مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره دوم (پیاپی ۱۹) تابستان ۱۳۹۳
صفحات ۱۴۷-۱۳۸

Original Article

بررسی وجود ژن های *ampC* و *esbls* در سویه های *اشریشیاکلی* جداسازی شده از موارد انسانی و طیور

الهام فرخ نظر[۱]، پژواک خاکی[۲]، سهیلا مرادی بیدهندی[۲*]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاداسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، [۲] استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: آنتی بیوتیک های بتالاکتام در حال حاضر رایج ترین درمان برای عفونت های باکتریایی می باشند. از مهم ترین مکانیسم های مقاومت به این آنتی بیوتیک ها تولید آنزیم های بتالاکتامازی توسط باکتری ها می باشد. هدف از این مطالعه بررسی وجود ژن های *بتالاکتامازی ampC* و *esbl* در نمونه های *اشریشیا کلی* جدا شده از موارد انسانی و طیوری می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی - توصیفی تعداد ۴۰۰ نمونه ادرار از مراکز درمانی و ۲۰۰ نمونه سواب کلواک طیور از مرغداری های استان تهران جمع آوری گردید. شناسایی فنوتیپی سویه های مولد بتا لاکتاماز با استفاده از آزمون حساسیت ضد میکروبی به روش انتشار دیسک انجام شد. به منظور تایید حضور ژن های *ampC* و *esbl* در باکتری های مولد آن از روش PCR استفاده گردید.

یافته ها: در مجموع ۱۲۰ نمونه انسانی (۳۰٪) و ۵۰ نمونه طیوری (۲۵٪) آلوده به باکتری *اشریشیاکلی* بودند. ارزیابی فنوتیپی نشان داد که ۵۴ مورد (۴۵٪) از نمونه های انسانی تولید کننده آنزیم بتا لاکتامازی نوع ESBLs و ۲ مورد (۱/۶۷٪) تولید کننده AmpC بودند. در نمونه های طیوری در ۳ مورد (۲۱/۴٪) وجود آنزیم بتا لاکتامازی نوع ESBLs تایید شد. این نمونه ها فاقد ژن *ampC* بودند. بررسی های ژنوتیپی نشان داد که ۲ (۱/۶۷٪) نمونه انسانی واجد ژن های بتالاکتامازی نوع *ampC* بودند.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می دهد که ژن بتالاکتامازی *ampC* در نمونه های انسانی وجود داشته اما در نمونه های طیوری باید مطالعات دقیق تری صورت پذیرد. به دلیل اهمیت ارگانیسم های تولیدکننده این آنزیم ها در ایجاد عفونت های بیمارستانی و برای جلوگیری از گسترش آن ها توصیه می شود تحقیقات وسیع تری از نظر بررسی شیوع واقعی این آنزیم در ایران انجام شود.

واژگان کلیدی: *اشریشیا کلی*، بتالاکتاماز، ژن *ampC*، ژن *esbl*.

دریافت مقاله: دی ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۳

مقدمه

آنتی بیوتیک های بتالاکتام بهترین گزینه برای درمان بسیاری از باکتری ها می باشند (۱). مکانیسم غالب برای مقاومت به آنتی بیوتیک های بتا-لاکتام در باکتری های گرم منفی، تولید آنزیم بتا-لاکتاماز می باشد (۲). بتالاکتامازها آنزیم هایی هستند که با هیدرولیز حلقه بتالاکتام، آن را غیرفعال می کنند (۳). این آنزیم ها بر اساس ساختار اولیه در ۴ کلاس (A, B, C و D) طبقه بندی می شوند (۴). آنزیم های ESBLs (Extended Spectrum Beta-Lactamase) در گروه A قرار گرفته و شامل مشتقات آنزیم های موتاسیون یافته TEM و SHV می باشد که توانایی هیدرولیتیک محدودتری دارند (۵ و ۶).

