

تعیین الگوی مقاومت ایزوله‌های بالینی اشریشیاکلی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف نوع AmpC براساس خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی

نویسندگان: صادق منصوری¹، دکتر محسن چیت‌ساز*²، دکتر رضا
حاجی حسینی³، محسن میرزایی⁴ و دکتر محمدحسین قینی⁵

1. کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد
2. استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد
3. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، مرکز تهران
4. کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد بروجرد
5. استادیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی شاهد.

دوماهنامه علمی -

پژوهشی

دانشگاه شاهد

سال شانزدهم - شماره 80

اردیبهشت 1388

مسئول:

نویسنده

*

Email: Mohsen.Chitsaz@unisa.edu.au

چکیده

مقدمه و هدف: استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام موجب توسعه مقاومت به این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های بیماریزا از طریق تولید آنزیم بتالاکتاماز می‌شود. این مطالعه به جهت تعیین تولید آنزیم بتالاکتاماز از نوع AmpC در باکتری اشریشیاکلی جداشده از سه بیمارستان منتخب شهر تهران انجام شده است.

مواد و روش‌ها: تعداد 154 ایزوله بالینی اشریشیاکلی غیرتکراری از سه بیمارستان منتخب شهر تهران جمع‌آوری و از نظر تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم، سفتریاکسون و سفپیم و همچنین مهارکننده بتالاکتاماز بنام اسیدکلوانیک به روش دیسک دیفیوژن و میزان MIC این آنتی‌بیوتیک‌ها به روش رقت در آگار مورد بررسی قرار گرفت. همچنین حساسیت این ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین مورد بررسی قرار گرفت. در پایان ایزوله‌های کاندید داشتن این آنزیم به روش Multiplex PCR تحت آزمایش قرار گرفتند.

نتایج: پس از انجام آزمایش‌ها، ایزوله‌ها از نظر فنوتیپ مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم به سه گروه P+ با 57/15 درصد (n=88)، P+C+ با 53/9 درصد (n=83)، و P+C- با 3/25 درصد (n=5) تقسیم شدند از 88 ایزوله بالینی (P+C+ و P+C-) که توسط روش Multiplex PCR مورد آزمایش قرار گرفتند، 5/7 درصد ایزوله‌ها (n=5) واجد ژن‌های بتالاکتاماز نوع AmpC بودند.

نتیجه‌گیری: این اولین گزارش از وجود بتالاکتامازهای نوع AmpC از دسته EBC-M، DHA-M و CIT-M در ایران بوده و به دلیل اهمیت ارگانیزم‌های تولیدکننده این آنزیم‌ها در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و برای جلوگیری از گسترش آن‌ها توصیه می‌شود تحقیقات وسیع‌تری از نظر بررسی شیوع واقعی این آنزیم در ایران انجام شود.

وصول: 87/7/7

آخرین اصلاحات: 87/10/15

پذیرش: 87/11/26

واژه های کلیدی: بتالاکتاماز، وسیع الطیف، AmpC، اشريشياکلی

مقدمه

مکانیسم عمومی مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک های بتالاکتام، تولید آنزیم های بتالاکتاماز است. این آنزیم حلقه بتالاکتام داروهای نظیر سفالوسپورین ها و پنی سیلین ها را هیدرولیز کرده و موجب غیرفعال شدن آن ها می گردد. در طول دو دهه گذشته بسیاری از آنتی بیوتیک های بتالاکتام جدید تهیه شده اند که به طور اختصاصی به عملکرد هیدرولیزکننده آنزیم های بتالاکتاماز مقاومت داشته باشند. به هر حال با وجود این گروه جدید از آنتی بیوتیک ها که برای درمان بیماران مورد استفاده قرار گرفته اند انواع جدیدی از آنزیم های بتالاکتاماز نظیر ESBL ها، بتالاکتامازهای نوع AmpC با واسطه پلاسمید و بتالاکتامازهای هیدرولیزکننده کاربامها (کاربامپنازها) ظاهر شده اند. باکتری های گرم منفی با انبوهی از بتالاکتامازهای جدید ذکر شده در بالا توانستند مقاومت به جدیدترین آنتی بیوتیک های بتالاکتام را کسب کنند [1-3].

بتالاکتامازهای نوع AmpC در اواخر دهه 1970 ظاهر و مورد مطالعه قرار گرفتند. بیش تر این آنزیم ها سفالوسپوریناز بوده ولی تا حدی توانایی هیدرولیز سایر بتالاکتام ها را نیز دارند. این آنزیم ها سفالوسپورین های وسیع الطیف مانند سفنازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم و مونوباکتام هایی مانند آرترونام و سفامایسین ها را هیدرولیز کرده ولی توسط مهارکننده های معمولی مانند کلوالانات مهار نمی شوند. مقاومت ابتدا در ارگانیزم هایی نظیر اتروباکتر کلوآکه (*Enterobacter cloacae*)، سیتروباکتر فروندی (*Citrobacter freundii*)، سرایشامارسنس (*Serratia mercerscens*) و پسودوموناس آتروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) به وجود آمد که علت آن تولید مضاعف AmpC کروموزومی بود. این آنزیم موجب مقاومت باکتری در برابر 7-آلفا - متوکسی سفالوسپورین ها و مونوباکتام ها شد. در اواخر دهه 1980 این ژن های کروموزومی قابل القاء روی

پلاسمیدها ظاهر شدند و به ارگانیزم هایی که ذاتاً این نوع بتالاکتاماز را بیان نمی کردند نظیر گونه های کلبسیلا، اشريشياکلی و یا گونه های سالمونلا منتقل شده و باعث مقاومت این ارگانیزم ها به اکسی ایمینوسفالوسپورین ها گردید [4 و 5].

