینی و همکاران در یزد، میزان مقاومت برای آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین در نمونه‌های Escherichia coli مولد عفونت ادراری را به ترتیب ۷۳/۴ و ۵۳/۲ درصد گزارش کردند (۱۲).



شکل ۴. بررسی محصول تکثیر ژن bla_{DHAM} توسط آگارز ژل الکتروفورز

ستون ۱: DNA ladder (۵۰ bp). ستون ۲: جدایه‌ی دارای ژن bla_{DHAM} (۴۰۵ bp)، ستون‌های ۳ و ۴: به ترتیب شاهد مثبت و منفی برای bla_{DHAM}

در مطالعه‌ی زندی و عظیمی وزیری، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، تری‌متوپریم- سولفامتاکسازول، نالیدیکسیک اسید، سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰، ۸۹/۲، ۸۱/۱، ۶۲/۲، ۶۰/۳ و ۴۲/۳ درصد گزارش شد (۱۳). در مطالعه‌ی مرتضوی و همکاران در یاسوج، در بین ۱۲۳ نمونه‌ی Escherichia coli، ۵۱/۲۱ درصد نمونه‌ها نسبت به نالیدیکسیک اسید، ۳۹/۰۰ درصد به سفوتاکسیم، ۱۷/۸۸ درصد به سفتازیدیم و ۲۲/۷۶ درصد نسبت به سیپروفلوکساسین مقاومت داشتند و نسبت به ایمی‌پنم، مقاومتی گزارش نشد (۱۴).

سلطان دلال و همکاران در تهران، از بین ۲۰۰ جدایه‌ی Escherichia coli، میزان مقاومت نسبت آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین را ۹۴/۵ درصد، ترومتوپریم- سولفامتاکسازول ۸۰/۵ درصد، نالیدیکسیک‌اسید ۷۴/۰ درصد، سفوتاکسیم ۶۴/۰ درصد، سفتازیدیم ۵۵/۵ درصد، سیپروفلوکساسین ۵۴/۵ درصد، جنتامایسین ۳۹/۰ درصد و ایمی‌پنم را صفر درصد گزارش کردند (۱۵).

میزان مقاومت به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر با توجه به تعداد نمونه های استفاده شده به مطالعات ذکر شده نزدیک بود، اما در مطالعه‌ای که Deshpande و همکاران در آمریکا انجام دادند، از بین ۱۴۲۹ جدایه، میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم ۱/۵ درصد، سفتریاکسون ۲/۱ درصد، سفوکسیتین ۳/۴ درصد، سفپیم ۱/۳ درصد، سیپروفلوکساسین ۱۴/۹ درصد، جنتامایسین ۸/۲ درصد گزارش گردید و کلیه‌ی نمونه‌ها نسبت به ایمی‌پنم حساس بودند (۱۶) که جز در مشابه بودن میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایمی‌پنم، در سایر موارد اختلاف داشت که به نظر می‌رسد به دلیل تعداد زیاد نمونه‌های مورد بررسی باشد.

در مطالعه‌ی AL-Subol و Youssef در سوریه، ۵۴/۳۳ درصد جدایه‌های Escherichia coli نسبت به جنتامایسین، ۷۲/۴۴ درصد به نالیدیکسیک اسید، ۵۲/۷۶ درصد به سیپروفلوکساسین و ۷۲/۴۴ درصد به ترومتوپریم- سولفومتاکسازول مقاوم بودند (۱۷). اسلامی و همکاران در هرمزگان، مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم را ۴۵/۰ درصد، سفوتاکسیم را ۷۲/۰ درصد، سفپیم را ۳۶/۰ درصد، سفوکسیتین را ۵۴/۰ درصد، جنتامایسین را ۳۶/۵ درصد، ایمی‌پنم را ۰/۵ درصد و سیپروفلوکساسین را ۳۹/۰ درصد گزارش کردند (۱۸). این اختلاف درصد در مقاومت‌ها را می‌توان به تفاوت در تعداد نمونه و استفاده‌ی نمونه از بخش‌های مختلف، سیستم کنترل عفونت، تفاوت ژنتیکی در کلون‌های مولد عفونت و یا میزان دسترسی به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در هر منطقه‌ی جغرافیایی دانست.

