بررسی فراوانی تولید بتالاکتامازها و تنوع فعالیت آنزیمی در جدایه‌های *اشرشیاکلی* دارای مقاومت بالا از بیماران مبتلا به اسهال و عفونت‌های بیمارستانی

محمد رحیمی [۲و۱](M.Sc)، مرسده تاج‌بخش [۲](M.Sc)، مریم رزاقی [۲](M.Sc)، الهه تاج الدین [۲]((M.Sc)، مسعود آل‌بویه [۳و۲*](Ph.D)، معصومه رجبی‌بذل [۱](Ph.D) ، محمدرضا زالی [۳و۲](M.D)

۱- *دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی*

۲- *دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد*

۳- *دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماری‌های دستگاه گوارش*

چکیده

سابقه و هدف: مقاومت‌های چندداروییِ پرخطر می‌توانند در بین سویه‌های *اشرشیاکلی* انتشار یابند. مقاومت علیه داروهای بتالاکتام می‌تواند از طریق تولید آنزیم‌های مختلف بتالاکتاماز با طیف اثر متفاوت بروز یابد. در این مطالعه فعالیت بتالاکتامازی جدایه‌های بالینی مختلف *اشرشیاکلی* و ارتباط آن‌ها با فنوتیپ مقاومت دارویی و الگوهای پلاسمیدی مورد بررسی قرار داده شد.

مواد و روش‌ها: مقاومت دارویی جدایه‌های *اشرشیاکلی* از نمونه‌های مختلف بالینی به ده آنتی‌بیوتیک بتالاکتام توسط روش انتشار از دیسک، و غلظت حداقل مهاری (MIC) این جدایه‌ها علیه سفوتاکسیم توسط روش انتشار در آگار تعیین شد. آزمون یدومتری در حضور سفوتاکسیم به منظور تعیین فعالیت بتالاکتامازی جزء پری‌پلاسمیک از مخلوط پروتئینی این باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در پایان انتقال‌پذیری این فنوتیپ مقاومتی به *اشرشیاکلی* HB101 توسط ترانسفرماسیون به‌روش کلریدکلسیم انجام پذیرفت.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق موید فراوانی بالای فنوتیپ مقاومتی چندداروییِ (۲۱٪) در بین این جدایه‌ها بود. بررسی نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام برای آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه نشان‌دهنده کم‌ترین مقاومت به ایمیپنم (۱۱٪) و سفتازیدیم (۱۵/۵۲٪) بود. فنوتیپ مقاومتی در این جدایه‌ها توسط پلاسمید قابل انتقال بود. نتایج بررسی فعالیت بتالاکتامازی نشان‌دهنده تنوع فعالیت آنزیمی در بین آن‌ها در طیف ۰/۰۰۷ تا ۰/۰۶۵ واحد آنزیمی بود. در برخی از جدایه‌ها ارتباط معناداری بین سطح MIC (4>to 1054 µg/ml) و میزان فعالیت آنزیمی دیده نشد.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان دادند که احتمالاً نوع آنزیم تولیدی و اختصاصیت آن برای سوبستراهای دارویی تعیین‌کننده سطح مقاومت ناشی از بتالاکتامازها باشند. سطوح MIC بالا در برخی از جدایه‌های با فعالیت آنزیمی بسیار کم، وجود سایر مکانیسم‌های مقاومت دارویی را در برخی از این سویه‌ها پیشنهاد می‌کند. شناسایی سوبستراهای دارویی این بتالاکتامازها و تعیین دقیق طیف فعالیتشان می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در رابطه با مقابله علیه این آنزیم‌ها و باکتری‌های تولیدکننده آن‌ها در درمان‌های دارویی آینده فراهم آورد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت بتالاکتاماز، *اشرشیاکلی*، انتشار عفونت، مقاومت دارویی، مقاومت باکتری به دارو، ایران

مقدمه

ظهور مقاومت‌های باکتریائی در دنیای امروز، یکی از معضلات کادر درمانی و تهدیدکننده سلامت عمومی شده است. امروزه بالقوه‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت‌ها با بروز مقاومت در ارگانیسم‌های مسئول آن‌ها روبه‌رو شده است. با افزایش روز افزون این معضل، سازمان

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۲۵۱۸ نمابر: ۲۲۴۳۲۵۱۷ - ۰۲۱

Email: masoud.alebouyeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۴/۲۵

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

بهداشت جهانی از مشکل مقاومت داروئی به عنوان یکی از سه مشکل عمده بخش سلامت و درمان نام برده است [۱]. به رغم تلاش‌های بسیار زیادی که در مبارزه با بیماری‌های عفونی و ریشه‌کن کردن این بیماری‌ها صورت گرفته است، همچنان بروز و شیوع مقاومت‌های داروئی، علی‌الخصوص مقاومت باکتری‌های گرم منفی یکی از سدهای بزرگ بر سر راه درمان این گونه بیماری‌ها محسوب می‌شود [۲]. باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی*، متعلق به خانواده انتروباکتریاسه، به عنوان یکی از اصلی‌ترین فاکتورهای ایجاد عفونت دستگاه ادراری، دستگاه تنفسی، دستگاه گوارش و عفونت‌های بیمارستانی به میزان زیادی با ظهور و شیوع سویه‌های جدید مقاوم همراه گشته است [۴،۳]. این باکتری به عنوان غالب‌ترین عامل عفونت ادراری، شایع‌ترین عامل اسهال‌های مسافرتی و یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های مسئول عفونت بیمارستانی محسوب می‌شود. حضور این باکتری در فلور طبیعی روده افراد جامعه و فضاهای بیمارستانی، آن‌ها را به عنوان یکی از اصلی‌ترین منابع انتقال ژن‌های مقاومت دارویی مطرح کرده است [۶،۵]. مطالعات متعدد نشان می‌دهد که این نوع مقاومت‌ها به دو دلیل ژنتیکی و غیر ژنتیکی است. غیرفعال شدن باکتری از لحاظ متابولیک، عدم نفوذپذیری نسبت به آنتی‌بیوتیک، تغییر شکل باکتری به فرم F یا پروتوپلاست، تولید آنزیم‌های مقاومت دارویی و استفاده از پمپ برای بیرون راندن آنتی‌بیوتیک نمونه‌هایی از مقاومت با منشأ غیر ژنتیکی محسوب می‌گردند [۷]. مقاومت ژنتیکی می‌تواند کروموزومی و پلاسمیدی باشد. جهش در ژن‌های کنترل‌کننده گیرنده‌های دارویی منجر به تغییر ساختمان گیرنده و در نتیجه مقاوم شدن باکتری‌ها در برابر داروها می‌شود. علاوه بر پلاسمیدها، که ژن‌های مولد مقاومت دارویی از جمله ژن‌هایی هستند که بر روی آن‌ها منتقل می‌شوند [۸،۷] بعضی از ژن‌های مسئول بروز مقاومت بر روی کاست‌های ژنی که در مناطق مختلفی از اینتگرون قرار دارند، حمل می‌شوند. این کاست‌ها واحدهای گسسته ژنی هستند که شامل ژن مقاومت و جایگاه نوترکیبی بوده و با اینتگراز قابل تشخیص هستند [۹].