*) آدرس برای مکاتبه: کرج، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۰۹۱۲۳۱۸۲۴۰۴ پست الکترونیک: s.bidhendi@rvsri.ac.ir

بتالاکتامازهای نوع AmpC در گروه C قرار گرفته و شامل CMY ,LAT ,BIL ,ACT ,MOX ,FOX ,DHA ,ACC می باشند (۷ و ۸). از این میان CMY-2 شایع ترین و رایج ترین نوع توزیع شده جغرافیایی این گروه است (۹). بتالاکتامازهای نوع AmpC در اواخر دهۀ ۱۹۷۰ ظاهر و مورد مطالعه قرار گرفتند. این آنزیم ها سفالوسپورین های وسیع الطیف مانند سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم و مونوباکتام هایی مانند آزترونام و سفامایسین ها را هیدرولیز می نمایند. اما توسط مهار کننده های معمولی مانند کلاوولانات مهار نمی شوند. در اواخر دهۀ ۱۹۸۰ این ژن های کروموزومی قابل القاء، بر روی پلاسمیدها ظاهر شدند و به ارگانیسم هایی که ذاتاً این نوع بتالاکتاماز را بیان نمی کردند مانند *کلبسیلا (Klebsiella)*، *اشریشیا کلی (Escherichia coli)* و یا *سالمونلا (Salmonella)* منتقل شدند (۱۰ و ۱۱).

مصرف غذایی حیوانات آلوده به باکتری های مولد ESBLs و یا AmpC سهم بالقوه ای در به خطر انداختن سلامت عمومی دارند. در چندین مطالعه، شواهد آشکاری مبنی بر انتقال مستقیم *اشریشیا کلی* تولید کننده AmpC یا ESBLs از مواد غذایی یا حیواناتی که در تهیه مواد غذایی برای انسان به کار می روند، مشاهده شده است (۱۲). از آنجایی که حیوانات منبعی برای انتشار ژن های کد کننده بتالاکتامازی از *اشریشیا کلی* به انسان می باشند (۱۲) و نیز به دلیل شیوع باکتری های مولد ESBLs و AmpC و ایجاد سطح بالای مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های بتالاکتام، انجام تحقیقات در این زمینه ضروری و اجتناب ناپذیر می باشد.

هدف از این مطالعه، بررسی وجود ژن های *ampC* و *esbl* در نمونه های *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد انسانی و طیوری در تهران می باشد.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه: این مطالعه به صورت توصیفی- مقطعی بر روی ۴۰۰ نمونه بالینی انسانی جمع آوری شده از بیمارستان های امام خمینی، امیراعلم و درمانگاه های بقراط و امام حسن مجتبی تهران و نیز ۲۰۰ نمونه سواپ کلواک جمع آوری شده از طیور مرغداری های استان تهران از تیرماه تا آبان ماه سال ۱۳۹۱ انجام گرفت. نمونه های جمع آوری شده بر روی محیط های اختصاصی انتروباکتریاسه کشت داده شدند. سپس تست های بیوشیمیایی افتراقی بر روی آنها انجام شد. نمونه های مثبت *اشریشیا کلی* در محیط نگهدارنده Trypticase Soy Broth (TSB) (مرک، آلمان) همراه با گلیسرول، در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری شدند (۱۳).

ب) شناسایی سویه های مولد بتالاکتاماز: به منظور شناسایی فنوتیپی سویه های مولد بتالاکتاماز، آزمون حساسیت ضد میکروبی به روش انتشار دیسک مطابق با استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام شد (۱۴). به طور اختصار، سوسپانسیون میکروبی از کشت ۲۴ ساعته مطابق با غلظت لوله نیم مک فارلند تهیه گردید و به طور کامل بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. سپس دیسک های آنتی بیوتیکی (شرکت Mast) شامل سفوتاکسیم (۳۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، سفپودوکسیم (۳۰ µg) به فاصله حداقل ۲ سانتی متر از یکدیگر بر روی محیط قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس، با توجه به قطر هاله عدم رشد نتایج به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش گردید (۱۴).

سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفپودوکسیم به منظور تائید حضور بتالاکتامازهای وسیع الطیف از طریق آنتی بیوتیک های سفتازیدیم-کلاوولانیک اسید (۱۰-۳۰ µg)، سفوتاکسیم- کلاوولانیک اسید (۱۰-۳۰ µg) و سفپودوکسیم- کلاوولانیک اسید (۱۰-۳۰ µg) (شرکت Mast)، مورد بررسی قرار گرفتند.

در این مطالعه از سویه های استاندارد *اشریشیا کلی* (ATCC 25922) و *کلبسیلا نمونیه* (ATCC 700603) تهیه شده از مرکز کلکسیون میکروبی موجود در بخش میکروب شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج - البرز به عنوان کنترل استفاده گردید (۱۴ و ۱۵).

