دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی – پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال شانزدهم – شماره ۸۰
اردیبهشت ۱۳۸۸

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

نویسندگان: صادق منصوری [۱]، دکتر محسن چیت‌ساز*[۲]، دکتر رضا حاجی‌حسینی [۳]، محسن میرزایی [٤] و دکتر محمدحسین قینی [٥]

۱. کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه شاهد
۲. استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه شاهد
۳. دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، مرکز تهران
٤. کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد بروجرد
۵. استادیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی شاهد.

نویسنده مسئول: *
Email: Mohsen.Chitsaz@unisa.edu.au

وصول: ۸۷/۷/۷
آخرین اصلاحات: ۸۷/۱۰/۱۵
پذیرش: ۸۷/۱۱/۲۶

چکیده

مقدمه و هدف: استفادهٔ 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 ۱۵۴ ایزولهٔ بالینی اشریشیاکلی غیرتکراری از سه بیمارستان منتخب شهر تهران جمع‌آوری و از نظر تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفپیم و همچنین مهارکنندهٔ بتالاکتاماز بنام اسیدکلاولانیک 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 ۵۷/۱۵ درصد (n= ۸۸)، +P+C با ۵۳/۹ درصد (n= ۸۳)، و -P+C با ۳/۲۵ درصد (۵ = n) تقسیم شدند از ۸۸ ایزولهٔ بالینی (-P+C و +P+C) که توسط روش Multiplex PCR مورد آزمایش قرار گرفتند، ۵/۷ درصد ایزوله‌ها (۵ =n) واجد ژن‌های بتالاکتاماز نوع AmpC بودند.

نتیجه‌گیری: این اولین گزارش از وجود بتالاکتامازهای نوع AmpC از دستهٔ EBC-M، DHA-M و CIT-M در ایران بوده و به دلیل اهمیت ارگانیسم‌های تولیدکنندهٔ 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.

واژه های کلیدی: بتالاکتاماز، وسیع‌الطیف، AmpC، اشریشیاکلی

مقدمه

مکانیسم عمومی مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است. این آنزیم حلقه بتالاکتام داروهایی نظیر سفالوسپورین‌ها و پنی سیلین‌ها را هیدرولیز کرده و موجب غیرفعال شدن آن‌ها می‌گردد. در طول دو دهه گذشته بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام جدید تهیه شده‌اند که به‌طور اختصاصی به عملکرد هیدرولیزکنندهٔ آنزیم‌های بتالاکتاماز مقاومت داشته باشند. به هر حال با وجود این گروه جدید از آنتی‌بیوتیک‌ها که برای درمان بیماران مورد استفاده قرار گرفته‌اند انواع جدیدی از آنزیم‌های بتالاکتاماز نظیر ESBL ها، بتالاکتامازهای نوع AmpC با واسطه پلاسمید و بتالاکتامازهای هیدرولیزکنندهٔ کارباپنم‌ها (کارباپنمازها) ظاهر شده‌اند. باکتری‌های گرم منفی با انبوهی از بتالاکتامازهای جدید ذکر شده در بالا توانستند مقاومت به جدیدترین آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را کسب کنند[۳-۱].

بتالاکتامازهای نوع AmpC در اواخر دههٔ ۱۹۷۰ ظاهر و مورد مطالعه قرار گرفتند. بیش‌تر این آنزیم‌ها سفالوسپورینناز بوده ولی تا حدی توانایی هیدرولیز سایر بتالاکتام‌ها را نیز دارند. این آنزیم‌ها سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مانند سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم و مونوباکتام‌هایی مانند آزترونام و سفامایسین‌ها را هیدرولیز کرده ولی توسط مهارکننده‌های معمولی مانند کلاولانات مهار نمی‌شوند. مقاومت ابتدا در ارگانیسم‌هایی نظیر انتروباکترکلوآکه (*Enterobacter cloacae*)، سیتروباکتر فروندی (*Citrobacter Freundii*)، سراشیامارسنس (*Serratia mercescens*) و پسودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) به‌وجود آمد که علت آن تولید مضاعف AmpC کروموزومی بود. این آنزیم موجب مقاومت باکتری در برابر ۷- آلفا - متوکسی سفالوسپورین‌ها و مونوباکتام‌ها شد. در اواخر دههٔ ۱۹۸۰ این ژن‌های کروموزومی قابل القاء روی پلاسمیدها ظاهر شدند و به ارگانیسم‌هایی که ذاتاً این نوع بتالاکتاماز را بیان نمی‌کردند نظیر گونه‌های کلبسیلا، اشریشیاکلی و یا گونه‌های سالمونلا منتقل شده و باعث مقاومت این ارگانیسم‌ها به اکسی ایمینوسفالوسپورین‌ها گردید[٤و٥].