امروزه، افزایش شیوع مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام بواسطه بتالاکتامازهای نوع AmpC در بین سویه های اشريشياکلی به یک نگرانی بالینی تبدیل شده است. این ارگانیزم ها می توانند توانایی تولید بتالاکتاماز نوع AmpC را بر روی پلاسمید کسب کنند. علاوه بر آن که اینها می توانند بتالاکتاماز نوع AmpC نوع کروموزومی را به مقدار زیاد تولید کنند در حالی که در حالت طبیعی این آنزیم ها به مقدار کم تولید می شوند [6-8].

اگرچه بیش از یک دهه از کشف بتالاکتامازهای نوع AmpC با واسطه پلاسمید می گذرد، بیش تر آزمایشگاه ها و پزشکان اهمیت بالینی این آنزیم ها را درک نکرده اند. روش های تشخیصی جدید جهت شناسایی ارگانیزم های تولیدکننده بتالاکتامازهای نوع AmpC با واسطه پلاسمید در آزمایشگاه های بالینی به منظور اجرا به صورت آزمایش های روزانه مورد نیاز است [9]. همچنین روش مولتی پلکس PCR (Multiplex PCR) به عنوان یک ابزار تحقیقی برای این آنزیم ها در دسترس است اما به عنوان یک ابزار عادی برای استفاده در آزمایشگاه های بالینی در دسترس نیست [9].

این مطالعه به منظور شناسایی ایزوله های بالینی مولد بتالاکتاماز نوع AmpC بر پایه تعیین MIC سفنازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم، سفوکسیتین و شناسایی ژن های مسئول تولید این آنزیم ها به روش مولتی پلکس PCR انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی 154 ایزوله بالینی اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های مختلف نظیر ادرار، زخم، خون، CSF، خلط و... از بیماران سه بیمارستان امام خمینی، شهید مصطفی خمینی و مرکز طبی کودکان تهران در یک مطالعه مقطعی و در فاصله زمانی اسفندماه 1385 تا شهریور ماه 1386 انجام شده است. ایزوله‌های بالینی بعد از انجام آزمایش‌های تعیین هویت توسط روش‌های متداول میکروپشناسی به طور دقیق شناسایی شده [10] و در محلول‌های مخصوص نگهداری باکتری‌ها در فریزر 70°C نگهداری گردید. در این مطالعه از سویه‌های اشریشیاکلی (*Escherichia coli* ATCC 25922) و کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumonia* ATCC 700603) به عنوان سویه‌های استاندارد برای آزمایش‌های کنترل کیفیت و دقت آزمایش‌های MIC استفاده گردید.

شناسایی سویه‌های تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در سطح فنوتیپی و بر مبنای شیوه‌های غربالگری و تأییدی توصیه شده توسط انستیتو استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) انجام شده است. اساس آزمایش‌ها بر پایه سنجش میزان MIC ایزوله‌ها برای آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم، سفتریاکسون و سفپیم است. آزمایش‌های تأیید تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف با استفاده از مهارکننده آنزیم بتالاکتاماز (کلوانیک اسید) انجام و در نهایت سویه‌هایی که به مهارکنندگی کلوانیک اسید حساسیت نشان ندادند به عنوان تولیدکننده بالقوه آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC در نظر گرفته شده و تست تعیین مقاومت به سفوکسیتین برای آن‌ها انجام گرفت [11].

پودر آنتی‌بیوتیک‌های مذکور از شرکت اکسیر پودر آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین از شرکت سیگما تهیه گردید. جهت تهیه محلول استوک آنتی‌بیوتیک‌ها از آب مقطر به عنوان حلال استفاده شد. مقدار ماده مؤثره آنتی‌بیوتیک در هر میلی‌گرم پودر سفنازیدیم 820 میکروگرم، سفتریاکسون 760 میکروگرم، سفپیم 690 میکروگرم و برای سفوکسیتین 980 میکروگرم بود. لوله‌های استوک

