Archive of SID

Original Article

Antibiotic Resistance and Phenotypic and Genotypic Detection of AmpC Beta-Lactamases among Klebsiella pneumoniae Isolates from Kermanshah Medical Centers

Alisha Akya[1], *Azam Elahi*[2*], *Roya Chegene Lorestani*[2], *Yazdan Hamzavi*[3]

[1]*Nosocomial Infection Research Centre, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.*

[3]*Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Azam Elahi; Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

Email: Azamelahi202@yahoo.com

Received: 18 Nov, 2017
Accepted: 31 Jan, 2018

Abstract

Background and Objectives: Acquisition of AmpC β-lactamase enzymes is one of the important factors in the resistance of *Klebsiella pneumoniae* to β-lactam antibiotics. The purpose of this study was to determine the antibiotic resistance, phenotypic frequency of *AmpC*, and detection of *MOX*, *CIT*, *DHA*, *ACC*, *EBC*, and *FOX* genes in *K. pneumoniae* strains isolated from medical centers in Kermanshah.

Methods: In this descriptive cross-sectional study, 100 suspected cases of *K. pneumoniae*, were collected from 2013 to 2015 from patients referring to three hospitals and one laboratory in Kermanshah city. antimicrobial susceptibility disk diffusion test and AmpC phenotypic screening test, were performed using boronic acid combination method, and after extraction of bacterial genome, *AmpC* genes were identified by multiplex PCR method.

Results: Resistance to third generation cephalosporins, was 70%, and resistance to aztreonam was reported 65%. The highest and the lowest resistance was to ampicillin (98.5%) and carbapenems (less than 10%), respectively; 27.1% of the isolates phenotypically produced *AmpC* and a high percentage of isolates from the infectious ward and intensive care unit (ICU) was *AmpC* producer. The frequency of *MOX*, *CIT*, *FOX*, and *DHA* genes was obtained to be 11.4%, 10%, 2.8%, and 1.4%, respectively. However, *EBC* and *ACC* genes, were not found in any of the isolates.

Conclusion: The results of this study showed that phenotypic tests alone are not sufficiently accurate in the evaluation of *AmpC* enzymes. Therefore, simultaneous use of genotypic methods is necessary. In this study, the high prevalence of AmpC genes, especially *MOX* and *CIT* in *K. pneumoniae* isolated from infectious and ICU wards in Kermanshah hospitals is indicative of importance of dissemination of this group of β-lactamase enzymes.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; Microbial drug resistance; AmpC beta-lactamases.

DOI: 10.29252/qums.12.11.5

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دوازدهم، شماره یازدهم، بهمن ۹۷
صفحه ۴۰ الی ۴۹

Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین بتالاکتامازهای AmpC از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی در بین ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* از مراکز پزشکی کرمانشاه

علیشا اکیا[۱]، اعظم الهی[۲*]، رؤیا چگنه لرستانی[۲]، یزدان حمزوی[۳]

[۱]مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

[۲]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

[۳]گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
اعظم الهی؛ گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
azamelahi202@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۷
تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: کسب آنزیم‌های بتالاکتاماز *AmpC*، یکی از عوامل مهم مقاومت *کلبسیلا پنومونیه* به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌باشد. این مطالعه با هدف تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی، فراوانی فنوتیپی *AmpC* و ژن‌های *MOX*، *CIT*، *DHA*، *ACC*، *EBC* و *FOX* در کلبسیلا پنومونیه‌های جداشده از مراکز پزشکی کرمانشاه انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - مقطعی، تعداد ۱۰۰ نمونه مشکوک به *کلبسیلا پنومونیه* طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۲ از بیماران مراجعه‌کننده به سه بیمارستان و یک آزمایشگاه در کرمانشاه جمع‌آوری شد. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک (Disk diffusion) و آزمایش فنوتیپی غربالگری *AmpC* به روش دیسک ترکیبی برونیک اسید صورت گرفت و پس از استخراج ژنوم باکتری‌ها، ژن‌های *AmpC* با روش Multiplex PCR شناسایی شدند.

یافته‌ها: مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم، حدود ۷۰٪ و مقاومت به آزترونام، ۶۵٪ گزارش شد. بیشترین و کمترین مقاومت به ترتیب به آمپی‌سیلین (۹۸/۵٪) و کارباپنم‌ها (کمتر از ۱۰٪) تعلق داشت. تولید *AmpC* در ۲۷/۱٪ از ایزوله‌ها به‌صورت فنوتیپی بود و درصد بالایی از ایزوله‌های بخش عفونی و مراقبت‌های ویژه (ICU)، مولد *AmpC* بودند. فراوانی ژن‌های *MOX*، *CIT*، *FOX* و *DHA* به‌ترتیب ۱۱/۴٪، ۱۰٪، ۲/۸٪ و ۱/۴٪ به دست آمد، اما ژن‌های EBC و *ACC* در هیچ‌یک از ایزوله‌ها یافت نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد تست‌های فنوتیپی به‌تنهایی در ارزیابی آنزیم‌های *AmpC* دقت کافی ندارند؛ بنابراین، استفاده همزمان از روش‌های ژنوتیپی لازم است. در این مطالعه، شیوع بالای ژن‌های *AmpC*، به‌ویژه *MOX* و *CIT* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* از بخش‌های عفونی و مراقبت‌های ویژه در بیمارستان‌های کرمانشاه، نشان‌دهنده اهمیت گسترش این دسته از آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشد.

