مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۴۹/هفته سوم مهر ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۲۷

فراوانی ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC با واسطه‌ی پلاسمید در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه

علیرضا ژاپونی‌نژاد[۱]، نسیمه فرد موسوی[۲]، مژده صفری[۳]، حمید کاظمیان[۱]، مهسا طبیب‌نژاد[۲]، دکتر علیرضا آموزنده نوباوه[۴]، دکتر حمید ابطحی[۵]، دکتر احسان‌الله غزنوی راد[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آنزیم‌های بتالاکتامازی یکی از مهم‌ترین عوامل در به وجود آوردن مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان باکتری‌های گرم منفی می‌باشند. این مطالعه به منظور تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و بررسی فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی Ampc در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه صورت پذیرفت.

روش‌ها: ۱۰۰ ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی مختلف بیمارستان ولیعصر اراک جمع‌آوری شدند و توسط آزمایش‌های بیوشیمیایی استاندارد تعیین هویت شدند. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مطابق با دستورالعمل‌های CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) تعیین گردید. ژن‌های پلاسمیدی AmpC با استفاده از روش PCR (Polymerase chain reaction) در ایزوله‌ها شناسایی شدند.

یافته‌ها: بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین و اریترومایسین بود (۹۰ درصد)، در حالی که کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم (۸ درصد) و کلیستین (صفر درصد) بود. از ۱۰۰ ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه ۱۹ ایزوله (۱۹ درصد) دارای ژن‌های بتالاکتامازی AmpC بودند. ۷ ایزوله (۷ درصد) دارای ژن‌های خانواده‌ی MOX، ۸ ایزوله (۸ درصد) دارای ژن‌های خانواده‌ی CIT، سه ایزوله (۳ درصد) دارای ژن‌های خانواده‌ی DHA و یک ایزوله (۱ درصد) نیز دارای ژن‌های خانواده‌ی EBC بودند در حالی که ژن‌های خانواده‌ی ACC و FOX در هیچ کدام از ایزوله‌ها یافت نگردید.

نتیجه‌گیری: این مطالعه اولین گزارش از وجود بتالاکتامازهای AmpC از دسته‌ی MOX در کلبسیلا پنومونیه در ایران بوده است. شیوع بالای ایزوله‌های تولیدکننده‌ی بتالاکتامازهای AmpC در بیمارستان مرکزی اراک، مقاومت آنتی‌بیوتیکی را تبدیل به نگرانی بزرگی کرده است. از این رو باید در سیاست‌های تجویز آنتی‌بیوتیکی و کنترل عفونت‌ها تجدید نظر حاصل گردد.

واژگان کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، ژن‌های بتالاکتامازی AmpC، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

ارجاع: ژاپونی‌نژاد علیرضا، فرد موسوی نسیمه، صفری مژده، کاظمیان حمید، طبیب‌نژاد مهسا، آموزنده نوباوه علیرضا، ابطحی حمید، غزنوی راد احسان‌الله. **فراوانی ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC با واسطه‌ی پلاسمید در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۴۹): ۱۲۹۵-۱۲۸۵

۱- کارشناس ارشد، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۳- کارشناس ارشد، آزمایشگاه مواد غذایی، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۴- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۵- دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک،اراک، ایران
۶- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر احسان‌الله غزنوی راد
Email: e.ghaznavirad@arakmu.ac.ir

www.SID.ir

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه پاتوژن فرصت‌طلبی از خانواده‌ی انتروباکتریاسه است که در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی مختلفی از جمله پنومونی، سپسیس، عفونت‌های دستگاه ادراری و عفونت‌های داخل شکمی در بیماران بستری و نیز بیماران مبتلا به بیماری‌های زمینه‌ای نقش عمده‌ای دارد (۱). آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به عنوان مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بسیاری از عفونت‌های باکتریایی مطرح هستند و بیش از ۵۰ گروه از این خانواده بزرگ شامل پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، کارباپنم‌ها، مونوباکتام‌ها و به تازگی هیبریدهای پنی‌سیلینی و سفالوسپورین‌ها تولید و توسط پزشکان تجویز می‌شوند (۲). تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی یکی از مهم‌ترین عوامل در ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های گرم منفی می‌باشد (۳). طبقه‌بندی بتالاکتامازها به دو صورت مولکولی (Ambler) و عملکردی (Bush-jacoby-medeiros) می‌باشد. بر اساس طبقه‌بندی مولکولی به ۴ کلاس A، B، C و D تقسیم می‌شوند (۳). بتالاکتامازهای AmpC سفالوسپورین‌هایی هستند که جزء طبقه‌بندی مولکولی کلاس C هستند، از نظر کلینیکی بسیار مهم می‌باشندو به وسیله‌ی کروموزوم در بسیاری از باکتری‌ها از جمله سیتروباکترها، انتروباکترها، مورگانلا، هافنیا و سراشیاها تولید می‌گردند (۴). این آنزیم‌ها قادر به هیدرولیز اکثر پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، سفامایسین‌ها و مهارکننده‌های بتالاکتامازی هستند و تنها افینیتی کمی برای آنتی‌بیوتیک‌های کاربانمی و سفپیم دارند (۵).