آنتی‌بیوتیک مذکور در شرایط دمایی 70°C تا زمان استفاده نگهداری شدند. در هر سری آزمایش رقت‌های متوالی از این آنتی‌بیوتیک‌ها در پلیت‌های مولر هینتون آگار (Merck) تهیه شد. محیط مولر هینتون آگار ذوب شده تا دمای 50°C – 45°C سرد شده و در این دما محلول‌های آنتی‌بیوتیک به آن‌ها اضافه شد. رقت‌های آنتی‌بیوتیک در هر سری پلیت به صورت: 0/0078 و 0/0156، 0/0312، 0/0625، 0/125، 0/5، 1، 2، 4، 8، 16، 32، 64، 128 میکروگرم در هر میلی‌لیتر بود. یک پلیت به منظور کنترل رشد (بدون آنتی‌بیوتیک) مورد استفاده قرار گرفت. از ایزوله‌های مورد مطالعه کشت 24 ساعته تهیه و سپس از هر کدام از ایزوله‌ها سوسپانسیون برابر با 0/5 مک فارلند که در هر میلی‌لیتر آن $10^8 \times 1/5$ باکتری وجود دارد، تهیه شد. پلیت‌ها به صورت نقطه‌ای توسط لوپ کالیبره یک میکرولیتری با سوسپانسیون تهیه شده با کدورت 0/5 مک فارلند که به نسبت $1/10$ رقیق شده بود تلقیح شد. همچنین در هر سری از آزمایش‌ها از سوسپانسیون تهیه شده از کشت 24 ساعته سویه‌های کنترل کیفی *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 در کنار سویه‌های آزمایش تلقیح شد. بعد از گرمخانه‌گذاری در 37°C به مدت 24 ساعت رشد باکتری در هر سری از پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. هرگونه رشد باکتری (به صورت انبوه یا کلنی‌های منفرد) به عنوان مقاومت نسبت به آن رقت تلقی می‌شد. حداقل غلظتی که باکتری هیچگونه رشد قابل مشاهده در آن نداشت به عنوان MIC در نظر گرفته شد. معیار مقاومت بر مبنای روش‌های غربالگری توصیه شده توسط انستیتو استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) انجام شد. به نحوی که برای هر یک از سویه‌های اشریشیاکلی در صورتی که نتایج آزمایش آن برای هر یک عوامل ضد میکروبی فوق بزرگ‌تر از $10^8/\text{ml}$ بود، سویه مزبور به عنوان یک تولیدکننده بالقوه آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (فنوتیپ P^+) در نظر گرفته شد [10].

استریل مخلوط کردیم. با استفاده از دستگاه ترموبلاک سلول‌ها را در دمای 95°C به مدت 10 دقیقه قرار داده تا سلول‌ها لیز شوند. محلول حاصل را در دور 17/210 به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ کردیم. مایع رویی حاوی DNA استخراج شده است که به‌عنوان الگو در روش PCR به کار برده می‌شود [9].

ب) محلول ذخیره پرایمر با غلظت 100 پیکومول بر میکرولیتر، dNTPs با غلظت 1/25 میکرومولار و بافر PCR با غلظت $10\times$ در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت [9].

تهیه مسترمیکس (Master Mix) برای انجام PCR
برای اطمینان از انجام صحیح آزمایش و صرفه جویی در وقت، می‌توان محلول‌های ذخیره از مخلوط واکنش PCR تهیه کرد.

برای تهیه مسترمیکس (Master Mix) جهت انجام PCR یک واکنشی، حجمی برابر با 47/75 میکرولیتر مورد نیاز است که شامل 22 میکرولیتر آب مقطر استریل، 5 میکرولیتر بافر PCR با غلظت $10\times$ ، 8 میکرولیتر dNTP مخلوط با غلظت 1/25 میکرومولار، 1/2 میکرولیتر از پرایمرهای MOXM - CITM (F&R) و DHAM با غلظت 25 پیکومول، 1 میکرولیتر از پرایمرهای ACCM (F&R) و FOXM با غلظت 25 پیکومول و 0/8 میکرولیتر از پرایمر FOXM (F&R) با غلظت 25 پیکومول است. بدیهی است برای واکنش‌های با تعداد بالاتر مقادیر بالا در تعداد واکنش‌ها ضرب خواهد شد.

هنگام انجام آزمایش به مقدار 1/25 میکرولیتر Tag DNA پلی مرز به ترکیب بالا اضافه می‌کنیم. ترکیب حاصل 48 میکرولیتر بوده و با اضافه کردن 2 میکرولیتر از DNA الگو محلول برای انجام واکنش‌های PCR آماده است [9].

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) طبق جدول 2 انجام گرفت:

تأیید تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، توسط ایزوله‌های بالینی اشریشیاکلی که در مرحله قبل دارای توانایی بالقوه تولید بتالاکتاماز شناخته شدند، به‌وسیله آزمایش آگاردایلوشن با استفاده از سه آنتی‌بیوتیک فوق‌الذکر به همراه کلانولانیک اسید به‌عنوان مهارکننده آنزیم بتالاکتاماز انجام شد. در صورتی که MIC حداقل یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها در ترکیب با کلانولانیک اسید سه مرتبه یا بیش‌تر از سه مرتبه از MIC آن آنتی‌بیوتیک به تنهایی کاهش نشان می‌داد به‌عنوان تولیدکننده قطعی آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در نظر گرفته شده در غیر این صورت باکتری مورد نظر از نظر فنوتیپی $P^{+}C^{-}$ در نظر گرفته می‌شد. ایزوله‌های دارای این فنوتیپ کاندید اصلی تولید بتالاکتاماز نوع AmpC می‌باشند [11].

به‌علاوه مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین نیز به‌عنوان معیاری برای تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC توسط ایزوله مورد نظر است. در صورتی که میزان MIC برای آنتی‌بیوتیک مذکور بزرگ‌تر یا مساوی $8^{\mu\text{g/ml}}$ به دست می‌آید ایزوله مورد نظر مظنون به تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC در نظر گرفته می‌شد [12]. در نتیجه علاوه بر روش‌های فوق، روش مطمئن‌تر شناسایی ایزوله‌های کاندید تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC یعنی روش Multiplex PCR به کار گرفته شد [9].

