Original Paper

Antibiotic resistance and phenotypically and genotypically AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates from Outpatients

Alisha Akya (Ph.D)[1], Azam Elahi (M.Sc)*[2]
Roya Chegene Lorestani (M.Sc)[3], Yazdan Hamzavi (Ph.D)[4]

[1]Associate Professor, Department of Microbiology, Nosocomial Infection Research Centre, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5651-7824

[2]***Corresponding Author**, M.Sc of Medical Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. **azamelahi202@yahoo.com** ORCID ID: 0000-0003-0539-4224

[3]M.Sc of Medical Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ORCID ID: 0000-0002-8137-5378

[4]Associate Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1663-8159

Abstract

Background and Objective: Production of beta-lactamase enzymes is the most common mechanism of bacterial resistance against beta-lactam antibiotics. The aim of this study was to determine the antibiotic resistance pattern and the frequency of AmpC genes in *Escherichia coli* (*E.coli*) isolated in outpatients.

Methods: In this descriptive-analytical study, 67 isolates of *E.coli* were investigated from urinary tract infection of outpatients of the largest medical center in Kermanshah, west of Iran. Their susceptibility to ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime, cefoxitin and imipenem antibiotics was determined using disk diffusion. AmpC phenotypic screening was performed using combination disk method (cefoxitin with and without boronic acid). After extraction the bacterial genome, the presence of MOX, CIT, DHA, ACC, EBC and FOX genes were tested by multiplex PCR.

Results: The resistance of 67 *E.coli* isolated to ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime and cefoxitin was 49.2%, 49.2%, 37.3% and 25.3%, respectively. The 100% of the isolates were sensitive to imipenem. Seventeen (25.3%) and 9 isolates (13.4%) were phenotypically and genotypically positive for AmpC, respectively. The prevalence of CIT, MOX, FOX, DHA and EBC genes was 7.4%, 5.9%, 4.4%, 4.4% and 2.9%, respectively. However, the ACC gene was not found in isolates. Except for significant correlation between AmpC phenotype and MOX gene ($P<0.05$), no significant statistical relationship was found between phenotype and AmpC genotype. There was a significant correlation between AmpC phenotype and ceftazidime antibiotic ($P<0.05$). There was a significant correlation between CIT gene and EBC and FOX ($P<0.05$).

Conclusion: AmpC-producing *E.coli* isolates cause significant resistance to cephalosporins. One of the current therapeutic options is using of carbapenems. However, the relatively high prevalence and synergistic genes of AmpC in outpatients are a big concern and unfortunately it reflects the fact that these isolates are prevalent in the society.

Keywords: *Escherichia coli*, Urinary tract infection, AmpC

Received 18 Sep 2017 **Revised** 29 Jul 2018 **Accepted** 14 Aug 2018

Cite this article as: Alisha Akya, Azam Elahi, Roya Chegene Lorestani, Yazdan Hamzavi. [Antibiotic resistance and phenotypically and genotypically AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates from Outpatients]. J Gorgan Univ Med Sci. 2019 Winter; 20 (4): 108-114. [Article in Persian]

تحقیقی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بتالاکتامازهای AmpC از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی در بین ایزوله‌های اشرشیاکلی بیماران سرپایی

دکتر علیشا اکیا[1]، اعظم الهی*[2]، رویا چگنه لرستانی[3]، دکتر یزدان حمزوی[4]

۱- دانشیار میکروب شناسی، مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد ارکید 0000-0001-5651-7824

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد ارکید 0000-0003-0539-4224

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد ارکید 0000-0002-8137-5378

۴- دانشیار انگل شناسی، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد ارکید 0000-0001-7360-2449

چکیده

زمینه و هدف: *تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی یکی از شایع‌ترین مکانیسم‌های مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است. این مطالعه به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های AmpC در ایزوله‌های اشرشیاکلی (E.coli) بیماران سرپایی انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی - تحلیلی ٦٧ ایزوله E.coli مولد عفونت ادراری از بیماران سرپایی بزرگترین مرکز پزشکی در کرمانشاه بررسی شد. تعیین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفوکسیتین و ایمی‌پنم به روش انتشار در دیسک انجام شد. آزمایش فنوتیپی غربالگری AmpC با روش دیسک ترکیبی (سفوکسیتین همراه و بدون برونیک‌اسید) انجام شد. پس از استخراج ژنوم باکتری‌ها، ژن‌های MOX، CIT، DHA، ACC، EBC و FOX با روش PCR Multiplex مورد آزمایش قرار گرفتند.*

