● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ دهم، شماره ۴، ص ۲۵۰-۲۴۶، ۱۳۸۲

مقالهٔ موردی

گزارش دو مورد اشریشیاکلی فاقد آنزیم بتالاکتاماز و مقاوم به آمپی‌سیلین در بین ۱۵۰ باکتری جدا شده از کشت ادرار و مدفوع در کرمان

دکتر محمدحسن مصحفی[۱]، دکتر شهلا منصوری[۲] و دکتر مهدیه سلاجقه[۳]

خلاصه

بتالاکتامازها آنزیم‌هایی هستند که سبب غیرفعال کردن آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام می‌گردند و یکی از مهمترین عوامل مقاومت نسبت به این داروها می‌باشند. جدیداً سویه‌هایی از باکتری‌های مختلف گزارش شده اند که فاقد آنزیم بتالاکتاماز بوده و لیکن نسبت به پنی‌سیلین‌ها مقاومند. در این تحقیق تولید بتالاکتاماز در ۱۵۰ نمونه اشریشیاکلی مقاوم به آمپی‌سیلین با روش یدومتری بررسی شد. دو نمونه که یکی از عفونت ادراری و دیگری از مدفوع جدا شده بودند، علاوه بر مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین، نسبت به ترکیب آموکسی‌سیلین ـ کلاولانیک اسید نیز مقاوم بوده و قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز نبودند. حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC) آمپی‌سیلین که با روش رقیق‌سازی در آگار انجام شد، برای این دو سویه بالاتر از ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. وجود اشریشیاکلی مقاوم به آمپی‌سیلین و مقاوم به مهار کنندهٔ بتالاکتاماز اولین مورد گزارش چنین سویه‌هایی در ایران است.

واژه‌های کلیدی: بتالاکتاماز، اشریشیاکلی، آمپی‌سیلین

۱- استادیار میکروبیولوژی، ۲- دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- دکتر داروساز

مقدمه

اشریشیاکلی مهمترین عامل عفونت‌های ادراری و از عوامل عمده عفونت‌های بیمارستانی بوده که به طور معمول در رودهٔ انسان و حیوانات یافت می‌شود (۱۲). آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام به دلیل قدرت اثر، طیف گسترده و توانایی در کشتن و سمیت کم برای سلول‌های یوکاریوت به فراوانی در پزشکی و دندانپزشکی استفاده شده و اهمیت زیادی در درمان دارند (۲). استفاده گسترده از این داروها به خصوص در بیمارستان‌ها سبب بروز سویه‌های مقاوم به دارو گردیده و افزایش مقاومت نسبت به این داروها در میان باکتری‌های روده‌ای گزارش شده است (۱۰،۱۲،۱۵).

حساسیت نسبت به داروهای بتالاکتام بستگی به اتصال دارو به پروتئین هدف، مقاومت در برابر بتالاکتاماز و در باکتری‌های گرم منفی نفوذپذیری غشاء دارد. در حالی که زیربنای اصلی مقاومت، غیرفعال شدن دارو به وسیله بتالاکتامازهاست. این آنزیم‌ها حلقه بتالاکتام در پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها را شکسته و سبب غیرفعال شدن دارو می‌گردند. بتالاکتامازها هم توسط باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی تولید شده و ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی می توانند در تولید بتالاکتامازها نقش داشته باشند (۸). علاوه بر تولید بتالاکتاماز، مقاومت در برابر داروهای بتالاکتام می‌تواند ناشی از تغییر در مقدار یا میل ترکیبی پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین (PBP) برای آنتی‌بیوتیک باشد. مقاومت کلینیکی نسبت به بتالاکتام‌ها در باکتری‌های گرم منفی غالباً در ارتباط با تغییر PBP نمی‌باشد (۴).

در اشریشیاکلی بیش از ۲۰۰ نوع بتالاکتاماز یافت شده که بر اساس عملکرد و ساختمان تقسیم‌بندی شده‌اند. فرم‌های کلاسیک این بتالاکتامازها شامل TEM-1، TEM-2 و SHV-1 می باشد که تولید آنها در باکتری‌های گرم منفی توسط پلاسمیدها کُد می‌گردد (۲).