روش مولتی پلکس (Multiplex PCR)

از این روش به‌منظور شناسایی ژن‌های مسئول بیان بتالاکتامازهای نوع AmpC و همچنین به‌منظور تشخیص ژن AmpC با واسطه پلاسمید در ارگانسیم‌هایی استفاده شده و شامل مراحل زیر است:

الف) تهیه DNA الگو: ابتدا یک کلنی از هر ارگانسیم مورد آزمایش را از روی محیط بلاد آگار در 5 میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی (LB Broth) تلقیح کرده و پس انکوباسیون در انکوباتور شیکردار در حرارت 37°C به مدت 20 ساعت، 1 میلی‌لیتر از کشت‌های به دست آمده را در دور 17/210 به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ، مایع روی را خارج و رسوب را در 500 میکرولیتر آب مقطر

جدول 1. نام، توالی، ژن‌های هدف و پرایمرهای به کار رفته در این تحقیق و وزن مولکولی محصول PCR حاصل از این پرایمرها

	Sequence (5' to 3')	Target(s)	Amplicon (bp)
MOXM-F MOXM-R	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG G	CMY-1, CMY-8 to CMY-11 MOX-1, MOX-2	520
CITM-F CITM-R	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	BIL-1, CMY-2 to XMY-7 LAT-1 to LAT-4	462
DHAM-F DHAM-R	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	DHA-1, DHA-2	405
ACCM-F ACCM-R	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	ACC	346
EBCM-F EBCM-R	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	MIR-1T, ACT-1	302
FOXM-F FOXM-R	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	FOX-1 to FOX-5b	190

جدول 2. مراحل و تعداد چرخه‌های آمپلی فیکاسیون برای تکثیر ژن‌های AmpC (25 چرخه و زمان تقریبی آن یک ساعت و 40 دقیقه است)

تعداد سیکل	زمان	دما	مراحل
1	3 دقیقه	94°C	شوک حرارتی اولیه
25	30 ثانیه	94°C	واسرشت DNA (Denaturation)
	30 ثانیه	64°C	جفت شدن پرایمر (Annealing)
	60 ثانیه	72°C	طویل شدن پرایمر (Extension)
1	7 دقیقه	72°C	طویل شدن نهایی
...	...	4°C	نگهداری

به منظور از دست نرفتن احتمالی ایزوله‌های حاوی ژن‌های مسئول بیان ژن‌های آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC، تمامی ایزوله‌های اعم از P⁺C⁻ و P⁺C⁺ توسط روش Multiplex PCR مورد آزمایش قرار گرفتند.

نتایج

در مجموع 154 ایزوله بالینی اشریشیاکلی از بیمارستان‌های امام خمینی، شهید مصطفی خمینی و مرکز طبی کودکان تهران از اسفند ماه 1385 تا شهریور ماه 1386 مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله‌های مورد

پس از مرحله سوم و پایانی آمپلیفیکاسیون، محصول PCR روی ژل آگارز 1/5 درصد در دستگاه الکتروفورز شرکت SciPlus انگلستان الکتروفورز می‌شد تا ژن‌های تکثیر یافته برحسب اندازه مولکولی خود جدا شوند. همچنین ژل‌ها با استفاده از رنگ اتیدیوم برماید، با افزودن به ژل، رنگ آمیزی شده و در دستگاه آشکار ساز و ثبت ژل (مدل UVtech) تصویر باندهای تشکیل شده مشاهده و ثبت می‌گردید. برای شناسایی موقعیت و اندازه DNA ژن‌های هدف از شاخص اندازه مولکولی DNA (DNA ladder) با فواصل صد جفت باز استفاده شد.

بر روی ژل آگاروز 3/4 درصد ایزوله‌ها (n=3) باندهایی با وزن مولکولی تقریبی 480bp به وجود آورده بودند که حاصل از پرایمر CITM است که ژن‌های هدف آن LAT-1 تا 4، BIL-1 و CMY-1 تا CMY-7 است. با توجه به این که شیوع ژن‌های CMY خصوصاً CMY-2 از ژن‌های دیگر بیش تر است احتمال دارد این ایزوله‌ها دارای یکی از ژن‌های CMY باشند. 2/2 درصد ایزوله‌ها (n=2) باندهایی با وزن مولکولی تقریبی 300bp تشکیل داده بودند که حاصل از پرایمر EBCM بوده که ژن‌های هدف آن ACT-1 و MIR-1 می‌باشند. با توجه به این که شیوع ژن ACT-1 بیش تر است احتمال وقوع این ژن بیش تر است.

نکته قابل توجه خصوصیت یکی از ایزوله‌ها بود که علاوه بر تشکیل باند حدود 300bp، در ناحیه 400bp نیز باند تشکیل داده بود که حکایت از وجود دو ژن مقاومت دارویی در ارگانسیم مذکور است. با توجه به وزن مولکولی تقریبی 400bp، این باند حاصل از پرایمر DHAM بوده که ژن‌های هدف آن DHA-1 و DHA-2 است.

نمودار 2 توزیع فراوان ایزوله‌های بالینی اشریشیاکلی تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC در جمعیت مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

بدیهی است که جهت تعیین دقیق ژن‌های مسئول تشکیل دهنده این باندها باید ژن‌های تشکیل دهنده این باندها تعیین توالی و با توالی‌های استاندارد موجود برای هر ژن مقایسه شود.