آنزیم‌های مقاومت دارویی، به‌ویژه بتالاکتامازها، از جمله عوامل مهم مسئول بروز مقاومت دارویی در باکتری‌ها در نظر گرفته می‌شوند. این آنزیم‌ها می‌توانند از طریق پلاسمید یا کروموزوم کد گردند. هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام توسط بتالاکتامازها شایع‌ترین مکانیسم مقاومت باکتریایی در باکتری‌های گرم منفی است که از لحاظ بالینی مهم هستند چرا که پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها جزوی از دسته داروهای درمانگر ترجیحی برای بسیاری از بیماری‌های عفونی می‌باشند. حضور و توصیف این آنزیم‌ها نقش حیاتی در انتخاب درمان مناسب بازی می‌کند. تولید بتالاکتاماز به طور گسترده‌ای در بیش‌تر ایزوله‌های باکتری‌های گرم منفی هم‌چون *اشرشیاکلی* که مقاومت به بتالاکتام آن‌ها ثابت شده است مورد شک می‌باشد [۹]. توانایی یا عدم توانایی بتالاکتامازها برای اعطای مقاومت، وابسته به موقعیت، کینتیک، مقدار تولید و شرایط فیزیوشیمیایی است [۱۱،۱۰]. این آنزیم‌ها قادر به هیدرولیز حلقه بتالاکتام آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شامل پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، منوباکتام‌ها و غیره می‌باشند که با اتصال به پروتئین متصل‌شونده به پنی‌سیلین (PBPs) که در دیواره سلولی باکتری وجود دارد باعث مهار ترانس پپتیدازها و تخریب پپتیدوگلیکان و در نتیجه مرگ باکتری خواهند شد. به دلیل بروز این مقاومت‌ها داروهای ترکیبی حاوی مهارکننده‌های بتالاکتاماز مورد استفاده قرار داده شده‌اند. این داروها حاوی کلاولونیک اسید، تازوباکتام و یا سولباکتام هستند که قادر به مهار فعالیت آنزیم‌های تولیدی برخی از اعضای گروه‌های A و گروه D بتالاکتاماز هستند اما بر روی سایر گروه‌های بتالاکتامازی اثر ندارند [۱۳،۱۲]. بتالاکتام‌ها در باکتری گرم منفی از طریق کانال‌های پورین وارد فضای پری‌پلاسمیک می‌شوند. این آنتی‌بیوتیک‌ها سپس با بتالاکتامازهایی که در داخل سلول ساخته شده و به فضای پری‌پلاسمیک رفته‌اند واکنش داده و سلول حضور بتالاکتام را در فضای خارج سلولی حس می‌کند. این مساعدت به‌واسطه اجزاء تنظیم‌کننده داخل سلول که بیان بتالاکتامازها را کنترل

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

می‌کنند منجر به افزایش بیان آنزیم و بروز مقاومت می‌گردد [۱۴].

آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده، به عنوان یک تهدید و یک چالش عظیم برای درمان‌های ضد میکروبی در اغلب تجویزهای درمانی محسوب می‌شوند [۱۶،۱۵]. فاضلی و همکاران در سال ۱۳۸۷ فراوانی الگوی مقاومت دارویی بتالاکتامازهای طیف گسترده را در جدایه‌های بالینی *اشرشیاکلی* ۵۳/۹٪ گزارش نمودند [۱۷]. این فراوانی توسط یزدی و همکاران در مورد جدایه‌های عفونت ادراری به‌میزان ۴۴/۳٪ گزارش گردید [۱۸]. فراوانی و تنوع فعالیت این آنزیم‌ها در ارتباط با میزان بروز مقاومت و پاسخ به درمان در عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها می‌باشد. دوز موثر درمان دارویی توسط میزان بیان این آنزیم‌ها و فعالیت آنزیمی آن‌ها با توجه به تنوع آنزیمی تولیدی توسط هر باکتری می‌تواند متفاوت باشد. شناسایی این آنزیم‌ها در نمونه‌های باکتریایی می‌تواند توجیه‌گر امکان شکست درمان یا غیر موثر بودن دوز تجویزی داروهای مورد استفاده در درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی و تعیین فراوانی ایزوله‌های مقاوم به داروهای بتالاکتام، بررسی فنوتیپی الگوهای مقاومتی متناسب با خانواده‌های آنزیمی بتالاکتاماز و تفاوت سطح مقاومت با توجه به فعالیت آنزیمی بتالاکتامازها نسبت به سوبسترای آنتی‌بیوتیکی اختصاصی در جدایه‌های مختلف *اشرشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های بالینی و تعیین انتقال‌پذیری این مقاومت با واسطه پلاسمید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و تعیین هویت جدایه‌های بالینی. تعداد ۱۹۵ و ۲۲ جدایه *اشرشیاکلی* به ترتیب از مبتلایان به بیماری‌های اسهالی و عفونت‌های بیمارستانی طی یک سال (شهریور ۱۳۸۹–خرداد ۱۳۹۰) جمع‌آوری گردید. بیماران مبتلا به انتریت و عفونت بیمارستانی مطابق با استانداردهای تعریف‌شده بالینی و شواهد آزمایشگاهی مورد شناسایی قرار داده شدند. عفونت‌های خون، زخم جراحی، تنفسی و ادراری که بیماران آن‌ها را حداقل ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از پذیرش در بیمارستان به علت عوامل عفونی کسب کرده باشند، به شرطی که فرد در زمان پذیرش فاقد علائم آشکار مربوطه باشد و بیماری در دوره نهفتگی خود نباشد، به‌عنوان عفونت بیمارستانی در نظر گرفته شد. به منظور تأیید، کلیه جدایه‌ها بر روی محیط‌های کشت مک‌کانکی آگار کشت و توسط آزمون‌های بیوشیمیایی تحت شرایط انکوباسیون دمایی مناسب (۳۷ °C برای ۱۸–۲۴ ساعت) مورد تعیین هویت قرار داده شدند. جدایه‌ها پس از تأیید در مقایسه با سویه مرجع (ATCC E. coli 25922) به منظور بررسی آزمون‌های تعیین حساسیت دارویی مورد آزمایش و بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های بیمارانی که تحت درمان آنتی‌بیوتیکی بودند از مطالعه حذف گردیدند.