استفاده از چنین ترکیباتی سبب ایجاد باکتری‌های جهش یافته‌ای شده که به طور نسبی به اثر غیرفعال کننده‌های بتالاکتاماز مقاوم شده و بنابراین نسبت به ترکیبات بتالاکتام و ممانعت کننده‌های بتالاکتاماز مقاوم گردیده‌اند (۱،۲،۳،۷،۱۶،۱۷).

این جهش در آنزیم‌های بتالاکتاماز کلاس A از خانواده SHV و TEM گزارش گردیده است (۱۴،۱۶،۱۸). پس از مشاهده اولین مورد بتاکتامازهای TEM که مقاوم به اسید کلاولانیک بودند، گزارشاتی مبنی بر پیدایش چنین آنزیم هایی در سایر نقاط داده شده است (۲،۴،۱۳،۱۴،۱۷). وجود سویه‌هایی از باکتری‌های مقاوم به مهارکننده‌های بتالاکتاماز علاوه بر باکتری‌های آنتریک در باکتری‌های دیگر نظیر هموفیلوس آنفلوآنزا نیز گزارش گردیده است. برای مثال در آمریکای شمالی سویه‌هایی از هموفیلوس آنفلوآنزا یافت شده که نسبت به آمپی‌سیلین مقاوم بوده و دارای MIC بالا نسبت به این دارو بوده‌اند لیکن قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز نبوده‌اند(۳). این بررسی با هدفی مشابه و در مورد سویه‌های اشریشیاکلی مقاوم به ممانعت کننده‌های بتالاکتاماز در کرمان صورت گرفته است.

مواد و روش کار

باکتری‌های مطالعه شده ۱۵۰ نمونه اشریشیاکلی شامل ۱۰۸ سویه از موارد عفونت ادراری و ۴۱ سویه از نمونه‌های کشت مدفوع بود که به دیسک ۱۰ میکروگرمی آمپی‌سیلین مقاومت داشتند. باکتری‌های مزبور از میان ۵۵۰ سویهٔ اشریشیاکلی که طی اسفند ماه ۱۳۷۸ لغایت مرداد ماه ۱۳۷۹ از سطح شهر کرمان جمع‌آوری و شناسایی شده بودند، جدا گردیدند (۱۲).

آزمایش تعیین حساسیت: از دیسک ۱۰ میکروگرمی آمپی‌سیلین ساخت شرکت پادتن طب و دیسک Amoxicillin / clavulanic acid 20/10mg ساخت شرکت Difco و با استفاده از روش استاندارد Nccls استفاده شد (۷).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC): برای تعیین MIC از روش استاندارد Agar dilution استفاده شد. آمپی‌سیلین به صورت پودر و با خلوص ۸۲/۶٪ از شرکت جابرین حیان تهیه شد. با توجه به خلوص آنتی‌بیوتیک غلظت‌های نهایی ۱۶ تا ۵۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر در محیط مولر هینتون آگار تهیه شد. پس از استاندارد کردن محلول میکروبی با استاندارد ۰/۵ مک فارلند، رقت ۱:۲۰۰ از آن تهیه شد و سوسپانسیون میکروبی (۱۰ میکرولیتر)

روی پلیت به صورت نقطه‌ای کشت داده شد به طوری که غلظت نهایی معادل 1×10^4 CFU/ml باشد.

