DOI: 10.22100/jkh.v18i2.3126

مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۸، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقاله پژوهشی

شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت بتالاکتامازی AmpC و ESBL در سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری

نسیمه علیزاده درزه کنانی[۱]، لیلا جبل عاملی[۱]، رضا بیگ وردی[۲]، فرشته جبل عاملی[۲*]

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

۲- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۲، **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۱۱/۲۳

چکیده

مقدمه: *اشریشیا کلی یکی از پاتوژن‌های اصلی ایجادکننده عفونت ادراری است. ظهور اشریشیاکلی تولیدکننده بتالاکتامازهای طیف گسترده (ESBLs) و بتالاکتامازهای AmpC یک مشکل رو به افزایش در سراسر جهان است که ممکن است منجر به شکست درمان آنتی‌بیوتیکی و حتی مرگ و میر در بیماران شود. در این مطالعه شیوع فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت بتالاکتامازی در سویه‌های بالینی اشرشیاکلی جدا شده از ادرار مورد بررسی قرار می‌گیرد.*

مواد و روش‌ها: *۲۳۱ سویه اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های عفونت ادراری از بیمارستان مرکز پزشکی کودکان تهران جمع‌آوری گردید. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک تعیین شد. ایزوله‌های تولیدکننده ESBL با آزمایش دیسک ترکیبی شناسایی شدند و تولید بتالاکتاماز AmpC به‌صورت غربالگری اولیه ارزیابی شد. ژن‌های کدکننده بتالاکتاماز با روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی شدند.*

نتایج: *تمام جدایه‌ها به آمپی‌سیلین و سفازولین مقاوم بودند. میزان مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها به شرح زیر بود: تری‌متوپریم سولفومتوکسازول ۸۵/۷ درصد، جنتامیسین ۳۷/۶ درصد، لووفلوکساسین ۳۵/۹ درصد و سفوکسیتین ۲۴/۶ درصد. حساسیت بالایی نسبت‌به مروپنم و نیتروفورانتوئین مشاهده شد. ۸۱/۵ درصد جدایه‌ها تولیدکننده ESBL بودند. میزان شیوع CTX-M، SHV و TEM در بین جدایه‌های تولیدکننده ESBL به‌ترتیب ۱۰۰، ۳۵ و ۴۶/۷ درصد بود. در بین ۶۸ تولیدکننده احتمالی AmpC، CIT و FOX به‌ترتیب بیشترین و کمترین شیوع ژن را داشتند.*

نتیجه‌گیری: *استفاده از تکنیک‌های فنوتیپی و مولکولی برای تعیین مشخصات الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و حضور ژن‌های مقاومت در بین جدایه‌های اشریشیاکلی به‌منظور دستیابی به یک درمان مؤثر آنتی‌بیوتیکی توصیه می‌شود.*

واژه‌های کلیدی: اشرشیا کلی، عفونت مجاری ادرار، **ESBLs**، **AmpC**.

***نویسنده مسئول:** استادیار گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، انتهای رجایی شهر، مجتمع دانشگاهی امیرالمومنین، دانشگاه آزاد اسلامی کرج- کرج- تهران، **تلفن:** ۰۹۱۲۳۱۱۰۹۸۵، **نمابر:** ۰۲۱۸۹۵۵۸۱۰، **Email:** jabalamf@tums.ac.ir

ارجاع: علیزاده درزه کنانی نسیمه، جبل‌عاملی لیلا، بیگ‌وردی رضا، جبل‌عاملی فرشته. شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت بتالاکتامازی AmpC و ESBL در سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۲؛۱۸(۲):۸-۱.