از دیگر اهداف این مطالعه، تعیین سویه‌های مولد بتالاکتاماز AmpC بود که بدین منظور، نمونه‌های مقاوم به سفالوسپورین‌های نسل سوم و سفوکسیتین به عنوان مولدین بتالاکتامازهای نوع AmpC در نظر گرفته و از نظر آزمون تأییدی بررسی شدند. برای کنترل انتشار بیشتر این گونه مقاومت‌ها در سویه‌های انتروباکتریاسه و درمان سریع و مناسب عفونت‌هایی که مشکوک به ارگانیسم‌های مولد بتالاکتامازها هستند و همچنین، جهت کسب آگاهی بیشتر از میزان شیوع ژن‌های مختلف این آنزیم‌ها در هر منطقه، باید بررسی‌های مولکولی صورت گیرد. در مطالعه‌ی منصوری و همکاران از میان ۳۳۸ نمونه‌ی Escherichia coli به صورت فنوتیپی ۲ درصد نمونه‌ها مولد AmpC گزارش شدند (۱۹). در مطالعه‌ی فرخ‌نظر و همکاران در تهران، ۲ مورد (۱/۶۷ درصد) از ۱۲۰ نمونه‌ی Escherichia coli (۲۰) و در مطالعه‌ی Ogbolu و همکاران در نیجریه، ۳ نمونه (۵/۶ درصد) از ۵۴ جدایه‌ی Escherichia coli به عنوان تولید کننده‌ی AmpC گزارش گردید (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر، ۱۳ جدایه (۱۷/۴ درصد) دارای ژن bla_{CITM} و ۲ جدایه (۲/۷ درصد) دارای ژن bla_{DHAM} بودند. ژن bla_{FOXM} در هیچ یک از نمونه‌ها یافت نشد. شیوع Escherichia coli تولید کننده‌ی بتالاکتاماز نوع AmpC در کشورهای مختلف متفاوت گزارش شده است. در مطالعه‌ی سلطان دلال و همکاران در تهران، از بین ۲۰۰ نمونه‌ی Escherichia coli ۱۳ جدایه (۱۰/۲ درصد) مولد AmpC گزارش گردید که ۵ جدایه (۳۸/۴ درصد) حاوی ژن bla_{DHAM} بودند و ژن bla_{FOXM} ردیابی نشد (۱۵). در مطالعه‌ی حاضر نیز ژن bla_{FOXM} یافت نشد.

اسلامی و همکاران، از بین ۲۰۰ نمونه‌ی Escherichia coli، تعداد ۱۱۸ نمونه (۵۹/۰ درصد) را از نظر فنوتیپی مولد AmpC گزارش نمودند. همچنین، از نظر مولکولی شیوع ژن‌های A mpC ۲/۵ درصد گزارش گردید که فقط در ۴ نمونه ژن bla_{CITM} و در یک نمونه هم ژن bla_{CITM} و هم ژن bla_{DHAM} ردیابی گردید (۱۸).

در مطالعه‌ی Hussain و همکاران که در پاکستان انجام شد، از بین ۱۲۱جدایه‌ی Escherichia coli، به ترتیب ژن bla_{CITM} و bla_{FOXM} در ۱۶ و ۲ نمونه ردیابی شد (۲۲). در مطالعه‌ی مالکی و همکاران در ایلام، از بین ۱۱۲ جدایه‌ی Escherichia col، ۲۸ جدایه (۴۰/۰ درصد) مولد AmpC بودند. از این تعداد، در ۲ جدایه ژن bla_{CITM}، در ۲ جدایه ژن bla_{DHAM} و در ۳ جدایه ژن bla_{FOXM} ردیابی شد (۲۳). در مطالعه‌ی Deshpande و همکاران، از بین ۱۴۲۹ جدایه‌ی Escherichia coli، ۲۹ ایزوله (۲/۷ درصد) فنوتیپ AmpC را نشان دادند که از این تعداد در ۳ جدایه ژن bla_{FOXM} و در ۱ جدایه ژن bla_{DHAM} ردیابی شد (۱۶).