بررسی تولید بتالاکتاماز: تولید بتالاکتاماز بر اساس آزمایش یدومتری و به روش اسلاید انجام گرفت (۱۱) به‌طور مختصر به یک ویال پنی‌سیلین G، ۱ میلیون واحدی ساخت کارخانه جابربن حیان، یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شده و به حجم‌های ۰/۱۵ میلی‌لیتر تقسیم گردید. برای نگهداری محلول پنی‌سیلین برای مدت طولانی محلول‌های تقسیم شده $-20^{\circ}C$ قرار داده شد. محلول ید با اضافه کردن ۱/۵ گرم یدورپتاسیم، ۰/۳ گرم کریستال ید در بافر فسفات تهیه و حجم آن به ۱۰۰ میلی‌متر رسانده شد. برای انجام آزمایش ۱/۱ میلی‌لیتر از محلول ید را به ۰/۱۵ میلی‌لیتر محلول پنی‌سیلین اضافه نموده و روی یک لام تمیز، نمونه میکروبی در یک قطره محلول ید، پنی‌سیلین حل شد. پس از مخلوط شدن کامل یک قطره نشاسته با غلظت (۰/۴ درصد) روی لام اضافه کرده و تغییر رنگ محلول از ارغوانی به سفید (نشان دهنده وجود بتالاکتاماز) در فواصل زمانی ۵، ۱۰ و ۳۰ دقیقه بررسی گردید. کنترل مثبت شامل سویه استافیلوکوک ارئوس ATCC ۲۵۹۲۲ تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز بود.

نتایج

در این بررسی با انجام آزمایش یدومتری جمعاً دو نمونه در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۳۰ دقیقه منفی بود. که یکی از نمونه‌ها مربوط به موارد ادراری و یک نمونه از کشت مدفوع جدا شده بود. بررسی فاصلهٔ زمانی تولید بتاکتاماز در سویه‌های ادراری و مدفوعی در جدول ۱، نشان داده شده است. به طورکلی در ۵۰٪ از نمونه‌ها در ۵ دقیقه اول، در ۳۵/۱٪ پس از ده دقیقه و در ۱۴/۹٪ موارد واکنش پس از ۳۰ دقیقه مثبت گردید.

در سویه‌های ادراری واکنش مثبت در ۵ دقیقه اول بیشتر بود در حالی که سویه‌های مدفوعی واکنش مثبت پس از ۱۰ دقیقه بیشتر بود.

حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد برای آمپی‌سیلین برای دو سویه بتالاکتاماز منفی، بالاتر از 512µg/ml بود و هر دو سویه نسبت به دیسک آموکسی‌سیلین ـ کلاولانیک اسید مقاوم بودند. قطر هالهٔ عدم رشد در برابر این دیسک معادل با ۱۰ میلی‌متر بود که در جدول استاندارد قطر هاله عدم رشد ≥۱۸ میلی‌لیتر حساس گزارش می‌گردد.

جدول ۱: *تولید بتالاکتاماز در ایزوله‌های ادراری و مدفوعی اشریشیاکلی در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۳۰ دقیقه*

زمان / سویه‌های مورد بررسی	واکنش مثبت در فاصله زمانی (دقیقه) تعداد (درصد)			
	۵	۱۰	۳۰	تعداد کل
سویه‌های جدا شده از کشت ادرار	۶۱ (۵۶/۵)	۲۹ (۲۶/۹)	۱۸ (۱۶/۶)	۱۰۸ (۱۰۰)
سویه‌های جدا شده از کشت مدفوع	۱۳ (۳۲/۵)	۲۳ (۵۷/۵)	۴ (۱۰)	۴۰ (۱۰۰)
جمع کل	۷۴ (۵۰)	۵۲ (۳۵/۱)	۲۲ (۱۴/۹)	۱۴۸ (۱۰۰)

بحث

اشریشیاکلی یکی از عوامل عمده عفونت‌های ادراری و عفونت‌های جدی در نوزادان، بیماران نوتروپنیک و سایر بیماری‌های زمینه‌ای بوده و اهمیت زیاد این باکتری در ایجاد بیماری‌های عفونی مختلف بر کسی پوشیده نیست. مقاومت زیاد این باکتری در برابر آمپی‌سیلین به عنوان دارویی مناسب در درمان عفونت‌های گرم منفی مسأله‌ای حائز اهمیت می‌باشد. در تحقیق انجام شده در کرمان میزان مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین ۷۶/۸ درصد گزارش شده است. (۱۲)

