گزارش کوتاه

فراوانی ژن بتالاکتاماز CTX-M-15 در سویه‌های بالینی *اشریشیاکلی* به روش PCR

دکتر محمد آهنجان[۱]، ظاهر مرسل جهان[۲]، بهنام هاشمی*[۳]، عیسی نظر[۴]، سعید قربانی[۵]

۱- دانشیار، گروه میکروبشناسی، مرکزتحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. ٤- دانشجوی کارشناسی ارشد آمار زیستی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. ۵- دانشجوی دکتری ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *آنزیم‌های بتالاکتامازی، مهم‌ترین عامل مقاومت در میان باکتری‌های گرم منفی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام محسوب می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین فراوانی ژن بتالاکتاماز CTX-M-15 در سویه‌های بالینی اشریشیاکلی به روش PCR انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه توصیفی - تحلیلی به روش مقطعی روی ۱۲۰ باکتری اشریشیاکلی جدا شده در بیمارستان‌های آموزشی شهر ساری انجام شد. برای تعیین مقاومت نمونه‌ها، تست آنتی‌بیوگرام با روش Combined Disk انجام گردید. وجود ژن CTX-M-15 با روش PCR ارزیابی شد.*

یافته‌ها : *۱۲۰ نمونه باکتری اشریشیاکلی از عفونت ادراری، خون و عفونت زخم به ترتیب با مقادیر ۸۱/٦ درصد (۹۸ نمونه)، ۱۲/۵ درصد (۱۵ نمونه) و ۵/۸۳ درصد (۷ نمونه) جداسازی شدند. ۹۸ نمونه ادرار، ۱۵ نمونه خون و ۷ نمونه زخم به ترتیب با ۸۳/٦ درصد، ۱۲/۷ درصد و ۳/٦ درصد دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند (P<۰/۰۵). ۱۸/۳درصد از سویه‌های مقاوم دارای بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از نوع CTX-M-15 بودند. بیشترین احتمال وجود CTX-M-15 در نمونه خون (۲۰درصد) و سپس نمونه ادرار و زخم (۱٤/۳درصد) تعیین شد (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری : *آنزیم بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در درصد بالایی از باکتری اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های ادراری شناسایی گردید.*

کلید واژه‌ها : *آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف ، اشریشیاکلی ، CTX-M-15 ، دستگاه ادراری*

* نویسنده مسؤول : بهنام هاشمی ، پست الکترونیکی **behnam.hashemi02@gmail.com**

نشانی: ساری کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی، تلفن ۳۳۵٤۳۰۸۱-۰۱۱، نمابر ۳۳۵٤۳۰۸۷

وصول مقاله : ۱۳۹٤/۳/۳۱ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹٤/۹/۱٤ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٤/۱۰/۱۵

مقدمه

اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) یکی از عوامل باکتریایی است که از عفونت های انسانی جدا شده و باعث عفونت دستگاه ادراری، گوارشی و منتژیت در نوزادان می‌شود. فراوان‌ترین باکتری هوازی- بی‌هوازی اختیاری روده بزرگ است. در بین انواع مقاومت‌های تولید شده به‌وسیله باکتری‌ها، انواعی که توانایی تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (extended-spectrum beta-lactamases: ESBL) را دارند؛ از اهمیت خاصی برخوردار هستند و به‌دلیل اکتساب پلاسمیدهای کدکننده آنزیم ESBL، به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مقاوم شده‌اند. از این‌رو درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها با مشکل مواجه شده است (۱). تولید ژن‌های بتالاکتاماز در باکتری‌ها یکی از خطرهای جدید در درمان عفونت های دارویی مقاومت چندگانه است که مهم‌ترین علت آن می تواند به‌خاطر مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام باشد. ارگانیسم‌هایی که این ژن‌ها را حمل می کنند؛ حتی می‌توانند باعث افزایش بیماری‌زایی و مرگ ومیر در بین افراد شوند (۲). ژن‌های اصلی کدکننده آنزیم ESBL به گروه‌های TEM ، SHV و CTX-M تعلق دارند. آنزیم CTX-M-15 در کلاس مولکولی A بتالاکتامازها قرار می‌گیرند (۳). این ژن سفوتاکسیم را به خوبی تجزیه می‌کند (۴). ژن CTXM-15 اولین بار از نمونه‌های *اشریشیاکلی* با منشا مدفوعی شناسایی شد که از نظرساختاری شبیه ژن CTX-M3 بود و تنها تفاوت آنها با یکدیگر در موقعیت یک اسیدامینه است که باعث افزایش توانایی CTXM-15 درتجزیه آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم می‌شود. ژن‌های CTXM-3 و CTXM-15 در گروه CTXM-9 قرار گرفته‌اند (۵و۶). بیش از ۲۰۰ نوع آنزیم ESBL کشف شده که اکثر آنها در خانواده انتروباکتریاسه دیده

