BRIEF REPORT

Prevalence of CTX-M-15β -lactamase Genes in Escherichia coli Strains Using PCR

Somayeh Parsania[1],
Mohammad Sohrabpour[2]

[1] MSc in Microbiology, Faculty of Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran,
[2] MSc in Microbiology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran

(Received April 23 , 2014 ; Accepted August 16, 2014)

Abstract

Background and purpose: Presence of extended spectrum β -lactamase (ESBL) genes plays an important role in spreading β -lactam antibiotic resistance in the producing strains of these enzymes. The resistance of gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli*, to different antimicrobial agents, has increasingly been reported. This study was conducted to determine the prevalence of ESBL in Escherichia coli isolates

Material and Methods: This analytical cross-sectional study was carried out between March 2013 and February 2014 on 131 bacterial of *Escherichia coli* which were isolated from clinical patient specimens in general hospitals in Urmia (northwest Iran). The frequency of ESBL producing strains was determined via the combined disk method. The presence of β- lactamase gene of CTX-M-15 in ESBL was assessed by PCR method.

Results: clinical presentations of infection were UTI in 108 cases (82.44%), septicemia in 15 cases (11.45%), wound infection in 7 cases (5.34%), and meningitis in 1 case (0.76%). Frequency of ESBL positive in *Escherichia coli* isolates was 55 cases (41.98%) of which 23.63% were positive for CTX-M-15 β -lactamases resistance gene.

Conclusion: The rate of ESBLs producing strains is highly increasing, therefore, using an appropriate treatment protocol based on the antibiogram pattern of the strains is highly recommended

Keywords: Extended-spectrum ß-lactamases, *Escherichia coli*, CTX-M-15

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(116): 58-62 (Persian).

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۶ شهریور سال ۱۳۹۳ (۶۲-۵۸)

شیوع ژن بتالاکتاماز CTX-M-15 در سویه های بالینی اشرشیا کلی توسط روش PCR

سمیه پارسانیا [1]
محمد سهراب پور [2]

چکیده

سابقه و هدف: حضور ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف به ویژه نوع CTX-M نقش مهمی در ایجاد مقاومت سویه‌های مولد این آنزیم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتام ایفا می‌کنند. مقاومت باکتری‌های گرم منفی از جمله Escherichia coli نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، به خصوص بتالاکتام‌ها به طور روزافزون گزارش شده است. این مطالعه با هدف ارزیابی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در باکتری E. coli صورت پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی- تحلیلی که از فروردین تا بهمن سال ۹۲ در بیمارستان‌های عمومی شهر ارومیه صورت گرفت، ۱۳۱ نمونه E. coli جداسازی و جهت بررسی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از روش Combined Disk استفاده شد. DNA با روش جوشیدن استخراج شد و از نظر وجود ژن CTX-M-15 با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: ۱۰۸ باکتری E.coli از عفونت ادراری (۸۲/۴۴ درصد)، ۱۵ مورد از سپتی سمی (۱۱/۴۵ درصد)، ۷ مورد از عفونت زخمی (۵/۳۴ درصد) و ۱ مورد هم از بیمار مبتلا به مننژیت (۷۶/ درصد) جداسازی شد. از ۱۳۱ مورد جداسازی شده، ۵۵ مورد (۴۱/۹۸ درصد) دارای مقاومت داروی چندگانه بودند. ۲۳/۶۳ درصد از سوی‌های مقاوم دارای بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از نوع CTX-M-15 بودند.

استنتاج: با توجه به شیوع رو به افزایش سویه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، استفاده از پروتکل درمانی مناسب براساس تعیین الگوی آنتی‌بیوگرام سویه‌ها، قویاً توصیه می‌شود.

واژه های کلیدی: بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، اشرشیا کلی، CTX-M-15

