

فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی وسیع الطیف گروه TEM و AmpC (DHA, MOX) به روش PCR در ایزوله‌های بالینی اشریشیاکلی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۵/۲۶

چکیده

محمد مهدی سلطان‌دلال^{۱*}، هدروشا ملاآقامیرزایی^۲، جلیل فلاح مهرآبادی^۳، عبدالعزیز رستگارلاری^۲، آیلا صباغی^۳، محمدرضا اشراقیان^۵، عاطفه فرد صانعی^۱، روناک بختیاری^۱، مجتبی حنفی ایدر^۶

۱- گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروبی‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۲- مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران.

۴- انستیتو بیوانفورماتیک، تهران، ایران.

۵- گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۶- گروه میکروبی‌شناسی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروبی‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تلفن: ۸۸۹۹۲۹۷۱
email: soltanirad34@yahoo.com

زمینه و هدف: آنزیم‌های بتالاکتامازی، مهم‌ترین عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام در میان باکتری‌های گرم منفی می‌باشند. امروزه شاهد افزایش روز افزون عفونت‌های ناشی از آن‌ها در جهان هستیم که این امر به عنوان یک موضوع مهم مورد توجه محققین در آمده است. آنزیم‌های بتالاکتامزهای TEM به علت شیوع بالا و AmpC به دلیل ایجاد اختلال در تست‌های فنوتیپی از اهمیت زیادی برخوردارند. از آنجا که ژن‌های خانواده بتالاکتامازی دارای زیرگروه‌های فراوانی بوده بر این اساس به‌کارگیری روش‌های مولکولی به ویژه استفاده از پرایمرهای یونیورسال به منظور شناسایی کامل این زیرگروه‌ها ضروری است، هدف از این تحقیق شناسایی و بررسی شیوع ژن‌های بتالاکتامازی TEM و AmpC (DHA, MOX) در ایزوله‌های بالینی *Escherichia coli* با استفاده از پرایمرهای یونیورسال می‌باشد. **روش بررسی:** تعداد ۵۰۰ نمونه بالینی از بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری گردید که با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی، تعداد ۲۰۰ ایزوله *E. coli* غربال شد و از طریق تست‌های فنوتیپی Disk diffusion method و Combined disk، از لحاظ تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی مورد ارزیابی قرار گرفتند. سویه‌های فنوتیپ مثبت، جهت جستجوی ژن‌های مذکور توسط پروسه PCR بررسی شدند. **یافته‌ها:** از ۲۰۰ ایزوله مورد بررسی (۶۴٪)، ۱۲۸ سویه از طریق تست‌های فنوتیپی برای PCR ژن‌های TEM و AmpC انتخاب شد، (۵۷/۸٪) و (۳/۹٪) ایزوله به ترتیب حاوی ژن‌های TEM و DHA بود و ژن MOX در هیچ ایزوله‌ای شناسایی نشد. **نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج حاصله، به کارگیری روش‌های مولکولی در کنار روش‌های فنوتیپی جهت تشخیص کامل این نوع مقاومت‌ها امری ضروری بوده و به علت شیوع بالای این مقاومت، بهتر است که نسبت به استفاده از پروتکل‌های درمانی رایج در کشور اقدامات مناسب‌تری به عمل آید.

کلمات کلیدی: اشریشیاکلی، بتالاکتامزهای وسیع الطیف، TEM، AmpC، بتالاکتامز.

مقدمه

باکتریال، منجر به بروز دسته جدیدی از این آنزیم‌ها به نام بتالاکتامزهای وسیع شده است.^۳ براساس عملکرد، آنزیم‌های بتالاکتامازی در چهار گروه یا چهار کلاس اصلی A، B، C و D طبقه‌بندی می‌شوند. بر اساس این طبقه‌بندی، آنزیم‌های وسیع الطیف در گروه A قرار گرفته و شامل مشتقات آنزیم‌های موتاسیون یافته TEM و SHV می‌باشند.^۴ آنزیم TEM بتالاکتامز برای اولین بار در سال ۱۹۶۵ از کشت خونی فردی به نام Temoneria در شهر آتن در یونان گزارش شد^۵ و در طی مدت زمان کوتاهی، به سرعت در میان سویه‌های بالینی در تمام جهان گسترش یافت. به طوری که امروزه این