نمودار 3 نشان‌دهنده توزیع فراوانی ایزوله‌های اشریشیاکلی واجد خانواده‌های ژنی کدکننده آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC است.

تصویر 1 باندهای تشکیل شده بر روی ژل آگاروز حاصل از محصولات PCR ایزوله‌های تحت مطالعه را نشان می‌دهد. بر روی شکل مکان تقریبی باندها با توجه به مقایسه آن‌ها با باندهای تشکیل شده توسط DNA

بررسی از بخش‌های اورژانس، داخلی و ICU به ترتیب با فراوانی نسبی 33/1 درصد (n=51)، 28/5 درصد (n=44) و 9 درصد (n=14) و بخش‌های دیگر با فراوانی کم تر به دست آمد. بیش ترین فراوانی مربوط به ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های ادرار (n=112) با فراوانی نسبی 73 درصد بود.

توزیع فراوانی ارگانسیم‌های تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و بتالاکتاماز نوع AmpC براساس نوع سفالوسپورین‌های نسل سوم مورد تجزیه نشان داد 57/15 درصد سویه‌ها (n=88) قادرند هر سه نوع سوبسترای آنتی‌بیوتیکی را تجزیه کنند. به عبارت دیگر در مقابل هر سه آنتی‌بیوتیک دارای $MIC > 1 \mu g/ml$ بوده و تولیدکننده بالقوه آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) یا AmpC و دارای فنوتیپ P+ بودند. 42/86 درصد از سویه‌ها (n=66) توانایی تجزیه هیچ یک از سه سوبسترا را نداشته و در نتیجه از نظر تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف منفی بوده و ارگانسیم‌های مورد نظر حساس در نظر گرفته می‌شوند. به عبارت دیگر این تعداد از ایزوله‌ها دارای $MIC \leq 1 \mu g/ml$ برای آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بوده و دارای فنوتیپ P- می‌باشند.

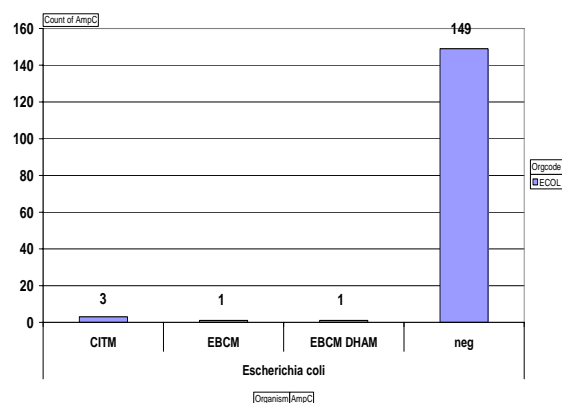
آزمایش تأییدی با استفاده از مهارکننده کلانولانیک اسید، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف نوع ESBL را در 53/9 درصد سویه‌های تحت آزمایش (n=83) تأیید کرد (فنوتیپ P+C+) و همچنین 3/25 درصد از سویه‌ها (n=5) دارای فنوتیپ P+C- شناخته شده و کاندید تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC شدند.

نمودار 1 توزیع فراوانی میزان شیوع ایزوله‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف نوع AmpC و ESBL در جامعه مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

از 88 ایزوله بالینی (P+C+ و P+C-) که توسط روش Multiplex PCR مورد آزمایش قرار گرفتند، 5/7 درصد ایزوله‌ها (n=5) واجد ژن‌های بتالاکتاماز نوع AmpC بودند. همه این ایزوله‌ها از نظر فنوتیپی P+C- بوده و دارای $MIC \geq 128 \mu g/ml$ بودند. با بررسی باند تشکیل شده

نمودار 2. توزیع فراوان ایزوله‌های بالینی اشریشیاکلی تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC

از مجموع 154 ایزوله بالینی مورد مطالعه تعداد 5 ایزوله دارای فنوتیپ P^+C^- و کاندید تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC بوده و 149 سوبه دارای فنوتیپ‌های دیگر (P^+C^+ ، P^-C^+ و P^-C^-) بودند طبق تعریف شرایط تولید آنزیم مورد مطالعه را نداشتند.



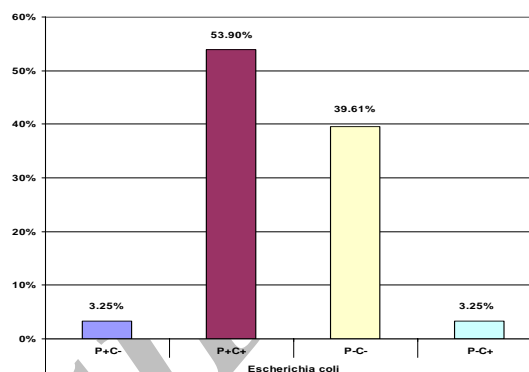
نمودار 3. توزیع فراوانی ایزوله‌های اشریشیاکلی واجد خانواده‌های ژنی کدکننده آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC

CITM: تعداد سه ایزوله از ایزوله‌های مورد مطالعه بر روی ژل آگاروز بانندی با وزن مولکولی برابر با آمپلیکون حاصل از پرایمر CITM تولید کردند که ژن‌های هدف آن LAT-1 تا LAT-4، BIL-1 و CMY-1 تا CMY-7 است.