کلید واژه‌ها: *کلبسیلا پنومونیه*؛ مقاومت دارویی میکروبی؛ بتالاکتامازهای ای ام پی سی.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Akya A, Elahi A, Chegene Lorestani R, Hamzavi Y. Antibiotic resistance and phenotypic and genotypic detection of ampc beta-lactamases among *klebsiella pneumoniae* isolates from Kermanshah medical centers. Qom Univ Med Sci J 2019;12(11):40-49. [Full Text in Persian]

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه به‌عنوان یک پاتوژن مهم، عامل عفونت‌هایی همچون باکتریمی، عفونت‌های دستگاه ادراری و دستگاه تنفسی می‌باشد (۱). ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در طول دهه‌های اخیر منجر به مشکلات جدی در درمان عفونت‌های این باکتری شده است (۲). یکی از مکانیسم‌های مهم ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در باکتری‌های گرم منفی ازجمله *کلبسیلا پنومونیه*، تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی می‌باشد (۳). براساس این عملکرد، آنزیم‌های بتالاکتامازی در چهار گروه A، B، C و D طبقه‌بندی می‌شوند (۴). بتالاکتامازهای نوع *AmpC* در اواخر دهه ۱۹۷۰، شناسایی و مورد بررسی قرار گرفتند (۵). در انتروباکتریاسه، آنزیم *AmpC* توسط ژن‌های کروموزومی یا پلاسمیدی کد می‌شود. اکثر بتالاکتامازهای *AmpC* کروموزومی در انتروباکتر، سراشیا، سودوموناس، اسینتوباکتر و گونه‌های سیتروباکتر وجود دارند (۶). این آنزیم‌ها در تقسیم‌بندی آمبلر در گروه C قرار می‌گیرند و شامل: ژن‌های *CMY*، *FOX*، *MOX*، *DHA*، *ACC*، *MIC*، *BIL/LAT* (مرتبط با خانواده *CIT*) و *MIR ACT* (مرتبط با خانواده *EBC*) می‌باشند (۸-۶). این آنزیم‌ها اغلب توسط بتالاکتام‌ها قابل‌القا بوده و در بسیاری از باسیل‌های گرم‌منفی وجود دارند (۵). بیشتر این آنزیم‌ها سفالوسپورینیاز هستند، ولی تا حدی توانایی هیدرولیز سایر بتالاکتام‌ها را نیز دارند و سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مانند سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم و مونوباکتام‌هایی (مانند آزترونام و سفامایسین‌ها) را هیدرولیز می‌کنند، ولی به‌وسیله مهارکننده‌های بتالاکتاماز مانند کلاولانات مهار نمی‌شوند (۹،۴). بتالاکتامازهای *AmpC* کروموزومی، قابل‌انتقال به پلاسمیدها هستند (۵)، و اولین‌بار در سال ۱۹۸۹ پلاسمید حاوی آن‌ها از *کلبسیلا پنومونیه* گزارش گردید (۱۰). دامنه فعالیت آنزیم‌های بتالاکتامازی *AmpC*، پلاسمیدی همچون آنزیم‌های *AmpC* کروموزومی است با این تفاوت که حساسیت آن‌ها نسبت به سفپیم، سفپیروم و کارباپنم‌ها کمتر است (۴). تاکنون بیش از ۲۰ نوع بتالاکتاماز نوع *AmpC* با واسطه پلاسمید شناخته شده است (۱۰،۵). همچنین ژن‌های کدکننده *AmpC* بر روی پلاسمیدهایی با اندازه‌های مختلف از ۱۸۰-۷ کیلوبایت یافت شده است (۱۱).