یافته ها: *مقاومت٦٧ ایزوله E.coli به سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفوکسیتین به‌ترتیب ٤٩/٢ درصد، ٤٩/٢ درصد، ٣٧/٣ درصد و ٢٥/٣ درصد تعیین شد. ١٠٠درصد ایزوله‌ها به ایمی‌پنم حساس بودند. ١٧ ایزوله (٢٥/٣درصد) و ٩ ایزوله (١٣/٤درصد) به‌ترتیب به‌صورت فنوتیپی و ژنوتیپی تولیدکننده AmpC بودند. فراوانی ژن‌هایCIT ، MOX، FOX، DHA و EBC به‌ترتیب ٧/٤درصد، ٥/٩درصد، ٤/٤درصد، ٤/٤درصد و ٢/٩درصد تعیین شد؛ اما ژن ACC در ایزوله‌ها یافت نشد. به‌جز ارتباط آماری معنی‌دار بین فنوتیپ AmpC و ژن MOX (P<٠/٠٥) هیچ ارتباط آماری معنی‌دار دیگری بین فنوتیپ و ژنوتیپ AmpC یافت نشد. بین فنوتیپ AmpC و آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم ارتباط آماری معنی‌داری وجود داشت (P<٠/٠٥). بین ژن CIT با EBC و FOX ارتباط آماری معنی‌داری یافت شد (P<٠/٠٥).*

نتیجه گیری: *جدایه‌های E.coli تولید کننده AmpC سبب مقاومت قابل توجهی به سفالوسپورین‌ها می‌شوند. یکی از گزینه‌های درمانی کنونی استفاده از کربا‌پنم‌ها است. با این حال شیوع نسبتاً بالا و حضور همزمان ژن‌های AmpC در بیماران سرپایی، یک نگرانی بزرگ و بیانگر این واقعیت است که این ایزوله‌ها در جامعه در حال شیوع هستند.*

کلید واژه‌ها: *اشرشیاکلی ، عفونت ادراری ، AmpC*

* نویسنده مسؤول : اعظم الهی ، پست الکترونیکی azamelahi202@yahoo.com

نشانی : کرمانشاه، باغ ابریشم، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی، کدپستی ٦٧١٤٨٦٩٩١٤ ، تلفن ٠٨٣-٣٤٢٧٤٦١٨

وصول مقاله: ١٣٩٦/٦/٢٧ ، اصلاح نهایی: ١٣٩٧/٥/٧ ، پذیرش مقاله: ١٣٩٧/٥/٢٣

مقدمه

اشرشیاکلی (*E.coli*) یکی از باکتری‌های مهم در ایجاد عفونت به‌خصوص عفونت مجرای ادراری (UTI) است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های *E.coli* بیشتر به‌صورت درمان تجربی انجام می‌شود و بسیاری از سویه‌های این باکتری به داروها مقاوم شده‌اند (١). آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام به‌دلیل طیف اثر گسترده و سمیت انتخابی علیه باکتری‌ها جایگاه ویژه‌ای در درمان عفونت‌ها دارند (٢)؛ اما استفاده وسیع آنها در طول چند دهه گذشته منجر به بروز مقاومت در بسیاری از باکتری‌ها شده است. مکانیسم اصلی مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است. این آنزیم‌ها حلقه بتالاکتام داروهایی نظیر سفالوسپورین‌ها و پنی‌سیلین‌ها را هیدرولیز کرده و موجب غیرفعال شدن آنها می‌گردند (٣). انواع جدیدتر آنزیم‌های بتالاکتاماز نظیر ESBL ها، بتالاکتامازهای نوع AmpC با واسطه پلاسمید (pAmpCs) و بتالاکتامازهای هیدرولیز کننده کاربا‌پنم (کاربا‌پنمازها) مقاومت به نسل‌های جدیدتر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را موجب شده‌اند (۴). بتالاکتامازهای نوع AmpC در تقسیم‌بندی آمبلر در گروه C قرار دارند و ژنوتیپ‌های معمول آنها شامل CIT، MOX، FOX، DHA، ACC و EBC هستند (۵). ژن‌های کدکننده بتالاکتامازهای AmpC روی کروموزوم یا