مقایسه‌ی نتایج مطالعات نشان می‌دهد که میزان فراوانی آنزیم‌های بتالاکتاماز در سویه‌های جدا شده از کشورهای مختلف و همچنین، در یک کشور از یک بیمارستان با بیمارستان دیگر، متفاوت می‌باشد که این مسأله بستگی به سیستم کنترل عفونت و نحوه‌ی درمان بیماران در آن بیمارستان دارد؛ به طوری که در مطالعه‌ی Ding و همکاران که در چین بر روی ۴۹۴ جدایه‌ی Escherichia coli از ۵ بیمارستان صورت گرفت، میزان شیوع ژن bla_{DHAM} ۹۳/۲ درصد گزارش شد. این درصد بالا از فراوانی، می‌تواند به دلیل نوع بیمارستان باشد. نمونه‌های جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های کودکان است؛ آن چه که مشخص است، وجود بیماران کم سن و سال و بیماران تضعیف سیستم ایمنی یا زمینه‌ای زیاد می‌باشد و در نتیجه، پزشکان برای پیش‌گیری یا درمان عفونت‌های بیمارستانی در این بیماران مجبور به تجویز آنتی‌بیوتیک‌هایی با دز زیاد و قوی هستند (۲۴). با توجه به این که نمونه‌های استفاده شده در این مطالعه از بیماران بستری در بیمارستان گرفته شده است، به نظر می‌رسد سابقه‌ی بستری بودن می‌تواند با سابقه‌ی تماس بیشتر با پاتوژن‌های بیمارستانی و باکتری‌های مقاوم منتشر در بیمارستان همراه باشد. از طرفی، ممکن است بیمار به علت درگیری با اقدامات تهاجمی تشخیصی یا درمانی، با این ارگانیسم‌ها کلونیزه شود. بنابراین، با رعایت بهداشت بیمار و تغییر مصرف آنتی‌بیوتیک، می‌توان شرایط مناسبی را در بخش‌هایی که بیماران در آن به مدت طولانی بستری هستند، مهیا کرد و تا حدی از انتقال این مقاومت‌ها جلوگیری نمود.

در نهایت، با توجه میزان بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این تحقیق، بهتر است قبل از شروع درمان سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی انجام شود تا با شکست درمان دارویی مواجه نشده و گسترش سویه‌های مقاوم را در پی نداشته باشد. در تحقیق حاضر و دیگر مطالعات نیز فراوانی سویه‌های مولد AmpC به دست آمده زیاد نیست. روش‌های فنوتیپی قادر نیستند تعداد واقعی سویه‌های مولد AmpC را مشخص نمایند، ز این رو، مطالعات مبتنی بر روش‌های مولکولی در سطح جامعه لازم می‌باشد و منجر به درمان مؤثر و سریع‌تر بیماران و جلوگیری از گسترش جدایه‌های مقاوم می‌شود.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر، حاصل بخشی از نتایج پایان‌نامه دوره‌ی کارشناسی ارشد می‌باشد. بدین وسیله، از همکاری پرسنل محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی صمیمانه قدردانی می‌گردد.