بررسی الگوی مقاومت دارویی مرتبط با بتالاکتامازها. تعیین حساسیت جدایه‌های بالینی به ۱۰ آنتی‌بیوتیک بتالاکتام شامل سفوتاکسیم (۳۰µg)، اگزاسیلین (۱µg)، کاربنی‌سیلین (۱۰۰µg)، آمپی‌سیلین (۱۰µg)، آموکسی‌سیلین–کلاولانیک‌اسید (۲۰/۱۰µg)، سفپیم (۳۰µg)، سفوکسیتین (۳۰µg)، سفالوتین (۳۰µg)، ایمی‌پنم (۱۰µg) آزترئونام (۳۰µg) با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بر اساس راهنمای CLSI انجام پذیرفت [۱۹]. سپس الگوهای مقاومت برای جدایه‌های مختلف ثبت و آزمون‌های تکمیلی جهت شناسائی اولیه الگوی فنوتیپی گروه آنزیمی به روش دیسک مرکب برای ۲ آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین (۳۰µg) در ترکیب با بورونیک اسید (۴۰۰µg) انجام گردید. با توجه به اهمیت بررسی سطح مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم در جدایه‌های دارای فنوتیپ مقاومتی بتالاکتاماز، حداقل غلظت مهاری (MIC) آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در غلظت‌های مختلف برای این جدایه‌ها به روش آگار دایلوشن تعیین گردید.

جداسازی مخلوط آنزیمی بتالاکتاماز. به منظور جداسازی مخلوط آنزیمی، بخش پروتئین پری‌پلاسمی در این باکتری‌ها با روش شوک اسمزی استخراج شد. به این منظور باکتری‌ها ابتدا در محیط LB broth به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ °C

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

در انکوباتور شیکردار کشت داده شدند. پس از سانتریفیوژ سلول‌های حاصل در ml ۴ از محلول سوکروز (۳۰٪، mM ۲۰ Tris-HCl ،pH ۸ و mM EDTA ۵) سوسپانسیون گشته و بعد از انکوبه شدن روی یخ توسط سانتریفوژ رسوب‌گذاری شدند. سپس رسوب باکتری در ml ۴ از $MgCl_2$ (۰/۵ mM) حاوی ترکیبات مهارکننده پروتئاز (PMSF, Roche, Germany) مخلوط و به دنبال انکوباسیون مجدد به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ و سانتریفوژ، مایع رویی آن‌ها به عنوان پروتئین تام پری‌پلاسمیک جهت بررسی فعالیت بتالاکتامازی استفاده گردید [۱۲]. میزان غلظت پروتئین‌های استخراج‌شده با روش استاندارد برادفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد [۲۰].

روش یدومتری. به منظور بررسی فعالیت آنزیمی مخلوط‌های پروتئینی تحت مطالعه علیه سوبستراهای مختلف دارویی، مقدار µg ۵ از پروتئین تام پری‌پلاسمی با ml ۰/۵ بافر فسفات (۱M, pH۷)، ml ۰/۵ مخلوط ید-نشاسته و ml ۰/۵ از آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه (سفوتاکسیم) مخلوط و تغییرات جذب نوری در طول موج nm ۶۲۰ در فاصله زمانی متوالی طی ۵ دقیقه در دمای اتاق قرائت گردید. واحد فعالیت آنزیمی بر اساس µM سوبسترای تجزیه‌شده بر دقیقه بر ml از حجم کل واکنش با فرمول مقابل محاسبه شد: 0/3 × (ΔOD/min/1.2) [۲۱].

استخراج پلاسمید به روش لیز قلیائی. جهت بررسی انتقال‌پذیری فنوتیپ مقاومتی بتالاکتاماز از طریق پلاسمید، مطابق پروتکل جداسازی Miniprep پلاسمیدهای هر باکتری جداسازی گردید.

(ref. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition (3 volume set) Joe Sambrook). ابتدا تک‌کلنی از هر باکتری در ml ۲ محیط LB (light broth) تلقیح و در ^{o}C ۳۷ سانتی‌گراد همراه با هم‌زدن انکوبه، بعد از سانتریفیوژ، سلول‌ها در بافر لیز I (۱۰mM EDTA pH,۸ ۵۰mM, ۲۵mM,) همراه با ورتکس سوسپانسیون و سپس توسط لیزوزیم طی نیم ساعت انکوباسیون در ^{o}C ۳۷ لیز شدند. در مرحله بعد محلول لیز II (0.2 N NaOH, 1% SDS) به مخلوط اضافه و به آرامی لوله‌ها تکان داده شدند. سپس محلول لیز III (۵۰ M potassium acetate, Glacial actetic acid, H2O) اضافه و مخلوط بعد از سه تا چهار دقیقه نگه‌داری بر روی یخ در بالاترین سرعت سانتریفیوژ و مایع‌روئی به لوله منتقل گردید. حذف ناخالصی‌ها توسط روش فنل‌کلروفرم انجام شد و پلاسمیدها در پایان توسط ترسیب با اتانل جمع‌آوری و توسط RNase تیمار شدند. الگوی باندی هر جدایه در پایان بر روی ژل اگارز ۱/۸٪ بررسی گردید [۲۲].