شده‌اند (۷). همچنین شیوع جهانی ژن CTXM-15 منجر به جایگزین شدن CTXM-15 با آنزیم ESBL نوع SHV و TEM در اروپا، کانادا و آسیا شده است(۸). از آنجایی که *اشریشیاکلی* عامل اصلی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده است؛ لذا این مطالعه به منظور تعیین فراوانی ژن بتالاکتاماز CTX-M-15 در سویه‌های بالینی *اشریشیاکلی* به روش PCR انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی تحلیلی ۱۲۰نمونه بالینی از ادرار، زخم و خون بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر ساری طی سال ۱۳۹۲ در مدت هشت ماه جداسازی شد.

نمونه‌های جدا شده به آزمایشگاه میکروبشناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران منتقل و بر روی محیط کشت انتخاب ائوزین متیلن‌بلو کشت داده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. ایزوله *اشریشیاکلی* از طریق انجام تست‌های بیوشیمیایی از جمله مالونات، اوره آز، MR، VP و لیزین دکربوکسیلازاگار شناسایی گردید.

تعیین حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تهیه شده از شرکت Mast شامل جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم، ایمی‌پنم، نالیدیکسیک اسید و استرپتومایسین تعیین گردید. از نظر حضور آنزیم ESBL با روش combined disk ارزیابی شدند. باکتری‌های مقاوم به سفالوسپورین‌ها برای بررسی آنزیم ESBL با روش combined disk با استفاده از دیسک‌های مرکب شامل یک دیسک سفتازیدیم (۳۰میکروگرم) و یک دیسک مرکب (۳۰ میکروگرم سفتازیدیم توام با ۱۰ میکروگرم کلاولانیک اسید) تهیه شد. سپس این دیسک‌ها در فاصله حداقل ۲/۵ سانتی‌متر از هم در محیط مولر هینتون آگار قرار داده شدند. تولید آنزیم ESBL از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی‌متر یا بیشتر در اطراف حاوی دیسک کلاولانیک اسید مشخص گردید.

از باکتری‌های رشدیافته DNA ژنومیک به روش جوشاندن استخراج گردید. بدین صورت که مقداری کلنی از این باکتری برداشته شد و در آب دیونیزه وارد گردید و به مدت ۸ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد جوشانده شد. سپس ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۱۴۰۰۰ سانترفیوژ شدند. محلول رویی به عنوان DNA الگو در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای انجام PCR نگهداری شد. مخلوط اصلی واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۰۰میکرومول dNTPs، ۱۰پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی‌مول در لیتر MgCL2، ۰/۵ واحد آنزیم Tag و ۵۰ نانوگرم DNA الگوبود. مشخصات پرایمرهای مورداستفاده در جدول یک آمده است (۹).

برنامه دستگاه ترموسایکلر شامل مرحله واسرشته شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه بودکه با ۳۲ سیکل ادامه یافت. مرحله واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ثانیه، مرحله اتصال دردمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ثانیه، مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه ادامه یافت. در واکنش PCR برای کنترل کیفی تست از سوش کنترل مثبت (*اشریشیاکلی* ۲۵۹۲۲) و سوش کنترل منفی (*اشریشیاکلی* ۷۰۰۶۰۳ ATTCC) استفاده شد.

جدول ۱ : توالی پرایمرهای استفاده شده در واکنش PCR

ژن	توالی پرایمر
CTX-F	5'- GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC-3'
CTX-R	5' AGC CGC CGA CGC TAA TAC A-3'

داده‌ها بااستفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-15 و آزمون کای‌اسکوئر در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه‌وتحلیل‌شدند.

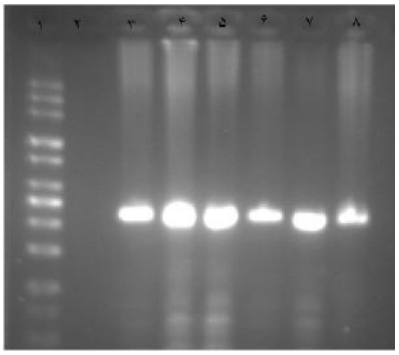
یافته‌ها

۱۲۰ نمونه باکتری اشریشیاکلی از عفونت ادراری، خون و عفونت زخم به ترتیب با مقادیر ۸۱/۶ درصد (۹۸ نمونه)، ۱۲/۵ درصد (۱۵ نمونه) و ۵/۸۳ درصد (۷ نمونه) جداسازی شدند.

۹۸ نمونه ادرار، ۱۵ نمونه خون و ۷ نمونه زخم به ترتیب با ۸۳/۶ درصد، ۱۲/۷ درصد و ۳/۶ درصد دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند (P<۰/۰۵) (جدول ۲).

جدول ۲ : توزیع فراوانی مقاومت دارویی ایزوله‌های اشریشیاکلی نمونه‌های ادرار، زخم و خون بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر ساری طی سال ۱۳۹۲

نام آنتی‌بیوتیک	تعداد (درصد)
نالیدیکسیک اسید	۶۲ (۶۱/۶۷)
استرپتومایسین	۵۷ (۴۷/۵)
سفتازیدیم	۴۸ (۴۰)
سیپروفلوکساسین	۳۲ (۲۶/۶۷)
جنتامایسین	۲۳ (۱۹/۱۷)
ایمی پنم	۱۵ (۱۲/۵)



شکل ۱ : ژل آگاروز حاوی نمونه‌های PCR ژن CTX-M-15 ایزوله‌های اشریشیاکلی نمونه‌های ادرار، زخم و خون بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر ساری طی سال ۱۳۹۲
۱- مارکر 100 bp ، ۲- کنترل منفی برای CTX-M ، ۳ الی ۸ - ایزوله بالینی مثبت برای CTX-M

۱۸/۳درصد از سویه‌های مقاوم دارای آنزیم ESBL از نوع CTX-M-15 بودند (شکل یک). بیشترین احتمال وجود CTX-M-15 در نمونه خون (۲۰درصد) و سپس نمونه ادرار و زخم (۱۴/۳درصد) تعیین شد (P<۰/۰۵).

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه آنزیم بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در درصد بالایی از باکتری *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های ادراری شناسایی گردید.

در مطالعه Khurana و همکاران در شمال هند ۲۶/۶درصد ایزوله‌های *اشریشیاکلی* به عنوان مولد آنزیم‌های ESBL گزارش گردید (۱۰) که نسبت به نتایج مطالعه ما پایین است. در مطالعه Taşli و Bahar در ترکیه میزان شناسایی فنوتیپ ESBL ۱۷ درصد تعیین شد (۱۱). در مطالعه میرزایی و همکاران ۱۶۰ ایزوله *اشریشیاکلی* از نظر تولید بتالاکتاماز CTX-M با روش PCR ارزیاب شد و ۳۷/۸ درصد نمونه‌ها مثبت بودند (۹). در مطالعه Ryoo و همکاران در کره، بتالاکتاماز نوع CTX-M-15 رایج‌ترین بتالاکتاماز در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* ارزیابی شد (۱۲). در مطالعه بابایی و همکاران در گرگان فراوانی ژن CTX-M ۴۵/۲درصد گزارش شد (۱۳) که بالاتر از مطالعه حاضر است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که آنزیم بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در درصد بالایی از باکتری *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه های ادراری شناسایی گردید. لذا استفاده از پروتکل درمانی مناسب برای تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۹۵/۱۸۶/ک) معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران بود و با حمایت مالی آن معاونت محترم به انجام رسید. همچنین از سرکار خانم مریم عبداللهی و از تمام کسانی که ما را در اجرای این مطالعه یاری نمودند؛ قدردانی می‌نماییم.

References

1. Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, et al. Genetic background of Escherichia coli and extended-spectrum beta-lactamase type. Emerg Infect Dis. 2005 Jan; 11(1): 54-61.

2. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect. 2008 Jan; 14 (Suppl 1): 144-53.

3. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Jan; 48(1): 1-14.

4. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum ß-lactamase-producing Escherichia coli. and Klebsiella pneumoniae in russian hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Dec; 47(12): 3724-32. doi: 10.1128/AAC.47.12.3724-3732. 2003

5. Duttaroy B, Mehta S. Extended spectrum b lactamases (ESBL) in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. Indian J Pathol Microbiol. 2005 Jan; 48(1): 45-8.

6. Malini AB, Sageerabanoo S, Kowsalya R,Sarkar G. The occurrence of CTX-M3 type extended Spectrum Beta Lactamases among Escherichia Coli causing urinary tract infections in a Tertiary Care Hospital in Puducherry. J Clin Diagn Res. 2012; 6(7): 1203-6.

7. Liu G, Ling BD, Zeng Y, Lin L, Xie YE, Lei J. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of Enterobacter cloacae from a Teaching Hospital in China. Jpn J Infect Dis. 2008 Jul; 61(4): 286-9.

8. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol. 2006 Oct; 9(5): 466-75.

9. Mirzaee M, Pourmand MR, Chitsaz M, Mansouri S. Antibiotic resistance to third generation cephalosporins due to CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases in clinical isolates of Escherichia coli. Iran J Public Health. 2009; 38(1): 10-17.

10. Khurana S, Taneja N, Sharma M. Extended spectrum beta-lactamase mediated resistance in urinary tract isolates of family Enterobacteriaceae. Indian J Med Res. 2002 Oct; 116: 145-9.

11. Taşli H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based Enterobacteriaceae in Turkey. Jpn J Infect Dis. 2005 Jun; 58(3): 162-7.

12. Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, Park YJ, Lee K, Bae IK, et al. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae and emergence of GES-3 in Korea. J Antimicrob Chemother. 2005 Oct; 56(4): 698-702.

13. Babaii Kochaksaraii M, Nasrolahi Omran A, Javid N, Shakeri F, Yazdi M, Ghaemi EA. [Extended spectrum beta lactamase producing E.coli isolated from Gorgan, North of Iran]. Medical Laboratory Journal. 2012; 6(1): 51-58. [Article in Persian]

Short Communication

Prevalence of CTX-M-15 type of beta-lactamase gene in *Escherichia coli* strains using PCR method

Ahanjan M (Ph.D)[1], Morsal-Jahan Z (B.Sc)[2]
Hashemi B (B.Sc)*[3], Nazar E (B.Sc)[4], Ghorbani S (M.Sc)[5]

[1]Associate Professor, Department Microbiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. [2]M.Sc Student in Immunology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. [3]M.Sc Student in Microbiology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. [4]M.Sc Student in Biostatistics, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. [5]Ph.D Candidate in Virology, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Beta-lactamase enzymes are the most important resistance factors among Gram-negative bacteria to the beta-lactam group of antibiotics. This study was conducted to determine the prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* isolates using PCR method.

Methods: This descriptive – analytic study was conducted on 120 *Escherichia coli* samples isolated in hospitals in Sari in northern Iran during 2013. Antibiogram was conducted using combined disk method to determine the sample resistance. The presence of β- lactamase gene of CTX-M-15 in ESBL was assessed using PCR method.

Results: Out of 120 *Escherichia coli*, 98 (81.6%), 15 (12.5%) and 7 (5.8%) bacteria isolated from urinary tract, blood and wound, respectively. Multiple drug resistance were seen in 98% of urine samples, 12.7% of blood samples and 3.6% of wound samples ($P<0.05$). 18.3% of multiple drug resistance samples were positive for CTX-M-15 β -lactamases resistance gene. The probable presence of CTX-M-15 were detected in blood sample (20%), urine sample and wounds (14.3%) ($P<0.05$).

Conclusion: Beta-lactamase enzymes were detected in high percent of *Escherichia coli* isolated from urine samples.

Keywords: Spectrum ß-lactamases, *Escherichia coli*, CTX-M-15, Urinary tract

*** Corresponding Author: Hashemi B (B.Sc), E-mail: behnam.hashemi02@gmail.com**

Received 21 Jun 2015 **Revised** 5 Dec 2015 **Accepted** 5 Jan 2016

Cite this article as: Ahanjan M, Morsal-Jahan Z, Hashemi B, Nazar E, Ghorbani S. [Prevalence of CTX-M-15 type of beta-lactamase gene in *Escherichia coli* strains using PCR method]. J Gorgan Uni Med Sci. Winter 2017; 18(4): 109-112. [Article in Persian]