مقدمه

اشریشیا کلی یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب است که بیش از ۸۰ درصد از عفونت‌های مجاری ادراری را ایجاد می‌کند (۱). اگرچه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به‌طور گسترده برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری استفاده می‌گردد، به‌دلیل افزایش نرخ بروز مقاومت نسبت‌به این آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان عفونت‌های مجاری ادراری به‌طور فزآینده‌ای بحث‌برانگیز شده است (۲). یکی از رایج‌ترین مکانیسم‌های مقاومت نسبت‌به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشد (۳). اشرشیاکلی‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای طیف گسترده (Extended Spectrum beta Lactamases, ESBLs) و AmpC به‌طور مداوم به برخی یا همه سفالوسپورین‌ها مقاوم هستند. با این حال، ESBLs توسط مهارکننده‌های بتالاکتام مهار می‌شوند و سفامایسین‌ها را هیدرولیز نمی‌کنند، در حالی که آنزیم‌های AmpC توسط مهارکننده‌های کلاسیک بتالاکتام مهار نمی‌شوند و به سفامایسین‌ها مقاومت می‌دهند، اما به‌طور مؤثر سفپیم را هیدرولیز نمی‌کنند (۴، ۵ و ۶). اکثر ESBLها را می‌توان به چندین گروه اصلی مانند تمونیرا (TEM)، متغیر سولفیدریل (SHV) و سفوتاکسیمازها (CTX-M) دسته‌بندی کرد (۷ و ۸). اکثر ESBLها از طریق جهش در آنزیم‌های TEM کلاسیک و SHV ایجاد شده و بتالاکتامازهای نوع CTX-M اهمیت بیشتری پیدا کرده (۹) و شایع‌ترین ESBLs می‌باشند (۸ و ۱۰). آنزیم‌های ESBL خانواده TEM، SHV و CTX-M اغلب در طیف وسیعی در انتروباکتریاسه‌ها یافت می‌شوند (۱۱ و ۱۲). با این حال، اکثر سویه‌های تولیدکننده ESBL اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه می‌باشند (۱۳). در باکتری‌های گرم منفی، تولید بتالاکتاماز AmpC به‌واسطه کروموزوم یا پلاسمید انجام می‌شود. ژن‌های کروموزومی AmpC به طور اساسی در سطح پایینی بیان می‌شوند (۱۴). منشا پلاسمید بتالاکتاماز AmpC، انتقال ژن‌های کروموزومی به پلاسمید می‌باشد و به شش خانواده (EBC، FOX، CIT، ACC، DHA، MOX) تقسیم می‌شوند (۱۵، ۱۶ و ۱۷). باکتری‌های تولیدکننده چنین آنزیم‌هایی، به چند دارو مقاوم می‌شوند (Multiple Drug Resistance, MDR) که منجر به گزینه‌های درمانی محدودی برای عفونت‌ها می‌شود (۱۸). از سوی دیگر، افزایش شیوع باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، به‌عنوان یکی از بزرگترین چالش‌ها در کنترل عفونت‌ها، ممکن است منعکس‌کننده لزوم استفاده از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی برای تعیین الگوی مقاوم به آنتی‌بیوتیک در بین جدایه‌ها یا ژن‌های مسئول چنین توانایی به باکتری‌های پاتوژن باشد. بنابراین، این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تشخیص فنوتیپی تولیدکنندگان ESBL و AmpC و همچنین بررسی حضور ژن‌های کدکننده بتالاکتاماز در جدایه‌های به‌دست آمده از کودکان بستری مبتلا به عفونت ادراری در بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی کودکان مبتلا به عفونت ادراری و بستری در بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران انجام شد. در مجموع ۲۳۱ ایزوله‌ی اشرشیاکلی از نمونه ادرار این بیماران در طی ۴ سال جمع‌آوری گردید. در آزمایشگاه گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران با انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی ایزوله‌های اشرشیا کلی تأیید شدند (۱۹). تمامی سویه‌ها تا زمان سایر آزمایش‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد در محیط تریپتی کیس سوی برات (شرکت کوندا، کشور اسپانیا) حاوی ۳۰ درصد گلیسرول نگهداری شدند.

جهت تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها از روش انتشار دیسک (Kirby Bauer) بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI) استفاده گردید (۲۰). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت MAST (انگلستان) تهیه شد که عبارتند از آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، نیتروفورانتوئین (۱۰ میکروگرم)، سفازولین (۱۰ میکروگرم)، لووفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، تری متوپریم–سولفومتوکسازول (۱۰ میکروگرم). از سویه اشرشیاکلی ATCC 25922 عنوان سویه کنترل استفاده شد.

مقاومت به چند دارو (MDR) به‌عنوان عدم حساسیت به بیش از ۱ عامل از حداقل سه کلاس مختلف آنتی‌بیوتیکی تعریف شد (۲۱). برای غربالگری ایزوله‌های مولد ESBL، آزمون تأییدی فنوتیپی به روش دیسک ترکیبی با دیسک‌های حاوی سفتازیدیم (۱۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۲۰ میکروگرم) به تنهایی یا در ترکیب با اسید کلاوولانیک (۱۰ میکروگرم) انجام شد (۲۲). افزایش قطرهاله بیش از ۵ میلی‌متر در دیسک ترکیبی نسبت‌به دیسک‌های تک دارو نشان‌دهنده تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز ESBL بود. جدایه‌های باکتریایی برای تولید احتمالی AmpC با آزمایش حساسیت آنها به سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) با استفاده از روش انتشار دیسک Kirby Bauer غربالگری شدند. جدایه‌هایی با قطر هاله کمتر از ۱۸ میلی‌متر به‌عنوان مثبت نشان داده شدند (۲۳).

جهت تعیین حضور ژن‌های آنزیم‌های بتالاکتاماز شامل blaTEM، blaTEM-1، blaCTX-M group، blaCTX-M-1 group، blaCTX-M-8 group، blaCTX-M-25 group، blaCTX-M-9 group و blaSHV از آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (شرکت پیشگام، کشور ایران) انجام گرفت. در جدول ۱ مشخصات پرایمرها آمده است.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای ژن‌های مقاومت بتالاکتامازی