روش ترانسفورماسیون .برای انجام ترانسفورماسیون پلاسمید به درون باکتری E. coli HB101 از روش کلریدکلسیم استفاده شد، در این روش پس از فراهم شدن سلول‌های مستعد مراحل کار به صورت زیر انجام گردید. میزان ng ۱۰ از مخلوط DNA پلاسمیدی مورد نظر در میکروتیوب استریل ریخته و بر روی یخ قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری مستعدشده به درون تیوب‌ها اضافه و پس از مخلوط‌سازی به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ نگه‌داری شد. سپس تیوب‌ها در بن‌ماری ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه تحت شوک حرارتی قرار داده شدند. نمونه‌ها بلافاصله بر روی یخ منتقل و به هر تیوب ml ۱ از محیط LB broth اضافه گردید. مقادیر µl ۱۰۰ از مخلوط حاضر پس از طی یک ساعت انکوباسیون در ^{o}C ۳۷ به محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک تلقیح و ظهور کلنی‌های ترانسفورم شده مقاوم پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون بررسی گردید. الگوی مقاومت و سطح MIC برای هر ترانسفورمانت به مانند آن‌چه در بخش تعیین الگوی مقاومت داروئی بیان گردید، تعیین و مورد مقایسه قرار داده شد.

ارتباط موجود بین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون T مورد بررسی قرار داده شدند. در تمامی بررسی‌ها مقادیر احتمال ۰.۰۵> به عنوان شاخص معناداری ارتباط لحاظ گردید.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

نتایج

نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه مربوط به نمونه‌های جمع‌آوری شده بیماران مبتلا به انتریت از آزمایشگاه بیمارستان طالقانی و نمونه‌های عفونت بیمارستانی (عفونت‌های زخم، ادراری، تنفسی، و خون) از ICU این بیمارستان بودند. تمامی جدایه‌های منتخب در این بررسی به عنوان *اشرشیاکلی* مورد تایید قرار گرفتند. بررسی نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام برای آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه نشان‌دهنده بیش‌ترین مقاومت به اگزاسیلین (۸۸/۵۳٪) و آمپی‌سیلین (۸۸/۵۳٪) و کم‌ترین مقاومت به ایمیپنم (۱۱٪) و سفتازیدیم (۱۵/۵۲٪) بود. نمونه‌هایی که به بیش از ۳ آنتی‌بیوتیک از خانواده‌های مختلف مقاومت نشان دادند به عنوان فنوتیپ مقاومت چندداروی (MDR) در نظر گرفته شده‌اند،۲۱٪ بودند (جدول ۱).

جدول ۱. فراوانی فنوتیپ های مقاومتی چندگانه در جدایه های بالینی اشرشیا کلی

Resistance phenotype	*Frequency*
AMC, AM	*147 (67%).*
AMC, OX	*146 (66%)*
AM, OX	*126 (58%)*
AMC, AM, OX	*143 (66%)*
AM, OX, CTX	*56 (26%)*
AMC, AM, OX, CTX	*61 (28%)*
AMC, AM, OX, CF	*65 (30%)*
AMC, AM, OX, CF, CB	*46 (21%)*
AMC, AM, OX, CF, CB, CTX	*45 (20%)*
AMC, AM, OX, CTX, FEP, IPM	*22 (10%)*
AMC, AM, OX, CF, CB, CTX, FEP	*37 (17%)*
AMC, AM, OX, CF, CB, CTX, FEP,IPM	*27 (12%)*

Am: ampicillin; CTX: cefotaxime; OX: Oxacillin; CB: carbenicillin; AMC: amoxicillin-clavulanic acid; FEP: cefepime; CAZ: ceftazidime; Oxa/Cloxa: oxacillin/cloxacillin, CF: Cefoxitin; IPM: imipenem.

الگوهای فنوتیپی مقاومتی مشابه در ۱۴/۱۵٪ از این جدایه‌ها حضور داشت. مهم‌ترین این الگوهای مقاومتی مربوط به فنوتیپ am^r ،amc^r ,ox^r با فراوانی ۶۴/۸۴٪ می‌باشد (جدول ۲). این الگوها پیشنهادکننده اولیه حضور فنوتیپ‌های مقاومتی بتا لاکتامازی a ۳ در ۲۹ جدایه، فنوتیپ ber ۲ در ۴۱ جدایه، فنوتیپ de ۲ در ۴۳ جدایه، و فنوتیپ ۱ در ۱۳ جدایه بود (جدول ۲). بررسی نتایج آزمون‌های دیسک دوگانه (سفوکسیتین– بورونیک اسید) مقاومت به آزترئونام، و مقاومت به EDTA، به‌منظور شناسایی دقیق‌تر حضور این خانواده‌ها انجام شد، این نتایج دسته‌بندی جدایه‌ها را بر اساس الگوی مقاومتی تأیید می‌نماید.

نتایج حداقل غلظت مهاری (MIC) در مورد آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم مؤید حضور سطح بالای مقاومت در ۵۰٪ از نمونه‌ها در غلظت ۵۱۲ µg/ml بود (MIC_{50}). سایر مقادیر سطوح MIC در جدول ۲ آورده شده است.

از میان سویه‌های دارای فنوتیپ مقاومتی بتالاکتاماز با توجه به فراوانی بالای اعضای دارای فنوتیپ ber ۲ و اهمیت بالینی این مقاومت، این سویه‌ها تحت بررسی فعالیت آنزیمی به روش ب یدومتری قرار داده شدند. نتایج به‌دست آمده از تست یدومتری برای جدایه‌های دارای سطح مقاومتی مجزا به صورت شکل ۱ آورده شده است. تمامی این جدایه‌ها دارای فعالیت آنزیمی بودند. بر اساس فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شده این جدایه‌ها در ۵ دسته مجزا قرا داده شدند که بیش‌ترین جدایه‌ها (۲۲ جدایه) در گروه آنزیمی دوم قرار گرفتند. ۶۱٪ جدایه‌ها فعالیت آنزیمی مشابهی را نشان می‌دادند. گروه چهارم و پنجم هر کدام با دو جدایه دارای کم‌ترین عضو بودند (شکل ۱).

جدول ۲: نتایج آزمون حساسیت سنجی جدایه های *اشرشیا کلی* به ترکیبات ضد میکروبی معرف الگوهای مقاومت دارویی بتا–لاکتامازی.