امروزه، افزایش شیوع مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به‌واسطه بتالاکتامازهای نوع *AmpC*، به یک مشکل تبدیل شده است. تشخیص میکروارگانیسم‌های واجد *AmpC* با روش‌های فنوتیپی دشوار است؛ زیرا این آنزیم‌ها ممکن است با روش‌های رایج تعیین حساسیت، شناسایی نشوند (۵)؛ بنابراین، روش‌های مولکولی برای شناسایی کامل این آنزیم‌ها حایز اهمیت است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند ژن‌های *MOX*، *CIT*، *DHA*، *ACC*، *EBC* و *FOX* نسبت به سایر ژن‌های *AmpC*، شیوع بیشتری دارند؛ به‌طوری‌که در چندین مطالعه، فراوانی این ۶ ژن مورد بررسی قرار گرفته است (۱۳،۱۲،۱۰،۹،۵،۴). با توجه به بروز مقاومت گسترده آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* و اهمیت پایش منطقه‌ای انتشار ژن‌های مقاومت، در این مطالعه فراوانی ژن‌های شایع *AmpC* (*MOX*، *CIT*، *DHA*، *ACC*، *EBC* و *FOX*) در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* در کرمانشاه بررسی گردید.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - مقطعی، تعداد ۱۰۰ نمونه مشکوک به *کلبسیلا پنومونیه* طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۲ از نمونه‌های مختلف بیماران از سه بیمارستان و یک آزمایشگاه تشخیص طبی شهر کرمانشاه جمع‌آوری شد. از کل نمونه‌ها، تعداد ۷۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* با استفاده از روش‌های باکتری‌شناسی، تست‌های افتراقی و در نهایت، کیت API-E20 (bioMérieux, France) جداسازی شدند. ایزوله‌ها در محیط نگه‌دارنده TSB (Trypticase Soy Broth) (ساخت شرکت Merck آلمان)، همراه با گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها برای ۱۱ آنتی‌بیوتیک از چهار گروه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شامل: پنی‌سیلین‌ها {آمپی‌سیلین و پیپراسیلین- تازوباکتام (۳۰ میکروگرم)}، سفالوسپورین‌ها {سفازولین، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم) و سفپودوکسیم (۱۰ میکروگرم)، مونوباکتام آزترئونام (۳۰ میکروگرم)}، کارباپنم‌ها {ارتاپنم، مروپنم، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)} با استفاده از روش انتشار دیسک (Disk diffusion, Mast Group, U.K) و براساس جداول

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

(Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI تعیین گردید (۱۴). از سویه *E. coli* ATCC 25922 به‌منظور کنترل کیفی استفاده شد. تست فنوتیپی تولید *AmpC* برای همه ایزوله‌ها به روش دیسک ترکیبی انجام گرفت. در این روش از دیسک‌های سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم (Mast Group, U.K) به‌همراه برونیک اسید (Sigma, Germany) استفاده شد؛ بدین ترتیب که ابتدا مقدار ۱۲۰ میلی‌گرم از پودر برونیک اسید در ۳ میلی‌لیتر DMSO و ۳ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید، سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از این محلول به دیسک سفوکسیتین اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در پلیت استریل قرار داده شد تا کاملاً جذب دیسک شود. در ادمه، سوسپانسیون باکتری (معادل ۰/۵ مک‌فارلند) تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار به کمک سواپ، کشت داده شد. دیسک سفوکسیتین به‌تنهایی و همراه با برونیک اسید با فاصله مناسب بر روی پلیت قرار گرفت و به‌مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. پس از سپری شدن این زمان، هاله عدم رشد، اندازه‌گیری شد و درصورتی‌که هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک همراه با برونیک اسید، بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر بود، ایزوله تولیدکننده *AmpC* در نظر گرفته می‌شد (۱۵).

از سویه‌های *Enterobacter cloacae* ATCC BAA-1143 و *E. coli* ATCC 25922 به‌ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده گردید. ژنوم ایزوله‌ها با روش جوشانیدن (Boiling)، استخراج و PCR با شش جفت پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *MOXM*، *CITM*، *DHAM*، *ACCM*، *EBCM* و *FOXM* بررسی شد (Sina Colon, Iran) (جدول شماره ۱).

سپس الکتروفورز محصولات PCR در کنار مارکر ۱۰۰bp (SinaColon, Iran) بر روی ژل آگارز ۱٪ انجام گرفت. بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه ژل‌داک (Bio-Rad, USA) و نور UV، باندهای مورد نظر ارزیابی شدند. از سویه‌های شناخته‌شده موجود در آزمایشگاه (حاوی ژن‌های مورد نظر) که قبلاً توالی‌یابی شده بودند، به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰، Excel و آزمون کای‌اسکوئر تجزیه و تحلیل شدند. سطح‌معنی‌داری، کمتر یا مساوی ۰۵/ در نظر گرفته شد.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرها و اندازه محصول آن‌ها