بتالاکتامازهای AmpC می‌توانند از آنزیم‌های بتالاکتامازی وسیع‌الطیف (ESBLs یا Extended-spectrum β-lactamases) به واسطه‌ی توانایی‌شان در هیدرولیز سفامایسین‌ها (سفوکسیتین و سفوتتان) و عدم مهارشان به وسیله‌ی کلاولانیک اسید متمایز گردند (۶-۵). از دیگر ویژگی‌های مهم این آنزیم‌ها توانایی ایجاد مقاومت نسبت به کاربانپم‌ها در زمانی است که آن‌ها با عدم بیان پورین در باکتری‌های گرم منفی همراه می‌شوند (۷). از سال ۱۹۸۹ آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC با واسطه‌ی پلاسمید (PABLs یا Plasmid-mediated AmpC β-lactamases) در سراسر جهان و در سویه‌های نظیر اشرشیا کلی، گونه‌های کلبسیلا،پروتئوس میرابیلیس و سالمونلا تشخیص داده شدند (۵). ژن‌های بتالاکتامازی AmpC با واسطه‌ی پلاسمید، در واقع ژن‌های Ampc کروموزومی هستند که از اعضای خانواده‌ی انتروباکتریاسه از جمله انتروباکتر کولاسه، سیتروباکتر فروندای، مورگانلا مورگانای و هافنیا آلوی مشتق شده‌اند کلبسیلا پنومونیه فاقد ژن AmpC به صورت کروموزومی می‌باشد، اما آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC پلاسمیدی می‌توانند به این باکتری منتقل شوند و باعث ایجاد مقاومت در آن شوند.

دامنه‌ی فعالیت در آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC با واسطه‌ی پلاسمید به مانند آنزیم‌های کروموزومی AmpC است با این تفاوت که حساسیت آن‌ها نسبت به سفپیم و سفپیروم و کاربانپم‌ها کمتر می‌باشد (۵). در بیشتر نقاط شیوع مقاومت به واسطه‌ی آنزیم‌های AmpC پلاسمیدی نسبت به ESBLها کمتر است، اما تشخیص آن‌ها مشکل‌تر و طیف مقاومت ایجادشده توسط این خانواده وسیع‌تر از ESBLها می‌باشد. پلاسمیدهای قابل انتقال دارای ژن‌هایی هستند که

Archive of SID
www.SID.ir

آنزیم‌های AmpC را کد می‌کنند. این پلاسمیدها می‌توانند در باکتری‌هایی که ژن‌های کروموزومی AmpC را ندارند (مانند کلبسیلاها) یا اگر هم دارند بیان این آنزیم‌ها در آن‌ها بسیار ضعیف می‌باشد (مانند اشرشیا کلی) منتقل شوند و باعث گسترش این ژن‌ها در میان باکتری‌ها شوند (۲). در نتیجه تشخیص ایزوله‌های تولیدکننده‌ی آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC با واسطه‌ی پلاسمید جهت کنترل عفونت‌های بیمارستانی و مطالعات اپیدمیولوژیکی بسیار مهم می‌باشد (۸).