بر اساس استاندارد جهانی CLSI اگر هاله عدم رشد اطراف

دیسک های حاوی کلاوونیک اسید بزرگتر یا مساوی ۵ میلی متر نسبت به دیسک بدون کلاوونیک اسید باشد سویه مورد نظر را می توان به عنوان مولد ESBLs در نظر گرفت (۱۶). از طرفی به پیشنهاد این سازمان سویه هایی که در تست فنوتیپی تاییدی، اثر بتالاکتاماز در آنها به وسیله مهارکننده بتالاکتامازی مهار نمی گردد به عنوان مولدین AmpC بتالاکتاماز محسوب می شوند. این سویه ها به دیسک های حاوی کلاوولانیک اسید نیز مقاوم می باشند (۱۷).

ج) شناسایی ژنوتیپی سویه های بتالاکتامازی: در ابتدا باکتری هایی که مولدین بالقوه AmpC بتالاکتاماز بودند، بر روی محیط لوریا براث (LB)، کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. سپس استخراج ژنوم بر اساس دستورالعمل استخراج DNA (کیت Cinna Pure DNA) انجام گرفت.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۸ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر، بافر PCR با غلظت ۲/۵x، یک میکرولیترdNTP، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (جدول ۱)، یک میکرولیتر DNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase انجام شد.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Master cycler Gradient, Germany) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید. در این مطالعه از سویه استاندارد *کلبسیلا نمونیه* (ATCC 700603) به عنوان کنترل استفاده شد.

یافته ها

از مجموع ۴۰۰ نمونه ادرار انسانی، ۱۲۰ مورد (۳۰٪) و از ۲۰۰ نمونه سواپ کلواک طیور ۵۰ مورد (۲۵٪) باکتری *اشریشیا کلی* جداسازی گردید.

الف) بررسی فنوتیپی سویه های انسانی و طیور: ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی *اشریشیا کلی* جداسازی شده در برابر سه آنتی بیوتیک سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفپودوکسیم در جدول ۲ نشان داده شده است. سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک های ذکر شده به عنوان باکتری های تولید کننده بالقوه آنزیم های بتالاکتامازی ESBLs و AmpC معرفی گردیدند.

آزمایشات تاییدی با استفاده از مهار کننده کلاوولانیک اسید بر روی سویه های مقاوم (جدول ۲) جداسازی شده از نمونه های بالینی نشان داد که ۵۴ نمونه (۴۵٪) به سه آنتی بیوتیک سفپودوکسیم-کلاوولانیک اسید، سفتازیدیم-کلاوولانیک اسید و سفوتاکسیم-کلاوولانیک اسید حساس بودند. بر همین اساس تولید آنزیم بتا لاکتامازی وسیع الطیف نوع ESBLs در آنها تایید گردید. همچنین ۲ نمونه (۱/۶۷٪) نسبت به هر سه آنتی بیوتیک سفپودوکسیم-کلاوولانیک اسید، سفتازیدیم-کلاوولانیک اسید و سفوتاکسیم- کلاوولانیک اسید مقاوم بودند که نشان دهنده وجود آنزیم بتالاکتامازی نوع AmpC در آنها بود. شکل ۱ مولدین ESBLs و AmpC را در نمونه های انسانی با روش انتشار دیسک نشان می دهد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه (۱۵ و ۱۸)

پرایمرها	توالی ژن ها ('۵ به '۳)	ژن های هدف	اندازه (جفت باز)
CITMF **CITMR**	TGG CCAGAACTGACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	LAT-1 TO LAT-4, CMY-2 TO CMY-7, BIL-1	۴۶۲
EBCMF **EBCMR**	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	MIR-IT, ACT-1	۳۰۲

جدول ۲: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشریشیا کلی* در نمونه های بالینی و طیور

آنتی بیو تیک ها	مقاوم (٪)	نیمه حساس (٪)	حساس (٪)
نمونه های بالینی			
سفپودوکسیم	۵۷ (٪۴۷/۵)	۳ (٪۲/۵)	۶۰ (٪۵۰)
سفتازیدیم	۵۶ (٪۴۷)	۵ (٪۴)	۵۹ (٪۴۹)
سفوتاکسیم	۵۹ (٪۴۹/۱)	۱ (٪ ۰/۹)	۶۰ (٪۵۰)
نمونه های طیور			
سفپودوکسیم	۳ (٪۶)	-	۴۷ (٪۹۴)
سفتازیدیم	۸ (٪۱۶)	۱ (٪۲)	۴۱ (٪۸۲)
سفوتاکسیم	۳ (٪۶)	۱ (٪۲)	۴۶ (٪۹۲)

از مجموع ۱۴ نمونه طیور که به سه آنتی بیوتیک سفپودوکسیم، سفتازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم بودند، تنها ۳ نمونه (٪۲۱/۴) به طور همزمان به هر سه آنتی بیوتیک مقاوم بودند. بنابراین به عنوان سویه های تولید کننده بالقوه آنزیم های بتالاکتامازی (ESBLs و AmpC) معرفی گردیدند.