پلاسمید قرار دارند (۶). ژن‌های پلاسمیدی pAmpCs از ژن‌های AmpC کروموزومی اعضای خانواده انتروباکتریاسه مشتق شده‌اند (۷). از سال ۱۹۸۹ آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC با واسطه پلاسمید در نقاط مختلف جهان گزارش شده‌اند (۶). این پلاسمیدها می‌توانند در باکتری‌هایی مانند کلبسیلاها که ژن‌های کروموزومی AmpC را ندارند و یا مانند *E.coli* به‌صورت ضعیف بیان می‌شوند؛ منتقل شوند و باعث گسترش این ژن‌ها در میان باکتری‌ها شوند (۲). از طرف دیگر، این ارگانیسم‌ها می‌توانند بتالاکتاماز نوع AmpC کروموزومی را به مقدار زیاد تولید کنند. در حالی که در حالت طبیعی این آنزیم‌ها به مقدار کم تولید می‌شوند (۴). بیشتر این آنزیم‌ها سفالوسپورینار بوده؛ ولی تا حدی توانایی هیدرولیز سایر بتالاکتام‌ها را نیز دارند. آنزیم‌های AmpC سفالوسپورین‌های طیف گسترده مانند سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم و سفومایسین‌ها (مانند سفوکسیتن، سفوتتان) و مونوباکتام‌هایی مانند آزترونام را هیدرولیز می‌کند (۲). در بیشتر نقاط دنیا شیوع مقاومت به‌واسطه آنزیم‌های AmpC پلاسمیدی نسبت به ESBLها کمتر است؛ اما تشخیص آنها مشکل‌تر و طیف مقاومت ایجاد شده توسط این خانواده وسیع‌تر از ESBLها است (۸). از آنجایی که بتالاکتامازهای AmpC در برابر مهارکنندگان بتالاکتامازی به‌ویژه کلاولانیک‌اسید مقاوم هستند؛ در نتیجه با تست تاییدی ESBL مشخص نمی‌شوند. از این رو تشخیص فنوتیپی ارگانیسم‌های AmpC به‌دلیل نتایج گمراه کننده در آزمون فنوتیپی دشوار است (۷). به‌طوری که مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) هیچ روشی برای بررسی فنوتیپی تولید AmpC در میکروارگانیسم‌ها معرفی نکرده است (۷و۹). با این وجود در مطالعات مختلف از روش‌های متعدد برای تشخیص فنوتیپی بتالاکتاماز AmpC استفاده شده که از جمله آنها می‌توان مقاومت در برابر سفامایسین و سفتازیدیم، حفظ حساسیت به سفپیم، استفاده از مهارکننده‌هایی مانند ترکیبات برونیک اسید و یا کلوگزاسیلین و نیز سنجش رنگ‌زایی سریع را نام برد (۶و۷). این روش‌ها معمولاً در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی به‌طور روتین به‌کار نمی‌روند. لذا استفاده از روش‌های ژنوتیپی برای شناسایی وجود ژن‌های AmpC در کنار روش‌های فنوتیپی ضروری است (۶و۷). شناسایی جدایه‌های تولید کننده AmpC می‌تواند در کنترل عفونت موثر باشد و به پزشکان در انتخاب یک رژیم مناسب آنتی‌بیوتیکی کمک نماید. این مطالعه به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های AmpC در ایزوله‌های اشرشیاکلی شهر کرمانشاه انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی تعداد ۱۰۰ نمونه ادرار عفونی از بیماران سرپایی آزمایشگاه بیمارستان امام رضا (ع) کرمانشاه در سال‌های ۹۵-۱۳۹۴ جمع‌آوری گردید. این مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق (IR.KUMS.REC.1394.372) دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه قرار گرفت و با رضایت بیماران انجام گردید.

نمونه‌های جمع‌آوری شده روی محیط‌های اختصاصی کشت داده شدند. سپس تست‌های بیوشیمیایی افتراقی بر روی آنها انجام شد که از میان آنها تعداد ۶۷ ایزوله *E.coli* غیرتکراری تایید و وارد مطالعه شد.

ایزوله‌ها در محیط نگهدارنده Trypticase Soy Broth (TSB) (Merck, Germany) همراه با گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شامل سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم) با روش انتشار در دیسک (کربی بائر) (Mast Group, UK) انجام شد.

تست غربالگری فنوتیپی AmpC برای تمامی ایزوله‌ها با استفاده از فنیل برونیک اسید انجام شد. بدین طریق که از دیسک‌های سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم (Mast Group, U. K) به همراه برونیک

جدول ۱ : پرایمرهای مورد استفاده

پرایمر	ژن هدف	توالی (۵ به ۳)	اندازه باند (bp)
MOXM	***CMY-1, CMY-8, CMY-11, MOX-1, MOX-2***	***F : GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT*** ***R: CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG G***	۵۲۰
CITM	***LAT-4, BIL-1, CMY-1 تا LAT- 1***	***F :TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA*** ***R: TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC***	٤٦٢
DHAM	***DHA-1 DHA-2,***	***F :AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T*** ***R: CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC***	٤٠٥
ACCM	***ACC***	***F :AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA*** ***R: TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC***	٣٤٦
EBCM	***MIR-1 ACT-1,***	***F :TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG*** ***R: CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT***	٣٠٢
FOXM	***FOX-1 FOX-5b,***	***F :AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G*** ***R: CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG***	۱۹۰

اسید (Sigma, Germany) استفاده شد. ابتدا مقدار ۱۲۰ میلی‌گرم از پودر برونیک‌اسید در ۳ میلی‌لیتر حلال DMSO (Dimethyl Sulfoxide) و ۳ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از این محلول به دیسک سفوکسیتین اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در پلیت استریل قرار داده شد تا کاملاً جذب دیسک شود. سپس سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک‌فارلند تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار به کمک سواپ کشت داده شد. دیسک سفوکستین به‌تنهایی و همراه با برونیک اسید با فاصله مناسب بر روی پلیت قرار گرفت و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از سپری شدن این زمان هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. اگر هاله عدم رشد در اطراف آنتی‌بیوتیک با برونیک اسید بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر بود؛ ایزوله تولید کننده AmpC در نظر گرفته شد (۱۰).

از باکتری *Enterobacter cloacae* ATCC BAA-1143 به‌عنوان کنترل مثبت و از باکتری *E.coli* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

شناسایی ژن‌های AmpC با PCR Multiplex: ژنوم باکتری‌ها با روش جوشانیدن (boiling) استخراج شد و PCR برای ژن‌های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای طراحی شده در جدول شماره یک (۱۱) به روش مولتی پلکس انجام شد. در این روش تمامی پرایمرهای موجود در یک تیوپ ریخته شد و مخلوطی از پرایمرها (Primer Mix) تهیه شد.

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۲۵ میکرولیتر محلول Master Mix (SinaClon, Iran) با غلظت X ۲ (حاوی HotStar Taq DNA Polymerase، بافر PCR، مخلوط MgCl2 (۱/۵ mM) و dNTPs)، ۸ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر، پرایمر رفت و برگشت (SinaClon, Iran) با غلظت ۱۰ پیکومول هرکدام به مقدار یک میکرولیتر (حجم کلی ۱۲ میکرولیتر) و ۵ میکرولیتر DNA انجام گردید.

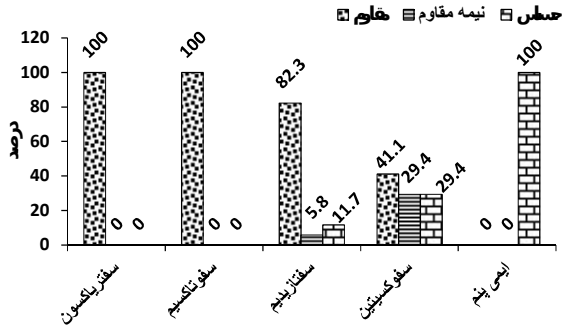
در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, USA) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس الکتروفورز محصولات PCR در کنار مارکر ۱۰۰ bp (SinaClon, Iran) بر روی ژل آگارز یک درصد انجام گردید. بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه ژل داک (Bio-Rad, USA) و نور UV باندهای مورد نظر ارزیابی شدند. از ایزوله‌های مشخص حاوی ژن‌های مورد نظر موجود در آزمایشگاه به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-20 و آزمون‌های آماری Chi-square و T-Test در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

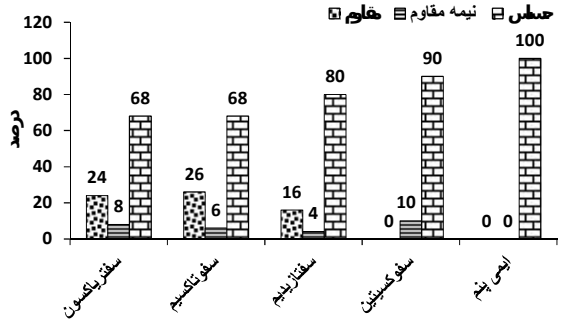
یافته‌ها

مقاومت ۶۷ ایزوله اشرشیاکلی (ایزوله‌های مقاوم و نیمه مقاوم) به سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفوکسیتین به‌ترتیب ۴۹/۲ درصد، ۴۹/۲ درصد، ۳۷/۳ درصد و ۲۵/۳ درصد تعیین شد.

۱۰۰ درصد ایزوله‌ها به ایمی‌پنم حساس بودند. نتایج سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها به تفکیک فنوتیپ مثبت و منفی در نمودارهای ۱ و ۲ آمده است.



نمودار ۱ : درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های اشرشیاکلی فنوتیپ مثبت AmpC

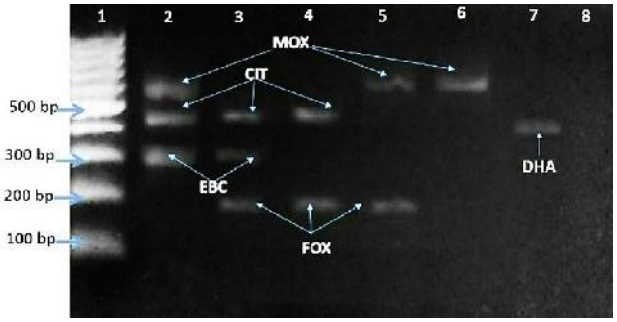


نمودار ۲ : درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های اشرشیاکلی فنوتیپ منفی AmpC

تعداد ۱۷ ایزوله (۲۵/۳ درصد) به‌صورت فنوتیپی و ۹ ایزوله (۱۳/۴ درصد) به‌صورت ژنوتیپی تولیدکننده AmpC بودند. فراوانی ژن‌های CIT، MOX، FOX، DHA و EBC به‌ترتیب ۵ ایزوله (۷/۴ درصد)، ۴ ایزوله (۵/۹ درصد)، ۳ ایزوله (۴/۴ درصد)، ۳ ایزوله (۴/۴ درصد) و ۲ ایزوله (۲/۹ درصد) بودند؛ اما ژن ACC در هیچیک از ایزوله‌ها یافت نشد. محصول PCR در شکل یک نشان داده شده است.