استراتژی‌های مختلفی توسط باکتری‌ها به کار گرفته می‌شود تا از اثرات زیان‌بار آنتی‌بیوتیک‌ها مصون بمانند. یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها، که در باکتری‌های گرم منفی علیه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به کار گرفته می‌شود تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی (Beta-lactamase enzymes) می‌باشد.^۱ این آنزیم‌ها، از طریق هیدرولیز حلقه بتالاکتام منجر به ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند.^۲ پیدایش آنتی‌بیوتیک‌های جدید از قبیل سفالوسپورین‌های طیف وسیع، آرترون‌ها و رواج استفاده از آن‌ها در درمان بیماری‌های عفونی

شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال داده شد. سپس نمونه‌ها بر روی محیط کشت انتخابی Hekton Entric Agar (HE) کشت داده شد و پلیت‌ها در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. از طریق انجام تست‌های بیوشیمیایی از قبیل IMVIC بر روی کلنی‌ها، ۲۰۰ ایزوله *E. coli* شناسایی گردید. کلنی‌های مربوط به ایزوله‌های مثبت *E. coli* را در 70°C - در محیط Skim milk نگهداری کرده تا در مراحل بعدی، از این ایزوله‌ها استفاده شود.

شناسایی فنوتیپی سویه‌های مولد ESBLs و AmpC بتالاکتاماز: آزمایش حساسیت آنتی‌میکروبیال به روش دیسک آگار دیفیوژن بر اساس استاندارد CLSI به منظور غربالگری اولیه ایزوله‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتامازی، بر روی محیط مولر هیتون آگار انجام شد. در این روش ابتدا پس از تهیه محیط مولر هیتون آگار ($\text{pH}=7/2$ تا $7/4$)، سوسپانسیون میکروبی مطابق با غلظت نیم مک فارلند تهیه و به طور کامل بر روی محیط مزبور پخش شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تهیه شده از شرکت Mast شامل: جنتامایسین ($10\mu\text{g}$)، کوتریموکسازول ($1/25\mu\text{g}$)، نالیدیکسیک اسید ($30\mu\text{g}$)، سیپروفلوکساسین ($5\mu\text{g}$)، سفوتاکسیم ($30\mu\text{g}$)، ایمی‌پنم ($10\mu\text{g}$)، سفتازیدیم ($30\mu\text{g}$)، آموکسی‌سیلین ($30\mu\text{g}$)، کلرامفنیکل ($30\mu\text{g}$)، استرپتومایسین ($10\mu\text{g}$) را به فاصله حداقل ۲cm از یکدیگر، بر روی محیط مزبور قرار داده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای 37°C ، با استفاده از خط‌کش، هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و با استانداردهای جهانی (CLSI) مقایسه شد. ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و سفوتاکسیم در جهت تأیید حضور بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از طریق آزمون Combined disk مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمون از دیسک‌های سفتازیدیم ($30\mu\text{g}$)، سفتازیدیم-کلاوونیک اسید ($30-10\mu\text{g}$)، سفوتاکسیم ($30\mu\text{g}$) و سفوتاکسیم-کلاوونیک اسید ($30-10\mu\text{g}$) تهیه شده از شرکت Mast بر روی مولر هیتون آگار استفاده شد که پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای 37°C ، هاله عدم رشد اطراف دیسک حاوی کلاوونیک اسید به عنوان مهارکننده آنزیم‌های ESBL نسبت به بدون کلاوونیک اسید سنجیده شد. به طوری که اگر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های حاوی کلاوونیک اسید بزرگتر یا مساوی ۵mm نسبت به بدون کلاوونیک اسید باشد سویه مورد نظر را می‌توان بر طبق CLSI، به عنوان مولد ESBLs در نظر گرفت و به پیشنهاد این