ژن	پرایمر (´3-´5)	دمای آنیلینگ	اندازه محصول (bp)	رفرانس
blaSHV	F-TCAGCGAAAAACACCTTG R-TCCCGCAGATAAATCACC	۴۹	۴۲۷	(۲۵)
blaTEM	F-CTTCCTGTTTTTGCTCACC R-AGCAATAAACCAGCCAGC	۵۴	۶۳۶	(۲۵)
blaTEM-1	F-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA R-GACAGTTACCAATGCTTAATC	۴۸	۱۰۷۰	(۲۵)
blaCTX-M	F-CGCTTTGCGATGTGCAG R-ACCGCGATATCGTTGGT	۵۲	۵۵۰	(۲۶)
blaCTX-M-1	F- GGT TAA AAA ATC ACT GCG TC R- TTG GTG ACG ATT TTA GCC GC	۵۲	۸۶۴	(۲۶)
blaCTX-M-9	F- ATG GTG ACA AAG AGA GTG CA R- CCC TTC GGC GAT GAT TCT C	۵۳	۸۷۰	(۲۶)
blaCTX-M-8	F-TCGCGTTAAGCGGATGATGC R-AACCCACGATGTGGGTAGC	۵۵	۶۸۸	(۲۷)
blaCTX-M-25	F-GCACGATGACATTCGGG R-AACCCACGATGTGGGTAGC	۵۳	۳۴۷	(۲۷)

استخراج DNA جدایه‌ها با استفاده از روش جوشاندن انجام گرفت (۲۴). به این منظور مقدار ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و سپس مقداری از کلنی‌های باکتری به لوله اپندرف اضافه گردید و به مدت ۱۲ دقیقه در حرارت آب جوش قرار داده شد. سپس در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و پس از اتمام سانتریفیوژ، مایع‌رویی آن در شرایط استریل در یک لوله دیگر به عنوان الگو برای انجام آزمون مولکولی استفاده شد. مقادیر واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (شرکت سیناژن)، ۵/۵ میکرولیتر آب تزریقی، ۱ میکرولیتر پرایمر فوروارد، ۱ میکرولیتر پرایمر ریورس و ۵ میکرولیتر از نمونه‌ی DNA بود. شرایط انجام واکنش بر اساس رفرانس‌های مربوطبه پرایمرها اجرا گردید (۲۸-۲۴). محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز (w/v) ۱٪ الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی روی سیستم ژل داک (Biorad، UK) مشاهده شدند. کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 به‌عنوان سویه شاهد استفاده شد.

نتایج

نتایج الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. از بین ۲۳۱ اشرشیاکلی جدا شده از عفونت‌های ادراری، هیچکدام به مروپنم مقاوم نبودند، اما همه آنها به دو آمپی‌سیلین و سفازولین مقاوم بودند. سپس بیشترین مقاومت نسبت‌به تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول (۸۵/۷ درصد) مشاهده شد. بر اساس نتایج حاصل بیش از ۵۰ درصد از جدایه‌ها به جنتامیسین، لووفلوکساسین، سفوکسیتین و نیتروفورانتوئین حساس بودند. با توجه به تعریف مقاومت چندگانه، ۱۳۰ جدایه به‌عنوان MDR شناسایی شدند. الگوهای مختلف آنتی‌بیوتیک در بین جدایه‌های MDR در جدول ۳ نشان داده شده است.

با روش دیسک ترکیبی نشان داده شد که ۱۸۸ جدایه از ۲۳۱ ایزوله اشریشیاکلی (۸۱/۴٪) از نظر فنوتیپی تولیدکننده ESBL می‌باشند. ۶۸ جدایه (۲۹/۴۳٪) به‌عنوان تولیدکننده احتمالی AmpC شناسایی شدند. ژن‌های کدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز به‌طور جداگانه توسط PCR ردیابی شدند و قطعات با اندازه‌های مورد انتظار روی ژل آگارز (w/v) ۱٪ شناسایی شد. تمام ایزوله‌های اشرشیا کلی مولد ESBL حامل ژن‌های نوع CTX-M بودند. در بین جدایه‌های AmpC مثبت، شایع‌ترین ژن CIT بود. شیوع همه ژن‌های بتالاکتاماز در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۲- الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های اشرشیاکلی

آنتی‌بیوتیک	تعداد (٪)		
	مقاوم	متوسط	حساس
آمپی‌سیلین	۲۳۱ (۱۰۰)	۰	۰
سفازولین	۲۳۱ (۱۰۰)	۰	۰
تری متوپریم سولفامتوکسازول	۱۹۸ (۸۵/۷)	۲ (۰/۸)	۳۱ (۱۳/۵)
جنتامیسین	۸۷ (۳۷/۶)	۳ (۳/۱)	۱۴۱ (۶۱/۱)
لووفلوکسازین	۸۳ (۳۶)	۲ (۰/۸)	۱۴۶ (۶۳/۲)
سفوکسیتین	۵۷ (۲۴/۶)	۱۱ (۴/۷)	۱۶۳ (۷۰/۶)
نیتروفورانتئین	۳ (۱/۳)	۱۲ (۲/۵)	۲۱۶ (۹۳/۵)
مروپنم	۰	۱ (۰/۵)	۲۳۰ (۹۹/۵)

جدول ۳- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک در سویه‌های MDR

الگوی مقاومت	تعداد (٪)
AP, NI, GM, TS, LV, FOX	۱ (۰/۷۶)
AP, GM, TS, LV, FOX	۱۳ (۱۰)
AP, GM, TS, LV	۲۶ (۲۰)
AP, GM, TS, FOX	۹ (۶/۹۲)
AP, TS, LV, FOX	۱۱ (۸/۴۶)
AP, GM, NI, TS	۱ (۰/۷۶)
AP, TS, FOX	۱۸ (۱۳/۹)
AP, TS, LV	۲۱ (۱۶/۱۵)
AP, GM, TS	۲۳ (۱۷/۷)
AP, GM, LV	۵ (۳/۹)
AP, FOX, LV	۱ (۰/۷۶)
AP, NI, TS	۱ (۰/۷۶)
Total MDR	۱۳۰ (۱۰۰)