امروزه روش‌های فنوتایپی بسیاری در جهت تشخیص این دسته از آنزیم‌ها در باکتری‌ها موجود می‌باشد (۹) ولی تاکنون روشی توسط CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) جهت شناسایی این آنزیم‌ها معرفی نشده است و هنوز روش ژنوتیپی Polymerase chain reaction (PCR) به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص آن‌ها به کار می‌رود (۵). کاهش حساسیت نسبت به سفوکسیتین در انتروباکتریاسه‌ها در بسیاری از مطالعات به عنوان نشان‌دهنده‌ی فعالیت آنزیم‌های AmpC در نظر گرفته شده است (۱۰)؛ اما باید این نکته را در نظر گرفت که مقاومت نسبت به سفوکسیتین می‌تواند به واسطه‌ی تغییرات در نفوذپذیری غشای خارجی باکتری‌ها و نیز آنزیم‌های کارباپنمازی ایجاد گردد. با توجه به بروز مقاومت گسترده‌ی آنتی‌بیوتیکی در کلبسیلا پنومونیه در سراسر دنیا (۹) و با توجه به این که در ایران تاکنون مطالعات بسیار کمی در رابطه با فراوانی این دسته از آنزیم‌های بتالاکتامازی در سویه‌های ایجادکننده‌ی عفونت‌های بیمارستانی صورت پذیرفته است، در این مطالعه فراوانی ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC با واسطه‌ی پلاسمید در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی جداشده از نمونه‌های کلینیکی بیمارستان ولیعصر اراک با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

روش‌ها

در این مطالعه که به صورت مقطعی و توصیفی و در مدت زمان بین شهریور ماه ۱۳۹۰ تا شهریور ماه ۱۳۹۱ صورت پذیرفت، تعداد ۱۰۰ ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های مختلف بالینی خون، مایع مغزی نخاعی، ادرار، ترشحات دستگاه تنفسی و زخم از بیماران بستری‌شده در بخش‌های مراقبت ویژه‌ی بیمارستان ولیعصر اراک جمع‌آوری گردید. این مطالعه در کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک با شماره‌ی ۹۱-۱۲۷-۲ تصویب شده است.

با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی استاندارد از جمله رنگ‌آمیزی گرم، رشد بر روی مک کانکی، اکسیداز، OF، TSI، SIM، MR، VP، سیترات، اوره، لیزین و اورنیتین دکربوکسیلاز، گونه‌های کلبسیلا پنومونیه تعیین هویت شدند (۱۱).

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (Kirby Bauer) مطابق با معیارهای CLSI تعیین گردید (۱۲). دیسک‌ها محصول شرکت MAST (انگلستان) و به شرح زیر بودند: سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفوکسیتین، سفپیم، سفتریاکسون، آموکسی‌کلاو، پیپراسیلین-تازوباکتام، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامایسین، تتراسایکلین، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول (کوتریموکسازول)، کلیستین، ایمیپنم، کلرامفنیکل،

Archive of SID
www.SID.ir

اریترومایسین و ریفامپین. همچنین سویه‌ی استاندارد پسودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به عنوان کنترل آنتی‌بیوگرام استفاده گردید. حداقل غلظت بازدارنده‌ی ایمیپنم با استفاده از نوارهای E-test (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) مطابق با دستورالعمل CLSI در ایزوله‌هایی که با استفاده از روش PCR در آن‌ها ژن‌های مربوط به AmpC تشخیص داده شده بود، تعیین گردید.

جهت استخراج DNA از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد. پس از پاساژ نمونه‌ها بر روی محیط بلاد آگار، یک تک کلنی از آن‌ها به ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع لوریا برتانی تلقیح گردید و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت بر روی شیکر انکوبه شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت در بردارنده‌ی باکتری درون لوله‌های اپندورف به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله‌ی بعد مایع رویی دور ریخته شد و رسوب آن به وسیله‌ی ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به حالت سوسپانسیون درآمد. سوسپانسیون حاصل با استفاده از دستگاه ترموبلاک به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن به طور مجدد به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی حاصله در برگیرنده‌ی DNA باکتری بود که پس از اندازه‌گیری میزان DNA توسط دستگاه بیوفتومتر (Eppendorf, Germany) به عنوان الگو در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت (۱۳).

سپس روش PCR با استفاده از شش جفت پرایمر جهت شناسایی ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC با واسطه‌ی پلاسمید انجام پذیرفت. مشخصات پرایمرهایی که در روش PCR مورد استفاده قرار گرفتند در جدول ۱ ذکر شده است (۱۳). برنامه‌ی PCR جهت تکثیر تمامی ژن‌ها بدین ترتیب بود که دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۲۵ سیکل با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله‌ی اتصال پرایمرها (Annealing) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، مرحله‌ی طویل‌سازی (Extention) به مدت ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و در نهایت مرحله‌ی طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه صورت پذیرفت. جهت هر کدام از ۶ خانواده‌ی ژنی، حجم نهایی مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. بدین ترتیب که ۱ میکرولیتر از پرایمر رفت، ۱ میکرولیتر از پرایمر برگشت با غلظت نهایی ۱۰ پیکومول، ۱ میکرولیتر از DNA به عنوان الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر از 2XTaq Master mix (Vivantis) و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استفاده گردید. PCR جهت هر خانواده‌ی ژنی به صورت جداگانه انجام پذیرفت. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد و ولتاژ ۹۰ به مدت ۱ ساعت صورت پذیرفت. سپس ژل با استفاده از نور ماورای بنفش مورد ارزیابی قرار گرفت و اندازه‌ی باندهای به دست‌آمده در مقایسه با مارکر ۱۰۰ جفت بازی Fermentas مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین توالی DNA جهت ژن‌های دسته‌ی MOX، DHA، CIT و EBC در یکی از ایزوله‌ها صورت پذیرفت و این سویه به عنوان کنترل مثبت ژن‌های نام برده شده در آزمون PCR استفاده گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و اندازه‌ی محصول