آزمایش تاییدی با استفاده از مهار کننده کلاوولانیک اسید بر روی ۳ نمونه فوق نشان داد که هر سه نمونه نسبت به سه آنتی بیوتیک سفپودوکسیم-کلاوولانیک اسید و سفتازیدیم-کلاوولانیک اسید و سفوتاکسیم-کلاوولانیک اسید حساس بودند. بنابراین تولید آنزیم بتا لاکتامازی وسیع الطیف نوع ESBLs در آنها تایید گردید. در هیچ کدام از موارد فوق آنزیم بتالاکتامازی AmpC مشاهده نشد.

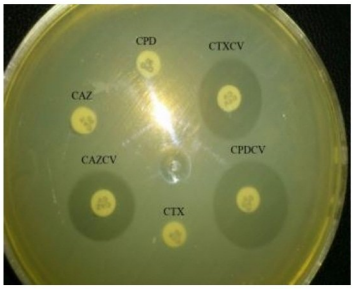
ب) بررسی ژنوتیپی نمونه های انسانی و طیور: نتایج حاصل از روش مولکولی نشان داد که از ۵۷ نمونه انسانی ۲ مورد (٪۱/۶۷)، دارای ژن های بتالاکتامازی نوع *ampC* بودند. این مطلب با مشاهده باند ۴۶۲ جفت بازی تایید گردید. همچنین هیچ کدام از ۳ نمونه طیوری، حاوی ژن های بتالاکتامازی *ampC* نبودند (شکل های ۲ و ۳).

بحث

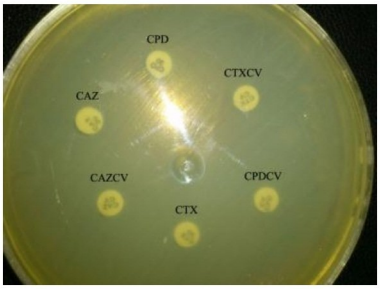
روش های مختلفی توسط باکتری ها به کار گرفته می شود تا از اثرات زیان بار آنتی بیوتیک ها مصون بمانند. یکی از مهم ترین مکانیسم هایی که در باکتری های گرم منفی علیه آنتی بیوتیک های بتالاکتام به کار گرفته می شود تولید آنزیم های بتالاکتامازی است. به طوری که این آنزیم ها با هیدرولیز حلقه بتالاکتام، منجر به غیر فعال شدن این آنتی بیوتیک ها می شوند (۱۹).

در طول دو دهه گذشته آنتی بیوتیک های بتالاکتام جدیدی تولید شده اند که به طور اختصاصی به عملکرد هیدرولیز کنندگی آنزیم های بتالاکتاماز مقاومت دارند. با وجود این گروه

الف

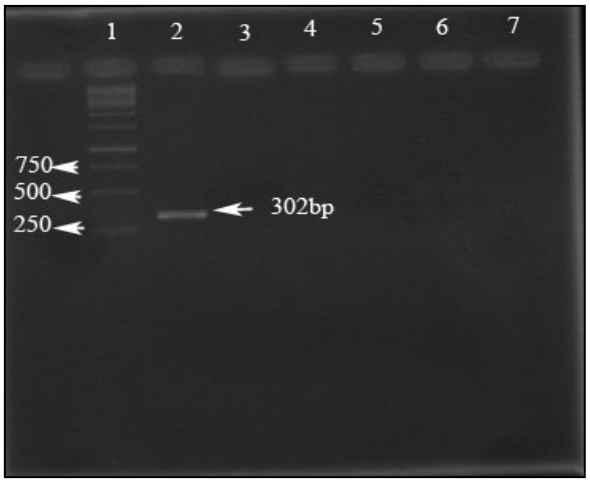


ب



شکل ۱: تشخیص فنوتیپی سویه های مولد ESBL و AmpC. الف) نمونه های دارای آنزیم ESBL، ب) نمونه های دارای آنزیم AmpC. علایم اختصاری آنتی بیوتیک ها شامل CTX (سفوتاکسیم)، CAZ (سفتازیدیم)، CPD (سفپودوکسیم) و CV (کلاوولانیک اسید) می باشد.

شکل ۲: نتایج الکتروفورز حاصل از PCR با استفاده از پرایمر CITM بر روی نمونه های انسانی و طیور. ستون۱) سایز مارکر (۱۰۰ جفت بازی)، ستون ۲) کنترل مثبت (*کلبسیلا نمونیه* ATCC700603)، ستون ۳) کنترل منفی، ستون های ۴ و ۶) نمونه انسانی، ستون های ۵ و ۷) نمونه طیور.



شکل ۳: نتایج الکتروفورز حاصل از PCR با استفاده از پرایمر EBCM بر روی نمونه های انسانی و طیور. ستون۱) سایز مارکر (۱۰۰ جفت بازی)، ستون ۲) کنترل مثبت (*کلبسیلا نمونیه* ATCC700603)، ستون ۳) کنترل منفی، ستون ۴) نمونه انسانی، ستون های ۵) نمونه طیور.

جدید از آنتی بیوتیک ها که برای درمان بیماران مورد استفاده قرار می گیرند، انواع جدیدی از آنزیم های بتالاکتامازی مانند ESBLs ها و AmpC ظاهر شده اند. به طوری که باکتری های گرم منفی به این وسیله می توانند مقاومت به جدیدترین آنتی بیوتیک های بتالاکتام را کسب نمایند (۲۰). مقاومت های آنتی بیوتیکی به عنوان یک معظل که منجر به ایجاد مشکلاتی در درمان می شوند سلامت جهانی را به خطر می اندازند (۲۱).

در این مطالعه از مجموع ۴۰۰ نمونه ادرار انسانی، ۱۲۰ مورد (۳۰٪) و از ۲۰۰ نمونه سواپ کلواک طیور ۵۰ مورد (۲۵٪) *اشریشیاکلی* جداسازی گردید. ارزیابی فنوتیپی نمونه های انسانی نشان داد که ۵۴ نمونه (۴۵٪) تولید کننده ESBLs و ۲ مورد (۱/۶۷٪) تولید کننده AmpC بودند. نتایج مولکولی نیز نشان داد که ۲ نمونه (۱/۶۷٪) دارای ژن های بتالاکتامازی نوع *ampC* بودند. در مورد نمونه های طیوری، در ۳ نمونه تولید آنزیم بتا لاکتامازی وسیع الطیف نوع ESBLs تایید گردید. اما در بررسی ژنوتیپی همگی فاقد ژن های بتالاکتامازی نوع *esbl* و *ampC* بودند.

چندین مطالعه نشان داده اند که حیوانات می توانند به عنوان منبع انتشار ژن های کد کننده بتالاکتامازی مانند *ampC* از *اشریشیاکلی* به انسان عمل نمایند. شواهدی از سویه های مولد CMY-2 در گاو، خوک، ماکیان، سگ ها و گربه ها نگران کننده است. زیرا حیوانات تولید کننده مواد غذایی و حیوانات خانگی اهلی ممکن است به عنوان منابعی از ارگانسیم های مقاوم مطرح باشند. بنابراین عواملی که منجر به جداسازی بالای *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز AmpC در بیماران می گردند باید بیشتر مورد شناسایی قرار گیرند (۲۴-۲۲).

ممتاز (Momtaz) و همکاران در سال ۲۰۱۲ توزیع ژن های دارای مقاومت آنتی بیوتیکی را در سویه های *اشریشیا کلی* به دست آمده از جوجه های وارداتی کشته شده در ایران مورد بررسی قرار دادند. از مجموع ۳۶۰ نمونه جمع آوری شده، ۵۷ مورد (۱۵/۸٪) *اشریشیاکلی* جداسازی گردید. مقاومت به تتراسایکلین در ۵۲/۶٪ سویه ها و مقاومت دوگانه به سولفونامیدها و اریترومایسین در ۴۷/۴٪ سویه ها تشخیص داده شد. یافته های آنها نشان داد که ژن های *qnrA*، *dfrA1* و *catA-1* در ۳۶/۸٪ سویه ها وجود داشته است. هیچ ژن شناخته

شده ای که مرتبط با مقاومت به استرپتومایسین، سفالوتین و آمپی سیلین باشد گزارش نگردید. همچنین هیچ کدام از ژن های بتالاکتامازی *bla CMY* شناسایی نشدند (۲۵). در مطالعه حاضر نیز از ۲۰۰ نمونه طیوری، ۵۰ مورد *اشریشیاکلی* جداسازی گردید و نتایج به دست آمده حضور ژن بتالاکتامازی نوع *esbl* را نشان داد.

در مطالعه ای که توسط مولجونتی (Mooljuntee) و همکاران در سال۲۰۱۰ در تایلند انجام شد، ۳۰ جدایه *اشریشیا کلی* حاصل از جوجه های گوشتی مورد بررسی قرار گرفتند. در تمام *اشریشیاکلی* های جدا شده، مقاومت به تتراسایکین، آمپی سیلین و اریترومایسین نشان داده شد. این خصوصیات مقاومتی در ارتباط با ژن های *tet* (*A*) ، *bla cmy* و *ere*(*A*) به ترتیب دارای فراوانی ۹۰٪، ۹۳/۳٪ و ۷۳/۳٪ بود.

مقاومت های پایین تر برای سفالوتین ۷۳/۳٪ و سولفونامید + تری متوپریم ۲۶/۷٪ مشاهده شد. این مقاومت ها در ۸۶/۴٪ از موارد در ارتباط با ژن *bla SHV* و در ۱۰۰٪ موارد با ژن های *sull* و *dfrA5* مرتبط بودند. در این مطالعه تست های حساسیت آنتی بیوتیکی، ۱۰۰٪ مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به آمپی سیلین، اریترومایسین و تتراسایکلین نشان داد. که اغلب در صنعت جوجه های گوشتی تایلند استفاده می شوند (۲۶). روش های به کار رفته در این تحقیق (انتشار دیسک و PCR) با روش های مورد استفاده در مطالعه حاضر مطابقت دارد. اما نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر با پژوهش فوق مطابقت ندارد. به طوری که ژن بتالاکتامازی *esbl* در ۶٪ نمونه ها شناسایی شد اما ژن بتالاکتامازی *ampC* در هیچکدام از نمونه های *اشریشیاکلی* های جدا شده از طیور در ایران شناسایی نشد. این امر ممکن است به دلیل استفاده از نوع متفاوت آنتی بیوتیک در کشور تایلند نسبت به کشور ایران باشد.

الوسوگا (Olusoga) و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطالعه ای را بر روی ۶۰ نمونه *کلبسیلا* و ۵۴ *اشریشیا کلی* جدا شده از بیماران سرپایی بیمارستانی در نیجریه انجام دادند. یافته های آنها نشان داد که پس از غربالگری اولیه با استفاده از آنتی بیوتیک های سفپیم، سفپودوکسیم، سفپیم – کلاوولانیک اسید و سفپودوکسیم– کلاوولانیک اسید، ۱۲ نمونه (۲۲/۲٪) *اشریشیا کلی* به عنوان تولید کننده ESBLs و ۳ نمونه (۵/۶٪) به عنوان تولید کننده AmpC معرفی شدند. با روش مولکولی نیز تایید گردید که ۳ نمونه (۵/۶٪) تولید کننده ژن *ampC* بودند (۱۵). این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر مطابقت دارد. به طوری که تنها ۲ جدایه *اشریشیا کلی* (۱/۶۷٪) دارای ژن *ampC* بودند. این اختلاف جزیی می تواند به دلیل تعداد نمونه های مورد بررسی باشد.

گازولی (Gazouli) و همکاران در سال ۱۹۹۶ در یونان تعداد ۲۱۳۳ مورد *اشریشیاکلی* انسانی را از نظر حضور ژن *ampC* در مورد ارزیابی قرار دادند. از این تعداد ۵۵ مورد (۲/۵۸٪) دارای ژن بتالاکتامازی *ampC* بودند (۲۷). نتایج به دست آمده از تحقیق آنها نزدیک به مطالعه حاضر می باشد. با توجه به اینکه زمان انجام تحقیق فوق در فاصله زمانی دورتری انجام شده است می تواند نشان دهنده افزایش مقاومت دارویی در سال های اخیر باشد.

در مطالعاتی که توسط سلطان دلال (Soltandallal) و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی ۵۰۰ نمونه بالینی در تهران انجام شد، ۲۰۰ مورد *اشریشیا کلی* شناسایی شد. از این تعداد ۱۲۸ مورد (۶۴٪) به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفتازیدیم مقاوم بودند. پس از استفاده از مهار کننده کلاوولانیک اسید، ۱۱۵ مورد (۸۹/۸٪) کاندید تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف ESBLs و ۱۳ مورد (۱۰/۲٪) کاندید تولید بتالاکتاماز AmpC شدند (۲۸). در مطالعات ژنومی با پرایمر CITM، در ۱۳ مورد (۱۰/۲٪) از جدایه ها باند مشاهده شد. در صورتی که در مطالعه حاضر ۲ مورد (۱/۶۷٪) از سویه ها با استفاده از این پرایمر مثبت شناخته شدند. این اختلاف ممکن است به دلیل تعداد جدایه های مورد بررسی باشد.

به دلیل اهمیت بتالاکتامازهای نوع ESBLs و AmpC در بین سویه های *اشریشیاکلی*، بررسی های بیشتر بر روی خانواده های ژنی بتالاکتاماز های *esbl* و *ampC* با روش های مولکولی پیشنهاد می گردد.

نتیجه گیری

با توجه به افزایش مقاومت دارویی، یافته های این تحقیق نشان می دهد که باید قبل از درمان آزمایشات روتین شناسایی سویه های ESBLs صورت گیرد. زیرا با گسترش سویه های مقاوم منجر به شکست درمان دارویی شده و خطرات بالقوه ای را به همراه دارد. از طرف دیگر با توجه به این که ماکیان به ویژه طیور سهم مهمی در تولید مواد غذایی برای انسان دارند، می توانند منبعی مهم برای انتشار مقاومت های آنتی بیوتیکی به انسان ها باشند. بنابراین باید مطالعات بیشتری در این زمینه بر روی موارد طیوری انجام شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از خانم رضوی پور و بخش میکروب شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی به دلیل همکاری صمیمانه در اجرا این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Shafaq AH, Syed AJ, Mustafa K. Occurrence of multidrug resistant and ESBL producing *E. coli* causing urinary tract infections. J Basic Appl Sci. 2011; 7(1): 39-43.
2. Paterson Dl. Resistance in gram-negative bacteria, *Enterobacteriaceae.* AJIC. 2006; 119(6): 520-528.
3. Khan S, Sallum UW, Zheng X, Nau Gj, Hasan T. Rapid optical determination of β-lactamase and antibiotic activity. BMC Microbiol. 2014; 14(84): 1471-2180.
4. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(3): 969-976.
5. Adeyankinnu FA, Motayo BO, Akinduti A, Akinbo J, Ogiogwa J, Aboderin B, Agunlejika R.A. A multicenter study of beta-lactamase resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* reveals high level chromosome mediated extended spectrum β lactamase resistance in Ogun State, Nigeria. Interdis Perspect Infect Dis. 2014; 2014(3): 1-7.
6. Aamer AS, Fariha H, Safia A, Abdul H. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of gram negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. Res Microbiol. 2004; 155(6): 409-421.
7. Sanders C. Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer beta-lactam antibiotics. Annu Rev Microbiol .1987; 41(10): 573-594.
8. George A, Jacoby. AmpC beta-Lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(1): 161-182.
9. Bauernfeind Y, Chong A, Lee K. Plasmid-encoded AmpC beta-lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery. Yonsei Med J. 1998; 39(6): 520-525.
10. Philipon A, Arlet G , Jecoby AG. Plesmid-determined AmpC-type - lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(1): 1-11.
11. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases molecular diversity and clinical consequences. Future Microbiol. 2007; 2(5): 501-512.
12. Andreoletti O, Budka H, Buncic S, Collins JD, Griffin J, Hald T, Havelaar H, Hope J, Klein G, Koutsumanis K, McLauchlin J, Muller-Graf AC, Nguyen-The C, Noerrung B, Peixe L,

Prieto M, Ricci A, Sofos J, Threlfall J, Vagsholm I, Vanopdenbosch E. Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β-lactamases and/or AmpC β-lactamases in food and food-producing animals. EFSA J. 2011; 9(8): 2322.

13. Nowroozi J. Bacteriology. 2 ed. Tehran. Hayan Publications; 2003.

14. Wayne PA. Clinical Laboratory Standards Institute, Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grows aerobically. (M07-A9). USA. CLSI; 2012.

15. Olusoga Ogbolu D, Terry Alli OA, Olanipekun LB, Ojo OI, Makinde O. Faecal carriage of extended-specterum beta-lactamase (ESBL)-producing commensal *Klebsiella Pneumoniae* and *Escerichia coli* from hospital out-patients in Southern Nigeria. Inter J Medi Medic Sci. 2013; 5(3): 97-105.

16. Wonkeun S, Kwon B, You-Nae L, Chae-Hoon L, Sang Hl, Seokh J. Detection of extended spectrum beta lactamases by using boronic acid as an AmpC beta- lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2007; 45(4): 1180-1184.

17. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. J Clin Microbiol. 2000; 38(5): 1791-1796.

18. Javier Pérez-Pérez F, Hanson Nancy D. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002; 40(6): 2153-2162.

19. Li Q, Lee JY, Castillo R, Hixon MS, Pujol C. Doppalapudi VR, Shepard HM, Wahl GM, Lobl TJ, Chan MF. A novel antibacterial agent with broad-spectrum activity and enhanced potency against beta-lactamase-producing strains. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 46 (5): 1262-1268.

20. 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): 933-951.

21. Demirel I, Kinnunen A, Önnberg a, Söderquist B, Persson K. Comparison of host response mechanisms evoked by extended spectrum beta lactamase (ESBL) and non-ESBL producing uropathogenic *E. coli*. BMC Microbiol. 2013; 13(181): 1471-2180.

22. Batchelor M, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Paiba Ga, Davies RH, Liebana E. Detection of multiple cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from a cattle fecal sample in Great Britain. Microbiol Drug Resist. 2005; 11(1): 58-61.

23. Yan JJ, Hong CY, Ko WC, Chen YJ, Tsai SH, Chuang CL, Wu JJ. Dissemination of bla CMY-2 among *Escherichia coli* isolates from food animals, retail ground meats, and humans in southern Taiwan. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(4): 1353-1356.

24. Poppe C, Martin LC, Gyles CL, Reid-Smith R, Boerlin P, McEwen SA, Prescott JF,

Forward KR. Acquisition of resistance to extended spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica subsp*. enterica serovar Newport and *Escherichia coli* in the Turkey poultry intestinal tract. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(3): 1184-1192.

25. Momtaz H, Rahimi E, Moshkelani S. Molecular detection of antimicrobial resistance genes in *E. coli* isolated from slaughtered commercial chickens in Iran. Vet Med. 2012; 57(4): 193-197. [In Persian]

26. Mooljuntee S, Chansiripornchai P, Chansiripornchai N. Prevalence of the cellular and molecular antimicrobial resistance against *E. coli* isolated from Thai broilers. Thai J Vet Med. 2010; 40(3): 311-315.

27. Gazouli MLS, Tzouvelekis C, Vatopoulos, Tzelepi E. Transferable class C beta-lactamases in *Escherichia coli* strains isolated in Greek hospitals and characterization of two enzyme variants (LAT-3 andLAT-4) closely related to *Citrobacter freundii* AmpC beta-lactamase. J Antimicrob Chemother. 1998; 42(4): 419-425.

28. Soltandallal M, Sabbaghi A, Mollaaghamirzaeie H, Rastegarlari A, Eshraghian M, Fallahmehrabadi J, Rajabi Z. Prevalence of AmpC and SHV beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* from Tehran hospitals. Jundishapur J Microbiol. 2013; 28(3): 269-276. [In Persian]

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 2, June 2014

Original Article

Investigation of *ampC* & *esbl* genes in *Escherichia coli* isolated from human and poultry

Elham Farrokhnazar[1], Pejvak Khaki[2], Soheila Moradi Bidhendi[2]

[1]MS.c., Department of Biology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Beta-lactam antibiotics are currently the most common treatment for bacterial infections. The production of beta-lactamase enzymes are the most important reason of bacterial resistance to these antibiotics. The aim of this study was to investigate the presence of *ampC* and *esbls* genes in *E. coli* isolated from human and poultry.

Materials & Methods: In this cross-sectional study, 400 urine samples were collected from medical centers and also 200 swab poultry cloaca samples were collected from poultry farms located in Tehran province. Phenotypic identification of the beta-lactamase producing strains was performed using disk diffusion method. The presence of *ampC* and *esbls* genes in bacteria was studied using PCR approach.

Results: A total of 120 (30%) human sample and 50 (25%) poultry samples were infected to *E. coli.* Phenotyping evaluation showed that 54 cases (45%) of the human samples carried *esbls* beta-lactamase gene while 2 cases (1.67%) carried *ampC* beta-lactamase gene. In poultry samples, 3 cases (21.4%) were confirmed for ESBLs enzymes and none of them carried *ampC* gene. Based on genotyping analysis 2 (1.67%) of the strains isolated from human samples carried *ampC* gene.

Conclusion: Based on the results of this study, the *ampC* beta-lactamase gene was found in human samples, but more accurate studies are required for poultry. Due to high risk factor of the beta-lactamase producing organisms in nosocomial infections further studies is suggested to prevent their spread in community.

Keywords: *Escherichia coli*, Beta-lactamas, *ampC gene, esbl* gene.

Correspondence to: Soheila Moradi Bidhendi

Tel: +989123182404

E-mail: s.bidhendi@rvsri.ac.ir

Journal of Microbial World 2014, 7(2): 138-147.