جدول ۲ :تست فنوتیپی و ژنوتیپی AmpC برای ایزوله‌های E.coli

تست فنوتیپی با برونیک اسید	شماره ایزوله‌ها (تعداد ایزوله‌ها)	ژن‌های AmpC					ژنوتیپ مثبت (تعداد ایزوله‌ها)
		CIT	MOX	DHA	FOX	EBC	
مثبت (۱۷ ایزوله)	۱ تا ۱۳ (۱۳ ایزوله)	-	-	-	-	-	۰
	۱۴ (۱ ایزوله)	+	+	-	-	-	۱
	۱۵ (۱ ایزوله)	+	-	+	-	-	۱
	۱۶ (۱ ایزوله)	-	+	-	-	-	۱
	۱۷ (۱ ایزوله)	-	+	-	+	-	۱
منفی (۵۰ ایزوله)	۱۸ تا ۶۲ (۴۵ ایزوله)	-	-	-	-	-	۰
	۶۳ (۱ ایزوله)	+	+	-	-	+	۱
	۶۴ (۱ ایزوله)	-	-	+	-	-	۱
	۶۵ (۱ ایزوله)	+	-	-	+	+	۱
	۶۶ (۱ ایزوله)	+	-	-	+	-	۱
	۶۷ (۱ ایزوله)	-	-	+	-	-	۱
جمع	۶۷ ایزوله	۵	۴	۳	۳	۲	۹



شکل ۱ : ژن‌های AmpC در ایزوله‌های E. coli
ردیف ۱: لدر ۱۰۰، ردیف ۲ تا ۷: نمونه‌های دارای ژن AmpC
ردیف ۸: نمونه منفی

به‌جز ارتباط آماری معنی‌دار بین فنوتیپ AmpC و ژن MOX (P<۰/۰۴۷) هیچ ارتباط آماری معنی‌دار دیگری بین فنوتیپ و ژنوتیپ AmpC یافت نشد. بین فنوتیپ AmpC و آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم ارتباط آماری معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۰۹). ارتباط بین ژن CIT با EBC (P<۰/۰۰۱) و FOX (P<۰/۰۰۴) از نظر آماری معنی دار بود. میزان مقاومت نسبت به سفوکسیتین ۱۷ ایزوله (۲۵/۳ درصد) تعیین شد. به طوری که ۷ ایزوله نسبت به سفوکسیتین مقاوم (کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر) و ۱۰ ایزوله نیمه‌مقاوم (کمتر یا مساوی ۱۸ میلی‌متر) بودند. همگی تولیدکننده AmpC به‌صورت فنوتیپی بودند و بقیه ایزوله‌ها (۷۴/۶درصد) نسبت به سفوکسیتین حساس (بیشتر یا مساوی ۱۸ میلی متر) بودند. در این میان ۵ ایزوله تولیدکننده AmpC به‌صورت ژنوتیپی (دارای حداقل یک ژن مثبت) یافت گردید.

۴ ایزوله هم از نظر فنوتیپی (تست برونیک اسید) و ژنوتیپی (PCR) مثبت بودند. به طوری که یک ایزوله دارای ژن‌های MOX و CIT، یک ایزوله دارای هر دو ژن CIT و DHA، یک ایزوله دارای ژن‌های FOX و MOX و یک ایزوله دارای ژن MOX بودند. ۵ ایزوله دارای ژنوتیپ مثبت بودند؛ در حالی که فنوتیپ منفی داشتند. به طوری که یک ایزوله دارای ژن‌های CIT، MOX و EBC، یک ایزوله دارای ژن‌های CIT، FOX و EBC، یک ایزوله دارای ژن‌های CIT و FOX و دو ایزوله دارای ژن DHA بودند (جدول ۲).

بحث

در این مطالعه همه ایزوله‌های مولد AmpC به ایمی‌پنم حساس بودند که بیانگر موثرترین آنتی‌بیوتیک بر علیه این سویه‌ها است.