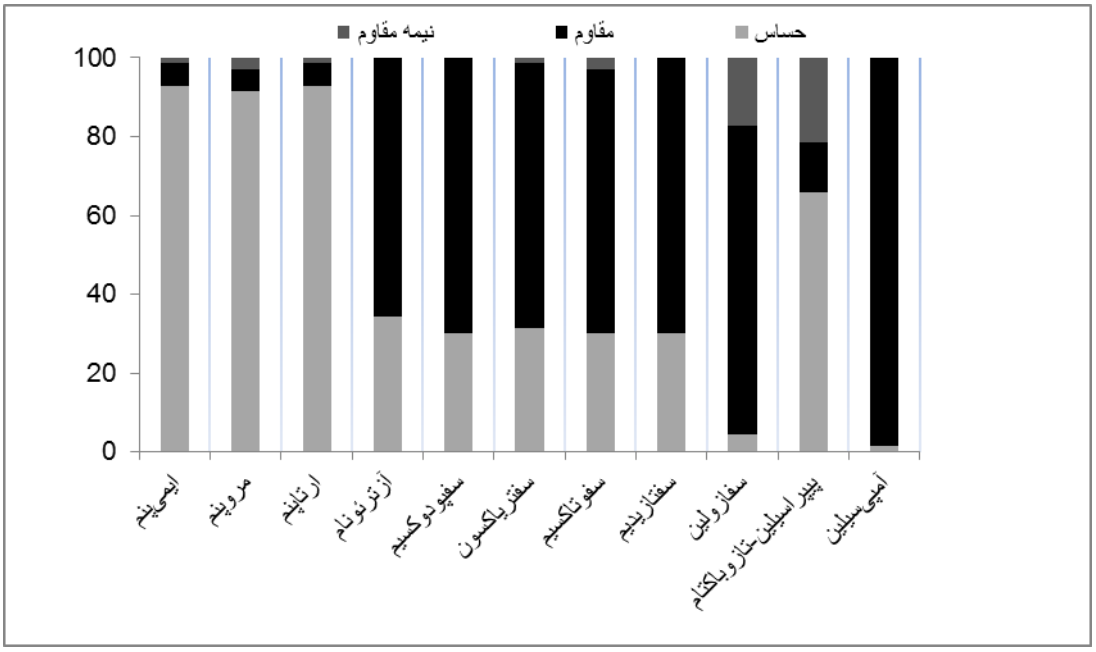
پرایمر	توالی (۵ به ۳)	اندازه باند (bp)	ژن هدف	منبع
MOXM	F: GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT R: CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	۵۲۰	*MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 to CMY-11*	(۱۶)
CITM	F:TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA R:TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	۴۶۲	*LAT-1 to LAT-4, CMY-2 to CMY-7, BIL-1*	(۱۶)
DHAM	F:AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T R:CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	۴۰۵	*DHA-1, DHA-2*	(۱۶)
ACCM	F:AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA R:TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	۳۴۶	*ACC*	(۱۶)
EBCM	F:TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG R:CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	۳۰۲	*MIR-1T ACT-1*	(۱۶)
FOXM	F:AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G R:CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	۱۹۰	*FOX-1 to FOX-5b*	(۱۶)

یافته‌ها

در این مطالعه از ۷۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه*، ۴۰ ایزوله (۵۷/۱٪) از بیمارستان امام خمینی، ۱۲ ایزوله (۱۷/۱٪) از آزمایشگاه رفرنس، ۹ ایزوله (۱۲/۸٪) از بیمارستان طالقانی و ۷ ایزوله (۱۰٪) از بیمارستان امام‌رضا جداسازی شد. ایزوله‌ها از نمونه‌های بالینی ادرار، ۳۶ نمونه (۵۱/۴٪)؛ سوختگی، ۱۴ نمونه (۲۰٪)؛ تراشه، ۱۱ نمونه (۱۵/۷٪)؛ خون، ۵ نمونه (۷/۱٪)؛ زخم، ۳ نمونه (۴/۲٪) و مایع آسیت، ۱ نمونه (۱/۴٪) جداسازی شدند. از مجموع بیماران، ۴۲ نفر (۶۰٪) زن و ۲۸ نفر (۴۰٪) مرد با میانگین سنی، ۲۶/۲±۳۹/۵ سال بودند. نتایج تست سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی در نمودار آمده است.

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID



نمودار: نتایج سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام (درصد) در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*.

تعداد ۱۹ ایزوله (۲۷/۱٪) به‌صورت فنوتیپی و ۱۶ ایزوله (۲۲/۸٪) به‌صورت ژنوتیپی، تولیدکننده *AmpC* بودند. فراوانی ژن‌های MOX، *CIT*، *FOX* و *DHA* به‌ترتیب در ۸ ایزوله (۱۱/۴٪)، ۷ ایزوله (۱۰٪)، ۲ ایزوله (۲/۸٪) و ۱ ایزوله (۱/۴٪) گزارش شد، اما ژن‌های EBC و *ACC* در هیچ‌یک از ایزوله‌ها یافت نشد. تنها دو ایزوله (۲/۸٪) به‌طور همزمان دارای ۲ ژن *FOX* و *MOX* بودند. بیشترین فراوانی ژن‌های *AmpC* از بخش ICU بود (جدول شماره ۲).

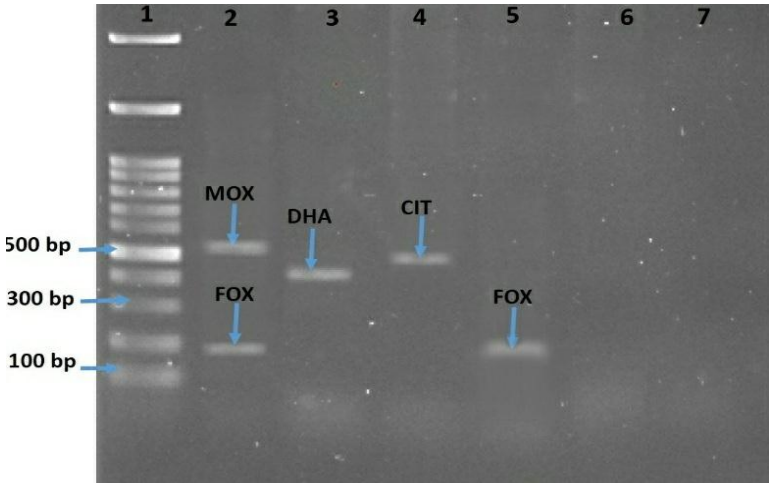
جدول شماره ۲: توزیع فراوانی فنوتیپی و ژنوتیپی ژن‌های *AmpC* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به تفکیک بخش‌های بیمارستانی

بخش‌های مراکز درمانی	تعداد کل تعداد ایزوله	ژنوتیپ *AmpC*			
		DHA	*CIT*	*MOX*	*FOX*
ICU	۱۵	۰	۱	۵	۱
سوختگی	۱۴	۰	۲	۰	۰
عفونی	۷	۱	۳	۱	۰
داخلی	۷	۰	۰	۱	۱
جراحی	۴	۰	۰	۱	۰
اطفال	۳	۰	۱	۰	۰
سایر بخش‌ها و بیماران سرپایی	۲۰	۰	۰	۰	۰
جمع	۷۰	۱	۷	۸	۲

مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین در ۱۰ ایزوله (۱۴/۲٪) وجود داشت (≤۱۴mm)، که ۹ ایزوله به‌صورت فنوتیپی، تولیدکننده *AmpC* بودند (در بین این ۹ ایزوله، ۳ ایزوله ژن‌های تولیدکننده A داشتند.) یک ایزوله فاقد فنوتیپ و ژنوتیپ*AmpC* و یک ایزوله نسبت به سفوکسیتین نیمه‌مقاوم بود (≤۱۸mm)، که به‌صورت فنوتیپی و ژنوتیپی *AmpC* را تولید می‌کرد (جدول شماره ۳). بین مقاومت به سفوکسیتین و فنوتیپ *AmpC*، ارتباط معنی‌داری وجود داشت (p=۰/۰۰۱).

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID



شکل: الکتروفورز نتایج PCR ژن‌های *AmpC* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*.
ردیف ۱: مارکر ۱۰۰، ردیف ۵-۲: نمونه‌های دارای ژن *AmpC*، ردیف ٦: نمونه کنترل منفی، ردیف ۷: نمونه منفی.

جدول شماره ۳: توزیع فراوانی ژنوتیپ *AmpC* با در نظر گرفتن مقاومت به سفالوسپورین‌ها در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*.

ایزوله‌های دارای ژن‌های *AmpC*	درصد مقاومت به سفالوسپورین‌ها				
	سفتازیدیم	سفوتاکسیم	سفتریاکسون	سفپودوکسیم	سفوکسیتین
MOX	٪۸۷/۵	٪۸۷/۵	٪۸۷/۵	٪۸۷/۵	٪۲۵
CIT	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۴/۲
DHA	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰
FOX	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۳۳/۳

بحث

پیدایش ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* با مقاومت چنددارویی، با پایداری نسبتاً بالای پلاسمیدهای کدکننده ژن‌های بتالاکتاماز همراه است (۱۷). باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتاماز *AmpC* به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند (۱۸). تشخیص و شناسایی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده *AmpC* برای شناخت گسترش مقاومت‌ها و شکست درمان در موارد استفاده از سفالوسپورین‌ها در طیف گسترده اهمیت دارند (۱۹)؛ حتی سال‌ها پس از قطع مصرف سفالوسپورین‌ها در طیف گسترده، ادامه کلونیزاسیون ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده بتالاکتاماز در بیماران بستری گزارش شده است (۱۷). همچنین باکتری‌های ایجادکننده عفونت (حامل ژن آنزیم بتالاکتاماز *AmpC* یا *ESBL*)، حتی درصورت حساسیت به داروهای بتالاکتام در شرایط آزمایشگاهی (in vitro)، ممکن است در شرایط in vivo با شکست درمانی مواجه شوند که این امر استراتژی‌های درمانی را در بیماران بستری پیچیده می‌سازد (۲۰).

در ایران مطالعات معدودی روی بتالاکتامازهای *AmpC* انجام شده که این امر ضرورت تحقیقات بیشتر در زمینه این ژن‌ها و مقاومت‌های حاصل از آن‌ها را نشان می‌دهد (۲۱). در مطالعه حاضر، نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد بیش از ۷۰٪ کل ایزوله‌ها و بیش از ۸۰٪ ایزوله‌های دارای *AmpC* نسبت به سفالوسپورین‌ها مقاوم هستند. در سایر مطالعاتی که در ایران انجام شده نیز میزان مقاومت به سفالوسپورین‌ها در بین ایزوله‌های تولیدکننده بتالاکتاماز به‌طور میانگین، بالای ۸۰٪ گزارش شده است (۲۴-۲۲). از آنجایی که سفالوسپورین‌ها مهم‌ترین و رایج‌ترین دسته آنتی‌بیوتیکی در درمان عفونت‌ها، به‌خصوص در بیماران بستری می‌باشند؛ اگر اقدامات مؤثری در زمینه جلوگیری از این روند ایجاد مقاومت انجام نگیرد، ممکن است مقاومت در مقابل سفالوسپورین‌ها به سطح خیلی بالایی برسد.

در مطالعه حاضر، بیشترین مقاومت ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بود (نزدیک به ۱۰۰٪) که عملاً این آنتی‌بیوتیک را از رده درمانی *کلبسیلا پنومونیه* خارج می‌سازد.

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

اما کارباپنم‌ها با حساسیت بالای ۹۰٪ هنوز مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها برعلیه ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* محسوب می‌شوند. همچنین باید توجه داشت حساسیت ایزوله‌ها نسبت به کارباپنم‌ها نباید ما را در تجویز بی‌رویه این دارو ترغیب کند؛ زیرا امکان گسترش سوش‌های مقاوم به آن را بیشتر می‌کند. در مطالعه حاضر، آنتی‌بیوتیک پیپراسیلین تازوباکتام نیز با حساسیت متوسط (۶۵٪)، اثربخشی مناسبی داشت که در چندین مطالعه دیگر نیز نتایج مشابهی به دست آمده است (۲۷-۲۵). فراوانی ژن *AmpC* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* در نقاط مختلف دنیا، متفاوت گزارش شده است.

در کشورهای اروپایی از ۵۵-۴۴٪ (۲۹،۲۸) و در کشورهای آسیایی، ازجمله چین ۱۰٪ (۳۰)، هند ۲۴/۱٪ (۳۱) و کره‌جنوبی ۳۹/۳-۷/۲٪ (۳۳،۳۲) و در آفریقا (نیجریه) ۱۱/۷٪ (۱۳) گزارش شده است. شیوع ژن *AmpC* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* در ایران نیز در شهرهای مختلف، متفاوت بوده است. در مطالعه‌ای که در تهران انجام شد، ۸/۴٪ ایزوله‌ها ژن *AmpC* داشتند که این نتایج از یافته به‌دست‌آمده مطالعه حاضر کمتر بود. در مطالعه مذکور شیوع ژن‌های *EBC* و DHA زیر ۱٪ و ژن *ACC* فاقد فراوانی گزارش شد که این یافته به نتایج این مطالعه نزدیک بود، ولی برخلاف مطالعه حاضر ژن *FOX*، سپس ژن CIT، بیشترین فراوانی را داشتند و ژن MOX یافت نشد (۵)؛ درصورتی‌که در مطالعه حاضر ژن *MOX* با بیشترین فراوانی به‌عنوان ژن غالب و ژن *CIT* بیشترین فراوانی را داشت.

در مطالعه‌ای در کرمان، شیوع *AmpC* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*، ۲۳٪ گزارش شد (۳۴). در مطالعه دیگری در تهران، شیوع *AmpC* درایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*، ۲۰٪ بود. در این مطالعه بیشترین فراوانی مربوط به ژن *MOX* گزارش شد که با مطالعه حاضر همخوانی داشت (۳۵). در مطالعه دیگری در اراک، شیوع *AmpC* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*، ۱۹٪ اعلام شد که بیشترین فراوانی مربوط به ژن‌های *CIT* و *MOX* بود، در مطالعه حاضر نیز این دو ژن بیشترین فراوانی را داشتند. همچنین ژن *ACC* نیز همانند مطالعه حاضر، ۰٪ گزارش شد؛ اما برخلاف مطالعه حاضر، ژن *FOX* در ایزوله‌ها یافت نشد (۴).

در مطالعه حاضر، شیوع بالای *AmpC* را می‌توان مرتبط با بیماران بستری در بخش‌های عفونی، ICU و سوختگی دانست؛ زیرا این بیماران به‌دلیل تضعیف سیستم ایمنی، بستری طولانی‌مدت و دریافت انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در طیف گسترده، ازجمله سفالوسپورین‌ها، با سوش‌های مقاوم کلونیزه می‌شوند (۱۲). به‌نظر می‌رسد درمان رضایت‌بخشی با استفاده سفالوسپورین‌ها در درمان عفونت‌های مقاوم این‌گونه بیماران به دست نمی‌آید (۱۷).

در این مطالعه میزان مقاومت به سفوکسیتین، ۱۴٪ بود و ارتباط معنی‌داری بین سفوکسیتین و فنوتیپ *AmpC* وجود داشت (p=۰/۰۰۱)، که در نتیجه مقاومت به سفوکسیتین تا حدی می‌تواند نشانه وجود ایزوله‌های مولد *AmpC* باشد. از آنجایی که تست‌های روتین برای غربالگری و تأیید *AmpC* در باکتری‌ها از دقت بالایی برخوردار نیستند، مقاومت به سفوکسیتین می‌تواند کمک‌کننده باشد (۱۸). همچنین در این مطالعه، مواردی از فنوتیپ مثبت و ژنوتیپ منفی در بین ایزوله‌ها مشاهده گردید که این امر ممکن است به‌دلیل امکان حضور سایر ژن‌های بتالاکتاماز *AmpC* باشد (۳۶). از سوی دیگر، ژن‌های *AmpC* ممکن است در باکتری وجود داشته باشند، اما به‌طور مؤثری بیان نشوند که در نتیجه ایزوله از نظر فنوتیپی منفی است (۱۲). در مطالعه حاضر، بیشترین درصد شیوع *AmpC* از ایزوله‌های بخش عفونی و مراقبت‌های ویژه گزارش شد که یکی از شایع‌ترین محل‌های عفونت‌های بیمارستانی است. همچنین سوش‌های خیلی مقاوم *کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده بتالاکتاماز اغلب از بیماران بخش ICU بود و همان‌طورکه قبلاً اشاره گردید این نتیجه می‌تواند ناشی از بستری طولانی‌مدت، مشکلات زمینه‌ای، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در طیف گسترده و درمان‌های تهاجمی باشد (۳۷).

نتیجه‌گیری

به‌علت انجام مطالعات محدود در مورد بتالاکتامازهای *AmpC* در کشور، اطلاعات کمی در مورد فراوانی آن‌ها، به‌خصوص در بخش‌های پرخطر بیمارستان‌ها همچون بخش‌های عفونی، مراقبت‌های ویژه و سوختگی موجود است. نتایج این مطالعه نشان داد تست‌های فنوتیپی به‌تنهایی در ارزیابی‌های آنزیم‌های *AmpC* دقیق نبوده و همزمان به‌کارگیری روش‌های ژنوتیپی لازم است.

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

با توجه به نتایج، شیوع *AmpC* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* در بیمارستان‌های کرمانشاه، به‌خصوص در بخش‌های عفونی و مراقبت‌های ویژه نسبتاً بالا بوده و نشان‌دهنده این واقعیت است که شیوع این دسته از آنزیم‌های بتالاکتاماز در طی این سال‌ها رو به افزایش است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه پس از تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و تصویب آن (با شماره ۹۴۵۴۸)، مورد حمایت مالی دانشگاه قرار گرفت.

References:

1. Gavriliu LC, Benea OE, Benea S. Antimicrobial resistance temporal trend of Klebsiella pneumoniae isolated from blood. J Med Life 2016;9(4):419-23. PubMed

2. Kim J, Jo A, Chukeatirote E, Ahn J. Assessment of antibiotic resistance in Klebsiella pneumoniae exposed to sequential in vitro antibiotic treatments. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2016;15:60. PubMed

3. Fallah F, Hakemi Vala M, Hashemi A, Shams S. Emergence of Novel Plasmid-mediated Beta-lactamase in Klebsiella pneumonia. Qom Univ Med Sci J 2012;6(4):104-16. [Full Text in Persian] Link

4. 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. [Full Text in Persian] Link

5. Niakan M, Chitsaz M, Metvaee AR. The prevalence of AmpC beta-lactamase gene in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008;27(10):915-21. PubMed

6. Mohd Khari FI, Karunakaran R, Rosli R, Tee Tay S. Genotypic and phenotypic detection of AmpC beta-lactamases in Enterobacter spp. Isolated from a teaching hospital in Malaysia. PloS One 2016;11(3):e0150643. PubMed

7. Farrokhnazar E, Khaki P, Moradi Bidhendi S. Investigation of ampC & esbl genes in Escherichia coli isolated from human and poultry. J Microbiol World 2014;7(2):138-47. Link

8. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2009;22(1):161-82. PubMed

9. Japoni-Nejad AA, Ghaznavi-Rad E, van Belkum A. Characterization of Plasmid-mediated AmpC and carbapenemases among Iranain nosocomial isolates of Klebsiella pneumoniae using phenotyping and genotyping methods. Osong Public Health Res Perspect 2014;5(6):333-8. PubMed

10. Mansouri S, Chitsaz M, Haji Hossein R, Mirzaee M, Kenites MH. Determine the resistance patterns of clinical isolates of AmpC- producing Escherichia coli based on phenotypic and genotypic characteristics. Daneshvar 2009;16(80):61-70. [Full Text in Persian] Link

11. Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Sugiyama T, Wacharotayankun R, Ito H, et al. Characterization of a plasmid-borne and constitutively expressed blaMOX-1 gene encoding AmpC-type beta-lactamase. Gene 1994;139(1):93-8. PubMed

12. 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 2014:1-8. PubMed

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

13. 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. Link

14. M100-S24. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 24 th informational supplement. 24th ed. NewYork: Nat'l Comm Clinical Lab Standards Pub; 2014.

15. 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;43(8):4163-7. PubMed

16. 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;46(4):1317-21. PubMed

17. Daoud Z, Moubareck C, Hakime N. Doucet-Populaire F. Extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in Lebanese ICU patients: Epidemiology and patterns of resistance. J Gen Appl Microbiol 2006;52(3):169-78. PubMed

18. Jacoby GA. AmpC beta -Lactamases. Clin Microbiol Rev 2009;22(1):161-82. PubMed

19. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Bo Ttger EC, Hombach M. Practical approach for reliable detection of AmpC Beta-Lactamase-producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2011;49(8):2798–803. PubMed

20. Schreckenberger PC. Conundrums in the laboratory detection of antimicrobial resistant Gram-negative bacteria. Rev Med Microbiol 2004;15(2):45-9. Link

21. 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. [Full Text in Persian] Link

22. Barakzahi M, Hormozi B, Rashki A, Ghalehnoo Z. Prevalence of extended spectrum β-Lactamase in Klebsiella pneumonia. Avicenna J Clin Microb Infec 2014;1(3):e22934. Link

23. Feizabadi MM, Mahamadi-Yeganeh S, Mirsalehian A, Mirafshar SM, Mahboobi M, Nili F, et al. Genetic characterization of ESBL producing strains of Klebsiella pneumoniae from Tehran hospitals. J Infect Dev Ctries 2010;4(10):609-15. PubMed

24. Mehrgan H, Rahbar M, Arab-Halvaii Z. High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. J Infect Dev Ctries 2010;4(3):132-8. PubMed

25. Agha-Seyed Hosseini M, Firoozeh F, Piroozmand A, Gilasi HR. Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae strains among clinical specimens in Kashan (2014-2015). Kashan Univ Med Sci 2016;20(3):267-73. Link

26. Nargesian M, Zargar M, Safari M. ESBL prevalence and molecular characterization of beta-lactamase gene blaTEM in urinary isolates of Klebsiella pneumoniae in Qom. Sci Res Appl Biol 2014;4(13):1-12. [Full Text in Persian] Link

27. Barzan M, Hoseyni-Doust R, Ghalavand Z. Investigation of frequency and antimicrobial pattern of gram-negative bacteria isolated from urine specimens of children with urinary tract infection in Tehran, Iran. Iran J Med Microbiol 2016;9(4):99-104. Link

28. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother 2007;59:165-74. PubMed

29. Woodford N, Reddy S, Fagan EJ, Hill RL, Hopkins KL, Kaufmann ME, et al. Wide geographic spread of diverse acquired AmpC beta-lactamases among Escherichia coli and Klebsiella spp. in the UK and Ireland. J Antimicrob Chemother 2007;59(1):102-5. PubMed

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

30. Ding H, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, et al. The prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from five children's hospitals in China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008;27(10):915-21. PubMed

31. Subha A, Devi VR, Ananthan S. AmpC beta-lactamase producing multidrug resistant strains of Klebsiella spp. & Escherichia coli isolated from children under five in Chennai. Indian J Med Res 2003;117:13-8. PubMed

32. Park MJ, Kim TK, Song W, Kim JS, Kim HS, Lee J. An Increase in the clinical isolation of acquired AmpC beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in Korea from 2007 to 2010. Ann Lab Med 2013;33(5):353-5. PubMed

33. 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;67(3):261-5. Link

34. Mansouri S, Kalantar Neyestanaki D, Shokoohi M, Halimi S, Beigverdi R, Rezagholezadeh F, et al. Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs types of beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli producing Extended Spectrum beta-lactamases in Kerman, Iran. Jundishapur J Microbiol 2014;7(2):e8756. PubMed

35. Amraei S, Eslami G, Taherpour A, Goudarzi H, Hashemi A. Detection of FOX, MOX, and ACT Genes in ESBL-producing Klebsiella pneumoniae Strains. J Mazandaran Univ Med Sci 2014;24(118):11-20. [Full Text in Persian] Link

36. Pitout JDD, Le PG, Moore KL, Church DL, Gregson DB. Detection of AmpC beta-lactamases in Escherichia coli, Klebsiella spp., Salmonella spp. and Proteus mirabilis in a regional clinical microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect 2010;16(2):165-70. PubMed

37. Rebuck JA, Olsen KM, Fey PD, Langnas AN, Rupp ME. Characterization of an outbreak due to extended-spectum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in a pediatric intensive care unite transplant population. Clin Infect Dis 2000;31(6):1368-72. PubMed

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0