EBCM: یکی از ایزوله‌های مورد مطالعه بر روی ژل آگاروز بانندی با وزن مولکولی برابر با آمپلیکون حاصل از پرایمر EBCM ایجاد کرد که ژن‌های هدف آن MIR-1 و ACT-1 می‌باشند.

DHAM: یکی از ایزوله‌های مورد مطالعه علاوه بر EBCM، بر روی ژل آگاروز بانندی با وزن مولکولی برابر با آمپلیکون حاصل از پرایمر DHAM تولید کرد که ژن‌های هدف آن DHA-1 و DHA-2 است.

Ladder و وزن مولکولی تقریبی آن‌ها مشخص شده است.

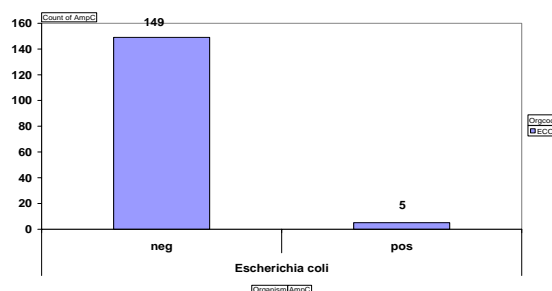


نمودار 1. توزیع فراوانی میزان شیوع ایزوله‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف نوع AmpC و ESBL در جامعه مورد مطالعه

(فنوتیپ P^+): چنانچه برای هریک از سوبه‌های نتایج آزمایش تعیین MIC برای هریک آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون و سفپیم از $1 \mu\text{g/ml}$ بود، سوبه مزبور به‌عنوان یک تولیدکننده بالقوه آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف با P^+ در نظر گرفته شد.

(فنوتیپ P^+C^+): در صورتی که MIC حداقل یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها در ترکیب با کلاولانیک اسید سه مرتبه یا بیش تر از MIC آن آنتی‌بیوتیک به تنهایی کاهش نشان می‌داد به‌عنوان تولیدکننده قطعی آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف یا P^+C^+ در نظر گرفته شد.

(فنوتیپ P^+C^-): در صورتی که MIC حداقل یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها در ترکیب با کلاولانیک اسید سه مرتبه یا بیش تر از MIC آن آنتی‌بیوتیک به تنهایی کاهش نشان نمی‌داد به‌عنوان سوبه مشکوک به تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC یا P^+C^- در نظر گرفته شد.