امروزه، افزایش شیوع مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بواسطهٔ بتالاکتامازهای نوع AmpC در بین سویه‌های اشریشیاکلی به یک نگرانی بالینی تبدیل شده است. این ارگانیسم‌ها می‌توانند توانایی تولید بتالاکتاماز نوع AmpC را بر روی پلاسمید کسب کنند. علاوه برآن‌که اینها می‌توانند بتالاکتاماز نوع AmpC نوع کروموزومی را به مقدار زیاد تولیدکنند در حالی که در حالت طبیعی این آنزیم‌ها به مقدار کم تولید می‌شوند[۸-٦].

اگرچه بیش از یک دهه از کشف بتالاکتامازهای نوع AmpC با واسطهٔ پلاسمید می‌گذرد، بیش‌تر آزمایشگاه‌ها و پزشکان اهمیت بالینی این آنزیم‌ها را درک نکرده‌اند. روش‌های تشخیصی جدید جهت شناسایی ارگانیسم‌های تولیدکنندهٔ بتالاکتامازهای نوع AmpC با واسطهٔ پلاسمید در آزمایشگاه‌های بالینی به‌منظور اجرا به‌صورت آزمایش‌های روزانه مورد نیاز است[۹]. همچنین روش مولتی‌پلکس PCR (Multiplex PCR) به‌عنوان یک ابزار تحقیقی برای این آنزیم‌ها در دسترس است اما به‌عنوان یک ابزار عادی برای استفاده در آزمایشگاه‌های بالینی در دسترس نیست[۹].

این مطالعه به‌منظور شناسایی ایزوله‌های بالینی مولد بتالاکتاماز نوع AmpC برپایهٔ تعیین MIC سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم، سفوکسیتین و شناسایی ژن‌های مسئول تولید این آنزیم‌ها به روش مولتی پلکس PCR انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی ۱۵٤ 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 مطالعهٔ مقطعی و در فاصلهٔ زمانی اسفندماه ۱۳۸۵ تا شهریور ماه ۱۳۸٦ انجام شده است. ایزوله‌های بالینی بعد از انجام آزمایش‌های تعیین هویت توسط روش‌های متداول میکروب‌شناسی به‌طور دقیق شناسایی شده[۱۰] و در محلول‌های مخصوص نگهداری باکتری‌ها در فریزر $-۷۰^{\circ}C$ نگهداری گردید. در این مطالعه از سویه‌های اشریشیاکلی (*Escherichia coli* ATCC 25922) و کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumonia* ATCC 700603) به‌عنوان سویه‌های استاندارد برای آزمایش‌های کنترل کیفیت و دقت آزمایش‌های MIC استفاده گردید.

شناسایی سویه‌های تولیدکنندهٔ 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 برپایهٔ سنجش میزان MIC ایزوله‌ها برای آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفپیم است. آزمایش‌های تأیید تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف با استفاده از مهارکنندهٔ آنزیم بتالاکتاماز (کلاولانیک اسید) انجام و در نهایت سویه‌هایی که به مهارکنندگی کلاولانیک اسید حساسیت نشان ندادند به‌عنوان تولیدکنندهٔ بالقوهٔ آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC در نظر گرفته شده و تست تعیین مقاومت به سفوکسیتین برای آن‌ها انجام گرفت[۱۱].

پودر آنتی‌بیوتیک‌های مذکور از شرکت اکسیر پودر آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین از شرکت سیگما تهیه گردید. جهت تهیه محلول استوک آنتی‌بیوتیک‌ها از آب مقطر به‌عنوان حلال استفاده شد. مقدار مادهٔ مؤثره آنتی‌بیوتیک در هر میلی‌گرم پودر سفتازیدیم ۸۲۰ میکروگرم، سفتریاکسون ۷٦۰ میکروگرم، سفپیم ٦۹۰ میکروگرم و برای سفوکسیتین ۹۸۰ میکروگرم بود. لوله‌های استوک آنتی‌بیوتیک مذکور در شرایط دمایی $-۷۰^{\circ}C$ تا زمان استفاده نگهداری شدند. در هر سری آزمایش رقت‌های متوالی از این آنتی‌بیوتیک‌ها در پلیت‌های مولرهینتون آگار (Merck) تهیه شد. محیط مولرهینتون آگار ذوب شده تا دمای $۵۰-٤۵^{\circ}C$ سرد شده و در این دما محلول‌های آنتی‌بیوتیک به آن‌ها اضافه شد. رقت‌های آنتی‌بیوتیک در هر سری پلیت به‌صورت: ۰/۰۰۷۸و ۰/۰۱۵٦، ۰/۰۳۱۲، ۰/۰٦۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ٤، ۸، ۱٦، ۳۲، ٦٤، ۱۲۸ میکروگرم در هر میلی‌لیتر بود. یک پلیت به‌منظور کنترل رشد (بدون آنتی‌بیوتیک) مورد استفاده قرار گرفت. از ایزوله‌های مورد مطالعه کشت ۲٤ ساعته تهیه و سپس از هر کدام از ایزوله‌ها سوسپانسیونی برابر با ۰/۵ مک فارلند که در هر میلی‌لیتر آن $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری وجود دارد، تهیه شد. پلیت‌ها به‌صورت نقطه‌ای توسط لوپ کالیبره یک میکرولیتری با سوسپانسیون تهیه شده با کدورت ۰/۵ مک فارلند که به نسبت $۱/۱۰^{۱}$ رقیق شده بود تلقیح شد. همچنین در هرسری از آزمایش‌ها از سوسپانسیون تهیه شده از کشت ۲٤ ساعتهٔ سویه‌های کنترل کیفی *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 در کنار سویه‌های آزمایش تلقیح شد. بعد از گرمخانهٔ‌گذاری در $۳۷^{\circ}C$ به مدت ۲٤ ساعت رشد باکتری در هر سری از پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. هرگونه رشد باکتری (به‌صورت انبوه یا کلنی‌های منفرد) به‌عنوان مقاومت نسبت به آن رقت تلقی می‌شد. حداقل غلظتی که باکتری هیچگونه رشد قابل مشاهده در آن نداشت به‌عنوان 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 ضدمیکروبی فوق بزرگ‌تر از $۱^{\mu g}/_{ml}$ بود، سویه مزبور به‌عنوان یک تولیدکنندهٔ بالقوهٔ آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (فنوتیپ P^{+}) درنظر گرفته شد[۱۰].

تأیید تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، توسط ایزوله‌های بالینی اشریشیاکلی که در مرحلهٔ قبل دارای توانایی بالقوهٔ تولید بتالاکتاماز شناخته شدند، به‌وسیلهٔ آزمایش آگاردایلوشن با استفاده از سه آنتی‌بیوتیک فوق‌الذکر به همراه کلاولانیک اسید به‌عنوان مهارکنندهٔ آنزیم بتالاکتاماز انجام شد. در صورتی که MIC حداقل یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها در ترکیب با کلاولانیک اسید سه مرتبه یا بیش‌تر از سه مرتبه از MIC آن آنتی‌بیوتیک به تنهایی کاهش نشان می‌داد به‌عنوان تولیدکنندهٔ 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[۱۱].

به‌علاوه مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین نیز به‌عنوان معیاری برای تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC توسط ایزولهٔ موردنظر است. در صورتی که میزان MIC برای آنتی‌بیوتیک مذکور بزرگ‌تر یا مساوی $8\ ^{\mu g}/_{ml}$ به‌دست می‌آمد ایزوله موردنظر مظنون به تولیدکنندهٔ آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC در نظر گرفته می‌شد [۱۲]. در نتیجه علاوه بر روش‌های فوق، روش مطمئن‌تر شناسایی ایزوله‌های کاندید تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC یعنی روش Multiplex PCR به‌کارگرفته شد[۹].

روش مولتی پلکس (Multiplex PCR)

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

الف) تهیه **DNA** الگو: ابتدا یک کلنی از هر ارگانیسم مورد آزمایش را از روی محیط بلاد آگار در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی (LB Broth) تلقیح کرده و پس انکوباسیون در انکوباتور شیکردار در حرارت $37^{\circ}C$ به مدت ۲۰ ساعت، ۱ میلی‌لیتر از کشت‌های به‌دست آمده را در دور ۱۷/۲۱۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ، مایع روی را خارج و رسوب را در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط کردیم. با استفاده از دستگاه ترموبلاک سلول‌ها را در دمای $95^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده تا سلول‌ها لیز شوند. محلول حاصل را در دور ۱۷/۲۱۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کردیم. مایع رویی حاوی DNA استخراج شده است که به‌عنوان الگو در روش PCR به‌کاربرده می‌شود[۹].

ب) محلول ذخیره پرایمر با غلظت ۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر، dNTPs با غلظت ۱/۲۵ میکرومولار و بافر PCR با غلظت ۱۰x در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت [۹].