اخیراً گزارش‌های زیادی در مورد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به واسطهٔ مهار از ممانعت کننده‌های بتاکتاماز که به فامیل TEM مربوط می‌شوند، به عمل آمده است (۵). اولین مکانیسمی که در

مورد مقاومت نسبت به مهار کننده‌های بتالاکتام - بتالاکتاماز در اشریشیاکلی شرح داده شده است، در ارتباط با تولید بیش از حد بتالاکتاماز نوع TEM و تغییر در پروتئین‌های غشایی است که جذب آنتی‌بیوتیک و مهارکننده را محدود می‌کنند (۵،۶).

اثر غیرفعال کنندهٔ بتاکتامازها به علت موتاسیون در بتاکتامازهای TEM که به نام (Inhibitor Resistance TEM) IRT نامیده شده‌اند، افزایش یافته و در فرانسه و سایر کشورهای اروپایی میزان سویه‌های IRT از موارد کلینیکی ۳٪ گزارش شده است.

در اسپانیا این باکتری‌ها را علاوه بر نمونه‌های انسانی از نمونه‌های مربوط به رودهٔ خوک نیز جداسازی نموده‌اند (۱۳). علاوه بر اشریشیاکلی انواع IRT در پروتئوس میرابیلیس، کلبسیلا پنومونیه و سایر باکتری‌های روده‌ای گزارش شده است (۱۲).

در بررسی حاضر ۲ مورد از ۱۵۰ سویه اشریشیاکلی (۱/۳٪) تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز نبوده‌اند که اندکی کمتر از میزان گزارش شده در کشورهای اروپایی است که می‌تواند به علت روش بررسی در این مطالعه باشد. هر دو سویه نسبت به سفالوسپورین‌های نسل دوم و سوم شامل سفازولین، سفتریاکسون و سفرادین حساس گزارش شده بودند و جداسازی اشریشیاکلی‌های مقاوم به آموکسی‌سیلین ـ کلاولانیک اسید ولی حساس به سفالوتین و سایر سفالوسپورین‌ها، به خوبی وجود آنزیم‌های IRT را در این دو سویه مشخص می‌کند که با تحقیق Brians و دیگر پژوهشگران در این زمینه همخوانی دارد (۲،۵،۱۶).

با توجه به اهمیت یافتن چنین سویه‌هایی که با مکانیسم جدید نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مقاوم شده‌اند، جا دارد تا این بررسی بر روی سویه‌های بیشتری و حتی در مورد سایر باکتری‌ها انجام گیرد و خصوصیت ژنتیکی نظیر وجود پلاسمید احتمالی در این سویه‌ها مورد بررسی قرار گیرد تا شاید از طریق یافتن مکانیسم ایجاد مقاومت، بتوان راهی برای مقابله با آن بدست آورد.

Summary

Identification of β-Lactamase-Negative-Ampicillin Resistance Strains of *Escherichia coli* in 150 Isolates from Urinary Tract Infection and Fecal Flora in Kerman

Moshafi M.H, PhD[1], Mansouri Sh., PhD.[2], and Salajeghe M, Pharm.D.[3]

1. Assistant Professor of Microbiology, 2. Associate Professor of Microbiology, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran 3. Pharmacist

β-lactamases are enzymes which inactivate the β-lactam antibacterial agents and are one of the major causes of resistance against these drugs. Recently there are reports on the isolation of bacteria which does not produce β-lactamase, but are resistant to penicillins. In the present study, β-laclamase production was determined using iodometric method on 150 ampicillin resistance Escherichia coli isolates from urinary tract infections (UTI) and fecal samples. These strains were resistance to both ampicillin and the combination of amoxicillin-clavulanic acid. They were identified as non-β-lactamase producers by iodometric method. Minimum inhibitory concentration for ampicillin in these strains were >512 μg/ml. This is the first report on the identification of ampicillin resistance β-lactamase negative E. coli in Iran.