References

1. Daoud Z, Afif C. Escherichia coli isolated from urinary tract infections of lebanese patients between 2000 and 2009: Epidemiology and profiles of resistance. Chemother Res Pract 2011; 2011: 218431.
2. Li Q, Lee JY, Castillo R, Hixon MS, Pujol C, Doppalapudi VR, et al. NB2001, a novel antibacterial agent with broad-spectrum activity and enhanced potency against beta-lactamase-producing strains. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(5): 1262-8.
3. Medeiros A, Mayer K, Opal SM. Plasmid-mediated beta-lactamases. The Antimicrobic Newsletter 1988; 5(9): 61-2.
4. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(3): 969-76.
5. Jacoby GA, Walsh KE, Walker VJ. Identification of extended-spectrum, AmpC, and carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae by disk tests. J Clin Microbiol 2006; 44(6): 1971-6.
6. Yazdi M, Nazemi A, Mir Inargasi M, Khataminejad MR, Sharifi S, Babai Kochkaksaraei M. Prevalence of SHV/CTX-M/TEM (ESBL) beta-lactamase resistance genes in Escherichia coli isolated from urinary tract infections in Tehran, Iran. Med Lab J 2010; 4(1): 48-54. [In Persian].
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: CLSI; 2013.
8. Japoni-Nejad A, Ghaznavi-Rad E, van Belkum A. Characterization of plasmid-mediated AmpC and carbapenemases among Iranain nosocomial isolates of Klebsiella pneumoniae using phenotyping and genotyping methods. Osong Public Health Res Perspect 2014; 5(6): 333-8.
9. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 2002; 40(6): 2153-62.
10. Sauer P, Gallo J, Kesselova M, Kolar M, Koukalova D. Universal primers for detection of common bacterial pathogens causing prosthetic joint infection. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2005; 149(2): 285-8.
11. Eslami M, Najar Peerayeh S. Phenotypic and molecular detection of TEM, PER, and VEB beta-lactamases in clinical strains of Escherichia coli. J Arak Univ Med Sci 2012; 15(1): 1-9. [In Persian].
12. Hosseini SS, Eslami G, Zandi H, Vakili M. Frequency of oqxA and oqxB plasmid-mediated quinolone resistance genes in Escherichia coli isolated from urine of inpatients with urinary tract infections in Yazd city, Iran. J Isfahan Med Sch 2016; 34(402): 1211-7. [In Persian].

13. Zandi H, AZimi Vaziri A. Frequency of extended spectrum beta-lactamases producing E. Coli strains isolated from urine of inpatients in Yazd hospitals and detection of resistance pattern. Iran J Infect Dis Trop Med 2016; 20(71): 41-7. [In Persian].
14. Mortezavi R, Khosravani S, Naghavi N. Molecular analysis of gene frequencies of TEM, CTX-M and SHV in beta-lactam antibiotic-resistant strains of E. Coli isolated from urinary tract infections in Yasuj hospitals. Armaghane-danesh 2014; 19(3): 233-41. [In Persian].
15. Soltan Dallal MM, Molla Aghamirzaei H, Fallah Mehrabadi J, Rastegar Lari A, Sabbaghi A , Eshraghian MR , et al. Molecular detection of TEM and AmpC (Dha, mox) broad spectrum β-lactamase in clinical isolates of Escherichia coli. Tehran Univ Med J. 2010; 68 (6): 315-20. [In Persian].
16. Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS. Occurrence of plasmidic AmpC type beta-lactamase-mediated resistance in Escherichia coli: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2004). Int J Antimicrob Agents 2006; 28(6): 578-81.
17. AL-Subol I, Youssef N. Prevalence of CTX-M, TEM and SHV beta-lactamases in clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from Aleppo University hospitals, Aleppo, Syria. Arch Clin Infect Dis 2015; 10(2): e22540.
18. Eslami M, Nourizadeh A, Salek Farrokhi A, Fallahi S. Detection of Amp-C type producing Escherichia coli using the clavulanic acid and boronic acid inhibitor and multiplex PCR method. Life Sci J 2013; 10(12s): 278-83.
19. Mansouri S, Kalantar ND, Shokoohi M, Halimi S, Beigverdi R, Rezagholezadeh F, et al. Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs types of beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli producing extended spectrum beta-lactamases in Kerman, Iran. Jundishapur J Microbiol 2014; 7(2): e8756.
20. Farrokhnazar E, Khaki P, Moradi Bidhendi S. Investigation of AmpC and ESBL Genes in Escherichia coli isolated from human and poultry. Journal of Microbial World 2014; 7(2): 138-47. [In Persian].
21. Ogbolu DO, Terry Alli OA, Olanipekun LB, Ojo OI, Makinde OO. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing commensal Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli from hospital out-patients in Southern Nigeria. Int J Med Med Sci 2013; 5(3): 97-105.
22. Hussain M, Hasan F, Shah AA, Hameed A, Jung M, Rayamajhi N, et al. Prevalence of class A and AmpC beta-lactamases in clinical Escherichia coli isolates from Pakistan Institute of Medical Science, Islamabad, Pakistan. Jpn J Infect Dis 2011; 64(3): 249-52.
23. Maleki A, Khosravi A, Ghafourian S, Pakzad I, Hosseini S, Ramazanzadeh R, et al. High prevalence of AmpC beta-lactamases in clinical isolates of Escherichia coli in Ilam, Iran. Osong Public Health Res Perspect 2015; 6(3): 201-4.
24. Ding H, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, et al. The prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from five children's hospitals in China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27(10): 915-21.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 35, No. 451, 3rd Week, December 2017