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 ۴۷/۷۵ میکرولیتر مورد نیاز است که شامل ۲۲ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت 10X، ۸ میکرولیتر dNTP مخلوط با غلظت ۱/۲۵ میکرومولار، ۱/۲ میکرولیتر از پرایمرهای MOXM - CITM (F&R) و DHAM با غلظت ۲۵ پیکومول، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای ACCM (F&R) و FOXM با غلظت ۲۵ پیکومول و ۰/۸ میکرولیتر از پرایمر FOXM (F&R) با غلظت ۲۵ پیکومول است. بدیهی است برای واکنش‌های با تعداد بالاتر مقادیر بالا در تعداد واکنش‌ها ضرب خواهد شد.

هنگام انجام آزمایش به مقدار ۱/۲۵ میکرولیتر Tag DNA پلی مراز به ترکیب بالا اضافه می‌کنیم. ترکیب حاصل ۴۸ میکرولیتر بوده و با اضافه کردن ۲ میکرولیتر از DNA الگو محلول برای انجام واکنش‌های PCR آماده است[۹].

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) طبق جدول ۲ انجام گرفت:

جدول ۱. نام، توالی، ژن‌های هدف و پرایمرهای به‌کار 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 toCMY-11 MOX-1, MOX-2	۵۲۰
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	٤٦٢
DHAM-F DHAM-R	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	DHA-1, DHA-2	٤٠٥
ACCM-F ACCM-R	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	ACC	٣٤٦
EBCM-F EBCM-R	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	MIR-1T, ACT-1	٣٠٢
FOXM-F FOXM-R	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	FOX-1 to FOX-5b	۱۹۰

جدول ۲. مراحل و تعداد چرخه‌های آمپلی فیکاسیون برای تکثیر ژن‌های AmpC (۲۵ چرخه و زمان تقریبی آن یک ساعت و ٤٠ دقیقه است)

مراحل	دما	زمان	تعداد سیکل
شوک حرارتی اولیه	۹٤°C	۳ دقیقه	۱
واسرشت DNA (Denaturation)	۹٤°C	۳۰ ثانیه	۲۵
جفت شدن پرایمر (Annealing)	٦٤°C	۳۰ ثانیه	
طویل شدن پرایمر (Extension)	۷۲°C	٦۰ ثانیه	
طویل شدن نهایی	۷۲°C	۷ دقیقه	۱
نگهداری	٤°C	...	...

پس از مرحلهٔ سوم و پایانی آمپلیفیکاسیون، محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در دستگاه الکتروفورز شرکت SciPlus انگلستان الکتروفورز می‌شد تا ژن‌های تکثیر یافته برحسب اندازهٔ مولکولی خود جدا شوند. هچنین ژل‌ها با استفاده از رنگ اتیدیوم برماید، با افزودن به ژل، رنگ‌آمیزی شده و در دستگاه آشکار ساز و ثبت ژل (مدل UVtech) تصویر باندهای تشکیل شده مشاهده و ثبت می‌گردید. برای شناسایی موقعیت و اندازهٔ DNA ژن‌های هدف از شاخص اندارهٔ ملکولی DNA (DNAladder) با فواصل صد جفت باز استفاده شد.

به‌منظور 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 ۱٥٤ ایزوله بالینی اشریشیاکلی از بیمارستان‌های امام خمینی، شهید مصطفی خمینی و مرکز طبی کودکان تهران از اسفند ماه ۱۳۸۵ تا شهریور ماه ۱۳۸٦ مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله‌های مورد

بررسی از بخش‌های اورژانس، داخلی و ICU به ترتیب با فراوانی نسبی ۳۳/۱ درصد (n=۵۱)، ۲۸/۵ درصد (n=٤٤) و ۹ درصد (n=١٤) و بخش‌های دیگر با فراوانی کم‌تر به‌دست آمد. بیش‌ترین فراوانی مربوط به ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های ادرار (n=۱۱۲) با فراوانی نسبی ۷۳ درصد بود.

توزیع فراوانی ارگانیسم‌های تولیدکنندهٔ آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و بتالاکتاماز نوع AmpC براساس نوع سفالوسپورین‌های نسل سوم مورد تجزیه نشان داد ۵۷/۱۵ درصد سویه‌ها (n=۸۸) 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 تولیدکنندهٔ بالقوهٔ آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) یا AmpC و دارای فنوتیپ +P بودند. ٤۲/۸٦ درصد از سویه‌ها (n=٦٦) توانایی تجزیه هیچ یک از سه سوبسترا را نداشته و در نتیجه از نظر تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف منفی بوده و ارگانیسم‌های مورد نظر حساس درنظر گرفته می‌شوند. به عبارت دیگر این تعداد از ایزوله‌ها دارای MIC ≤ 1 $^{\mu g}/_{ml}$ برای آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بوده و دارای فنوتیپ -P می‌باشند.