الگوی مقاومت دارویی									درصد فراوانی
1) ESBL	Am^r	CTX^r	AMC^s	FEP^r	CAZ^r	Imp^s	AZT^r	$EDTA^r$	0
2) 3a	Am^r	CTX^r	AMC^r	FEP^r	CAZ^r	Imp^r	AZT^s	$EDTA^s$	13
3) 2ber	Am^r	CTX^r	AMC^r	FEP^r	CAZ^r	Imp^s	AZT^r	$EDTA^r$	18
4) AmpC	Am^r	CTX^r	AMC^s	FEP^r	CAZ^r	Imp^s	$EDTA^r$	FOX^r Boronic acid ^{r}	0
5) 2de	$Oxa/Clox^r$	CTX^r	AMC^r	CAZ^r	Imp^r	$EDTA^r$			19

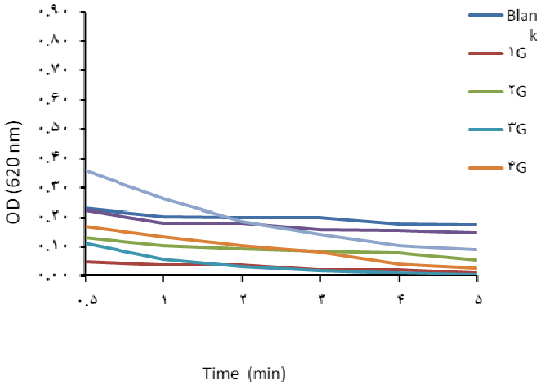
ESBL: Extended spectrum β-lactamase; ESBL, 3a, 2ber, ampC, 2de refer to different phenotypic and molecular classes of β-lactamase. Am: ampicillin; CTX: cefotaxime; OX: oxacillin; CB: carbenicillin; AMC: amoxicillin-clavulanic acid; FEP: cefepime; CAZ: ceftazidime; Oxa/Cloxa: oxacillin/cloxacillin, CF: cefoxitin; r: resistant, s: sensitive.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

جدول شماره ۳: نتایج آزمون تعیین سطح MIC علیه سفوتاکسیم.

Antibiotic concentration (µg/ml)	> ۴	۴	۳۲	۶۴	۱۲۸	۵۱۲[a]	۱۰۲۴[b]
Frequency	٪۷/۳۱ (۳)	٪۲۴/۳۹ (۱۰)	٪۱۴/۶۳ (۶)	٪۲/۴۳ (۱)	٪۲/۴۳ (۱)	٪۴۶/۳۴ (۱۹)	٪۲/۴۳ (۱)
Total	۴۱	۴۱	۴۱	۴۱	۴۱	۴۱	۴۱

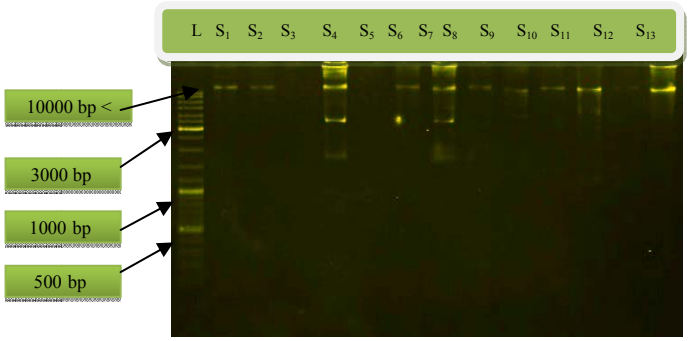
[a] MIC_{50} :غلظتی از آنتی بیوتیک که در آن ۵۰ درصد جدایه ها الگوی مقاومت را نشان دهند، که در تحقیق پیشرو ۵۱۲ µg/ml می باشد. [b]MIC_{90} غلظتی از آنتی بیوتیک که در آن ۹۰ درصد جدایه ها حساس هستند، که در تحقیق پیشرو ۱۰۲۴ µg/ml می باشد.



شکل ۱. نتیجه آزمون یدومتری برای جدایه‌های دارای فعالیت آنزیمی متفاوت علیه آنتی بیوتیک سفوتاکسیم. (گروه‌ها بر اساس فعالیت آنزیمی از هم جدا شده‌اند؛ نمونه 1G دارای کم‌ترین فعالیت آنزیمی و 5G دارای بیش‌ترین فعالیت آنزیمی می‌باشد).

مقایسه نتایج MIC و نتایج حاصله از بررسی فعالیت آنزیمی در دسته‌بندی صورت گرفته ارتباط معناداری بین این میزان فعالیت و سطح MIC در سویه‌های گروه چهار را نشان داد، به بیان دیگر فعالیت آنزیمی هم‌سو با افزایش سطح مقاومت، افزایش پیدا کرده بود. این ارتباط در سایر جدایه‌ها اثبات نگردید.

الگوی پلاسمیدی. پلاسمید استخراج‌شده از گونه‌های وحشی و ترانسفورم شده در شکل ۲ نمایش داده شده‌اند. اکثر سویه‌ها دارای پلاسمید بزرگ‌تر از ۱۰ Kbp و بعضی دارای ۳ پلاسمید در طیف ۱ تا ۱۰ Kbp بودند. حضور پلاسمید ۱۰ Kbp با فنوتیپ مقاومت ارتباط معناداری نشان داد ($p<0/05$). نتایج ترانسفورماسیون موید انتقال‌پذیری فنوتیپ مقاومت توسط پلاسمیدهای بزرگ‌تر از ۱۰ Kbp بود. تمامی سویه‌های ترانسفرم شده تحت مطالعه دارای الگوهای فنوتیپی مشابه مقاومتی با والد اولیه خود و سطوح MIC یک‌سان بودند.



شکل ۲. الگوهای پلاسمیدی استخراج شده از باکتری وحشی. الکتروفورز پلاسمید استخراج شده از باکتری وحشی، بر روی ژل اگارز ۱/۲٪ . L: مارکر وزن مولکولی (10 kb DNA Ladder). ستون‌های شماره‌های ۱ تا ۱۳: نمونه های پلاسمیدی استخراج شده از جدایه های مختلف باکتری *اشرشیا کلی*. موقعیت پلاسمیدها با پیکان مشخص شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده در درمان عفونت‌های روده‌ای و خارج روده‌ای *اشرشیاکلی* شامل دوکسی‌سیکلین، تریمپتوپریم/سولفامتوکسازول، فلوئوروکینولون‌ها، سفالوسپورین‌های نسل سوم و ریفاکسیمین هستند. در عفونت‌های حاد این باکتری پیپراسیلین و تازوباکتام، ایمی‌پنم و سیلاستاتین، یا مروپنم به‌کار گرفته می‌شوند. ظهور سویه‌های *اشرشیاکلی* دارای مقاومت دارویی چندگانه‌ی تولیدکننده‌ی آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده به عنوان مهم‌ترین معضل درمانی برای عفونت‌های بیمارستانی در سال‌های اخیر مطرح می‌باشد. این سویه‌ها به اغلب ترکیبات دارویی معمول (مانند پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها) و داروهای مختص عفونت‌های حاد (مانند فلوروکینولون‌ها و

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

جنتامایسین) مقاوم هستند. میزان مرگ و میر عفونت‌های ناشی از *اشرشیاکلی*های کدکننده بتالاکتامازهای طیف گسترده بسیار بالاتر از سویه‌های فاقد آن‌ها می‌باشد. این امر اهمیت پی‌گیری فراوانی این سویه‌ها را در نمونه‌های بیماران مختلف گوش‌زد می‌نماید [۲۳]. بر اساس نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر، میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبتاً بالایی در جدایه‌های بالینی عفونت بیمارستانی و هم‌چنین نمونه‌های مدفوع بیماران مبتلا به گاستروانتریت مورد مطالعه دیده شد. نتایج ما نشان می‌دهد که از ۲۱۷ نمونه مورد بررسی ۲۶/۲٪ نمونه‌ها به بیش از پنج آنتی‌بیوتیک مقاومت دارند. مقاومت در این جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین در میزان بالایی بود. این یافته با نتایج Taneja و همکاران که میزان مقاومت نسبت به چند دارو را ۳۰/۶٪ گزارش نموده است هم‌خوانی دارد [۲۵،۲۳]. غالب‌ترین فنوتیپ مقاومت چنددارویی در این جدایه‌ها مربوط به اگزاسیلین، آموکسی‌سیلین و آموکسی‌کلاو بود. در حالی‌که الگوهای فنوتیپی مقاومت دارویی ESBL پیش از این در ایران در دامنه فراوانی ۱۹/۸۶٪، ۵۳/۹٪ و ۴۴/۳٪ گزارش شده بود [۱۸،۱۷،۲۶]، نتایج حاصل از مطالعه حاضر فراوانی ۰٪ را مشخص نمود. استفاده از الگوی تشخیصی صحیح و کامل مقاومت دارویی در این مطالعه می‌تواند توجیه‌گر این تفاوت فراوانی باشد. این فراوانی در کشورهای کره، دانمارک و چین به ترتیب برابر ۱۲/۶٪، ۰/۸٪ و ۱۶/۸٪ گزارش شده است [۲۹،۲۸،۲۷]. بیش‌ترین الگوی مقاومتی بتالاکتامازی مشاهده شده در این مطالعه مربوط به فنوتیپ‌های مقاومتی گروه‌های de ۲ (۱۹٪) و ber ۲ (۱۸٪) تعیین گردید. سوبستراهای اختصاصی این خانواده‌های بتالاکتامازی سفالوسپورین‌های طیف گسترده می‌باشند که موید افزایش خطر در شکست درمان‌های مرسوم علیه عفونت‌های ایجاد شده توسط سویه‌های تولیدکننده این آنزیم‌ها در ایران می‌باشد (جدول ۲).

نتایج آزمون یدومتری حضور بتالاکتاماز را در کلیه سویه‌های مورد بررسی نشان داد. مقایسه میزان جذب نوری (OD) و واحد آنزیمی (واحد آنزیم بر اساس µM سوبسترای تجزیه‌شده بر دقیقه بر ml) در این سویه‌ها موید آن نکته بود که میزان تولید آنزیم در سویه‌های مختلف متفاوت است. نکته قابل اشاره در مورد تحقیق حاضر عدم هم‌خوانی نتایج آزمون تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) با نتایج آزمون یدومتری در غالب جدایه‌ها بود. در این جدایه‌ها میزان MIC ی بالاتر به معنی میزان تولید بتالاکتاماز بیش‌تر نبود. به‌علاوه به‌طور جالبی جردایه‌های دارای فنوتیپ مقاومت چنددارویی و MIC یک‌سان نیز فعالیت آنزیمی مشابهی را نشان نمی‌دادند. وجود فعالیت متنوع آنزیمی در سطوح غلظتی یک‌سان از مخلوط‌های پروتئینی به‌دست آمده از این جدایه‌ها نکته قابل توجهی در مطالعه حاضر است. تنوع آنزیم‌ها، هم‌زمانی حضور چند آنزیم در یک سویه، اختصاصیت سوبسترایی متفاوت و حضور مکانیسم‌های مقاومتی غیر آنزیمی در این سویه‌ها می‌تواند این تفاوت‌ها را توجیه نماید.

شباهت الگوی مقاومت باکتری‌های ترانسفورم شده با باکتری‌های وحشی تاییدکننده انتقال‌پذیری هم‌زمان بیش از چند ژن مقاومت دارویی در پلاسمیدهای حمل‌کننده آن‌هاست. این یافته‌ها احتمال وجود پلاسمیدهای انتقال‌پذیر خاص که مرتبط با بروز مقاومت به چند دسته از داروها باشند را در بین این جدایه‌ها با توجه به نزدیکی درصد سویه‌های مقاوم و این‌که حدوداً ۲۷٪ از آن‌ها به بیش از ۵ آنتی‌بیوتیک مقاومت دارند، پیشنهاد می‌کند. این مسئله می‌تواند برای درمان این بیماری‌ها کاملاً نگران‌کننده باشد. نکته دیگر این‌که قرار گرفتن ژن مقاومت بر روی حامل‌های ژنی هم‌چون پلاسمید می‌تواند به شیوع مقاومت در سویه‌های مقاوم کمک نماید. انتقال‌پذیری برخی از اعضای خانواده بتالاکتامازهای طیف گسترده توسط پلاسمیدها (به‌ویژه CTX-M و AmpC) امروزه به‌عنوان یک معضل درمانی مطرح می‌باشد، چرا که سویه‌های دارای این نوع مقاومت‌ها به اغلب رژیم‌های درمانی پاسخ نمی‌دهند [۳۱، ۳۲]. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق و با توجه به فعالیت بتالاکتامازی بالای جدایه‌های تحت مطالعه علیه سفالوسپورین‌های نسل سوم (MIC_{50} معادل با ۵۰µg/ml) به نظر می‌رسد که اعضای کاربانم‌ها بهترین دارو برای درمان عفونت‌های حاد ناشی از سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

باشند، که این بررسی با نتایج محققین دیگر هم‌خوانی دارد [۱۷]. اساساً کارباپنم‌ها در برابر قدرت هیدرولیزکنندگی بتالاکتاماز مقاومت نشان می‌دهند و به‌دلیل کوچکی مولکول قادر به نفوذ به‌داخل سلول باکتری از طریق پورین می‌باشند. نتایج درمانی خوبی به‌دنبال استفاده از این آنتی‌بیوتیک در مقابله با سویه‌های مولد گزارش شده است [۳۳]. با این وجود گزارشات متعددی از پیدایش مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها از کشورهای مختلف جهان وجود دارد که اهمیت خطرات ناشی از استفاده بی‌رویه از این آنتی‌بیوتیک را نمایان می‌سازد. به دلیل محدود بودن داروهای موجود علیه سویه‌های تولیدکننده بتالاکتامازها و با توجه به یافته‌های حاضر که دلالت‌گر شیوع بالای سویه‌های کدکننده این آنزیم‌ها است، باید تدابیر لازم برای پیش‌گیری و کنترل این مقاومت‌ها به عمل آید. انجام مطالعات وسیع‌تر با سایر سوبستراهای آنتی‌بیوتیکی و شناسایی سوبستراهای غیر قابل تجزیه توسط این آنزیم‌ها می‌تواند اطلاعات ارزش‌مندی را در رابطه با درمان دارویی عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها در آینده فراهم نماید.

نتایج این مطالعه مؤید فراوانی به نسبت بالای مقاومت‌های چنددارویی پرخطر در میان جدایه‌های بیمارستانی و بالینی *اشرشیاکلی* در ایران می‌باشد. نتایج بررسی فعالیت آنزیمی بتالاکتاماز در این جدایه‌ها تنوع فعالیت آنزیمی را در سطوح مختلف نشان می‌دهد. مقایسه سطوح MIC در این جدایه‌ها توجیه‌گر حضور مکانیسم‌های مقاومتی غیر آنزیمی در این باکتری‌ها می‌باشد. عدم توافق فعالیت آنزیمی و سطح مقاومتی در این مطالعه پیشنهادکننده اهمیت تعیین سطح MIC نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بدون توجه به میزان فعالیت بتالاکتامازی تام این سویه‌ها در شرایط آزمایش‌گاهی می‌باشد. با توجه به اهمیت نقش تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها در افزایش سویه‌های مقاوم و افزایش احتمال انتقال‌پذیری ژنی در این سویه به سویه‌های کم‌تر حساس پیشنهاد می‌گردد تا تجویز داروها در مورد این نوع از عفونت‌ها مبتنی بر غربال‌گری‌های آزمایش‌گاهی و آگاهی از وضعیت مقاومت به آن دارو توسط عوامل عفونی مورد نظر باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه همکارانی که ما را در تهیه این طرح یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌نماییم. این طرح در قالب پایان‌نامه دانشجویی و طرح تحقیقاتی مصوب در سال ۱۳۹۰ در مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسیده است.

منابع

[1] Bassetti M, Ginocchio F, Mikulska M. New treatment options against gram-negative organisms. Crit Care 2011; 15: 215.

[2] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis 2010; 10: 597-602.

[3] Nield BS, Holmes AJ, Gillings MR, Recchia GD, Mabbutt BC, Nevalainen KM, Stokes HW. Recovery of new integron classes from environmental DNA. FEMS Microbiol lett 2001; 195: 59-65.

[4] Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Ploncard P, Dychinco B, Davies J, Mazel D. The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistance integrons. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 652-657.

[5] Simoons-Smit AM, Verwey-van Vught AM, Kanis IY, MacLaren DM. Virulance of klebsiella strains in experimentally induced skin lesions in the mouse. J Med Microbiol 1984; 17: 67-77.

[6] Tängdén T, Cars O, Melhus Å, Löwdin E. Foreign travel is a major risk factor for colonization with Escherichia coli producing CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases: a prospective study with Swedish volunteers. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 3564-3568.

[7] Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 557-584.

[8] Hart CA, Batt RM, Saunders JR. Diarrhoea caused by Escherichia coli. Ann Trop Pediatr 1993; 13: 121-131.

[9] Seidler RJ, Knittel MD, Brown C. Potential pathogens in the environment:Cultural reactions and nucleic acid studieson Klebsiella pneuomoniae from clinical and environmental sorces. Appl Microbiol 1975; 29: 819-825.

[10] Rubtsova MY, Ulyashova MM, Bachmann TT, Schmid RD, Egorov AM. Multiparametric determination of genes and their point mutations for identification of beta-lactamases. Biochemistry (Mosc) 2010; 75: 1628-1649.

[11] Sideraki V, Huang W, Palzkill T, Gilbert HF. A secondary drug resistance mutation of TEM-1 β-lactamase that suppresses misfolding and aggregation. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 283-288.

[12] Haeggman S, Löfdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 2400-2408.

[13] Farmer TH, Page JW, Payne DJ, Knowles D. Kinetic and physical studies of beta-lactamase inhibition by a novel penem, BRL 42715. Biochem J 1994; 303: 825-830.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

[14] Farmer TH, Degnan BA, Payne DJ. Penetration of beta-lactamase inhibitors into the periplasm of Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett 1999; 176: 11-15.

[15] Machado E, Coque TM, Cantón R, Novais Â, Sousa JC, Baquero F, et al. High diversity of extended-spectrum β-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 1370-1374.

[16] Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Stürenburg E, Seifert H. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. J Clin Microbiol 2007; 45: 1167-1174.

[17] Fazeli H, Hosseini MM, Mohammadi Ghalaei P. Frequency and antimicrobial susceptibility of extended spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli in clinical samples of Alzahra hospital, Isfahan 2007. Shahre Kord Med Univ J 2008; 10: 58-67. (Persian).