Received: 03.10.2017

Accepted: 27.10.2017

Frequency of AmpC Beta-Lactamase Genes in Escherichia Coli Genera of Urinary Tract Infection Isolated from Patients Admitted to Internal Wards of Yazd Hospitals, Iran

Ali Mansouri[1], Akram Astani[2], Hengameh Zandi[3], Sahar Sadat Emadi[4], Alireza Torki[5], Mahmoud Vakili[6]

Original Article

Abstract

Background: Nowadays, beta-lactams are the most common antimicrobial agents used for treatment of bacterial infections. On the other hand, the production of beta-lactamase enzymes including AmpC is one of the reasons for bacterial resistance to antibiotics. The aim of this study was to determine the frequency of AmpC-type beta-lactamase genes in Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infections.

Methods: In this cross-sectional study, 75 isolates of Escherichia coli were collected from the urine specimen of patients with urinary tract infections admitted to internal wards of Yazd hospitals, Iran. After culturing of specimens and isolation, identification of isolates was performed using biochemical tests and polymerase chain reaction (PCR) method. Disk diffusion method according to protocols of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI-2016) was used for the susceptibility testing of isolates. AmpC genes were detected using PCR method and specific primers. The data were analyzed via SPSS software.

Findings: The highest and the lowest antibiotic resistance were observed for amoxicillin and imipenem, respectively. Out of 75 isolates, 19 isolates (25.3%) produced AmpC genes. bla_{CITM} and bla_{DHAM} genes were present in 13 (17.4%) and 2 (7.2%) Escherichia coli isolates, respectively. The bla_{FOXM} gene was not detected in any of the isolates.

Conclusion: Our results indicate that AmpC genes are present in beta-lactamase-producing specimens, which is a serious threat for prescribing third-generation cephalosporins. In order to prevent the spread of these resistance, molecular methods-based studies should be performed to identify routine beta-lactamases such as AmpC.

Keywords: Escherichia coli, Antimicrobial drug resistance, AmpC beta-lactamases

Citation: Mansouri A, Astani A, Zandi H, Emadi SS, Torki A, Vakili M. **Frequency of AmpC Beta-Lactamase Genes in Escherichia Coli Genera of Urinary Tract Infection Isolated from Patients Admitted to Internal Wards of Yazd Hospitals, Iran.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(451): 1444-51.

1- MSc Student, Department of Microbiology, International Campus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
3- Assistant Professor, Research Center for Food Hygiene and Safety AND Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
4- Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
5- PhD Candidate, Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6- Associate Professor, Department of Community Medicine, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
Corresponding Author: Hengameh Zandi, Email: hengameh_zandi@yahoo.com