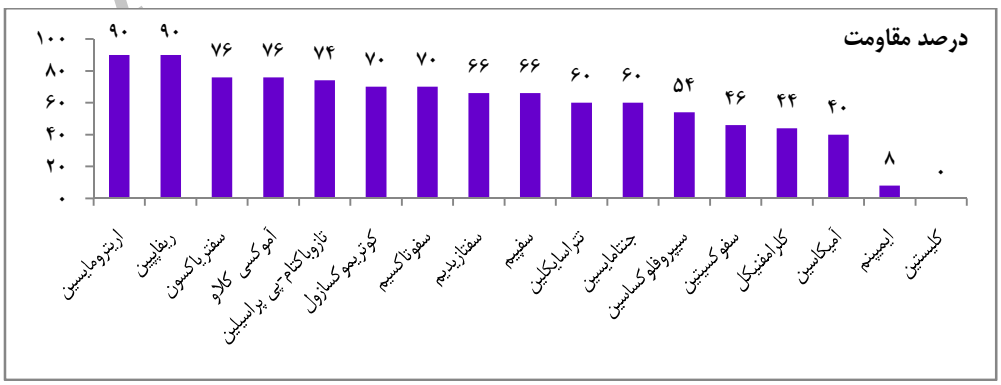
نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه‌ی محصول
FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	۱۹۰
FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	
MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	۵۲۰
MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGTGC	
CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	۴۶۲
CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	
DHAMF	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	۴۰۵
DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTT TGC	
EBCMF	TCGGTAAAG CCG ATG TTG CGG	۳۰۲
EBCMR	CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	
ACCMF	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	۳۴۶
ACCMR	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	

یافته‌ها

در صد مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه در برابر ۱۷ آنتی‌بیوتیک به کار گرفته‌شده در شکل ۱ نشان داده شده است. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین و اریترومایسین بود(۹۰ درصد)، در حالی که کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های ایمیپنم (۸ درصد) و کلیستین (صفر درصد) بود.