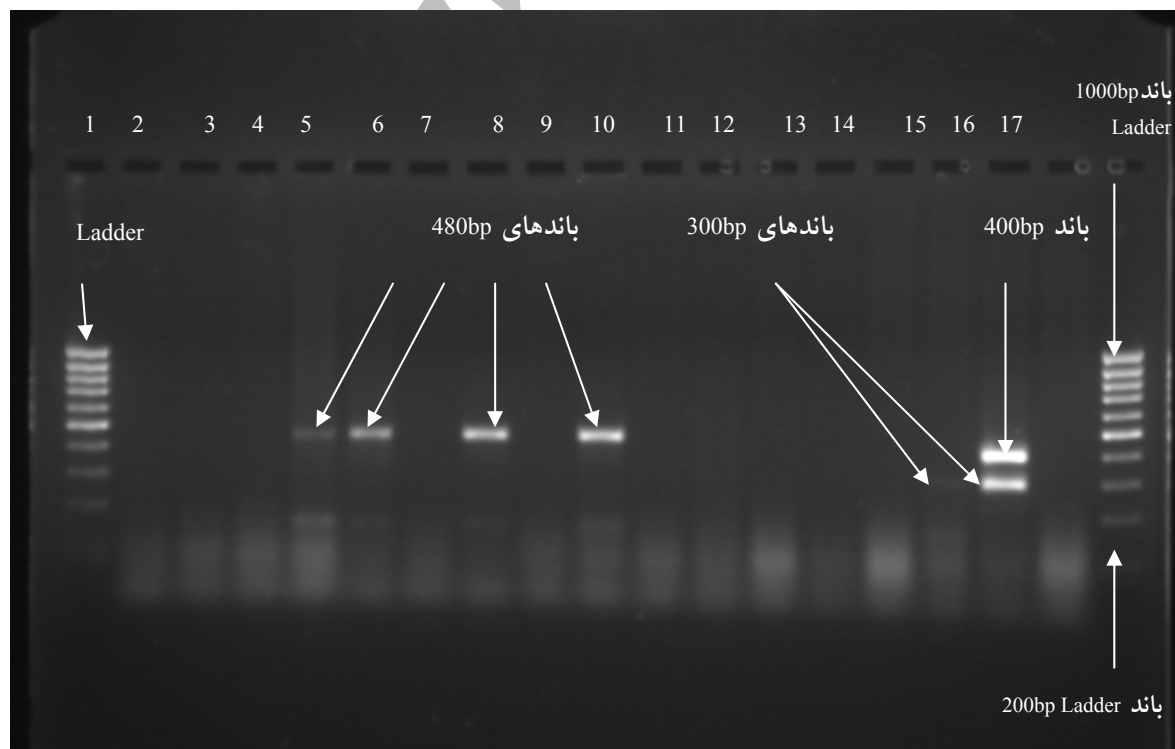


بحث و نتیجه‌گیری

بتالاکتامازها سیستم دفاعی اصلی باکتری‌های گرم منفی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام هستند. از زمانی که آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در بالین مورد استفاده قرار گرفتند، بتالاکتامازها به همراه آن‌ها تکامل یافتند و نقش اصلی را در شکست‌های درمانی در آنتی‌بیوتیک‌تراپی ایفا کردند. در ابتدا شیوع آن‌ها در ارگانسیم‌هایی بود که به‌طور معمول مولد آنزیم نبودند نظیر استافیلوکوکوس اورئوس و به پاتوژن‌هایی نظیر هموفیلوس انفلوآنزا و نایسریاگونوره آ که قبلاً آنزیم را نداشتند گسترش پیدا کردند. 20 سال قبل پلاسمیدهای واسطه مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در اشریشیاکلی و دیگر اعضای خانواده انتروباکتریاسه شناخته شدند که اغلب حامل ژن‌های کدکننده کلاس A آنزیم‌های بتالاکتاماز بودند. کلاس B و کلاس C آنزیم‌ها دارای طیف وسیع فعالیت بوده و غالباً به‌وسیله ژن‌های روی کروموزوم کد می‌شوند. بتالاکتامازهای نوع AmpC اغلب توسط ژن‌های کروموزومی کد شده و در بسیاری از باسیل‌های گرم

منفی وجود دارند [13]. آنزیم AmpC کروموزومی در باکتری اشریشیاکلی به مقدار کم تولید شده اما آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC با واسطه پلاسمید می‌تواند به این ارگانسیم‌ها مقاومتی شبیه به مقاومت در ارگانسیم دارای بتالاکتاماز نوع AmpC کروموزومی اعطاء کند. بیش از 20 نوع بتالاکتاماز نوع AmpC با واسطه پلاسمید شناخته شده است. از نظر خواص بتالاکتامازهای نوع AmpC مقاومت به سفامایسین را به‌خوبی مقاومت به اکسی‌ایمینوبتالاکتامازها به‌وجود آورده و این آنزیم‌ها به مهار توسط کلانولینیک اسید مقاوم هستند. بتالاکتامازهای نوع AmpC با واسطه پلاسمید که از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به‌دست آمد، اولین بار در سال 1989 از شهر سئول کره جنوبی گزارش شد [4].

براساس یافته‌های این تحقیق از کل 154 ایزوله بالینی تحت آزمایش 57/15 درصد دارای فنوتیپ P^+ بودند. به این معنا که به‌صورت بالقوه توانایی تولید آنزیم‌های



تصویر 1. باندهای تشکیل شده بر روی ژل آگاروز حاصل از محصولات PCR ایزوله‌های تحت مطالعه

- شکاف‌های (Slots) شماره 1 و 19: DNA Ladder
- همه شکاف‌ها (به جز 1، 4، 5 و 19) حاوی محصولات حاصل از PCR ژن‌های استخراج شده از ایزوله‌های کاندید تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC است.
- شکاف 5 حاوی محصول حاصل از PCR ژن *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 به‌عنوان کنترل مثبت و شکاف شماره 4 حاوی ژن کنترل منفی است.
- باندهایی با وزن مولکولی تقریبی 480bp، حاصل از پرایمر CITM با ژن‌های هدف LAT-1 تا LAT-4، BIL-1 و CMY-1 تا CMY-7 است.
- باندهایی با وزن مولکولی تقریبی 300bp حاصل از پرایمر EBCM بوده که ژن‌های هدف آن MIR-1 و ACT-1 می‌باشند.
- باند تشکیل شده در ناحیه 400bp حکایت از وجود دو ژن مقاومت دارویی در ارگانسیم مذکور است. با توجه به وزن مولکولی تقریبی 400bp، این باند حاصل از پرایمر DHAM بوده که ژن‌های هدف آن DHA-1 و DHA-2 است.

با وزن مولکولی تقریبی 480bp به‌وجود آوردند که حاصل از پرایمر CITM با ژن‌های هدف LAT-1 تا LAT-4، BIL-1 و CMY-1 تا CMY-7 است. 2/3 درصد ایزوله‌ها (n=2) باندهایی با وزن مولکولی تقریبی 300bp تشکیل داده بودند که حاصل از پرایمر EBCM بوده که ژن‌های هدف آن MIR-1 و ACT-1 می‌باشند. یکی از ایزوله‌ها علاوه بر تشکیل باند حدود 300bp، در ناحیه 400bp نیز باند تشکیل داده بود که حکایت از وجود دو ژن مقاومت دارویی در ارگانسیم مذکور است. با توجه به وزن مولکولی تقریبی 400bp، این باند حاصل از پرایمر DHAM بوده که ژن‌های هدف آن DHA-1 و DHA-2 است.

در سایر نقاط جهان نیز طی چند سال گذشته موارد متعددی از سویه‌های تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC گزارش شده است. در سال 1998 نوزده نوع از بتالاکتامازهای نوع AmpC از نیجریه، فرانسه، آلمان، یونان، هند، پاکستان، ترکیه، انگلستان و ایالات متحده آمریکا گزارش شد. شیوع آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC در چین برای اشریشیاکلی 2 درصد گزارش شد [14].