آزمایش تأییدی با استفاده از مهارکنندهٔ کلاولانیک اسید، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف نوع ESBL را در ۵۳/۹ درصد سویه‌های تحت آزمایش (n=۸۳) تأیید کرد (فنوتیپ +P+C) و همچنین ۳/۲۵ درصد از سویه‌ها (n=۵) دارای فنوتیپ -P+C شناخته شده و کاندید تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC شدند.

نمودار ۱ توزیع فراوانی میزان شیوع ایزوله‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف نوع AmpC و ESBL در جامعه مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

از ۸۸ ایزولهٔ بالینی (-P+C و +P+C) که توسط روش Multiplex PCR مورد آزمایش قرار گرفتند، ۵/۷ درصد ایزوله‌ها (n=۵) واجد ژن‌های بتالاکتاماز نوع AmpC بودند. همهٔ این ایزوله‌ها از نظر فنوتیپی -P+C بوده و دارای MIC≥128 $^{\mu g}/_{ml}$ بودند. با بررسی باند تشکیل شده بر روی ژل اگاروز ۳/٤ درصد ایزوله‌ها (n=۳) باندهایی با وزن مولکولی تقریبی 480bp به‌وجود آورده بودند که حاصل از پرایمر CITM است که ژن‌های هدف آن LAT-1 تا LAT-4، BIL-1 و CMY-1 تا CMY-7 است. با توجه به این‌که شیوع ژن‌های CMY خصوصاً CMY-2 از ژن‌های دیگر بیش‌تر است احتمال دارد این ایزوله‌ها دارای یکی از ژن‌های CMY باشند. ۲/۲ درصد ایزوله‌ها (n=۲) باندهایی با وزن مولکولی تقریبی ۳۰۰bp تشکیل داده بودند که حاصل از پرایمر EBCM بوده که ژن‌های هدف آن MIR-1 و ACT-1 می‌باشند. با توجه به این‌که شیوع ژن ACT-1 بیش‌تر است احتمال وقوع این ژن بیش‌تر است.

نکته قابل توجه خصوصیت یکی از ایزوله‌ها بود که علاوه بر تشکیل باند حدود ۳۰۰bp، در ناحیه ٤۰۰bp نیز باند تشکیل داده بود که حکایت از وجود دو ژن مقاومت دارویی در ارگانیسم مذکور است. با توجه به وزن مولکولی تقریبی ٤۰۰bp، این باند حاصل از پرایمر DHAM بوده که ژن‌های هدف آن DHA-1 و DHA-2 است.

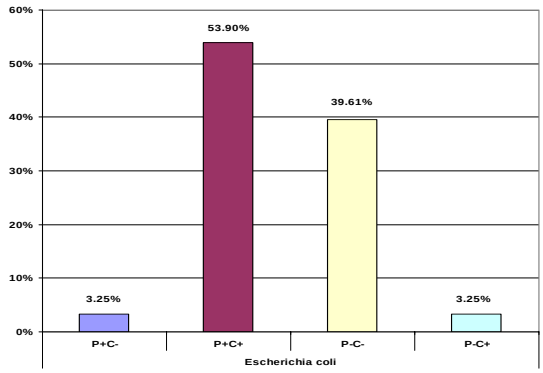
نمودار ۲ توزیع فراوان ایزوله‌های بالینی اشریشیاکلی تولیدکنندهٔ آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC در جمعیت مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

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

نمودار ۳ نشان‌دهنده توزیع فراوانی ایزوله‌های اشریشیاکلی واجد خانواده‌های ژنی کدکنندهٔ آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC است.

تصویر ۱ 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

Ladder و وزن مولکولی تقریبی آن‌ها مشخص شده است.

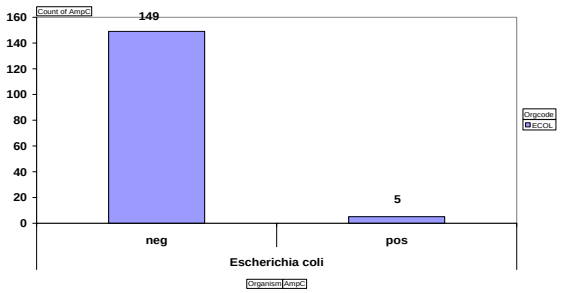


نمودار ۱. توزیع فراوانی میزان شیوع ایزوله‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف نوع AmpC و ESBL در جامعه مورد مطالعه

(فنوتیپ P^+): چنانچه برای هریک از سویه‌های نتایج آزمایش تعیین MIC برای هریک آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفپیم از $1\ ^{\mu g}/_{ml}$ بود، سویه مزبور به‌عنوان یک تولیدکنندهٔ بالقوهٔ آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف با P^+درنظر گرفته شد.

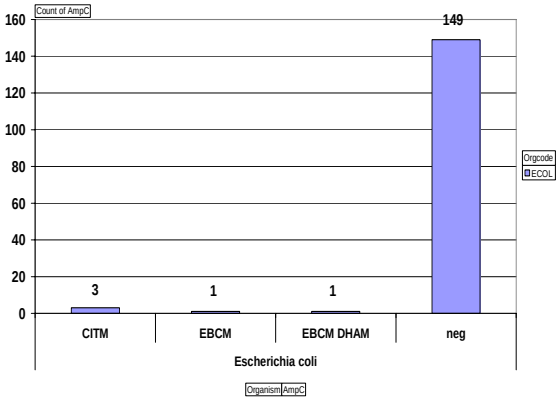
(فنوتیپ P^+C^+): در صورتی که MIC حداقل یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها در ترکیب با کلاولانیک اسید سه مرتبه یا بیش‌تر از MIC آن آنتی‌بیوتیک به تنهایی کاهش نشان می‌داد به‌عنوان تولیدکنندهٔ قطعی آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف یا P^+C^+ درنظر گرفته شد.

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



نمودار ۲. توزیع فراوان ایزوله‌های بالینی اشریشیاکلی تولیدکنندهٔ آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC

از مجموع ۱۵۴ ایزوله بالینی مورد مطالعه تعداد ۵ ایزوله دارای فنوتیپ P^+C^- و کاندید تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC بوده و ۱۴۹ سویه دارای فنوتیپ‌های دیگر (P^+C^+، P^-C^- و P^-C^+) بودند طبق تعریف شرایط تولید آنزیم مورد مطالعه را نداشتند.



نمودار ۳. توزیع فراوانی ایزوله های اشریشیاکلی واجد خانواده‌های ژنی کدکنندهٔ آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC

CITM: تعداد سه ایزوله از ایزوله‌های مورد مطالعه بر روی ژل آگاروز باندی 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.

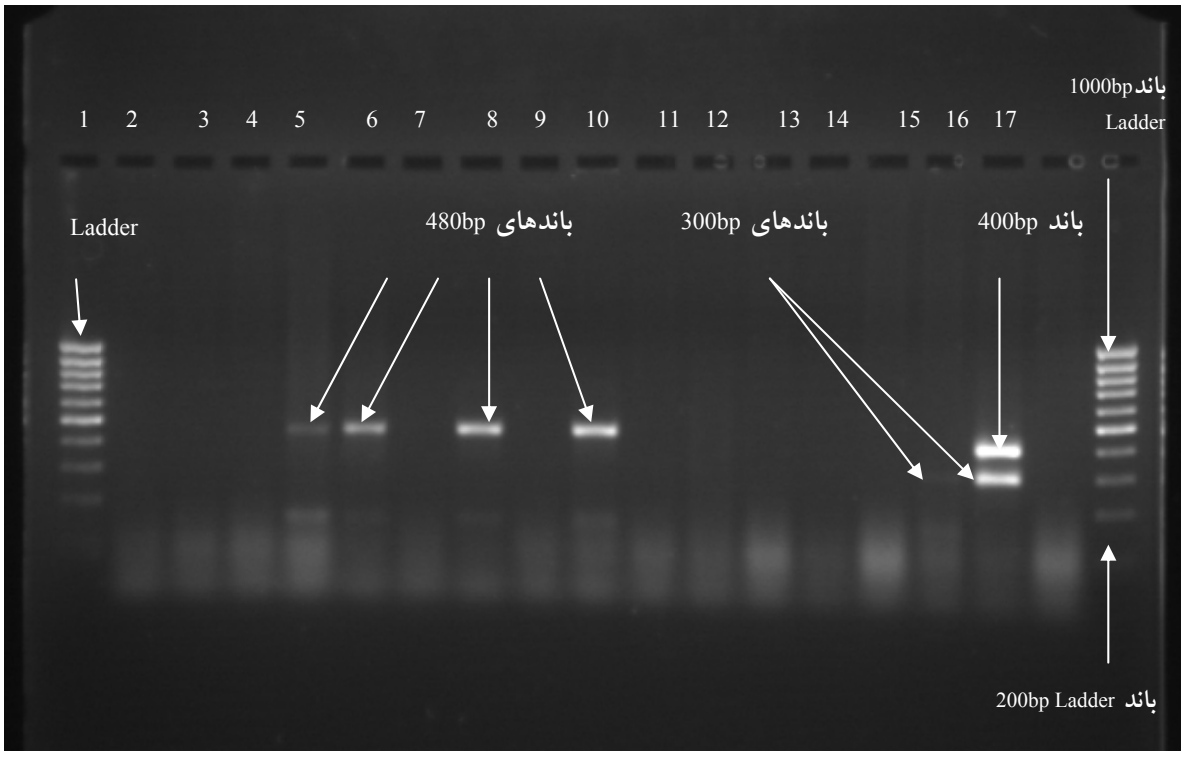
EBCM: یکی از ایزوله‌های مورد مطالعه بر روی ژل آگاروز باندی با وزن مولکولی برابر با آمپلیکون حاصل از پرایمر EBCM ایجاد کرد که ژن‌های هدف آن MIR-1 و ACT-1 می‌باشند.

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

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 آنتی‌بیوتیک تراپی ایفا کردند. در ابتدا شیوع آن‌ها در ارگانیسم‌هایی 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. ۲۰ سال قبل پلاسمیدهای واسطهٔ مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در اشریشیاکلی و دیگر اعضای خانوادهٔ انتروباکتریاسه شناخته شدند که اغلب حامل ژن‌های کدکنندهٔ 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[۱۳]. آنزیم AmpC کروموزومی در باکتری اشریشیاکلی به مقدار کم تولید شده اما آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC با واسطهٔ پلاسمید می‌تواند به این ارگانیسم‌ها مقاومتی شبیه به مقاومت در ارگانیسم دارای بتالاکتاماز نوع AmpC کروموزومی اعطاء کند. بیش از ۲۰ نوع بتالاکتاماز نوع AmpC با واسطهٔ پلاسمید شناخته شده است. از نظر خواص بتالاکتامازهای نوع AmpC مقاومت به سفامایسین را به‌خوبی مقاومت به اکسی ایمینوبتالاکتامازها به‌وجود آورده و این آنزیم‌ها به مهار توسط کلاولانیک اسید مقاوم هستند. بتالاکتامازهای نوع AmpC با واسطهٔ پلاسمید که از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به‌دست آمد، اولین بار در سال ۱۹۸۹ از شهر سئول کره جنوبی گزارش شد[٤].

براساس یافته‌های این تحقیق از کل ۱۵٤ ایزولهٔ بالینی تحت آزمایش ۵۷/۱۵ درصد دارای فنوتیپ P^+ بودند. به این معنا که به‌صورت بالقوه توانایی تولید آنزیم‌های



تصویر ۱. باندهای تشکیل شده بر روی ژل آگاروز حاصل از محصولات PCR ایزوله‌های تحت مطالعه

- **شکاف‌های (Slots) شماره ۱ و ۱۹:** DNA Ladder
- **همه شکاف‌ها (به جز ۱، ٤، ۵ و ۱۹) حاوی محصولات حاصل از PCR ژن‌های استخراج شده از ایزوله‌های کاندید تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC است.**
- **شکاف ۵ حاوی محصول حاصل از PCR ژن *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 به‌عنوان کنترل مثبت و شکاف شماره ٤ 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 ارگانیسم 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.**

بتالاکتاماز وسیع‌الطیف ESBL را دارا بودند. سپس با قرارگرفتن در معرض ترکیب آنتی‌بیوتیک + مهاکننده (کلاولانیک اسید)، ۵۳/۹ درصد از این گروه از ایزوله‌ها کاهش MIC به اندازهٔ سه مرتبه یا بیش‌تر را نشان دادند که بیان کنندهٔ مهارشدن آنزیم بتالاکتاماز آن‌ها است. این گروه داری فنوتیپ P^+C^+ در نظر گرفته شدند. به عبارت دیگر این گروه تولیدکنندهٔ قطعی آنزیم بتالاکتاماز نوع ESBL بودند. ۵/۷ درصد از ایزوله‌ها کاهش MIC را نشان نداده به این معنی که به مهار توسط مهارکنندهٔ بتالاکتاماز مقاومت نشان داده (خصوصیت ویژهٔ سویه‌های تولیدکنندهٔ آنزیم‌های بتالاکتاماز نوع AmpC) و فنوتیپ P^+C^- برای آن‌ها درنظر گرفته شد. ایزوله‌های دارای فنوتیپ P^+C^- از نظر مقاومت به سفوکسیتین مورد بررسی قرار گرفتند که ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها مقاومت بالای ۱۲۸ 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 ۵/۷ درصد ایزوله‌ها (n =۵) واجد ژن‌های بتالاکتاماز نوع AmpC هستند که از میان آن‌ها ۳/٤ درصد ایزوله‌ها (n=۳) روی ژل اگاروز باندهایی با وزن مولکولی تقریبی ٤۸۰bp به‌وجود آوردند که حاصل از پرایمر CITM با ژن‌های هدف LAT-1 تا LAT-4، BIL-1 و CMY-1 تا CMY-7 است. ۲/۳ درصد ایزوله‌ها (n=۲) باندهایی با وزن مولکولی تقریبی ۳۰۰bp 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 ۳۰۰bp، در ناحیه ٤۰۰bp نیز باند تشکیل داده بود که حکایت از وجود دو ژن مقاومت دارویی در ارگانیسم مذکور است. با توجه به وزن مولکولی تقریبی ٤۰۰bp، 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 گذشت موارد متعددی از سویه‌های تولید کنندهٔ آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC گزارش شده است. در سال ۱۹۹۸ 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 ۲ درصد گزارش شد[۱٤].

بتالاکتاماز قابل القاء نوع DHA-1 برای اولین بار در سال ۱۹۹۸ از عربستان سعودی و بعداً در سال ۲۰۰۲ از

تایوان گزارش شد. بتالاکتامازهای نوع AmpC کد شده توسط پلاسمید در ٤ درصد از ایزوله‌های اشریشیاکلی که از ۲۵ منطقه از ناحیهٔ مرکزی ایالات متحده انتخاب شده بودند، یافت شدند. در سال ۲۰۰۳، ۲۰/۷ درصد ارگانیسم مولد این آنزیم در بین باکتری‌های گرم منفی یکی از بیمارستان‌های دهلی نو گزارش شد[١٤].

همچنین سورانجان آرورا و دیگران در سال ۲۰۰۵ از بین ٢٨٤ سویه، ۲۷ سویهٔ مقاوم به سفوکسیتین را جداسازی کردند که از بین آن‌ها ٦/٦٩ درصد سویه‌ها (n=١٩) دارای بتالاکتاماز نوع AmpC، ١/٤ درصد، (n=٤) دارای بتالاکتاماز نوع AmpC با واسطهٔ پلاسمید و ١/٤ درصد سویه‌ها (n=٤) تولیدکنندهٔ آنزیم نبودند. از بین ۲۳ تولیدکنندهٔ آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC، ٤٧/٨ درصد (n=١١) اشریشیاکلی، ۱۷/۳ درصد سویه‌ها (n=٤) پسودوموناس، ۱۳ درصد سویه (n=٣) کلبسیلاپنومونیه و ٤/٣ درصد سویه‌ها (n=١) کلبسیلا آئروژینوزا بودند. در نقاط مختلف جهان درصدهای مختلفی از شیوع بتالاکتامازهای نوع AmpC گزارش شده است[٨].

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، شیوع ۵/۷ درصدی ایزوله‌های اشریشیاکلی تولیدکنندهٔ آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC در مقایسه با نتایج به‌دست آمده از نقاط مختلف جهان (چین ۲ درصد، ناحیه مرکزی آمریکا ٤ درصد، هند ۲۰/۷ درصد و نتایج به‌دست آمده توسط سورانجان آرورا ٦/٦٩ 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

1. Bradford Patricia A. Extended-spectrum ß-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clinical Microbiology Reviews 2001; 14(4):933-51.
2. Babic M, Hujer AM and Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. Drug Resistance Updats 2006; 9(3)142-56.
3. Paterson D L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. American Journal of Infection Control 2006; 34(5) S20-S28.
4. Philipon Alian, Arlet Guillaume, Jacoby A Goerge. Plasmid-Determined AmpC-Type ß -lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002; 46(1)1-11.
5. Poirel L, Pitout JD and Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. Future Microbiology 2007; 2:501-12
6. 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
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
8. Arora S, Bal M. AmpC beta-lactamase producing bacterial isolates from Kolkata hospital. Indian Journal of Medicin2005;122:224-33
9. 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.
10. Betty A. Forbes, Daniel F. Sahm, Alice S. Weissfeld. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier. 2007.
11. Wayne Pa. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement. National committee for Clinical Laboratory Standards 2005.
12. Reisbig MD, Hossain A, Hanson ND. Factors influencing gene expression and resistance for gram–negative organisms expressing plasmid–encoded AmpC genes of Entrobacter origin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2003; 51:1141-51.
13. Sanders, CC. Chromosomal cphalosporinases responsible for multiple resistances to newer β–lactam antibiotics. Clinical Microbiology Reviews 1987; 41:573-593.
14. 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.