تیپ آنزیمی به عنوان یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومتی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام، در میان باکتری‌های گرم منفی مطرح می‌باشد.^۶ امروزه بیش از ۱۱۹ تیپ TEM بتالاکتامازی شناسایی شده است.^۷ بر این اساس شناسایی سریع این سویه‌ها در آزمایشگاه‌های بالینی به منظور تشخیص این مقاومت، بسیار حائز اهمیت است.^۸ برای شناسایی سویه‌های مولد آنزیم‌های Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)، در نمونه‌های بالینی، چندین روش مختلف پیشنهاد شده که بهترین روش، یک غربالگری اولیه برای حساسیت کاهش یافته نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پیشنهادی Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) است و سپس انجام آزمون‌های تأییدی، برای اثبات اثر سینرژسم بین یک نشانگر سفالوسپورین و یک مهارکننده بتالاکتامازی می‌باشد.^۹ یکی دیگر از مکانیسم‌های مهم مقاومتی در میان باکتری‌های گرم منفی تولید سفالوسپورین‌های کروموزومی گروه C از قبیل AmpC بتالاکتامازها می‌باشد. این آنزیم‌ها به واسطه پلاسمید در میان بسیاری از ایزوله‌های بالینی به ویژه خانواده انتروباکتریاسه منتشر شده و معضلات و آفری را در جهت شناسایی آنزیم‌های بتالاکتامازی طیف وسیع از طریق پوشاندن اثر آن‌ها در تست فنوتیپی تأییدی، اعمال می‌کنند. امروزه ایزوله‌هایی که هم AmpC و هم آنزیم‌های ESBLs را تولید می‌کنند، در حال افزایش است که این امر، مقاومت بالایی را نسبت به عوامل ضد میکروبی ایجاد کرده و همچنین منجر به بروز نتایج منفی کاذب ESBLs در تست فنوتیپی تأییدی شده است.^{۱۰-۱۲} بنابراین استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی کامل این آنزیم‌ها، حایز اهمیت است و از آنجا که این دو خانواده بتالاکتامازی شامل زیر خانواده‌های متعدد بوده بر این اساس هدف از این تحقیق، بررسی وجود ژن‌های بتالاکتامازی TEM و (DHA, MOX) AmpC در ایزوله‌های بالینی *E. coli* با استفاده از پرایمرهای یونیورسال به منظور شناسایی کامل تمام زیر خانواده‌های هر گروه ژنی توسط پروسه PCR، می‌باشد.

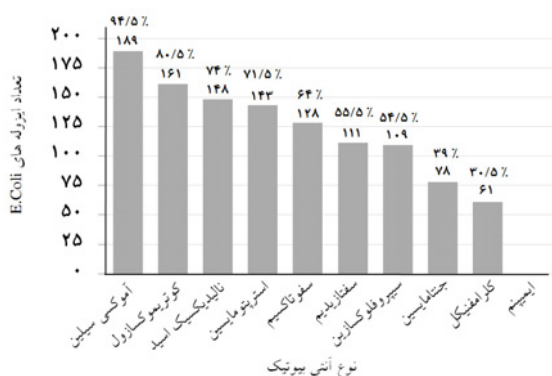
روش بررسی

این مطالعه از نوع توصیفی است ۵۰۰ نمونه بالینی شامل ادرار، مدفوع، خون و زخم در طی شش ماه از مهر تا اسفند ۱۳۸۷ از بیمارستان‌های مفید، علی‌اصغر، امام‌خمینی، شریعتی، اقبال و مرکز طبی کودکان شهر تهران جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه گروه میکروب-

گردد. نواحی مشترک توالی‌های هم طراز به منظور طراحی پرایمر در برنامه‌ی Generunner بررسی شد که به منظور اطمینان از عملکرد اختصاصی این پرایمرها از برنامه BLAST در NCBI استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه از مجموع ۲۰۰ ایزوله *E. coli* (۱۲۵/۶۲/۵) ایزوله از ادار و کاتر اداری، (۴۸/۲۴) ایزوله از مدفوع، (۱۸/۹) ایزوله از خون، (۵/۲/۵) ایزوله از زخم و (۴/۲) ایزوله از سایر نمونه‌های بالینی جمع‌آوری شد. الگوی مقاومتی سوش‌ها در برابر ۱۰ آنتی‌بیوتیک به کار گرفته شده در نمودار ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصل از آزمون غربالی دیسک آگار دیفیوژن، (۶۴/۱۲۸) نمونه به منظور تأیید تولید ESBLs از طریق آزمون Combined disk مورد ارزیابی قرار گرفت که از این میان، (۸۹/۱۱۵) و (۲/۱۰/۱۳) ایزوله به ترتیب به عنوان مولد ESBLs و AmpC بتالاکتامازی (شکل ۱) شناسایی شد. قابل توجه است که بیشترین مولدین آنزیم‌های بتالاکتامازی (۸۰٪) متعلق به نمونه‌های اداری بود. در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، از میان ۱۲۸ ایزوله غربال شده در تست تأییدی، (۷۴/۵۷/۸) و (۵/۳/۹) ایزوله به ترتیب حاوی ژن‌های TEM و DHA بود و ژن MOX در هیچ ایزوله‌ای شناسایی نشد. لازم به ذکر است که از این میان، دو نمونه بالینی از ادار، واجد دو خانواده مختلف از آنزیم‌های بتالاکتامازی (TEM و DHA) بود که از طریق Multiplex PCR به اثبات رسید (شکل ۲). نتایج به دست آمده از توالی‌های سکانس شده با استفاده از برنامه ClustaW2 و هم‌طراز کردن آن‌ها با توالی‌های مربوطه در ژن بانک،