GM, Gentamicin; NI, Nitrofurantoin; LV, Levofloxacin; FOX, Cefoxitin; AP, Ampicilin; TS, Trimethoprim/Sulfamethoxazole;

از بین ۱۳۰ ایزوله MDR، ۱۰۱ ایزوله از نظر فنوتیپی ESBL مثبت و ۲۹ ایزوله دیگر ESBL منفی بودند. وجود همزمان ژن‌های بتالاکتاماز در بین ایزوله‌های تولیدکننده ESBL نیز در جدول ۵ آمده است. نتایج نشان داد که بیش از نیمی از جدایه‌ها دارای هر دو ژن CTX-M و TEM بوده، در حالی که حدود ۲۴ درصد از آنها حاوی هر سه ژن تولیدکننده ESBL بودند.

جدول ٤- فراوانی نسبی و مطلق ژن‌های ESBLو AmpC

ژن‌های ESBL (تعداد کل= ۱۸۸ ایزوله)					
SHV	TEM	CTX-M			
	TEM-1	CTX-M25	CTX-M9	CTX-M8	CTX-M-1
۸۱(۴۳)	۶۲(۳۲/۹۷)	۰(۰)	۴۴(۲۰/۴۰)	۶۲(۳۲/۹۹)	۱۵۳(۸۱/۳۸)
ژن‌های AmpC (تعداد کل= ۶۸ ایزوله)					
FOX	MOX	DHA	ACC	EBC	CIT
۰(۰)	۴۸(۷۰/۵۸)	۳۲(۴۷/۰۵)	۱۴(۲۰/۵۸)	۴۴(۴۶/۷۰)	۵۲(۷۶/۴۷)

جدول ۵- حضور همزمان ژن‌هایESBL در ایزوله‌های اشرشیاکلی

ESBL ژن‌های	تعداد (٪)
CTX-M, TEM	۱۰۸ (۵۷/۵)
CTX-M SHV	۸۱ (۴۳)
TEM, SHV	۴۶ (۲۴/۵)
CTX-M-1, CTX-M-8	۵۲ (۲۷/۶)
CTX-M-1, CTX-M-9	۳۶ (۱۹/۱)
CTX-M-9, CTX-M-8	۱۸ (۹/۵)
CTX-M, SHV, TEM	۴۶ (۲۴/۵)
TEM, SHV, CTX-M-1	۴۰ (۲۱/۲)
TEM, SHV, CTX-M-8	۱۹ (۱۰)
TEM, SHV, CTX-M-9	۹ (۴/۷)
CTX-M-1, CTX-M-8, CTX-M-9	۱۶ (۸/۵)
TEM-1, CTX-M-1, CTX-M-8, CTX-M-9	۸ (۴/۲)

بحث

میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه به‌ویژه اشرشیاکلی به سرعت در حال افزایش است، به‌ویژه مقاومت به فلوروکینولون‌ها و سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم. علاوه بر این، بتالاکتامازهای با طیف گسترده (ESBLs) علت اصلی مقاومت دارویی در میان این سویه‌های باکتریایی هستند و تولید ESBLs منجر به مقاومت در برابر بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شود (۲۹). با این حال، شباهت و تفاوت‌هایی در فراوانی نسبی سویه‌های اشرشیاکلی مولد ESBL وجود دارد که بیشتر به شرایط منطقه‌ای و جغرافیایی منطقه مورد مطالعه و همچنین به روش درمان آنتی‌بیوتیکی و استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف بستگی دارد (۳۰). قابل توجه است، شیوع بالای اشرشیاکلی تولیدکننده ESBL در ایران نیازمند سیستم‌های مراقبت بهداشتی فعال برای نظارت بر حضور و انتشار این ارگانیسم‌ها است (۳۱).