[18] Yazdi M, Nazemi A, Miri Nargesi M, Khatami nejad MR, Sharifi SA, Babaei Kochaksaraei M. Prevalence of β-lactamase SHV/CTX/TEM in Escherichia coli isolates from urinary tract infection in Tehran. Med Lab J 2010; 4: 48-54. (Persian).

[19] Matthew A. Franklin R. William A. Michael N. George M. David W, et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Document M100-S16. Clin Lab Stand Institu 2006; 26.

[20] Neu HC, Heppel LA. The release of enzymes from Escherichia coli by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. J Biol Chem 1965; 240: 3685-3692.

[21] Sykes RB, Nordstrom K. Microiodometric determination of beta-lactamase activity. Antimicrob Agents Chemother 1972; 1: 94-99.

[22] Sambrook JF, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, 3nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[23] Melzer M, Petersen I. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing E. coli compared to non-ESBL producing E. coli. J Infect 2007; 55: 254-259.

[24] Taneja N, Rao P, Arora J, Dogra A. Occurrence of ESBL & Amp-C beta-lactamases & susceptibility to newer antimicrobial agents in complicated UTI. Indian J Med Res 2008; 127: 85-88.

[25] Mehrgan H, Rahbar M. Prevalence of extended-spectrum [beta]-lactamase-producing Escherichia coli in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Int J Antimicrob Agents 2008; 31: 147-151.

[26] Tashlori M, Zia Sheikhaleslami N, Mirzaei T, Yosefi H, Mokhtari F, et al. Evaluation of producing extended spectrum β-lactamase among isolated escherchia coli from patients suffering from urinary tract infections: (Short Report). J Rafsanjan Univ Med Sci 2010; 1: 62-68. (Persian).

[27] Li XM, Jang SJ, Bae IK, Park G, Kim YS, Shin JH, et al. Frequency of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) and AmpC β-lactamase genes in escherichia coli and klebsiella pneumoniae over a three-year period in a university hospital in Korea. Korean J Lab Med 2010; 30: 616-623.

[28] Afridi FI, Farooqi BJ, Hussain A. Frequency of extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae among urinary pathogen isolates. J Coll Physicians Surg Pak 2011; 21: 741-744.

[29] Wang QT, Liu YM, Wang H, Sun HL, Chen MJ, Du XL. Plasmid-mediated cephalosporinase among extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Zhonghua Nei Ke Za Zhi 2004; 43: 487-490.

[30] Naseer U, Sundsfjord A. The CTX-M Conundrum: Dissemination of Plasmids and Escherichia coli Clones. Microb Drug Resist 2011; 17: 83-97.

[31] Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC β-lactamases in the United states. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 533-537.

[32] Kiremitci A, Dinleyici EC, Erben N, Durmaz G, Yargic ZA, Aybey AD, Usluer G. In vitro activity of ertapenem and other carbapenems against extended-spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae clinical isolates in a tertiary care center in Turkey. Expert Opin Pharmacother 2008; 9: 1441-1449.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

Frequency of β-lactamase producing isolates of *Escherichia coli* and their diversity in enzyme activities among the resistance isolates from patients with diarrhea and nosocomial infections in Tehran, Iran

Mohammad Rahimi (M.Sc)[1,3], Mercedeh Tajbakhsh (M.Sc)[2], Maryam Razaghi (M.Sc)[2], Elahe Tajeddin (M.Sc)[2], Masoud Alebouyeh (Ph.D)[*2,3], Masoumeh Rajabi Bazl (Ph.D)[1], Mohammad Reza Zali (M.D)[2,3]

1 – Dept. of Medical Biochemistry, Shahid Beheshti University of Medical sciences, Tehran, Iran

2 - Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical sciences, Tehran, Iran

3 - Basic and Molecular Epidemiology of Gastrointestinal Disorders Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 14 Oct 2012; Accepted: 16 Jul 2013)

Introduction: The risky multidrug resistance phenotypes could be spread among strains of Escherichia coli (E. coli). The resistance against β-lactam drugs could emerge through the production of different enzymes with different spectrum of activities. This study was planned to determine the activity of β-lactamases extracted from different clinical isolates of E. coli and their relatedness with resistance phenotype and plasmid patterns.

Materials and Methods: Antimicrobial susceptibility of *E. coli* isolates from different clinical samples to 10 β-lactam antibiotics were studied by disk diffusion method and minimal inhibitory concentration (MIC) of the resistant isolates were determined against cefotaxime by agar dilution method. Iodometry assay was used to detect β-lactamase activity of periplasmic fractions of the protein extracts in the presence of cefotaxime. Plasmid transmissibility of the resistance phenotype into *E. coli* HB101was finally studied by CaCl2 transformation method.

Results: Results of this research showed existence of high plenty of multidrug resistance phenotypes (21%) among these isolates. The study-generated antibiogram showed that the lowest percent resistance antibiotics for all the isolates were imipenem (11%) and ceftazidime (15.52%). This resistance phenotype was transferable by plasmids in strain *E. coli* HB101. Analysis of the β-lactamase activities showed a variation among them in ranges of 0,007 upto 0,065 units. No significant relationship was observed between the level of MIC (<4 to 1024 µg/ml) and the amounts of enzyme activities.

Conclusion: These results indicated that type of the produced enzymes and also their specificities for β-lactam drugs, but not the amount of their total enzyme activities, do determine the level of their resistance phenotypes and MIC levels. Presence of the high levels of MIC in some isolates with very low enzyme activities suggested the existence of other mechanisms of drug resistance among them. Identification of antibiotics with higher affinity for these β-lactamases will provide valuable information about fighting against these bacteria in severe infections.

Keywords: Beta lactamase, *Escherichia coli*, Cross Infection, Drug resistance, Bacterial drug resistance, Iran

* Corresponding author: Fax: +98 21 22432517; Tel +98 21 22432518

masoud.alebouyeh@gmail.com

How to cite this article:
Rahimi M, Tajbakhsh M, Razaghi M, Tajeddin E, Alebouyeh M, Rajabi Bazl M, Zali M. Frequency of β-lactamase producing isolates of Escherichia coli and their diversity in enzyme activities among the resistance isolates from patients with diarrhea and nosocomial infections in Tehran, Iran. koomesh. 2014; 15 (2) :197-205
URL http://www.koomeshjournal.ir/browse.php?a_code=A-10-1775-1&slc_lang=en&sid=1

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]