نمودار- ۱: مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مورد بررسی در این مطالعه

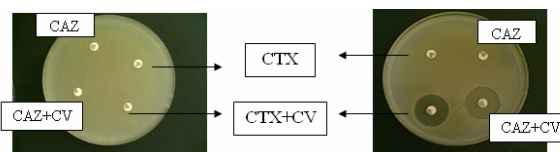
سازمان ایزوله‌ها با نتایج منفی تست تأییدی به عنوان مولدین بالقوه AmpC بتالاکتامازی انتخاب شدند همان‌طور که در صفحه ۳۴۵ در نشریه Diagnostic microbiology and infectious disease در سال ۲۰۰۷ به آن اشاره شده است.^{۱۳،۱۴} شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی نوع TEM، DHA و MOX DNA: ژنومیک سویه‌های غربال شده طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Bioneer) استخراج شد و برای پروسه PCR به منظور تکثیر ژن‌های بتالاکتامازی (TEM(۶۱۸bp)، DHA(۴۶۹bp) و MOX(۲۱۸bp) با استفاده از سه جفت پرایمر یونیورسال با شرایط زیر به کار گرفته شد.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵μl شامل: ۲μl MgCl2، ۵۰mM، ۲/۵ μl بافر ۱۰x، ۱۰mM، ۱μl dNTP، ۱/۵μl پرایمر ۵۰Pmol/μl هر کدام (۵۰U/μl)، ۱μl Taq DNA polymerase، ۲μl DNA الگو ۵۰ Pmol/μl و ۱۴/۵μl H2O در طی ۳۵ سیکل، تحت برنامه زمانی ترموسایکلر شامل: مرحله اولیه باز شدن دو رشته DNA به مدت سه دقیقه در دمای ۹۴°C، مرحله باز شدن دو رشته به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴°C، مرحله اتصال پرایمرها به مدت یک دقیقه در دمای ۶۲°C، مرحله تولید شدن رشته هدف به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲°C و مرحله تولید شدن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد و از طرف دیگر یک Multiplex PCR برای ژن‌های TEM و DHA مشابه با برنامه ذکر شده با افزودن هر دو جفت پرایمر صورت گرفت. در این مطالعه از سویه K. Pneumoniae ۷۸۸۱، مولد TEM جهت کنترل مثبت و از مخلوطی از مواد PCR بدون رشته الگو به عنوان کنترل منفی برای ژن‌های TEM، DHA و MOX استفاده شد. الکتروفورس محصولات PCR در ژل آگارز ۰/۸٪ در حضور مارکر bp (Fermentas) ۱۰۰ انجام شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید نتایج با UV مشاهده شد. به منظور اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر، باندهای محصولات PCR که از نظر اندازه مطابق با اندازه‌های پیش‌بینی شده بود را از روی ژل بریده و با استفاده از کیت Fermentas تخلیص گردید و نهایتاً تعیین توالی شد.

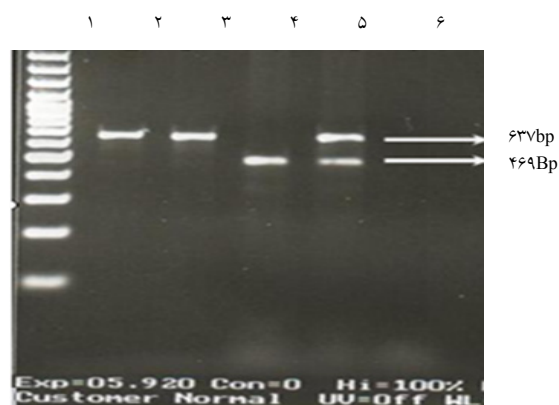
طراحی پرایمر: برای این منظور از توالی‌های مربوط به ژن‌های TEM، DHA و MOX در باکتری *E. coli* که به تعداد ۲۲، ۲۲ و شش (به ترتیب) در بانک ژن ثبت شده بود، استفاده گردید. توالی‌های هر گروه با استفاده از برنامه MEGA 4 multiple-alignment، هم‌طراز شده تا نواحی مشترک در زیر خانواده‌های هر گروه ژنی مشخص

(TEM, DHA و MOX) واجد زیرگروه‌های متعدد بوده لذا به منظور شناسایی کامل این زیرگروه‌ها در پروسه PCR از پرایمرهای یونیورسالی استفاده شد که با استفاده از برنامه BLAST این اطمینان حاصل گشت که این پرایمرها می‌توانند طیف وسیعی از این زیر گروه‌ها را پوشش دهند. طی فرایند PCR مشخص گردید که ۵۷/۸٪ و ۳/۹٪ ایزوله‌ها به ترتیب حاوی ژنوتیپ TEM و DHA بوده که در این میان دو ایزوله‌ای که فنوتیپ AmpC را نشان می‌دادند، حاوی ژن هر دو خانواده بتالاکتامازی TEM و DHA بودند که این امر بیان کننده اثر مهاري AmpC بتالاکتامازی در شناسایی فنوتیپی آنزیم‌های ESBLs می‌باشد که برای نشان دادن حضور همزمان ژن‌های این دو آنزیم از Multiplex PCR استفاده شد.

این امر حاکی از دو مورد گزارش منفی کاذب ESBLs از میان ۱۳ نمونه‌ای که در تست فنوتیپی به‌عنوان مولدین AmpC بتالاکتامازی مشخص شده بودند، می‌باشد. لازم به ذکر است که این میزان اختلاف بین نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی در مطالعه حاضر ناشی از تولید آنزیم‌های دیگر کلاس C بتالاکتامازی از قبیل CITM و کلاس A بتالاکتامازی از قبیل SHV, CTX-M, VEB و مانند آن می‌باشد. لذا انجام تکنیک‌های مولکولی با بهره‌گیری از پرایمرهای یونیورسالی می‌تواند نقش عمده‌ای را در تشخیص انواع آنزیم‌های ESBLs ایفا کند. در مطالعه مشابهی که توسط مزینانی و سایر همکاران در سال ۱۳۸۶ در بیمارستان ولیعصر تهران صورت گرفت، از میان ۷۶ نمونه بالینی *E. coli*، ۴۷ ایزوله (۶۰٪) حاوی ژن TEM بودند که این میزان بسیار مشابه با نتایج حاصل از این تحقیق بود.^{۱۵} مسجیدیان نشان داد که از میان ۱۴۸ سویه *E. coli*، ۸۴/۶٪ ایزوله‌ها ژن TEM را در برداشتند^{۱۶} و در تحقیقی که توسط میرصالحیان انجام شد، نشان داده شد که از میان ۳۳ سویه *E. coli*، ۳۹/۴٪ ایزوله حاوی ژن TEM بتالاکتامازی بودند.^{۱۷} مقایسه نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با مطالعات مذکور، نشان‌دهنده شیوع بالای این تیپ آنزیمی در سویه‌های بالینی *E. coli* در کشور ما می‌باشد. در مطالعه انجام شده توسط Bradford، نشان داده شد که بیشترین فراوانی آنزیم‌های ESBLs در ایالات متحده، مربوط به خانواده TEM بتالاکتاماز می‌باشد.^{۱۸} Hong Fang در طی سال‌های ۲۰۰۱ الی ۲۰۰۶ در سوئد نشان داد که از میان ۸۷ ایزوله اشریشیاکلی که از لحاظ فنوتیپی به عنوان مولدین ESBLs شناخته شده بودند، ۶۳٪ ژنوتیپ TEM



شکل - ۱: تشخیص فنوتیپی مولدین ESBLs و AmpC. شکل سمت راست: تست فنوتیپی ESBLs مثبت، شکل سمت چپ: تست فنوتیپی AmpC مثبت. CTX: سفوتاکسیم، CAZ: سفنازیدیم و CV: کلاوونیک اسید.



شکل - ۲: الکتروفورز ژل آگارز. ۱: مارکر ۱۰۰ bp، ۲: کنترل مثبت (کلبسیلا پنومونه ۷۸۸) برای bla-TEM، ۳: ایزوله بالینی مثبت برای bla-TEM، ۴ و ۵: ایزوله بالینی مثبت برای bla-Dha، bla-TEM و bla-Dha، ۶: کنترل منفی.

بررسی شدند که تشابه بالای ۹۰٪ را نشان دادند که این امر صحت طراحی پرایمرها و تکنیک درست و مناسب قطعه مورد نظر در طی روند PCR را نشان می‌دهد.

بحث

تشخیص فنوتیپی بتالاکتامازهای طیف وسیع (ESBLs)، به دلایل مختلف به ویژه بیان همزمان AmpC بتالاکتامازها، به طور کامل میسر نمی‌باشد. در این مطالعه نتایج نشان داد که از میان ۲۰۰ ایزوله *E. coli*، ۱۱۵ ایزوله از لحاظ تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی طیف وسیع فنوتیپ مثبت بوده که این امر نشان‌دهنده پتانسیل بالای مقاومتی این سویه‌ها می‌باشد. از طرفی ۱۳ ایزوله به عنوان مولدین AmpC بتالاکتامازی شناسایی شد که به منظور اثبات اثر این آنزیم‌ها در تست فنوتیپ تأییدی به جهت گزارش نتایج منفی کاذب ESBLs، از روش‌های مولکولی استفاده شد. از آنجایی که این خانواده‌های بتالاکتامازی

خانواده کار کرده‌اند. در این تحقیق سعی بر آن بود که با طراحی سه جفت پرایمر با طیف وسیع، زیرگروه‌های بیشتری را شناسایی کنیم که این مهم از طریق سنجش پرایمرها در برنامه BLAST به اثبات رسید. در میان ارگانیزم‌های تولید کننده ESBLs، اشریشیاکلی قادر به تولید این آنزیم‌ها به ویژه تیپ TEM بتالاکتامازی می‌باشد^{۲۰،۲۱} این امر در مطالعه حاضر به اثبات رسید. شناسایی سویه‌های مولد این آنزیم‌ها از طریق تست‌های فنوتیپیکی به سختی امکان‌پذیر می‌باشد^{۲۲} لذا لحاظ کردن بررسی‌های مولکولی با پرایمرهای یونیورسال در کنار آزمون‌های فنوتیپی می‌تواند در تشخیص کامل این نوع مقاومت‌ها مؤثر بوده و سهم عمده‌ای را در کنترل عفونت ایفا کند.

بتالاکتاماز را دارا بودند.^{۱۹} در مطالعه انجام شده توسط Emilio David Valverde، نشان داده شد که از میان ۱۱۲۷۲ نمونه *E. coli* از بیمارستان سالامانسا در اسپانیا، ۱۳۰ (۱٪) نمونه‌ها مولد آنزیم‌های ESBLs بوده که از این میان سهم خانواده TEM، ۲۲/۱٪ بوده است.^{۲۰} در تحقیقات به عمل آمده به ویژه در ایران به حضور AmpC بتالاکتامازها که منجر به نتایج منفی کاذب ESBLs می‌گردند، کم‌تر اشاره شده است. بنابراین ضروری است که برای شناسایی دقیق این نوع مقاومت از روش‌های مولکولی در کنار روش‌های فنوتیپی استفاده شود. از طرفی در این تحقیقات کم‌تر به یک خانواده بتالاکتامازی به طور کلی توجه شده و اکثریت، روی کلاس‌های محدودی از هر

References

- Li Q, Lee JY, Castillo R, Hixon MS, Pujol C, Doppalapudi VR, et al. NB2001, a novel antibacterial agent with broad-spectrum activity and enhanced potency against beta-lactamase-producing strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(5):1262-8.
- Perilli M, Celenza G, De Santis F, Pellegrini C, Forcella C, Rossolini GM, et al. E240V substitution increases catalytic efficiency toward ceftazidime in a new natural TEM-type extended-spectrum beta-lactamase, TEM-149, from *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(3):915-9.
- Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver A, et al. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum beta-lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during Project ICARE. *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3142-6.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(6):1211-33.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(4):657-86.
- Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003;47(4):273-95.
- Vakulenko S, Golemi D. Mutant TEM beta-lactamase producing resistance to ceftazidime, ampicillins, and beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(3):646-53.
- Kurokawa H, Shibata N, Doi Y, Shibayama K, Kamachi K, Yagi T, et al. A new TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase (TEM-91) with an R164C substitution at the omega-loop confers ceftazidime resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(9):2981-3.
- Hanson ND, Sanders CC. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Curr Pharm Des* 1999;5(11):881-94.
- Jacoby GA, Walsh KE, Walker VJ. Identification of extended-spectrum, AmpC, and carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by disk tests. *J Clin Microbiol* 2006;44(6):1971-6.
- Pai H, Kang CI, Byeon JH, Lee KD, Park WB, Kim HB, et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(10):3720-8.
- Goossens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53(4):257-64.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 15th informational supplement. Wayne, Pennsylvania: Clinical Laboratory Standards Institute Document M100-S15, 2005.
- Netzel TC, Jindani I, Hanson N, Turner BM, Smith L, Rand KH. The AmpC inhibitor, Syn2190, can be used to reveal extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58(3):345-8.
- Hosseini-Mazinani SM, Eftekhari F, Milani M, Ghandili S. Characterization of beta-lactamases from urinary isolates of *Escherichia coli* in Tehran. *Iran Biomed J* 2007;11(2):95-9.
- Masjedani GF, Valehi F, Talebi A and Rastegar LA. Molecular evaluation of resistance to expanded antibiotics in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Med Microbiol* 1386;1(2):27-34.
- Mirsalehian A, Akbari-Nakhjavani F, Peymani A, Kazemi B, Jabal Ameli F, Mirafshar SM. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae by phenotypic and genotypic methods in intensive care units in Tehran, Iran. *Daru* 2008;16(3):169-73.
- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(4):933-51, table of contents.
- Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol* 2008;46(2):707-12.
- Romero ED, Padilla TP, Hernández AH, Grande RP, Vázquez MF, García IG, et al. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. producing multiple extended-spectrum beta-lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;59(4):433-7.
- Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8(3):159-66.
- Rodríguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended spectrum beta-lactamases-producing *E. coli* in non hospitalized patient. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):1089-94.

Molecular detection of TEM and AmpC (Dha, mox) broad spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli*

Received: June 19, 2010 Accepted: August 17, 2010

Abstract

Mohammad Mehdi Soltan Dallal PhD.^{1,2}
Hedrosha Molla Aghamirzaei MS.³
Jalil Fallah Mehrabadi. PhD.⁴
Abdolaziz Rastegar Lari PhD.²
Aylar Sabbaghi MS.³
Mohammad Reza Eshraghian PhD.⁵
Atfeh Fard Sanei MS.¹
Ronak Bakhtiari MS.¹
Mojtaba Hanafi Abdar MS.⁶

1- Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Antimicrobial Resistant Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran.

4-MARS Bioinformatics Institute, Tehran, Iran.

5- Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

6- Department of Microbiology, Shahed University, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98-21- 88992971
email: soltanirad34@yahoo.com

Background: Beta- lactamase enzymes are the most important resistant factors to beta lactam antibiotics among gram negative bacteria. Nowadays, the prevalence of beta-lactamase infection is increasing worldwide and drawn the scientists attention as an important subject. Due to high prevalence of bacteria contained TEM beta lactamase and AmpC enzymes, using molecular methods especially designing universal primers could be valuable to detect all of them. The aim of this study was to determine the prevalence of TEM and AmpC (Dha and MOX) beta- lactamase genes using universal primers.

Methods: A total of 500 clinical specimens from various Hospitals in Tehran, Iran were collected and analyzed for *E. coli* based on biochemical tests. These clinical specimens were also screened by Disk diffusion agar, combined disk method and PCR to detect the samples producing extended- spectrum beta- lactamase.

Results: Overall 200 isolates of *Escherichia coli* were collected from the 500 clinical specimens out of which 128(64%) isolates were positive by PCR assay and showed bla-TEM, bla- AmpC (Dha, MOX) genes, 74(57.8%) and 5(3.9%) to have bla- TEM and bla Dha, respectively. Mox gene was not detected in any of the specimens.

Conclusions: Our results revealed that using the molecular methods with phenotype methods is very essential for complete detection of Beta- lactamases. There is the need for updating the treatment protocol because the prevalence of this resistance is increasing.

Keywords: *Escherichia coli*, extended spectrum, beta- lactamase TEM, AmpC beta-lactamase.