بر اساس نتایج حاضر، تمام ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و سفازولین مقاوم بودند که استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها را برای درمان تجربی یا پروفیلاکسی بیماران مبتلا به عفونت ادراری نامناسب می‌کند. علاوه بر این، مقاومت به تری متوپریم/ سولفامتوکسازول در بیش از ۸۵ درصد از جدایه‌ها مشاهده شد. بر این اساس، به‌دلیل مقاومت گسترده به این داروها، کوتریموکسازول به تدریج از سال ۲۰۰۰ با فلوروکینولون‌ها جایگزین شد (۳۲). مطالعه‌ی حاضر و همچنین تحقیقات تادیس و همکاران (۳۳) روند رو به افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند آمپی‌سیلین، جنتامیسین، تتراسایکلین و تری متوپریم/سولفامتوکسازول را تأیید کردند. در این بررسی بیشترین حساسیت به مروپنم (۹۹/۵٪) به‌دست آمد که این نتیجه مشابه نتایج مطالعه صدیقی و همکاران است که حساسیت بالا را نسبت‌به آنتی‌بیوتیک کار با پنم دیگر، ایمی‌پنم (۹۶/۷٪) گزارش کردند (۳۴). با توجه به حساسیت بالا به نیتروفورانتوئین (بیش از ۹۰٪)، این دارو گزینه‌ای مناسب برای درمان عفونت‌های ادراری می‌باشد، با این حال Tankhiwale و همکاران ایزوله‌هایی با حساسیت پایین (حدود ۶۰ درصد) به این آنتی‌بیوتیک را گزارش کردند (۳۵). شیوع بالای باکتری‌های MDR به‌عنوان عامل عفونت مجاری ادرار با استفاده مکرر از آنتی‌بیوتیک‌ها برای بیماران مرتبط می‌باشد. از بین آنها اشرشیاکلی اوروپاتوژنیک شایع‌ترین گونه‌های جدا شده است که قادر به زنده ماندن در برابر درمان آنتی‌بیوتیکی بوده و منجر به عود عفونت می‌گردد (۳۶ و ۳۷). نتایج ما نشان داد که بیش از نیمی از جدایه‌ها MDR بوده که با مطالعه‌ی یزدی و همکاران همخوانی دارد (۳۸). شایع‌ترین الگوی مقاومت جدایه‌های MDR در برابر آمپی‌سیلین، جنتامیسین و تری‌متوپریم/سولفامتوکسازول مشاهده شد. با این حال، در یک مطالعه مقطعی انجام شده در مکزیک (۳۹) میزان جدایه‌های MDR بیشتر بود. تفاوت مشاهده شده بین نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطالعه حاضر و سایر تحقیقات ممکن است به الگوی متفاوت استفاده از آنتی‌بیوتیک، تنوع منطقه‌ای و استفاده‌ی بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها مربوط باشد.

بر اساس این مطالعه میزان شیوع ایزوله‌های اشریشیاکلی مولد ESBL (حدود ۸۰ درصد) با گزارش‌های ارایه شده از شمال (۴۰) و جنوب ایران (۴۱) قابل مقایسه است. شیوع کمتر این گروه از باکتری‌ها در کشورهای دیگر مانند مصر (۳۶٪) و عربستان سعودی (۳۳٪) مشاهده شد (۴۲ و ۴۳). افزایش شیوع و گسترش جهانی ژن‌های ESBL مانند آنزیم‌های CTX-M که با فنوتیپ‌های MDR مرتبط هستند، به یک نگرانی اصلی تبدیل شده است (۴۶-۴۴). در مطالعه حاضر، بررسی ژن‌های کدکننده ESBL نشان داد که CTX-M شایع‌ترین ژن مقاوم (۱۰۰ درصد) در جدایه‌های اشریشیاکلی می‌باشد که با نتایج سایر مطالعاتی که TEM و SHV به‌عنوان شایع‌ترین ژن در بین جدایه‌ها گزارش شده، مغایرت داشت (۴۰ و ۴۷). با این حال، شیوع ۱۰۰ درصدی تولید CTX-M در مطالعه حاضر ممکن است یک گزارش هشداردهنده باشد زیرا وجود این ژن به‌طور قابل توجهی با مقاومت به فلوروکینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها و همچنین کاهش حساسیت به سفوتاکسیم و سفتریاکسون ارتباط دارد و در نتیجه منجر به افزایش سویه‌های مقاوم به چند دارو می‌شود (۳). طبق نتایج ما، اکثریت CTX-M متعلق به گروه TX-M-1 (۳/۸۱٪) بود، که مشابه نتایج سایر مطالعات می‌باشد (۴۸ و ۴۹). وجود همزمان ژن‌های بتالاکتاماز در ایزوله‌های اشرشیاکلی در بسیاری از مطالعات گزارش شده است (۳۹، ۵۰ و ۵۱). با این حال، شیوع همزمان سه ژن بتالاکتاماز در مطالعه حاضر (۲۴٪) بیشتر از سایر مطالعات انجام شده در ایران بود (۵۲ و ۵۳). از بین ژن‌های AmpC شناسایی‌شده در مطالعه حاضر، ژن‌های CIT و MOX ژن‌های غالب بودند. این نتیجه مطابق با یافته‌های قبلی انجام شده توسط ییلماز و همکاران است (۵۴) اما مخالف با تحقیقات دیگری است که در چین انجام شده است که ژن DHA را به‌عنوان رایج‌ترین ژن مقاومت AmpC گزارش کرده است (۲۸).

این مطالعه اهمیت جداسازی ایزوله‌های اشرشیاکلی از عفونت‌های ادراری با مقاوم بالا نسبت‌به آنتی‌بیوتیک‌ها، ظهور سویه‌های MDR، را نشان می‌دهد. از سوی دیگر، از آنجا که الگوی مقاومت باکتریایی به‌طور مداوم در حال تغییر است، نظارت بر حساسیت ضدمیکروبی به بخش مهمی از ارایه اطلاعات در مورد ارگانیسم‌های بیماری‌زا جدا شده از بیماران و مناسب‌ترین راه برای انتخاب درمان مناسب و مؤثر ضدمیکروبی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح پژوهشی به شماره ۹۷-۰۲-۳۰-۳۸۶۹۲ و با کد اخلاق به شماره IR.TUMS.MEDICINE.REC.1397.256 اخذ شده از دانشگاه علوم پزشکی تهران است. هیچگونه تعارض منافعی از سوی نویسندگان گزارش نشده است. مقاله توسط تمام نویسندگان خوانده شده و مورد قبول قرار گرفته است پژوهشگران بر خود الزم می‌دانند که از تمامی مشارکت‌کنندگانی که که در این پژوهش همکاری کردند تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Piatti G, Mannini A, Balistreri M, Schito AM. Virulence factors in urinary Escherichia coli strains: phylogenetic background and quinolone and fluoroquinolone resistance. J Clin Microbiol 2008;46:480-7. doi: 10.1128/JCM.01488-07
2. White B. Diagnosis and treatment of urinary tract infections in children. Am Fam Physician 2011;83:409-15.
3. Peirano G, Pitout JDD. Molecular epidemiology of Escherichia coli producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25: H4. Int J Antimicrob Agents 2010;35:316-21. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.11.003
4. Paterson DL, Bonomo R. Extended-spectrum -lactamase: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005;18:657-86. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005
5. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis 2008;8:159-66. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70041-0
6. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2009;22:161-82. doi: 10.1128/CMR.00036-08
7. Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum β-Lactamases: the CTX-M Enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1-14. doi: 10.1128/AAC.48.1.1-14.2004
8. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Perilli M, et al. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:2700-6. doi: 10.1128/AAC.00068-06
9. Kaur M, Aggarwal A. Occurrence of the CTX-M, SHV and the TEM genes among the extended spectrum beta-lactamase producing isolates of Enterobacteriaceae in a tertiary care hospital of north india. J Clin Diagn Res 2013;7:642-5. doi: 10.7860/JCDR/2013/5081.2872
10. Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 602-604. doi: 10.1128/AAC.46.2.602-604.2002
11. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended spectrum enzymes. Int J Antimicrob Agents 2000;14:137-42. doi: 10.1016/S0924-8579(99)00165-X
12. 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 S.typhimurium in Latvia. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:1980-4. doi: 10.1128/AAC.42.8.1980
13. Nathisuwan S, Burgess DS, Lewis JS. ESBLs: Epidemiology, detection and treatment. Pharmacotherapy 2007;21:920-8. doi: 10.1592/phco.21.11.920.34529
14. El-Hady SA, Adel LA. Occurrence and detection of AmpC b-lactamases among Enterobacteriaceae isolates from patients at Ain Shams University Hospital. Egypt J Med Hum Genet 2015;16:239-44. doi:10.1016/j.ejmhg.2015.03.001
15. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β-lactamases. Antimicrob Agents Chemotherapy 2010;54:969-76. doi:10.1128/AAC.01009-09
16. Mohamudha PR, Harish B, Parija S. Molecular description of plasmid-mediated AmpC β-lactamases among nosocomial isolates of Escherichia coli & Klebsiella pneumoniae from six different hospitals in India. Indian J Med Res 2012;135:114. doi: 10.4103/0971-5916.93433
17. Hussain M, Hasan F, Shah AA, Hameed A, Jung M, Rayamajhi N, et al. Prevalence of class A and AmpC b-lactamases in clinical Escherichia coli isolates from Pakistan Institute of Medical Science, Islamabad, Pakistan. Jpn J Infect Dis 2011;64:249252. doi: 10.7883/yoken.64.249

18. Yusuf I, Yusha'u M, Sharif AA, Getso MI, Yahaya H, Bala JA, Aliyu IA, Haruna M. Detection of metallobeta lactamases among gram negative bacterial isolates from Murtala Muhammad Specialist Hospital, Kano and Almadina Hospital Kaduna, Nigeria. Bayer J Pure Appl Sci 2012;5:84-8. doi:10.4314/bajopas.v5i2.15

19. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Bacterial identification methods in the microbiology laboratory. Enferm Infecc Microbiol Clin 2011;29:601-8. doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.012

20. Patel JP, Cockerill FR, Bradford PA, Eliopoulos GM, Hindler A. Laboratory standards institute, performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-second information supplement, wayne, pennsylvania. Clinical Laboratory Standards Institute Document M100-S22;2012;1-188.

21. Jafari Z, Harati AA, Haeili M, Kardan-Yamchi J, Jafari S, Jabalameli F, Meysamie A, Abdollahi A, Feizabadi MM. Molecular Epidemiology and Drug Resistance Pattern of Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Isolates from Iran. Microb Drug Resist 2019; 25:336-43. doi: 10.1089/mdr.2017.0404

22. Hsueha P, Kob W, Wuc J, Lud J, Wange F, Wuf H, et al. Consensus Statement on the Adherence to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines (CLSI-2010 and CLSI-2010-update) for Enterobacteriaceae in Clinical Microbiology Laboratories in Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2010;43:452-5. doi: 10.1016/S1684-1182(10)60070-9

23. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966;45:493-6.doi:10.1093/ajcp/45.4_ts.493

24. Varaiya A, Dogra J, Kulkarni M, Bhalekar P. Extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in diabetic foot infection. Indian J Med Microbiol 2008; 26:281-2. doi: 10.4103/0255-0857.42056

25. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, et al., Distribution of blaTEM, blaSHV, blaCTX-M genes among clinical isolated of Klebsiella pneumonia at Labbafinejad Hospital,Tehran, Iran. Microb Drug Resist 2010;16:53-49. doi: 10.1089/mdr.2009.0096

26. Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. FEMS Microbiol Lett 20029;209:161-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11126.x

27. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. J Antimicrob Chemother 2006;57:154-61. doi:10.1093/jac/dki412

28. Xiangqun Liu, Yongrui Liu Detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamase in Escherichia coli. Biomed Rep 2016;4:687-90. doi: 10.3892/br.2016.661

29. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. Perspect Med Chem 20146:25-64. doi:10.4137/PMC.S14459

30. Ngai KL, Wertheim HF, Phu Dinh V, Dung Thi KK, Hai Thanh L, Bich Thi NH, et al. High prevalence of hospital-acquired infections caused by gram-negative carbapenem resistant strains in Vietnamese pediatric ICUs. Medicine (Baltimore) 2016;95:1-7. doi:10.1097/MD.0000000000004099

31. Jabalameli L, Beigverdi R, Hagh Ranjbar H, Pouriran R, Jabalameli F, and Emaneini M. Phenotypic and Genotypic Prevalence of Extended-Spectrum b-Lactamase-Producing Escherichia coli: A Systematic Review and Meta-analysis in Iran. Microb Drug Resist 2021;27:73-86. doi:10.1089/mdr.2019.0396

32. Garrison J, Hooton TM. Fluoroquinolones in the treatment of acute uncomplicated urinary tract infections in adult women. Expert Opin Pharmaco 2001; 2:1227-37. doi:10.1517/14656566.2.8.1227

33. Tadesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ, et al. Antimicrobial drug resistance in Escherichia coli from humans and food animals, United States, 1950-2002. Emerg Infect Dis. 2012; 18:741-9. doi:10.3201/eid1805.111153

34. Sedighi I, Arabestani MR, Rahimbakhsh A, Karimitabar Z, Alikhani MY. Dissemination of Extended-Spectrum β-Lactamases and Quinolone Resistance Genes among Clinical Isolates of Uropathogenic Escherichia coli in Children. Jundishapur J Microbiol 2015;8:e19184. doi:10.5812/jjm.19184v2

35. Tankhiwale SS, Jalgaonkar SV, Ahamad S, Hassani U. Evaluation of extended spectrum betalactamase in urinary isolates. Indian J Med Res 2004;120:553-6.

36. Schito GC, Naber KG, Botto H, Palou J, Mazzei T, Gualco L, Marchese A, The ARESC study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. Int J Antimicrob Agents 2009;34:407-13. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.04.012

37. Muttersa NT, Mampela A, Kropidlowskia R, Biehlera K, Güntherb F, Băluc I, Malekc V, Franka U. Treating urinary tract infections due to MDR E. coli with Isothiocyanates - a phytotherapeutic alternative to antibiotics? Fitoterapia 2018;129:237-240. doi:10.1016/j.fitote.2018.07.012

38. Yazdi M, Nazemi A, Mirinargasi M, Jafarpour M, Sharifi SH. Genotypic versus Phenotypic methods to detect Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) in Uropathogenic Escherichia coli. Ann Biol Res 2012;3:2454-8.

39. Ramírez-Castillo FY, Moreno-Flores AC, Avelar-González FJ, Márquez-Díaz F, Harel J, Guerrero-Barrera AL. An evaluation of multidrug-resistant Escherichia coli isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico: cross-sectional study. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2018;17:34. doi:10.1186/s12941-018-0286-5

40. Rezai MS, Salehifar E, Rafiei A, Langaee T, Rafati M, Shafahi KH, Eslami G. Characterization of Multidrug Resistant Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli among Uropathogens of Pediatrics in North of Iran. BioMed Res Int 2015:309478. doi:10.1155/2015/309478

41. Malekzadegan Y, Rastegar E, Moradi M, Heidari H, Sedigh Ebrahim-Saraie H. Prevalence of quinolone-resistant uropathogenic Escherichia coli in a tertiary care hospital in south Iran. Infect Drug Resist 2019;12:1683-9. doi:10.2147/IDR.S206966

42. Elsayed TI, Ismail HA, Elgamal SA, Ahmed HA Gad. The Occurrence of Multidrug Resistant E. Coli which Produce ESBL and Cause Urinary Tract Infections. J Appl Microbiol Biochem. 2017; 2:8. doi:10.21767/2576-1412.100008

43. Alqasim A, Abu Jaffal A, Alyousef AA, Prevalence of Multidrug Resistance and Extended-Spectrum β-Lactamase Carriage of Clinical Uropathogenic Escherichia coli Isolates in Riyadh, Saudi Arabia. Int J Microbiol 2018;1-9. doi:10.1155/2018/3026851

44. Liu BT, Yang QE, Li L, Sun J, Liao XP, Fang LX, Yang SS, Deng H, Liu YH. Dissemination and characterization of plasmids carrying oqxAB-blaCTX-M genes in Escherichia coli isolates from food-producing animals. PLoS ONE 2013;8:e73947. doi:10.1371/journal.pone.0073947

45. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis 2008;8:159-66. doi:10.1016/S1473-3099(08)70041-0

46. Urban C, Mariano N, Bradford PA, Tuckman M, Segal-Maurer S, Wehbeh W, Grenner L, Colon-Urban R, Johnston B, Johnson JR, et al. Identification of CTX-M beta-lactamases in Escherichia coli from hospitalized patients and residents of long-term care facilities. Diagn Microbiol Infect Dis 2010;66:402-6. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.11.012

47. Tayebi Z, Heidari H, Kazemian H, Ghafoori SM, Boroumandi SH, Houri H. Comparison of quinolone and β-lactam resistance among Escherichia coli strains isolated from urinary tract infections. Le Infezioni in Medicina 2016;4:326-30.

48. Lartigue MF, Zinsius C, Wenger A, et al. Extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M type now in Switzerland. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:2855-60. doi:10.1128/AAC.01614-06

49. Mirzaee M, Owlia P, Mansouri S. Distribution of CTX-M β-lactamase Genes Among Escherichia coli Strains Isolated from Patients in Iran. Lab Med 2009;40:724-7. doi: 10.1309/LMUUWBHMZEDYTBW5

50. Sedighi I, Arabestani MR, Rahimbakhsh A, Karimitabar Z, Alikhani MY. Dissemination of Extended-Spectrum β-Lactamases and Quinolone Resistance Genes Among Clinical Isolates of Uropathogenic Escherichia coli in Children. Jundishapur J Microbiol 2015;25;8:e19184. doi:10.5812/jjm.19184v2

51. Karami P, Bazmamoun H, Sedighi I, Mozaffari Nejad AS, Aslani MM, Alikhani MY. Antibacterial resistance patterns of extended spectrum β-lactamase -producing enteropathogenic Escherichia coli strains isolated from children. Arab J Gastroenterol 2017;18:206-9. doi:10.1016/j.ajg.2017.11.004

52. Shahcheraghi F, Nasiri S, Noveiri H. The survey of genes encoding beta-lactamases, in escherichia coli resistant to beta-lactam and non-beta-lactam antibiotics. Iran J Basic Med Sci, 2010;13:230-7. doi: 10.22038/ijbms.2010.5068

53. Ghorbani-Dalini S, Kargar M, Doosti A, Abbasi P, Sarshar M. Molecular Epidemiology of ESBL Genes and Multi-Drug Resistance in Diarrheagenic Escherichia coli strains Isolated from Adults in Iran. Iran J Pharm Res 2015;14:1257-62.

54. Yilmaz NO, Agus N, Bozcal E, Oner O, Uzel A. Detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamase in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Indian J Med Microbiol 2013;31:53-9. doi:10.4103/0255-0857.108723

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2023; Vol 18, No 2

DOI: 10.22100/jkh.v18i2.3126

Original Article

Phenotypic and Genotypic Detection of AmpC and ESBL Beta-Lactamase Resistance in *Escherichia Coli* Strains Isolated from Patients with Urinary Tract Infections

Nasim Alizadeh-Darzehkanani (M.Sc.)[1], Leila Jabalameli (Ph.D.)[1], Reza Beigverdi (Ph.D.)[2], Fereshteh Jabalameli (Ph.D.)[2*]

1- Dept. of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
2- Dept. of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 2 January 2023**, Accepted:** 12 February 2023

Abstract:

Introduction*: Escherichia coli (E. coli) is one of the major pathogens causing urinary tract infection (UTI). The Spread of Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBL)/AmpC enzymes has become a major issue, particularly due to the antibiotic therapeutic failures that result in less favorable patient outcomes, including higher mortality. This study aimed to investigate the prevalence of phenotypic and genotypic beta-lactamase resistance in E. coli strains isolated from the urine sample.*

Methods: *A total of 231 E. coli isolates were collected from urine samples of patients from Tehran Children's medical center hospital between 2012 to 2015. The antibiotic resistance pattern of clinical isolates was determined by using the disk diffusion method. AmpC β-lactamases and ESBLs, alone and in combination, could reliably be detected using a disc diffusion method. Genes encoding beta-lactamases were detected by PCR method using β-lactamase gene-specific primers.*

Results*: All isolates of the present study were resistant to ampicillin and cefazoline. The resistance rate to other antibiotics was as follows: trimethoprim-sulfamethoxazole 85.7%, gentamicin 37.6%, levofloxacin 35.9%, and cefoxitin 24.6%. A high sensitivity rate was observed against meropenem and nitrofurantoin. Among collected isolates, 81.5% were ESBLs-producers. The prevalence of ESBLs production in CTX-M, SHV, and TEM was 100%, 35%, and 46.7%, respectively. Among 68 presumptive AmpC producers, CIT was the most prevalent detected gene, while FOX was the least seen.*

Conclusion*: Regarding the production of ESBL by some E. coli isolates, phenotypic detection for determining the antibiotic profile and resistance genes is recommended to formulate an effective antibiotic therapy.*

Keyword: Escherichia coli; Urinary tract infection; ESBLs; AmpC.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** F. Jabalameli , **Email**: jabalamf@tums.ac.ir*

Citation: Alizadeh-Darzehkanani N, Jabalameli L, Beigverdi R, Jabalameli F. Phenotypic and genotypic detection of AmpC and ESBL beta-lactamase resistance in Escherichia coli strains isolated from patients with urinary tract infections. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;18(2):1-8.