Key Words: *β-lactamase, E. coli, Ampicillin*

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2003; 10(4): 246-250

References

1. Arpin C, Labia R, Dubois V, Noury P, Souquet M and Quentin C. TEM-80, a novel inhibitor-resistant β-lactamase in a clinical isolate of Enterobacter cloacae. *Antmicrob Agents Chemother 2002; 46(5):* 1183-1189.
2. Brinas T, Zarazaga M, Saenz Y. Ruiz-Lerrea F and Torres C. β-lactamases in ampicillin- resistant Escherichia coli isolates from foods, humans and healthy animals. *Microb* 2003; 46(10): 3156-3163.
3. Barry AL, Fuchs PC and Brown SD. Identification of β-lactamase-negative, ampicillin-resistant strains of Haemophilus influenzae with four methods and eight media. *Anti Microb Agents chemother* 2001; 45(5): 1585-1588.
4. Canica M, Ferreira M, Ferreira E. and Cabral L. Phenotype and molecular characterization of the first inhibitor-resistant TEM-derived β-lactamase identified in Portugal. Microb 2002; 46(11): 3688-3689.
5. Canica MM, Barthelemy M, Gilly L, Labia R, Krishnamoorthy R and Paul G. Properties of IRT-14 (TEM-45) a newly characterized mutant of TEM-type β-Lactamases. *Antimicrob Agents chemother* 1997; 41(2): 374-378.
6. Donowitz GR and Mandell GI. Beta-Lactam antibiotics. *New Eng J Med* 1988; 318(17): 419-426.
7. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS: Laboratory methods for detection of antibacterial resistance. In: E.J. Baron LR, Peterson SM and Finegold (eds). 10th ed., Mosby Co., 1998; PP: 250-272.
8. Georgopapadakou. N. H. Minireview: penicillin Binding proteins and Bacterial resistance to β-Lactamas. Antibacter Agents. Chemother. 1995; 37: 2045-2053.
9. Kerins DM. Ampicillin Sulbactam- a combination of an old and a new agent in the treatment of infection. *Am J Med Sci* 1991; 301(6): 406-411.
10. Levy SB. The challenge of antibiotic resistance *Sci Am* 1998; 278(3): 46-53.
11. Macfaddin JE: β-Lactamase test. In: Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3th ed., Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 1999; PP: 254-273.
12. Mansouri S and Shareifi S: Antimicrobial resistance Pattern of Escherichia coli causing urinary tract infections, and that of human fecal flora, in the southeast of Iran. *Microb Drug Resist* 2002; 8(2): 123-128.
13. Miro E, Navarro F, Mirelis B, Sabate M, Rivera A, Coll P and Prats G. Prevalence of clinical isolate of Escherichia coli producing inhibitor-resistant β-Lactamase at a University Hospital in Barcelona, Spain, over a 3 year period. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(12): 3991-3994.
14. Perilli M, Segatore B, Massis MR. *et al.* Characterization of a new extended-spectrum β-Lactamase (TEM-87) isolated in proteus mirabilis during an Italian survey. *Antimicrob Agents chemother* 2002; 46(3): 925-928.
15. Struelens MJ. Tracking the epidemiology of antimicrobial drug resistance in hospitals: time to deploy molecular typing. *J Med Microbiol* 1998; 47(12): 1035-1036.
16. Tzouvelekis LS, Gazouli M, Prinarakis EE, Tzelepi E and Legakis NJ. Comparative evaluation of the inhibitory activities of the novel penicillanic acid sulfone RO 48-1220 against β-Lactamases that belongs to groups 1, 2b and 2be. *Antimicrob Agents chemother* 1997; 41(2): 475-477.
17. Vakulenko SB, Geryk B, Kotra LP, Mobashery S, and Lerner SA. Selection and characterization of β-Lactam - β-Lactamase inactivator - resistant mutants following PCR mutagenesis of the TEM-1 β-Lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother 1998;* 42(7): 1542-1548.
18. Vakulenko S and Golemi D. Mutant TEM β-Lactamase producing resistance to ceftazidime ampicillins and β–lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents chemother* 2002; 46(3): 646-653.