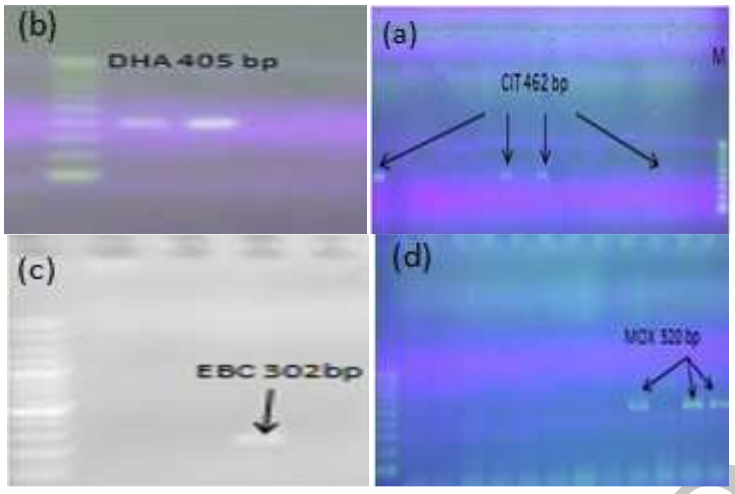
نتایج روش PCR

از ۱۰۰ ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه که توسط روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۲)، در مجموع ۱۹ ایزوله (۱۹ درصد از ایزوله‌ها) واجد ژن‌های کدکننده آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC با واسطه‌ی پلاسمید بودند. توزیع ژن‌ها در ایزوله‌ها بدین صورت بود که ۷ ایزوله (۷ درصد) دارای ژن‌های خانواده‌ی MOX، ۸ ایزوله (۸ درصد) دارای ژن‌های خانواده‌ی CIT، سه ایزوله دارای ژن‌های خانواده‌ی DHA و یک ایزوله نیز دارای ژن‌های خانواده‌ی EBC بودند. در حالی که ژن‌های خانواده‌ی ACC و FOX در هیچ کدام از ایزوله‌ها یافت نگردید. در این مطالعه تمامی ایزوله‌های مورد بررسی که از نظر AmpC مثبت بودند و فقط دارای ژن‌های یک خانواده بودند و ایزوله‌ای یافت نگردید که همزمان در برگیرنده‌ی چندین خانواده از ژن‌های AmpC باشد. همچنین نتایج حاصل از توالی‌یابی نیز صحت روش PCR در تشخیص خانواده‌های ژنی را تأیید کرد.



شکل ۱. درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های مورد بررسی در این مطالعه

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR (Polymerase chain reaction) مربوط به ژن‌های بتالاکتامازی AmpC در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه
در مقایسه با مارکر M با اندازه‌ی ۱۰۰ جفت باز.
a: باندهایی با وزن مولکولی ۴۶۲ جفت باز حاصل پرایمر **CITM**
b: باندهایی با وزن مولکولی ۴۰۵ جفت باز حاصل پرایمر **DHAM**
c: باند با وزن مولکولی ۳۰۲ جفت باز را حاصل پرایمر **EBCM**
d: باندهایی با وزن مولکولی ۵۲۰ جفت باز حاصل پرایمر **MOXM**

نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت بازدارنده‌ی ایمیپنم در ۱۹ ایزوله‌ی دارای بتالاکتاماز AmpC بدین صورت شد که ۱۵ ایزوله دارای MIC کمتر از ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۳ ایزوله دارای MIC کمتر از ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۱ ایزوله دارای MIC بیشتر از ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بودند. در مجموع ۱۸ ایزوله دارای بتالاکتاماز AmpC مطابق با دستورالعمل‌های CLSI(2011) به ایمیپنم حساس بودند و تنها یک ایزوله نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاوم بود.

بحث

با توجه به نقش بسیار مهم آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC با واسطه‌ی پلاسمید در ایجاد و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های گرم منفی و طیف بسیار گسترده‌ی فعالیت این آنزیم‌ها و نیز گسترش شیوع عفونت‌های ایجادشده به وسیله‌ی کلبسیلا پنومونیه در بیمارستان مرکزی دانشگاه علوم پزشکی اراک و نیز با توجه به این که مطالعات بسیار کمی در ایران در زمینه‌ی AmpC صورت پذیرفته است (۱۴)، مطالعه‌ی حاضر جهت بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و نیز بررسی فراوانی آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC با واسطه‌ی پلاسمید در کلبسیلا پنومونیه‌های جداشده از نمونه‌های کلینیکی صورت پذیرفت.

بتالاکتامازهای AmpC به دو دسته‌ی کروموزومی و پلاسمیدی تقسیم می‌شوند. دسته‌ی کروموزومی قابل القا هستند و اغلب دارای بیان کمی در ایزوله‌هایی در برگیرنده‌ی این آنزیم می‌باشند. بنزیل پنیسیلین‌ها، آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، سفازولین و سفالوتین از القاکننده‌های قوی بتالاکتامازهای AmpC هستند. زمانی که یک باکتری که دارای این آنزیم به

www.SID.ir
www.mui.ac.ir
Archive of SID

صورت کروموزومی است در معرض این القاکننده‌ها قرار بگیرد، بیان آنزیم آن افزایش می‌یابد. در نتیجه باعث ایجاد مقاومت در باکتری می‌شود. علاوه بر آنتی‌بیوتیک‌های ذکرشده ایمیپنم نیز القاکننده‌ی قوی این آنزیم است، اما بر خلاف مابقی القاکننده‌های قوی، این آنتی‌بیوتیک در برابر هیدرولیز آنزیمی بسیار پایدارتر می‌باشد (۹، ۵).

آنزیم‌های AmpC پلاسمیدی به ۶ خانواده‌ی MOX، FOX، CIT، DHA، ACC و EBC تقسیم می‌شوند. تغییرات اندک در توالی اسیدهای آمینه‌ی آن‌ها باعث به وجود آمدن واریانت‌های مختلف در میان خانواده می‌گردد (۱۵، ۱۳). به جز ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های ACT1، DHA1 و 2 و CMY13 که القاپذیر هستند، مابقی ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های پلاسمیدی غیر القایی هستند. بیان ژن‌های پلاسمیدی در حالت عادی بسیار بیشتر از ژن‌های کروموزومی است، که باعث می‌شود این ژن‌ها نقش بسیار مهمی را در ایجاد مقاومت در سویه‌های در برگیرنده ایفا کنند (۵).