از آنجایی که ژن‌های کد کننده AmpC به‌صورت پلاسمیدی نیز منتقل می‌شوند؛ امکان گسترش سوش‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به‌وسیله این ژن‌ها در بین گونه‌های باکتریایی وجود دارد. به‌نظر می‌رسد ESBLها به‌طور ذاتی به‌وسیله ژن‌های کروموزومی سفالسپورین‌های کلاس C (AmpC) تولید و در ایجاد مقاومت در باکتری‌های گرم منفی شرکت می‌کنند (۱۲). آنزیم AmpC کروموزومی در *E.coli* به مقدار کم تولید می‌شود؛ اما آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC با واسطه پلاسمید می‌تواند به این باکتری مقاومتی شبیه مقاومت در ارگانیسم‌های دارای بتالاکتاماز نوع AmpC کروموزومی (همچون انتروباکتر، سیتروباکتر، سراشیا و سودوموناس) اعطا کند (۴). ژن‌های پلاسمیدی AmpC فعالیت متفاوتی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف دارند. مثلاً ایزوله‌های *E.coli* دارای ژن ACC-1 می‌توانند نسبت به سفتازیدیم مقاوم شوند؛ اما نسبت به سفوتاکسیم و سفوتتان حساس باشند. در حالی که ایزوله‌های دارای ژن DHA-2، مقاومت متوسطی نسبت به سفوکسیتین دارند؛ اما نسبت به سفوتاکسیم یا سفتازیدیم حساسند (۳).

کاربابنم‌ها کلاس مهمی از داروهای بتالاکتام هستند که در برابر بتالاکتامازها مقاومند و در درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌های تولیدکننده AmpC و ESBL که قادر به هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها و سفالسپورین‌ها هستند؛ به‌کار می‌روند (۱۳)؛ اما در مطالعه حاضر

مقاومت بالایی به سفتریاکسون، سفوتاکسیم و سفتازیدیم وجود داشت که آنتی‌بیوتیک‌های مذکور عملاً علیه ایزوله‌های مولد AmpC کارایی لازم را ندارند. ایزوله‌های تولیدکننده pAmpCs نه‌تنها در برابر سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم مقاومند؛ بلکه در چنین ایزوله‌هایی امکان ایجاد جهش بیشتر و در نتیجه کاهش بیان پورین‌ها و مقاومت در برابر کارباپنم‌ها وجود دارد (۱۴). تست فنوتیپی استفاده از فنیل برونیک اسید به‌عنوان یک روش قابل اطمینان برای غربالگری AmpC معرفی شده است (۱۰). با این وجود، در مطالعه حاضر ۵ ایزوله (۴/۲۹درصد) دارای ژنوتیپ AmpC، از نظر فنوتیپی منفی بودند. نتایج به‌دست آمده از مطالعات متعدد نشان می‌دهد که تست‌های فنوتیپی روش دقیقی برای تشخیص قطعی بتالاکتاماز AmpC نبوده و بررسی بیان ژن‌های مرتبط ممکن است؛ کارآمدتر باشد (۱۵). جداسازی ارگانیسم‌های مولد AmpC دشوار است. زیرا حضور AmpC در باکتری‌ها همواره منجر به بروز مقاومت فنوتیپی نمی‌شود؛ خصوصاً اگر از روش‌هایی نظیر دیسک دیفیوژن ساده برای تفسیر نتایج حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده شود (۱۶). هرچند روش PCR به‌عنوان یک ابزار تحقیقی سودمند برای تشخیص این آنزیم‌ها به‌کار می‌رود؛ اما به‌صورت یک روش روتین در دسترس آزمایشگاه‌های بالینی قرار ندارد. در مطالعه حاضر تعدادی از سویه‌های مقاوم به سفوکسیتین تولیدکننده ژن‌های AmpC نبودند که دلایل مختلفی می‌تواند داشته باشد. از جمله احتمال وجود سایر ژن‌های AmpC که در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته است یا به‌دلیل دخالت سایر مکانیسم‌های مقاومت باشد. زیرا مقاومت در برابر سفوکسیتین تنها به‌دلیل تولید AmpC نبوده؛ بلکه مکانیسم‌های دیگری، از جمله تولید بتالاکتاماز طیف گسترده (ESBL)، متالوبتالاکتاماز (MBL) و یا تغییر در کانال‌های پورین نیز مطرح است (۶). شیوع واقعی AmpC در کشورهای مختلف و حتی در مناطق مختلف یک کشور تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای دارد. یکی از عوامل موثر در این امر، اتخاذ روش‌های متفاوت در شناسایی این آنزیم‌ها است. در مطالعه حاضر ۱۳/۴درصد ایزوله‌ها از نظر ژنوتیپی مثبت بودند که با نتایج برخی مطالعات در ایران سازگار است. مثلاً در مطالعاتی که طی سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۹۱ در بیمارستان‌های تهران انجام شد؛ فراوانی ژن AmpC در *E.coli* از ۱/۶۷درصد تا ۲۴درصد گزارش گردید (۴و۱۷و۱۸). تمامی ژن‌های AmpC شیوع زیر ۱۰درصد داشتند که با اکثر مطالعات انجام شده در ایران و سایر کشورها شباهت دارد (۴و۱۸و۱۹). ژن FOX در ایران توسط ملکی و همکاران در شهر ایلام با فراوانی ۴/۲درصد گزارش شد (۲۰) که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد؛ اما در چندین مطالعه در ایران صفر درصد گزارش شده است (۱۷و۱۸). در مطالعه ما ژن MOX با فراوانی ۵/۹درصد گزارش شد که پیش از این در هیچ مطالعه‌ای در ایران گزارش نشده بود (۴و۱۷). فقط در یک مطالعه که برروی ایزوله‌های *E.coli* در ایران انجام شد؛ ژن CMY (یکی از ژن‌های هدف MOX) ۳/۳درصد گزارش شد (۲۱). در مطاله ما ژن ACCیافت نشد که در یک مطالعه در ایران نیز صفر درصد گزارش شده است (۴). شیوع آنزیم بتالاکتاماز AmpC در *E.coli* در قاره اروپا از ۰/۶۹ درصد تا ۵۸/۲ درصد (۲۴-۲۲)، در قاره آسیا از ۱/۳ درصد تا ۲۰/۷درصد (۲۵)، در قاره آمریکا ۶/۱درصد (۲۶) و در قاره آفریقا ۶/۵ درصد (۱۹) گزارش شده است. وضعیت بهداشتی، نوع سویه‌ها، دوره و روش مطالعه در میزان فراونی ژن‌های AmpC موثر است (۶). به‌همین دلیل مقایسه شیوع AmpC در مطالعات مختلف دشوار است. شیوع مقاومت AmpC در سطح ملی در بسیاری از کشورها ناشناخته است (۵). حضور همزمان چند ژن AmpC در یک ایزوله زنگ خطری برای گسترش ژن‌های مقاومت AmpC است (۵و۶).

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم دسترسی به پرونده بیمار (به‌علت سرپایی بودن) برای بررسی سوابق بیمار از جمله سابقه بستری بودن در بیمارستان در چند سال اخیر، بررسی مصرف آنتی‌بیوتیک‌های تجویزی، ابتلا به بیماری‌های خاص نظیر نقص سیستم ایمنی اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که جدایه‌های *E.coli* تولید کننده AmpC سبب مقاومت قابل توجهی به سفالوسپورین‌ها می‌شوند و زمانی که با داروهای سفالسپورین درمان شوند؛ شکست درمانی بالاست. با توجه به نتایج این مطالعه یکی از گزینه‌های درمانی کنونی استفاده از کرباپنم‌ها است. با این حال، شیوع نسبتاً بالا و حضور همزمان ژن‌های AmpC در بیماران سرپایی، یک نگرانی بزرگ بوده و بیانگر این واقعیت است که متاسفانه این ایزوله‌ها در جامعه در حال شیوع هستند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه نتیجه طرح مصوب (شماره ۹۴۵۴۸) معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه بود و با حمایت مالی آن معاونت انجام گردید. بدین‌وسیله از کارکنان محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Akya A, Khodadoost M, Rashiditabar E. [Prevalence of blaTEM gene in Escherichia coli isolated from urinary tract infections of outpatients in Kermanshah]. J Zanjan Univ Med Sci. 2013; 21(5): 84-94. [Article in Persian]

2. Japoni-Nejad A, Fardmusavi N, Safari M, Kazemian H, Tabibnejad M, Nobaveh A, et al. [Prevalence of plasmid-mediated AmpC ß-Lactamase genes in clinical isolates of Klebsiella Pneumoniae in Arak city, Iran]. J Isfahan Med Sch. 2013; 31(249):

1285-95. [Article in Persian]

3. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid determined AmpC type β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Jan; 46(1): 1-11. doi: 10.1128/AAC.46.1.1-11.2002

4. Mansouri S, Chitsaz M, Hajihosseini R, Mirzaee M, Gheini M. [Determination of resistance pattern of plasmid-mediated AmpC]. Daneshvar Medicine. 2009; 16(80): 61-70. [Article in Persian]

5. Manoharan A, Sugumar M, Kumar A, Jose H, Mathai D, Khilnani GC, et al. Phenotypic & molecular characterization of AmpC β-lactamases among Escherichia coli, Klebsiella spp. & Enterobacter spp. from five Indian Medical Centers. Indian J Med Res. 2012 Mar; 135: 359-64.

6. Helmy MM, Wasfi R. Phenotypic and molecular characterization of plasmid mediated AmpC β-lactamases among Escherichia coli, Klebsiella spp., and Proteus mirabilis isolated from urinary tract infections in Egyptian hospitals. Biomed Res Int. 2014; 2014: 171548. doi: 10.1155/2014/171548

7. 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 Jan-Mar; 31(1): 53-9. doi: 10.4103/0255-0857.108723

8. Kim J, Lim YM. Prevalence of derepressed ampC mutants and extended-spectrum beta-lactamase producers among clinical isolates of Citrobacter freundii, Enterobacter spp., and Serratia marcescens in Korea: dissemination of CTX-M-3, TEM-52, and SHV-12. J Clin Microbiol. 2005 May; 43(5): 2452-55. doi: 10.1128/JCM.43.5.2452-2455.2005

9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fourth Informational Supplement. M100-S24. 2014 Jan.

10. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Klebsiella spp., Escherichia coli, and Proteus mirabilis. J Clin Microbiol. 2005 Aug; 43(8): 4163-7. doi: 10.1128/JCM.43.8.4163-4167.2005

11. Li Y, Li Q, Du Y, Jiang X, Tang J, Wang J, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-Type AmpC beta-lactamase resistance in China. J Clin Microbiol. 2008 Apr; 46(4): 1317-21. doi: 10.1128/JCM.00073-07

12. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect. 2003 Nov; 47(4): 273-95.

13. Kalantar D, Mansouri S, Razavi M. [Emergence of imipenem resistance and presence of Metallo-β-Lactamases enzymes in multi drug resistant gram negative Bacilli isolated from clinical samples in Kerman, 2007-2008]. J Kerman Univ Med Sci. 2010 Jun; 17(3): 208-14. [Article in Persian]

14. Dahmen S, Mansour W, Charfi K, Boujaafar N, Arlet G, Bouallègue O. Imipenem resistance in Klebsiella pneumoniae is associated to the combination of plasmid-mediated CMY-4 AmpC β-lactamase and loss of an outer membrane protein. Microb Drug Resist. 2012 Oct; 18(5): 479-83. doi: 10.1089/mdr.2011.0214

15. Tofteland S, Haldorsen B, Dahl KH, Simonsen GS, Steinbakk M, Walsh TR, et al. Effects of phenotype and genotype on methods for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Norway. J Clin Microbiol. 2007 Jan; 45(1): 199-205. doi: 10.1128/JCM.01319-06

16. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. Clin Microbiol Infect. 2008 Jan; 14 Suppl 1: 90-103. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x

17. Soltan dallal MM, Sabbaghi A, Fallah A, Molaaqamirrzaee H, Rstgearlary A, Fard Saneii A. [Detection of beta-lactamase genes bla-SHV and bla-AmpC (CITM, FOX) in clinical isolates of Escherichia coli]. J Med Counc I.R. Iran. 2010; 28(3): 269-76. [Article in Persian]

18. Soltan Dallal MM, Molla Aghamirzaei H, Fallah Mehrabadi J, Rastegar Lari A, Sabbaghi A, Eshraghian MR, et al. [Molecular detection of TEM and AmpC (Dha, mox) broad spectrum β-lactamase in clinical isolates of Escherichia coli]. Tehran Univ Med J. 2010; 68(6): 315-20. [Article in Persian]

19. Olusoga Ogbolu D, Terry Alli OA, Olanipekun LB, Ojo OI, Makinde OO. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing commensal Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli from hospital out-patients in Southern Nigeria. Afr J Med Med Sci. 2013; 5(3): 97-105. doi: 10.5897/IJMMS12.0005

20. Maleki A, Khosravi A, Ghafourian S, Pakzad I, Hosseini S, Ramazanzadeh R, et al. High Prevalence of AmpC β-Lactamases in Clinical Isolates of Escherichia coli in Ilam, Iran. Osong Public Health Res Perspect. 2015 Jun; 6(3): 201-4. doi: 10.1016/j.phrp.2015.02.001

21. Shayan S, Bokaeian M, Shahraki S. Prevalence and molecular characterization of AmpC-producing clinical isolates of Escherichia coli from southeastern Iran. Microb Drug Resist. 2014 Apr; 20(2): 104-7. doi: 10.1089/mdr.2013.0087

22. Gazouli M, Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC, Tzelepi E. Transferable class C beta-lactamases in Escherichia coli strains isolated in Greek hospitals and characterization of two enzyme variants (LAT-3 and LAT-4) closely related to Citrobacter freundii AmpC beta-lactamase. J Antimicrob Chemother. 1998 Oct; 42(4): 419-25.

23. Miró E, Agüero J, Larrosa MN, Fernández A, Conejo MC, Bou G, et al. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC β-lactamases and carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013 Feb; 32(2): 253-59. doi: 10.1007/s10096-012-1737-0

24. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother. 2007 Feb; 59(2): 165-74. doi: 10.1093/jac/dkl483

25. Yoo JS, Byeon J, Yang J, Yoo JI, Chung GT, Lee YS. High prevalence of extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from long-term care facilities in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010 Jul; 67(3): 261-65. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.012

26. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis isolates at a veterans medical center. J Clin Microbiol. 2000 May; 38(5): 1791-96.