مقدمه

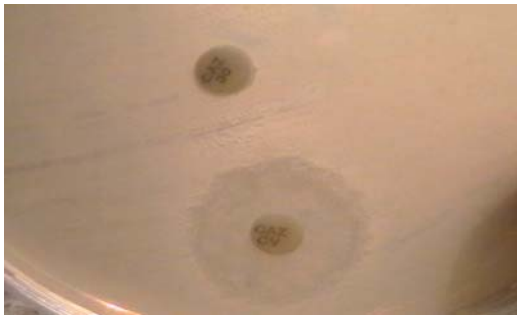
در بین انواع مقاومت‌های تولید شده به وسیله باکتری‌ها، انواعی که توانایی تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBL) را دارند، از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند(۱). ژن‌های اصلی کد کننده $ESBL_S$ به گروه‌های SHV,TEM و CTX-M تعلق دارند. بتالاکتامازهای نوع CTX-M بر اساس تشابه توالی اسید آمینه‌ای به ۵ گروه اصلی شامل CTX-M-2, CTX-M-1, 8,CTX-M-9 و CTX-M-25/26 طبقه‌بندی می‌شود. ژن CTX-M-15 برای اولین بار از نمونه‌های E. coli با منشا مدفوعی شناسایی شد که از نظر ساختاری

مولف مسئول: سمیه پارسانیا- تهران، میدان ونک، ده ونک، گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه الزهرا E-mail:somayeh.parsabnia@yahoo.com
۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی از دانشکده علوم پایه دانشگاه الزهر(س)،ایران
۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۲/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۴/۱۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۵/۲۵

فوق‌العاده شبیه ژن CTX-M-3 بوده و تنها تفاوت آن‌ها با یکدیگر در موقعیت یک اسید آمینه می‌باشد که باعث افزایش توانایی CTX-M-15 در تجزیه آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم می‌شود. ژن های CTX-M-15 و CTX-M-3 در گروه CTX-M-9 قرار گرفته‌اند(۲). شیوع جهانی ژن CTX-M-15 منجر به جایگزین شدن ژن CTX-M-15 با ESBLs نوع SHV و TEM در اروپا، کانادا و آسیا شده است(۳). از آن جائی که Escherichia coli عامل اصلی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های ادراری عفونت‌های مجاری تنفسی تحتانی، احشایی، آبسه های کبدی کلانژیت و کوله سیستیت و آبسه‌های پانکراس می‌باشد و با توجه به افزایش روبه رشد این سویه‌ها در عفونت‌های بیمارستانی، تعیین الگوی مقاومت گونه‌های E. coli جدا شده از منابع بیمارستانی و شناسائی سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز نوع CTX-M-15 در نمونه‌های بالینی از اهداف این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱۳۱ سویه E. coli از نمونه‌های مختلف (ادرار، زخم، خون و ...) بیماران بیمارستان‌های عمومی شهر ارومیه از مهر سال ۹۱ تا شهریور سال ۹۲ ایزوله و پس از انجام آزمایش بیوشیمیایی از جمله IMViC ، دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه، اکسیداز، مصرف مالونات، اوره از، حرکت و ... تعیین هویت شدند و از نظر حضور ESBLs با روش Combined Disk مورد بررسی قرار گرفتند. در این روش از دیسک های مرکب شامل یک دیسک سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) و یک دیسک مرکب (۳۰ میکروگرم سفتازیدیم + ۱۰ میکروگرم کلاولانیک اسید) تهیه شده از شرکت ماست انگلستان استفاده شد که این دیسک‌ها در فاصله ۲۰ میلی‌متری از هم در محیط مولر هینتون آگار (مرک) قرار گرفتند. در صورتی که قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک حاوی کلاولانیک اسید پنج یا بیش تر از پنج میلی‌متر باشد، تولید ESBLs مثبت تلقی می شود (تصویر شماره ۱) (۴).



تصویر شماره ۱: تست تایید فنوتیپی به روش دیسک دوتایی

DNA ایزوله‌هایی که در این مرحله به عنوان سویه مولد ESBLs شناسایی شدند، از نظر حضور ژن CTX-M-15 به روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. هر نمونه داخل ویال اپندورف حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد و سپس ورتکس شده، به مدت ۱۰- ۱۵ دقیقه در داخل بن ماری جوش قرار داده شد. نهایتاً ویال‌ها را به مدت ۷ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ کرده، محلول رویی ویال‌ها برای انجام واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط اصلی واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر کلرید منیزیوم، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs ، ۱۷/۳ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر پرایمر رفت و برگشت CTX-M-15 (از هر کدام ۱میکرولیتر) و ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز بود و نهایتاً یک میکرولیتر DNA الگو به هر یک از ویال‌ها اضافه گردید (کلیه مواد از شرکت فرمنتاز کشور آلمان تهیه شده است). توالی پرایمر و دماهای مورد استفاده بر طبق مطالعات محققین انتخاب گردید (جدول شماره ۱). برنامه دستگاه ترموسایکلر شامل مرحله واسرشته شدن اولیه در دمای $^{\circ}C$ ۹۵ به مدت ۲ دقیقه، که با ۳۰ سیکل ادامه می‌یابد، مرحله واسرشته شدن در دمای $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال در دمای $^{\circ}C$ ۵۲ به مدت ۱ دقیقه، مرحله طویل شدن در دمای $^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۱/۵

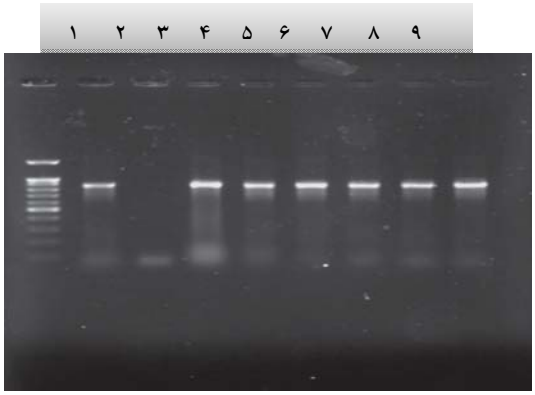
جدول شماره ۱: توالی پرایمر و دماهای مورد استفاده در مطالعه

پرایمر	توالی پرایمر	وزن محصول	تعداد چرخه	رفرانس
CTX-M-15(A)	5'-AGAATAAGGAATCCCATGGTT-3'	۵۴۴ bp	۳۰	۱۲
CTX-M-15(B)	5'-ACCGTCGGTGACGATTTTAG-3'			

دقیقه و مرحله طویل شدن نهایی هم در دمای $72\ ^{o}C$ به مدت ۳ دقیقه ادامه می‌یابد. در این مطالعه از سوش کنترل مثبت E.coli ATTCC 25922 و سوش کنترل منفی E. coli ATTCC 700603 استفاده گردید. پس از پایان یافتن مراحل PCR به منظور مشاهده باندهای مجزا شده از الکتروفورز با آگاروز ۲ درصد استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل نتایج از نرم افزار SPSS (Version 11.5) و آزمون کای دو استفاده شد(۵، ۶).

یافته ها و بحث

در این مطالعه ۱۳۱ سویه E. coli شامل ۱۰۸ مورد از عفونت ادراری (۸۲/۴۴ درصد)، ۱۵ مورد از سپتی سمی (۱۱/۴۵ درصد)، ۷ مورد از عفونت زخمی (۵/۳۵ درصد) و ۱ مورد هم از بیمار مبتلا به مننژیت (۰/۷۶ درصد) جداسازی شد. ۵۵ مورد (۴۱/۹۸ درصد) دارای مقاومت داروی چندگانه بودند. میزان شناسایی فنوتیپ $ESBL_S$ در سویه های E.coli در ترکیه ۱۷ درصد و در شانگ‌های۴۷/۴ درصد بوده است که مورد اخیر به نتایج ما نزدیک است(۷، ۸). میرزایی و همکاران در سال ۱۳۸۵ در تهران ۵۳/۷۵ درصد سویه ها اشرشیاکلی را مولد ESBL تشخیص دادند(۹). که علت این اختلاف را می‌توان به دلیل ظهور مقاوم غالب و مولد ESBL در منطقه و الگوی درمانی وابسته به سفالوسپورین‌ها نسبت داد. آزمون مجذور کای نشان داد که بین وجود فنوتیپ $ESBL_S$ و نوع نمونه بالینی ارتباط معنی‌داری وجود دارد ($p < ۰/۰۵$). به طوری که فراوانی فنوتیپ مثبت $ESBL_S$ در نمونه‌های ادرار بیش تر از سایر نمونه‌ها می‌باشد. هم‌چنین ارزیابی نتایج PCR از میان ۵۵ سویه بتالاکتاماز وسیع‌الطیف مثبت نشان می‌دهد ۱۳ ایزوله (۲۳/۶۳ درصد) واجد ژن CTX-M-15 می باشند (تصویر شماره ۲). در مطالعه‌ای Johnson و همکارانش فراوانی ژن CTX-M-15 در ایزوله‌های E.coli ۴۵ درصد و در مطالعه Sidjabat و همکارانش ۳۳ درصد گزارش گردید(۱۰، ۱۱). در مطالعه Malini و همکاران در هند ۸۴ درصد از سویه‌های E. coli جدا شده از نمونه‌های ادراری دارای ژن CTX-M-3 بودند(۲). در مطالعه دیگری که در کره صورت گرفت مشخص شد که بتالاکتامازهای نوع CTX-M-3 و CTX-M-15 رایج‌ترین بتالاکتاماز ها در ایزوله‌های E. coli می‌باشد(۱۲). در مطالعه‌ای که توسط صفری و همکاران در ایران صورت گرفت، فراوانی ژن‌های CTX-M-1,-2,-8,-9 در میان سویه های جدا شده به ترتیب ۹۲/۲ ، ۲۸/۵، ۱۷/۵، ۳۸/۳ درصد گزارش گردید(۱۳). اپیدمیولوژی ارگانیسم‌های حامل بتالاکتامازهای نوع CTX-M در سال‌های اخیر به ویژه در نمونه‌های ادراری تغییر کرده است و این امر می‌تواند به دلیل توانایی بالای این بتالاکتامازها در انتشار در بین میکروارگانیسم ها و مزیت‌های اکولوژیکی آن جهت حضور در جامعه باشد(۱۴).



تصویر شماره ۲: الگوی الکتروفورزی محصولات PCR

۱) مارکر bp ۱۰۰ ۲) کنترل مثبت ۳) کنترل منفی ۴) ۹ -۴ هم به عنوان گروه‌های واجد CTX-M-15 با

توجه به این‌که نتیجه تست فنوتیپی تأییدی ۴۱/۹۸ درصد می‌باشد و نتیجه تست ژنوتیپی ۲۳/۶۳ درصد است، مشخص می‌شود که در ایجاد مقاومت در E.coli سایر کلاس‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف دخالت دارند.

References

1. Paterson DL, and Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases:a clinical update. Clin Microbiol Rev.2005; 18: 657–686.
2. 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. JCDR .2012; 6(7): 1203-1206.
3. Cantón R, Coque TM.The CTX-M β-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol. 2006; 9(5): 466–475.
4. Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother. 2001; 48 (suppl 1): 59-64.
5. Rasheed J, Tenover F. Detection and characterization of antimicrobial resistance genes in bacteria. In: Murray P, Baron E, Jorgensen J, editors. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington D. C2003. p1196-212.
6. Mendonca N, Louro D, Castro AP,Diogo J , Canica M. CTX-M-15, OXA-30 and TEM-1-producing Escherichia coli in two Portuguese regions. J Antimicrob Chemother. 2006; 57: 1014-1016.
7. Tasli 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; 58(3): 162-167.
8. Aminzadeh Z, Sadat KM, Sha'bani M. Bacteriuria by extended-spectrum Beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: isolates in a governmental hospital in South of Tehran, Iran. Iran J Kidney 2008;2(4):197-200.
9. Mirzaee M, Chitsaz M, Mansouri S, Pourmand MR. Antibiotic resistance to third generation cephalosporins due to CTX-M-Type extended-spectrum β-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. Iran J Pub Health. 2009; 38(1): 10-17.
10. Johnson JR, Johnston BD, Jorgensen JH, Lewis JS, Robisek A, Menard M, et al. Abstr. 48th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother abstr 2008; K-3444.
11. Sidjabat HE, Paterson DL, Adams-Haduch JM, Ewan L, Pasculle AW, et al. Molecular Epidemiology of CTX- M- Producing *Escherichia coli* Isolates at a Tertiary Medical Center in Western Pennsylvania. AAC 2009; 53(11): 4733–4739.
12. Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, Park YJ, Lee K, Bae IK, et al. Dissemination of the SHV-12 and the CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases among the clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumonia and the emergence of GES-3 in Korea .J Antimicrobial Chemother. 2005; 56(4): 698-702.
13. Safari M, Shojapour M, Akbari M, Pourbabaee A, Abtahi H. Dissemination of CTX- M- Type Beta-lactamase Among Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* in Markazi Province, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(8): e7182.
14. Ruppe E, Hem S, Lath S, Gautier V, Ariey F, Sarthou JL, et al. The CTX-M β-lactamases in Escherichia coli which were isolated from community-acquired urinary tract infections in Cambodia. Emerg Inf Dis. 2009; 15(5): 741-748.