در مطالعه‌ی حاضر نتایج حاصل از تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌ها نشان داد که کلیستین و ایمیپنم با مقاومت آنتی‌بیوتیکی صفر و نه درصدی به ترتیب مؤثرترین آنتی‌بیوتیک بر علیه ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه می‌باشند. از ۱۹ ایزوله‌ای که دارای ژن‌های بتالاکتامازی AmpC به واسطه‌ی پلاسمید بودند، ۱۸ ایزوله به ایمیپنم حساسیت نشان دادند. با توجه به اثرات نفروتوکسیکی کلیستین، ایمیپنم می‌تواند گزینه‌ی مناسبی جهت درمان این ایزوله‌ها باشد. همچنین نتایج حاصل از تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ۱۹ ایزوله‌ی دارای ژن‌های بتالاکتامازی AmpC نشان داد که تنها ۸ ایزوله از ۱۹ ایزوله نسبت به سفپیم حساسیت نشان دادند و ۱۱ ایزوله به این آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. این مقاومت شاید به دلیل تغییر در ساختمان آنزیم AmpC (موتاسیون نقطه‌ای یا حذف اسید آمینه‌های موجود در آنزیم AmpC) و یا افزایش در تولید این آنزیم به همراه عدم بیان پورین‌های غشای خارجی، به وجود آمده باشد (۱۶).

در مطالعه‌ای که توسط نیاکان و همکاران بر روی ۱۶۸ ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه صورت پذیرفت، فراوانی ژن‌های پلاسمیدی AmpC، ۸/۴ درصد (۱۰ ایزوله) گزارش گردید (۱۷)؛ در حالی که در مطالعه‌ی حاضر فراوانی ژن‌های پلاسمیدی AmpC، ۱۹ درصد (۱۹ ایزوله) بود. ژن‌های بتالاکتامازی مربوط به خانواده‌های CIT، EBC و DHA در دو مطالعه گزارش گردیدند؛ در صورتی که ژن‌های مربوط به خانواده‌ی ACC در هیچ یک از دو مطالعه یافت نگردید. ژن‌های مربوط به خانواده‌ی FOX دارای بیشترین فراوانی در ایزوله‌ها در مطالعه‌ی نیاکان و همکاران بود (۱۷) و در مطالعه‌ی حاضر یافت نگردید. در مطالعه‌ی حاضر ژن‌های مربوط به خانواده‌ی MOX در ۷ ایزوله گزارش گردید ولی این گروه از ژن‌ها در مطالعه‌ی نیاکان و همکاران گزارش نگردید. در این مطالعه برای اولین بار در ایران ژن‌های مربوط به خانواده‌ی MOX در کلبسیلا پنومونیه گزارش گردید.

میزان مقاومت نسبت به سفوکسیتین در مطالعه‌ی حاضر ۴۶ درصد بود که از ۴۶ سویه که مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک را نشان دادند، تنها ۱۲ ایزوله دارای آنزیم AmpC بودند و ۳۴ ایزوله‌ی

Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

باقی‌مانده دارای آنزیم AmpC نبودند. این موضوع نشانگر این مطلب است که دیگر مکانیسم‌ها از جمله عدم بیان در پورین‌های غشای خارجی و نیز آنزیم‌های کارباپنمازی همان طوری که در دیگر مطالعات ذکر شده‌اند، می‌توانند در به وجود آمدن مقاومت نسبت به سفوکسیتین نقش داشته باشند (۱۸). در مطالعه‌ی حاضر از ۱۹ ایزوله‌ای که دارای آنزیم AmpC بودند، ۷ ایزوله نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین حساسیت نشان دادند که این موضوع می‌تواند استفاده از سفوکسیتین به عنوان مارکر اولیه در جهت تشخیص این نوع از مقاومت را رد کند، بر خلاف دیگر مطالعات صورت‌پذیرفته که این آنتی‌بیوتیک را به عنوان شاخص معرفی کرده‌اند (۱۹، ۹). به همین دلیل در این مطالعه PCR جهت تمامی ۱۰۰ ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه صرف نظر از مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها انجام شد.علاوه بر مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم و آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین، شاخص فنوتایپی دیگر در جهت تشخیص ایزوله‌های دارای بتالاکتاماز AmpC عدم مهار مقاومت به وسیله‌ی مهارکننده‌های آنزیم‌های بتالاکتاماز از جمله کلاولانیک اسید می‌باشد (۱۴)، در مطالعه‌ی حاضر از ۱۹ ایزوله‌ی دارای بتالاکتاماز AmpC، ۱۳ ایزوله به آموکسی‌کلاو مقاومت نشان دادند و ۶ ایزوله‌ی دیگر به این آنتی‌بیوتیک حساس بودند. این مسأله نشان‌دهنده‌ی این مطلب است که سویه‌های دارای این بتالاکتاماز می‌توانند الگوی Heterogeneous از مقاومت فنوتایپی را نشان دهند. در نتیجه جهت تشخیص و شناسایی این سویه‌ها استفاده از الگوی مقاومت فنوتایپی به عنوان روش‌های اولیه می‌تواند مشکل‌ساز باشد.