بتالاکتاماز قابل‌القاء نوع DHA-1 برای اولین بار در سال 1998 از عربستان سعودی و بعداً در سال 2002

بتالاکتاماز وسیع‌الطیف ESBL را دارا بودند. سپس با فرارگرفتن در معرض ترکیب آنتی‌بیوتیک + مهاکننده (کلولانیک اسید)، 53/9 درصد از این گروه از ایزوله‌ها کاهش MIC به اندازه سه مرتبه یا بیش‌تر را نشان دادند که بیان‌کننده مهارشدن آنزیم بتالاکتاماز آن‌ها است. این گروه دارای فنوتیپ P⁺C⁺ در نظر گرفته شدند. به عبارت دیگر این گروه تولیدکننده قطعی آنزیم بتالاکتاماز نوع ESBL بودند. 5/7 درصد از ایزوله‌ها کاهش MIC را نشان نداده به این معنی که به مهار توسط مهارکننده بتالاکتاماز مقاومت نشان داده (خصوصیت ویژه سویه‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز نوع AmpC) و فنوتیپ P⁺C⁻ برای آن‌ها در نظر گرفته شد. ایزوله‌های دارای فنوتیپ P⁺C⁻ از نظر مقاومت به سفوکسیتین مورد بررسی قرار گرفتند که 100 درصد ایزوله‌ها مقاومت بالای 128 میکروگرم بر میلی‌لیتر به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین از خود نشان دادند.

سویه‌های کاندید تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC توسط روش Multiplex PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که 5/7 درصد ایزوله‌ها (n=5) واجد ژن‌های بتالاکتاماز نوع AmpC هستند که از میان آن‌ها 3/4 درصد ایزوله‌ها (n=3) روی ژل آگاروز باندهایی

- detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14(4):933-51.
- Babic M, Hujer AM and Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates* 2006; 9(3):142-56.
 - Paterson D L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *American Journal of Infection Control* 2006; 34(5) S20-S28.
 - Philipon Alian, Arlet Guillaume, Jacoby A Goerge. Plasmid-Determined AmpC-Type β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46(1):1-11.
 - Poirel L, Pitout JD and Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiology* 2007; 2:501-12
 - Fakioglu E, Queenan AM, Bush K, Jenkins SG and Herold BC. Amp C beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in neonatal meningitis: diagnostic and therapeutic challenge. *J Perinatol* 2006;26:515-7
 - Ding H, Yang Y, Lu Q, 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. *Journal of Clinical Microbiology* 2008
 - Arora S, Bal M. AmpC beta-lactamase producing bacterial isolates from Kolkata hospital. *Indian Journal of Medicin* 2005;122:224-33
 - Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(21) 2153-2162.
 - Betty A. Forbes, Daniel F. Sahm, Alice S. Weissfeld. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier. 2007.
 - Wayne Pa. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement. National committee for Clinical Laboratory Standards 2005.
 - Reisbig MD, Hossain A, Hanson ND. Factors influencing gene expression and resistance for gram-negative organisms expressing plasmid-encoded AmpC genes of *Enterobacter* origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51:1141-51.
 - Sanders, CC. Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistances to newer β -lactam antibiotics. *Clinical Microbiology Reviews* 1987; 41:573-593.
 - Papanicolaou, G. Medeiros A, and G. A. Jacoby. Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino and α -methoxy-lactam in clinical isolates of *Kelebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1990; 34:2200-2209.

از تایوان گزارش شد. بتالاکتامازهای نوع AmpC کد شده توسط پلاسמיד در 4 درصد از ایزوله‌های اش‌ریشیاکلی که از 25 منطقه از ناحیه مرکزی ایالات متحده انتخاب شده بودند، یافت شدند. در سال 2003، 20/7 درصد ارگانسیم مولد این آنزیم در بین باکتری‌های گرم منفی یکی از بیمارستان‌های دهلی نو گزارش شد [14].

همچنین سورانجان آرورا و دیگران در سال 2005 از بین 284 سویه، 27 سویه مقاوم به سفوکسیتین را جداسازی کردند که از بین آن‌ها 6/69 درصد سویه‌ها (n=19) دارای بتالاکتاماز نوع AmpC، 1/4 درصد، (n=4) دارای بتالاکتاماز نوع AmpC با واسطه پلاسמיד و 1/4 درصد سویه‌ها (n=4) تولیدکننده آنزیم نبودند. از بین 23 تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC، 47/8 درصد (n=11) اش‌ریشیاکلی، 17/3 درصد سویه‌ها (n=4) پseudomonas، 13 درصد سویه (n=3) کلبسیلا پنومونیه و 4/3 درصد سویه‌ها (n=1) کلبسیلا آئروژینوزا بودند. در نقاط مختلف جهان درصد‌های مختلفی از شیوع بتالاکتامازهای نوع AmpC گزارش شده است [8].

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، شیوع 5/7 درصدی ایزوله‌های اش‌ریشیاکلی تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC در مقایسه با نتایج به‌دست آمده از نقاط مختلف جهان (چین 2 درصد، ناحیه مرکزی آمریکا 4 درصد، هند 20/7 درصد و نتایج به‌دست آمده توسط سورانجان آرورا 6/69 درصد) در جامعه مورد مطالعه قابل قبول بوده و پیشنهاد می‌شود که این بررسی به جهت اهمیت آن از نظر شیوع مقاومت دارویی سویه‌های تولیدکننده این آنزیم در سطح وسیع‌تری در کشور حتی به‌عنوان یک طرح ملی اجرا شود.

منابع

- Bradford Patricia A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and