در دیگر نقاط دنیا درصدهای مختلفی از شیوع آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC به واسطه‌ی پلاسمید ارائه شده است. در مطالعه‌ای که بر روی ۴۰۸ ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان‌های ۱۸ ایالت امریکا صورت پذیرفت، میزان شیوع این آنزیم ۱۳/۲ درصد گزارش گردید (۲۰)، این میزان در دیگر مطالعه‌ی صورت‌پذیرفته در همین کشور که بر روی ۱۹۰ ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه‌ی برگرفته شده از خون صورت پذیرفت، ۲/۶ درصد گزارش گردید (۲۱). فراوانی این آنزیم در دیگر کشورها مانند کره‌ی جنوبی و چین به ترتیب ۷/۲ درصد و ۲/۸ درصد در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه گزارش گردید (۲۳-۲۲). در مطالعه‌ای دیگر در کشور انگلستان، ۵۵ درصد از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه دارای آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC به واسطه‌ی پلاسمید بودند (۲۴).

نتیجه‌گیری

این مطالعه اولین گزارش از وجود بتالاکتامازهای AmpC از دسته‌ی MOX در کلبسیلا پنومونیه در ایران بوده است. طیف بسیار گسترده‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شیوع بالای ایزوله‌های تولیدکننده‌ی بتالاکتامازهای AmpC در بیمارستان مرکزی اراک، مقاومت آنتی‌بیوتیکی را تبدیل به نگرانی بزرگی کرده است. از این رو باید در سیاست‌های تجویز آنتی‌بیوتیکی و کنترل عفونت‌ها تجدید نظر حاصل گردد. همچنین توصیه می‌گردد که مطالعات وسیع‌تری در این زمینه در ایران صورت بپذیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل اجرای طرح تحقیقاتی به شماره‌ی

Archive of SID
www.SID.ir

۷۵۴ در دانشگاه علوم پزشکی اراک بود. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک بابت تأمین هزینه‌های مالی و همین طور از کلیه‌ی کسانی که مجریان را در انجام این طرح یاری نمودند، تشکر به عمل می‌آید. به علاوه از زحمات سرکار خانم مرضیه رنجبران و آقای مسعود صرافیان در جداسازی اولیه‌ی ایزوله‌های باکتریایی قدردانی می‌گردد.

References

1. Struve C, Krogfelt KA. Pathogenic potential of environmental Klebsiella pneumoniae isolates. Environ Microbiol 2004; 6(6): 584-90.
2. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. Int J Med Microbiol 2010; 300(6): 371-9.
3. Tenover FC, Emery SL, Spiegel CA, Bradford PA, Eells S, Endimiani A, et al. Identification of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Escherichia coli, Klebsiella spp., and proteus species can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. J Clin Microbiol 2009; 47(2): 294-9.
4. Kong KF, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. APMIS 2010; 118(1): 1-36.
5. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2009; 22(1): 161-82, Table.
6. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(6): 1211-33.
7. Nasim K, Elsayed S, Pitout JD, Conly J, Church DL, Gregson DB. New method for laboratory detection of AmpC beta-lactamases in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. J Clin Microbiol 2004; 42(10): 4799-802.
8. Hanson ND. AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? J Antimicrob Chemother 2003; 52(1): 2-4.
9. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Bottger EC, Hombach M. Practical approach for reliable detection of AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2011; 49(8): 2798-803.
10. Manchanda V, Singh NP. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among Gram-negative clinical isolates using a modified three-dimensional test at Guru Tegh Bahadur Hospital, Delhi, India. J Antimicrob Chemother 2003; 51(2): 415-8.
11. Mahon CR, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology. 2nd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2000.
12. Cockerill FR. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement. Philadelphia, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
13. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 2002; 40(6): 2153-62.
14. Mansouri S, Chitsaz M, Hajihosseini R, Mirzaee M, Gheini MH. Determination of Resistance Pattern of Plasmid-Mediated AmpC?-Lactamases Producing Isolate of Escherichia coli. Daneshvar 2009; 16(80): 61-70. [In Persian].
15. Kashif MT, Yassin AS, Hosny A. Detection of AmpC beta-lactamases using sodium salicylate. J Microbiol Methods 2012; 91(3): 354-7.
16. Barnaud G, Benzerara Y, Gravisse J, Raskine L, Sanson-Le Pors MJ, Labia R, et al. Selection during cefepime treatment of a new cephalosporinase variant with extended-spectrum resistance to cefepime in an Enterobacter aerogenes clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(3): 1040-2.
17. Niakan M, Chitsaz M, Metwaei AR. Prevalence of AmpC type extended spectrum beta lactamases genes in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. Iran J Med Microbiol 2008; 2(2): 1-8.
18. Tan TY, Ng LS, He J, Koh TH, Hsu LY. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(1): 146-9.
19. Yamasaki K, Komatsu M, Abe N, Fukuda S, Miyamoto Y, Higuchi T, et al. Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the Kinki region of Japan. J Clin Microbiol 2010; 48(9): 3267-73.
20. Moland ES, Black JA, Ourada J, Reisbig MD, Hanson ND, Thomson KS. Occurrence of newer

Archive of SID
www.SID.ir

beta-lactamases in Klebsiella pneumoniae isolates from 24 U.S. hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(12): 3837-42.
21. Coudron PE, Hanson ND, Climo MW. Occurrence of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in bloodstream isolates of Klebsiella pneumoniae: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC beta-lactamases. J Clin Microbiol 2003; 41(2): 772-7.
22. Pai H, Kang CI, Byeon JH, Lee KD, Park WB, Kim HB, et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(10): 3720-8.
23. 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.
24. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Isfahan Medical School Received: 14.05.2013

Vol. 31, No. 249, 3rd Week, October 2013 Accepted: 18.08.2013

Prevalence of Plasmid-Mediated AmpC ß-Lactamase Genes in Clinical Isolates of Klebsiella Pneumoniae in Arak City, Iran

Alireza Japoni-Nejad MSc[1], Nasim Fardmusavi[2], Mojdeh Safari MSc[3], Hamid Kazemian MSc[1], Mahsa Tabibnejad[2], Alireza Amuzandeh Nobaveh MD[4], Hamid Abtahie PhD[5], Ehsanollah Ghaznavi-Rad PhD[6]

Original Article

Abstract

Background: ß-lactamase enzymes are the most important factor for antimicrobial resistance in Gram-negative rods. This study aimed to determine the antimicrobial susceptibility pattern and the occurrence of AmpC ß-lactamase genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae (K. pneumonia).*

Methods: A total of 100 *K. pneumonia* isolates was collected from clinical specimens obtained in the Vali-Asr hospital, Arak, Iran. The isolates were identified on the basis of standard biochemical tests. Antimicrobial susceptibility pattern was defined by the standard disk diffusion method according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) guidelines. Plasmid-mediated AmpC β-lactamases genes were detected by using polymerase chain reaction (PCR) method.

Findings: Of the 100 isolates tested, 19 (19%) were demonstrated to harbor AmpC β-lactamases by multiplex PCR; eight isolates carried β-lactamases genes of the CIT group, seven isolates carried genes belonging to the MOX group, three and one isolates carried genes belonging to the EBC and DHA groups, respectively. ACC and FOX groups were not found in our isolates.

Conclusion: This study is the first report of MOX group of AmpC β-lactamases in *K. pneumoniae* in Iran. High prevalence of plasmid-mediated AmpC in the central hospital of Arak, indicating the antibiotic resistant, is a major concern; hence, antibiotic prescription policy should be revised and infection control measure is necessary to be improved.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, AmpC ß-lactamase genes, Antibiotic resistance

Citation: 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

1- Student Research Committee, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
2- MSc Student, Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3- Food Microbiology Laboratory, Food and Drug Deputy, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
4- Assistant Professor, Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
5- Associate Professor, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
6- Assistant Professor, Department of Medical Microbiology, School of Medicine AND Molecular And Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
Corresponding Author: Ehsanollah Ghaznavi-Rad PhD, Email: e.ghaznavirad@arakmu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir