ORIGINAL ARTICLE

Detection of FOX, MOX, and ACT Genes in ESBL-producing Klebsiella pneumoniae Strains

Shokouh Amraei[1],
Gita Eslami[2],
Arezou Taherpour[3],
Hossein Goudarzi[2],
Ali Hashemi[4]

[1] MSc in Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received July 7, 2014 ; Accepted November 11, 2014)

Abstract

Background and purpose: An increasing emergence of multidrug resistance among *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates has limited the therapeutic options for treatment. The beta-lactamases are the major defense of gram-negative bacteria against antibiotics. The aim of this study was the detection of ESBLs and Amp-C enzymes and MOX, FOX, and ACT genes in *K.pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Tehran hospitals during 2011-2013.

Materials and methods: This study was conducted in 120 *K. pneumoniae* isolates from Imam Hossein, Taleghani and Mofid Children's hospitals in Tehran, Iran. Antibiotic susceptibility tests were performed using Kirby-Bauer disc diffusion and Broth Microdilution methods. The detection of Amp-C and ESBLs enzymes was carried out according to CLSI guidelines. The MOX, FOX, and ACT genes were detected by PCR and sequencing methods.

Results: Among 120 *K. pneumoniae* strains, 24 (20%) and 68(56.8%) were Amp-C and ESBL positive, respectively. In this study colistin and tigecycline were found more active than other antibiotics. ACT, FOX, and MOX genes were detected in 16 (13%), 46 (38.33%) and 43(35.83%) of the isolates, respectively.

Conclusion: The prevalence of antibiotic resistance genes detected in this study is of great concern and highlights the need for infection control measures including antibacterial management and identification of resistant isolates.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Extended-Spectrum-beta-lactamase, Amp-C, antibiotic resistance

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(118): 11-20 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۸ آبان سال ۱۳۹۳ (۲۰-۱۱)

تشخیص مولکولی ژن های FOX, MOX, ACT در سویه های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده بتالاکتاماز با طیف وسیع

شکوه امرائی[۱]
گیتا اسلامی[۲]
آرزو طاهرپور[۳]
حسین گودرزی[۲]
علی هاشمی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: افزایش ظهور مقاومت چند دارویی در بین ایزوله‌های بیمارستانی کلبسیلاپنومونیه، گزینه‌های درمانی را برای درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این باکتری محدود کرده است که در این میان بتالاکتامازها به عنوان یکی از مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در این باکتری محسوب می‌شوند. لذا هدف از این مطالعه، تشخیص فنوتیپی بتالاکتامازهای با طیف وسیع (ESBLs، Amp-C) و شناسایی ژن‌های پلاسمیدی FOX, MOX, ACT در میان ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر تهران در سال‌های ۹۳–۹۱ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی بر روی ۱۲۰ایزوله کلبسیلاپنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های امام حسین(ع)، طالقانی و کودکان مفید شهر تهران انجام شده است. تست‌های حساسیت ضد میکروبی با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث بر اساس رهنمودهای CLSI انجام گردید و تشخیص فنوتیپی آنزیم‌های Amp-C و ESBL با استفاده از کیت شرکت Mast مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی ژن‌های پلاسمیدی *FOX, MOX, ACT* با استفاده از روش‌های PCR و Sequencing انجام گردید.

یافته‌ها: از ۱۲۰ایزوله کلبسیلا پنومونیه (۲۰ درصد) ۲۴ حاوی آنزیم Amp-C و (۵۶.۸ درصد)۶۸ از ایزوله‌ها حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع (ESBL) بودند. در این مطالعه کلیستین و تیجیسیکلین بهترین اثر را داشتند. در بین ایزوله‌ها (۱۳ درصد) ۱۶ دارای ژن ACT، (۳۸.۳۳ درصد) ۴۶ دارای ژن FOX و (۳۵.۸۳)۴۳ دارای ژن MOX بودند.

استنتاج: شیوع آنزیم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در این مطالعه موجب نگرانی است، از این رو برای کنترل عفونت و جلوگیری از گسترش باکتری‌های مقاوم به دارو، نیاز به مدیریت دقیق در تجویز دارو و شناسایی ایزوله‌های مقاوم می‌باشد.

واژه های کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتاماز با طیف وسیع، Amp-C، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یکی از موارد مهم عفونت‌های اکتسابی از جامعه و بیمارستان است. این باکتری یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی است که میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا می‌باشد و باعث انواع مختلفی از عفونت‌ها به ویژه پنومونی، سپتی‌سمی، اسهال، ایجاد آبسه در کبد، اندوفتالمیت، مننژیت، عفونت‌های ادراری

مولف مسئول: گیتا اسلامی– تهران: ولنجک، بلوار دانشجو، خیابان کودک یار، دانشکده پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی E-mail: g-eslami@yahoo.com
۱. کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. استاد، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۴. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۴/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۶/۱۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۸/۲۰

و باکتریمی در نوزادان می‌گردد. در هر سال چهار میلیون نوزاد فوت می‌کنند که بیش‌ترین میزان مرگ و میر در نوزادان مربوط به عفونت‌های پنومونی، سپتی سمی، مننژیت و اسهال می‌باشد. نوزادان به دلیل نداشتن سیستم ایمنی کامل، آسیب‌پذیرتر هستند. درمان عفونت‌های نوزادان آلوده به ارگانیسم‌های مقاوم به چندین دارو، تبدیل به یک مشکل جدی شده است(۱). مقاومت به داروها به عنوان یک تهدید جدی برای سلامت انسان‌ها مطرح می‌باشد که بیماران را در سرتا سر بیمارستان‌های جهان تحت تاثیر قرار می‌دهد، از این‌رو سازمان بهداشت جهانی سال ۲۰۱۱ را به عنوان سال مقاومت آنتی بیوتیکی نامیده بود. این سازمان توصیه های زیادی را برای کنترل و جلوگیری ازمقاومت آنتی بیوتیکی به دولت‌ها کرده است که شامل ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استفاده صحیح از آنتی بیوتیک‌ها، فروش آنتی‌بیوتیک‌ها فقط با نسخه پزشکان، کنترل و جلوگیری از عفونت‌ها می‌باشد(۲،۱). افزایش ظهور مقاومت چند داروئی در بین ایزوله‌های بیمارستانی کلبسیلا پنومونیه، گزینه‌های درمانی را برای درمان عفونت‌های ایجاد شده به‌وسیله این باکتری محدود کرده است. بیش‌تر ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چندین دارو می‌باشند. در بین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک، بتالاکتامازها به عنوان دفاع اصلی باکتری‌های گرم منفی به ویژه کلبسیلا پنومونیه در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام محسوب می‌شوند. طبق نظر Ambler، Bush-Jacoby بتالاکتامازها به چهار گروه تقسیم می‌شوند(۲،۱). باکتری‌های دارای بتالاکتاماز با طیف وسیع (ESBL) به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله پنی‌سیلین‌ها، سفالسپورین‌های نسل اول، دوم و سوم و آزترونام (به جز سفامایسین‌ها و کاربا‌پنم‌ها) مقاوم هستند. این آنزیم‌ها به وسیله کلاولانات مهار می‌شوند و در خانواده انتروباکتریاسه، سودوموناس و اسینتوباکتر بامانی دیده شده‌اند(۳). طبق طبقه بندی Bush–Jacoby، این آنزیم ها در گروه 2be (آنزیم‌های کلاس A) و بعضی دیگر در کلاس 2d (آنزیم‌های کلاس D) قرار دارند. ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها بر روی عناصر ژنتیکی متحرک از قبیل پلاسمید یا کروموزوم قرار دارند(۳-۱). ژن کدکننده آنزیم‌های Amp-C بر روی کروموزم یا پلاسمید قرار دارند. باکتری‌های حاوی این آنزیم قادر به هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های سفالوتین، سفازولین، سفوکسیتین، بیش‌تر پنی‌سیلین‌ها و ترکیبات بتالاکتام های ممانعت‌کننده بتالاکتاماز می‌باشند(۴). در بسیاری از باکتری‌ها، آنزیم‌های AmpC القایی هستند و در اثر موتاسیون در میزان بالا بیان می‌شوند. بیان بسیار بالا، باعث مقاومت باکتری‌ها به سفالسپورین‌ها شامل سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفتریاکسون می‌شوند. در بعضی از باکتری‌ها از قبیل کلبسیلا پنومونیه، اشریشیاکلی و پروتئوس، ژن کدکننده این آنزیم‌ها بر روی پلاسمید قرار دارد. مقاومت به واسطه این آنزیم‌ها بسیار کم‌تر از بتالاکتامازهای با طیف وسیع می‌باشد. این آنزیم‌ها در گروه C طبقه‌بندی بتالاکتامازها قرار دارند(۵،۴). بتالاکتامازهای Amp-C شامل آنزیم‌های ACC، MIR، CMY، ACT، FOX ، MOX می‌باشند. ژن‌های ACT، FOX ، MOX باعث مقاومت به داروهای سفالوسپورین نظیر سفتازیدیم، سفوتاکسیم وآزترونام می شوند، از این‌رو باعث افزایش هزینه درمان وطول مدت بستری و مرگ و میر می‌شوند(۶). لذا هدف از این مطالعه شناسایی بتالاکتامازهای با طیف وسیع و آنزیم‌های Amp-C (ACT,FOX,MOX) در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر تهران در سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۲ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این پژوهش سویه‌های مشکوک به کلبسیلا پنومونیه از بیماران بستری در بیمارستان‌های کودکان مفید، طالقانی و امام حسین (ع) جمع‌آوری شد. پس از انتقال نمونه‌های مشکوک به آزمایشگاه تحقیقاتی

میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، شناسایی تاییدی آن‌ها با روش‌های استاندارد و افتراقی میکروبیولوژی انجام شد. درمجموع ۱۲۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری گردید.

جداسازی و تشخیص ایزوله‌ها

برای تایید، نمونه‌ها بر روی محیط کشت EMB ، مک کانکی آگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از انکوباسیون از کلنی‌های مشکوک به کلبسیلا پنومونیه‌لام مستقیم تهیه کرده و درصورت دیدن باسیل‌های گرم منفی، کارهای تشخیصی زیر انجام شد: از تست‌های مرسوم آزمایشگاهی شامل تست اکسیداز، کشت در محیط‌های TSI، MR،SIM، VP، لیزین دکربوکسیلاز، سیترات، اوره و ... استفاده گردید.

بررسی الگوی مقاومت دارویی

مقاومت دارویی سویه‌های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک های(ایمی پنم، مروپنم، آزترونام، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، تیجیسیکلین، فسفومایسین، دوریپنم، ارتاپنم، کلیستین، سفپیم، جنتامایسین، آمیکاسین، پیپراسیلین، تتراسیکلین، آمپی سیلین، سفپودوکسیم) به روش انتشار دیسک در آگار(Disk Diffusion)انجام شد. به طور خلاصه، چند کلنی از کشت ۲۴ ساعته باکتری از محیط نوترین اگار برداشته و در ۰/۹ درصد محلول نمکی حل شده تا به غلظت نیم مک فارلند برسد، سپس مقدار مشخصی از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی را با فاصله مناسب روی محیط قرار داده و پلیت ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس نتایج با استفاده از پروتکل CLSI مورد بررسی قرار گرفتند(۷).

تعیین الگوی حساسیت سویه‌ها توسط MIC به روش میکرودایلوشن براث:

ابتدا آنتی‌بیوتیک‌های (ایمی پنم، مروپنم، سفتازیدیم، سفوتاکسیم و آمپی سیلین را بر طبق CLSI در حلال مربوطه حل نموده و سپس طبق رهنمودهای CLSI به ترتیب غلظت‌های ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲ تهیه و سپس از هر غلظت (آنتی‌بیوتیک به علاوه محیط مولر هینتون براث) ۰/۱ ml داخل هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. در مرحله بعد از هر باکتری کشت داده شده نیم مک فارلند تهیه می‌کنیم و سپس از هر سوسپانسیون نیم مک فارلند هر باکتری، رقت ۱:۱۰ تهیه کرده و مقدار ۰/۰۰۵ ml داخل هر چاهک می‌ریزم تا غلظت باکتری داخل هر چاهک ۵×۱۰۵ CFU/mL شود. یک لاین به عنوان کنترل منفی که در واقع محلول آنتی‌بیوتیک به همراه محیط مولر هینتون براث می باشد و یک لاین دیگر به عنوان کنترل مثبت که در واقع E.Coli ATCC25922 می باشد، قرار داده شد(۷).

تعیین باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتاماز با طیف وسیع(ESBL):

جهت شناسایی باکتری های حاوی ESBL با توجه به دستورالعمل CLSI از روش Combined Test استفاده شد. به این صورت که بر روی محیط مولر هینتون آگار دیسک سفتازیدم را به فاصله ۳۰ میلی‌متر از دیسک سفتازیدیم/کلاولانیک اسید، دیسک سفوتاکسیم به فاصله ۳۰ میلی‌متر از دیسک سفوتاکسیم/ کلاولانیک اسید و دیسک سفپودوکسیم به فاصله ۳۰ میلی متر از دیسک سفپودوکسیم/کلاولانیک اسید (MAST انگلیس) قرارداده شد. ایزوله‌هایی که قطر هاله ممانعت از رشد دیسک سفالوسپورین همراه کلاوونیک اسید نسبت به دیسک سفالوسپورین فاقد کلاولانیک اسید بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر بود به عنوان باکتری‌های تولیدکننده ESBL در نظر گرفته شدند. از کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع به عنوان سوش کنترل مثبت استفاده گردید(۱۱-۷).

غربالگری باکتری های تولید کننده Amp-C:

برای بررسی نمونه‌های حاوی این آنزیم از کیت شرکت Mast کشور انگلستان استفاده شد. کیت حاوی

سه دیسک A,B,C بود. دیسک A شامل سفپودوکسیم و یک القاءکننده آنزیم Amp-C، دیسک B شامل سفپودوکسیم، یک القاءکننده آنزیم Amp-C و یک ممانعت‌کننده ESBL و دیسک C شامل سفپودوکسیم، یک القاءکننده Amp-C، یک ممانعت‌کننده ESBL و ممانعت‌کننده Amp-C بود. از هر باکتری نیم مک فارلند تهیه و سپس توسط سواب بر روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح شد. دیسک با فاصله مشخصی بر روی پلیت قرار گرفته و سپس به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در صورتی که هاله عدم رشد اطراف دیسک C به میزان ۵ میلی‌متر بیشتر از دیسک‌های B,A بود، نشان دهنده تولید آنزیم Amp-C بود(۸).

آماده سازی نمونه جهت بررسی مولکولی

استخراج DNA

برای استخراج DNA ابتدا مقدار ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری کشت داده شده در محیط TSB را سانتریفیوژ کرده و سپس از رسوب حاصل برای استخراج DNA استفاده می شود.

روش فنل- کلروفرم برای استخراج DNA:

باکتری کلبسیلا پنومونیه بر روی محیط TSB براث کشت داده شد و محیط‌ها در انکوباتور شیکردار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس سوسپانسیون باکتری را داخل میکروتیوپ ۲ میلی لیتری سانتریفوژ کرده (۷۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه) و سپس رسوب حاصل توسط سمپلر در محلول‌های ۶۰۰ میکرولیتر تامپون لیز و ۲۰ میکرولیتر از SDS25% و ۳ میکرولیتر از پروتیناز–K، حل گردید. میکروتیوپ‌ها در بن ماری ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت انکوبه گردید. بر روی سوسپانسیون لیز شده باکتریایی ۶۲۰ میکرولیتر مخلوط فنل- کلروفورم- ایزوآمیل الکل اضافه گردید سپس سوسپانسیون فوق در (۱۰۰۰۰ rpm) به مدت ۱۰ دقیقه و در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. فاز رویی را به یک میکروتیوپ ۲ میلی لیتری جدید منتقل شد. ۶۲۰ میکرولیتر مخلوط فنل- کلروفوم- ایزوآمیل الکل به محلول حاصل از مرحله ۴ اضافه گردید و مراحل ۳ و۴ تکرار گردید. ۶۲۰ میکرولیتر کلروفوم به روی میکروتیوپ اضافه شد و کاملا مخلوط گردید تا سوسپانسیون شیری رنگ حاصل شود سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰rpm و در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. فاز رویی را به یک میکروتیوپ ۲ میلی لیتری جدید دیگری منتقل گردید و حدود ۱/۵ میلی لیتر اتانول خالص سرد به آن اضافه گردید و با واژگون کردن مکرر لوله به آرامی مخلوط را به هم زده تا رشته DNA ظاهر شود. DNA رسوب یافته توسط سانتریفیوژ با دور ۹۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه به دست آمد و مایع روی را خارج گردید و میکروتیوپ در هوای اطاق خشک شد. DNA در ۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE حاوی RNAase حل گردید(۹).

انجام PCR برای ژن های ACT,FOX,MOX

برای انجام واکنش PCR، ابتدا مخلوط واکنش در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری تهیه شد. برای تهیه این مخلوط ابتدا مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش را برای یک نمونه محاسبه کرده و سپس بسته به تعداد نمونه مقادیر برای تعداد نمونه مورد نظر محاسبه گردید. به منظور دقت و صحت انجام تست باید برای هر بار انجام واکنش، نمونه‌های کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شود. به همین جهت لازم است که در محاسبه مقادیر واکنش، کنترل های مثبت و منفی نیز منظور گردد. در این مطالعه از سویه‌های حاوی ژن‌های فوق به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به جای DNA به عنوان کنترل منفی استفاده شد. کنترل منفی برای چک کردن عدم آلودگی مواد PCR استفاده می‌شود. برای تکثیر ناحیه درونی ژن‌های نامبرده شده، مجموعه ای از پرایمرها مورداستفاده قرار گرفت. توالی پرایمرها

با اطلاعات توالی نوکلئوتیدی موجود در Gene Bank (سیستم blast) چک گردید (جدول شماره ۱). مقادیر لازم برای انجام PCR درجدول شماره ۲ آورده شده است.

انجام الکتروفورز

از این روش برای جداسازی محصولات PCR ژن‌های مورد نظر استفاده شد. همان طور که قبلا اشاره شد جهت تعیین صحت استخراج DNA و هم چنین بررسی محصولات، پس از انجام عمل PCR لازم است تا محصول مورد نظر بر روی ژل آگارز الکتروفورز شود. در این مطالعه با توجه به محصول DNA و نیز محصول ژن تکثیر شده مورد نظر از ژل آگارز با غلظت یک درصد برای جداسازی محصولات تکثیر یافته استفاده شد.

انجام Sequencing

پس از انجام PCR محصول آن را راند کرده و با استفاده از کیت، باندهای ژن مورد نظر را استخراج کرده و برای تایید سویه‌های حاوی ژن‌های فوق از روش Sequencing استفاده کردیم. نمونه‌ها برای انجام تعیین توالی به شرکت Bioneer کشور کره جنوبی ارسال شد و سپس نتایج با استفاده از نرم افزار Chromas 1.45 و Blast در NCBI مورد بررسی قرار گرفت(۱۵-۱۳).

یافته ها

از آبان ماه سال ۱۳۹۱ تا فروردین سال ۱۳۹۳، ۱۲۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جدا شد که در این میان ۵۵ (۵۸/۳۳ درصد) ایزوله از بیمارستان طالقانی، ۴۵ (۳۷/۵ درصد) ایزوله از بیمارستان کودکان مفید و ۵ (۴/۱۶ درصد) ایزوله ازبیمارستان امام حسین (ع) بود که (۵۵/۸۳ درصد)۶۷ نمونه‌ها از مردان و ۵۳ (۴۴/۱۶ درصد) از زن‌ها جدا شده بود. به ترتیب ۲۷ (۲۲/۵ درصد)، ۱۰(۱۰ درصد)، ۹(۷/۵ درصد)، ۸ (۶/۶۶ درصد)، ۹(۷/۵ درصد)، ۹(۷/۵ درصد) و ۴۶(۳۸/۳۳ درصد) از ایزوله ها مربوط به سنین بالای ۶۰ سال، ۵۰ تا ۵۹، ۴۰ تا ۴۹، ۳۰ تا ۳۹ سال، ۲۰ تا ۲۹ سال، ۸ تا ۱۹ سال و ۰ تا ۷سال بود. ۴۹ ایزوله از بخش کودکان، ۱۶ ایزوله از بیماران سرپایی، ۱۳ ایزوله از بخش مراقبت‌های ویژه، ۹ ایزوله از بخش جراحی، ۱۲ ایزوله از NICU، 4 ایزوله از واحد پیوند استخوان، ۴ ایزوله از هماتولوژی، ۳ ایزوله از اندوکاردیت، ۳ ایزوله از واحد گوارش، ۷ ایزوله از بخش‌های دیگر بود. ۴۵ ایزوله از نمونه مدفوع، ۳۶ ایزوله از نمونه خون، ۱۲ ایزوله از نمونه زخم، ۱۲ ایزوله از نمونه خلط، ۸ ایزوله از نمونه خارج شکمی، ۳ ایزوله از مایع مغزی- نخاعی و ۴ ایزوله از نمونه‌های دیگر بود. الگوی مقاومت دارویی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده در جدول شماره ۳ و حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) در جدول شماره ۴ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از شناسایی بتالاکتاماز با طیف وسیع

از ۱۲۰ ایزوله کلبسیلاپنومونیه جدا شده از بیماران، ۶۸ (۵۶/۶۶ درصد) از ایزوله‌ها با استفاده از دیسک سفوتاکسیم و سفتازیدیم به تنهایی و در ترکیب با کلاولانیک اسید دارای بتالاکتاماز با طیف وسیع بودند که در این میان ۴۳ ایزوله مربوط به بیمارستان طالقانی، ۲۰ ایزوله از بیماران بستری در بیمارستان مفید و ۵ ایزوله از بیمارستان امام حسین (ع) جدا شد (تصویر شماره ۱).

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق(۱۲)

نام پرایمر	ژن شناسایی شده	سکانس ژن		اندازه محصول BP
F-ACT R-ACT	ACT	5'-TAGAACCCAGTTCGAACAAGG -3'	5'-TGACTAAATCCCTTTGCTGCG -3'	249 bp
F-FOX R-FOX	FOX	5'-CAAAGCGCGTAACCGGATTGG -3'	5'-AACATGGGGTATCAGGGAGATG-3'	190 bp
F-MOX R-MOX	MOX	5'-CACATTGACATAGGTGTGGTGC -3'	5'-GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT -3'	520 bp

جدول شماره۲: مقادیر لازم از مواد مورد نیاز برای انجام PCR

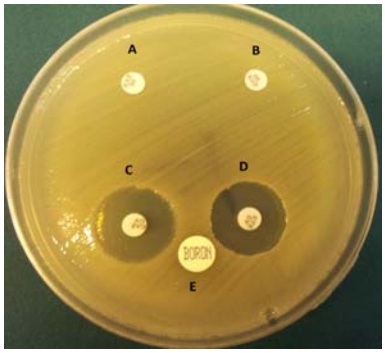
Digit/Unit	Quality Substance	
۲/۵ µl	Reaction Buffer	
۰/۸ µl	$MgCL_2$ (25mM)	
۰/۵ µl	dNTP(10mM)	
۱ µl	ACT-F,R	Primers
۱ µl	FOX-F,R	
۱ µl	MOX-F,R	
۰/۱ µl	Taq Polymerase 5U/µl	
۳ µl	ACT FOX MOX	DNA Tamplate

جدول شماره ۳: نتایج تست حساسیت دارویی

Sensitive تعداد (درصد)	Intermediate تعداد (درصد)	Resistant تعداد (درصد)	Antibiotic
(۳۰) ۳۷	(۶) ۸	(۶۲) ۷۵	Aztreonam (ATM,10 µg)
(۶۵) ۷۸	(۱۱) ۱۴	(۲۳) ۲۸	Meropenem (MEM,10 µg)
(۵۴) ۶۵	(۳) ۴	(۴۲) ۵۱	Gentamicin(GEN,10 µg)
(۶۳) ۷۶	(۳) ۴	(۳۳) ۴۰	Amikacin (AK,30 µg)
(۶۵) ۷۸	(۱۱) ۱۴	(۲۳) ۲۸	Imipenem(IMP,10 µg)
(۳۳) ۴۰	(۲) ۳	(۶۴) ۷۷	Cefotaxime(CTX,30 µg)
(۳۵) ۴۳	(۶) ۷	(۵۸) ۷۰	Tetracycline(TE,10 µg)
(۱۶) ۲۰	(۶) ۷	(۶۰) ۷۳	Ampicillin(AMP,10 µg)
(۳۴) ۴۱	(۵) ۶	(۶۰) ۷۳	Piperacillin(PIP,100 µg)
(۲۵) ۳۰	(۵) ۶	(۷۰) ۸۴	Cefpodoxime(CPD,30µg)
(۵۶) ۶۸	(۲۸) ۳۴	(۱۴) ۱۷	Tigecycline(TGC,15µg)
(۶۵) ۷۸	(۱۱) ۱۴	(۲۳) ۲۸	Doripenem(DOR,10 µg)
(۶۵) ۷۸	(۱۱) ۱۴	(۲۳) ۲۸	Ertapenem(ETP, 10 µg)
(۳۳) ۴۰	(۵) ۶	(۶۱) ۷۴	Ceftazidime (CAZ,30 µg)
(۹۶) ۱۱۵	(۰) ۰	(۴) ۵	Colistin(CO,10 µg)

جدول شماره۴:نتایج حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد(MIC)

MIC(µg/ml)			Antibiotics
۹۰ درصد	۵۰ درصد	Range	
۳۲	۱	۰/۲۵ -۲۵۶	Meropenem
۱۶	۱	۰/۲۵ -۲۵۶	Imipenem
> ۲۵۶	۶۴	-۱ > ۲۵۶	Ceftazidime
> ۲۵۶	۱۶	-۰/۵ > ۲۵۶	Cefotaxime
> ۲۵۶	۲۵۶	-۲ > ۲۵۶	Ampicillin



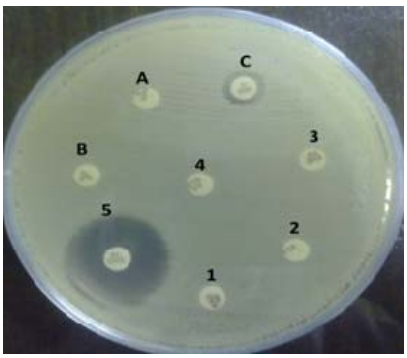
تصویر شماره ۱: شناسایی بتالاکتاماز با طیف وسیع با استفاده از روش CDDT

A: دیسک سفتازیدیم، C: دیسک سفتازیدیم به علاوه کلاونیک اسید، B: دیسک سفوتاکسیم، D: دیسک سفوتاکسیم به علاوه کلاونیک اسید، E: دیسک برونیک اسید

نتایج حاصل از شناسایی آنزیم Amp-C

با اسفاده از کیت شرکت MAST، ۲۴ (۲۰ درصد) ایزوله کلبسیلا پنومونیه دارای آنزیم Amp-C بودند که در این میان ۱۵ ایزوله از بیماران بستری در بیمارستان طالقانی و ۹ ایزوله از بیماران بستری از بیمارستان مفید جدا شد (تصویر شماره ۲).

با استفاده از روش‌های PCR و Sequencing ۱۶ (۱۳ درصد) از ایزوله‌ها دارای ژن ACT-1، ۴۶ (۸۳/۳۳ درصد) دارای ژن FOX-1 و ۴۳ (۳۵/۸۳ درصد) دارای ژن MOX-1 بودند (جدول شماره ۵) و در جدول شماره ۶ درصد شیوع ژن‌های ACT,FOX,MOX در سویه‌های حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع و سویه‌های فاقد بتالاکتاماز نشان داده شده است. توالی ژن ACT در NCBI با شماره دسترسی KM094181 به ثبت رسیده است.



تصویر شماره ۲: شناسایی آنزیم های Amp-C با استفاده از Mast Group kit

A: دیسک سفپودوکسیم به علاوه یک القاء کننده آنزیم Amp-C، B: دیسک سفپودوکسیم و یک القاء کننده Amp-C و یک مهار کننده بتالاکتاماز با طیف وسیع، C: دیسک شامل سفپودوکسیم به علاوه القاء کننده Amp-C و هم چنین یک مهارکننده بتالاکتاماز با طیف وسیع،۱: دیسک سفتازیدیم، ۲: دیسک سفوتاکسیم، ۳: دیسک سفتازیدیم به علاوه کلاونیک اسید، ۴: دیسک سفوتاکسیم به علاوه کلاونیک اسید، ۵: دیسک تیجیسکلین

جدول شماره ۵: درصد ژن‌های ACT,FOX,MOX در بیمارستان‌های شهر تهران

نام ژن	بیمارستان امام حسین (ع)	بیمارستان کودکان مفید	بیمارستان طالقانی	مجموع تعداد (درصد)
ACT	۰	۹	۷	(۱۳/۳۳) ۱۶
FOX	۱	۱۵	۳۰	(۳۸/۳۳) ۴۶
MOX	۱	۱۶	۲۶	(۳۵/۸۳) ۴۳

جدول شماره ۶: درصد ژن های ACT,FOX,MOX درسویه‌های حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع و سویه های فاقد بتالاکتاماز با طیف وسیع

نام ژن	ESBL(n=68)	NON ESBL(n=52)
ACT	۶ (۴/۰۸)	۱۰ (۵/۲)
FOX	۲۶ (۱۷/۶۸)	۱۰ (۵/۲)
MOX	۲۲ (۱۴/۹۶)	۲۱ (۱۰/۹۲)
ACT-FOX	۴ (۲/۷۲)	۳ (۱/۵۶)
ACT-MOX	۲ (۱/۳۶)	۴ (۲/۰۵)
FOX-MOX	۸ (۵/۴۴)	۱۰ (۵/۲)

بحث

بکارگیری موثر از آزمایشگاه‌های میکروب شناسی برای تشخیص صحیح و جلوگیری از گسترش پاتوژن‌های مقاوم، موجب کاهش نیاز به استفاده از داروها می‌شود. کنترل عفونت برای بیماران بسیار سودمند و موجب کاهش میزان مرگ و میر در سرتاسر جهان می‌گردد. تجربه در آزمایشگاه میکروب شناسی برای تشخیص باکتری‌های مقاوم بسیار حیاتی است. بسیاری از باکتری‌ها ممکن است درست تشخیص داده نشوند و در تست‌های آزمایشگاهی به اشتباه مقاوم و یا حساس گزارش شوند که این امر موجب آن می‌شود که بیماران داروهای نامناسب را دریافت و باعث انتقال باکتری‌ها به دیگر بیماران می شود. از این رو شناسایی باکتری‌های با مقاومت مخفی ضروری است. سنجش‌های مفید برای شناسایی مکانیسم‌های مقاومت مورد نیاز است. از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت می‌توان به بتالاکتامازها اشاره کرد که شامل آنزیم‌های Amp-C، بتالاکتامازهای با طیف وسیع و کارباپنم آزها کلاس A,B را نام برد که شامل آنزیم‌های مهمی از قبیل NDM,KPC می‌باشند(۸). در این تحقیق وجود ژن‌های بتالاکتامازی ACT,FOX,MOX به عنوان یکی از دلایل موثر در بروز مقاومت دارویی در این باکتری مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه بیش‌ترین حساسیت را به آنتی‌بیوتیک‌های فسفومایسین و تیجیسیکلین و بیش‌ترین مقاومت را به داروی سفپودوکسیم داشتند. در این مطالعه مقاومت به سفالسپورین ها از جمله سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفپودوکسیم به ترتیب ۶۱ درصد، ۶۴ درصد، و ۷۰ درصد بود که در میان سفالسپورین‌ها، سفتازیدیم آنتی‌بیوتیک نسل سوم بهترین اثر را داشت. علت اصلی مقاومت به سفالسپورین‌ها، بتالاکتامازهای با طیف وسیع می‌باشند که در میان نمونه‌های مقاوم به سفالسپورین‌ها مشاهده می‌شود. در تحقیقی که شاهچراغی و همکاران در سال ۲۰۰۷ در شهر تهران انجام دادند، ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۳۱ و ۳۲ درصد به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم بودند(۱۶). مقایسه میزان مقاومت در دو مطالعه نشان می‌دهد که به مرور زمان به علت کسب ژن های مقاوم، میزان مقاومت در سال ۲۰۱۳ افزایش یافته است. در این مطالعه ۴۲ درصد مقاوم به جنتامایسین و ۳۳ درصد مقاوم به آمیکاسین بودند. در تحقیق که فیض‌آبادی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در شهر تهران انجام دادند، یک ایزوله کلبسیلا پنومونیه مقاوم به ایمی پنم بود و۴۴/۲ و ۲۵ درصد به ترتیب مقاوم به آمیکاسین و سیپروفلوکساسین بودند(۱۷). کارباپنم ها از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که در برابر ارگانیسم‌های ESBL+ پایدارند. به عنوان مثال ایمی پنم در شرایط in vitro بر روی بسیاری از این ارگانیسم‌ها مؤثر بوده است(۱۸،۲،۱). در بین آنتی‌بیوتیک‌های تحت بررسی در این تحقیق تأثیر کارباپنم‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL بارز است به‌طوری‌که تنها ۲۳ درصد از ایزوله‌های تحت بررسی مقاوم به آنتی‌بیوتیک کارباپنم بودند. استفاده از کارباپنم‌ها به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی در درمان عفونت‌های ناشی از ارگانیسم‌های واجد ESBL، در تحقیقات علمی دیگر نیز به اثبات رسیده است. به عنوان مثال، رستگار و همکاران در سال ۲۰۱۳ در شهر تهران نشان دادند که از ۳۵ ایزوله کلبسیلا پنومونیه فقط ۱۹ (۵۴/۲۸ درصد) ایزوله مقاوم به ایمی‌پنم بودند(۱۹). هم چنین در مطالعه‌ای که شاه‌چراغی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در شهر تهران انجام دادند، ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه ۶/۳

درصد به مروپنم، ۳ درصد به ارتاپنم و ۱/۱ درصد مقاوم به ایمی پنم بودند(۲۰). میزان مقاومت در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جدا شده در تحقیق رستگار و همکاران از مطالعه ما بیشتر بود که علت آن را می‌توان در نوع نمونه مطرح کرد، چرا که نمونه‌های جدا شده از بیماران سوختگی مقاومت بیش‌تری دارند. این افراد ایمنی ضعیفی دارند و مدت زیادی در بیمارستان بستری و تحت درمان قرار می‌گیرند. از طرفی بتالاکتامازهای باکتریایی از جمله بتالاکتاماز با طیف وسیع (ESBLs) قادر به هیدرولیز داروهای ایمی پنم و مروپنم نبوده و در مطالعه ما متالوبتالاکتاماز دیده نشده است. باید توجه داشته که حساسیت سویه‌ها نسبت به ایمی‌پنم و مروپنم نباید ما را در مصرف و تجویز بی‌رویهٔ این دارو ترغیب نماید، چه بسا این قبیل اقدامات ممکن است باعث پیدایش و شیوع سوش‌های مقاوم به ایمی‌پنم و مروپنم شود.

بتالاکتامازهای با طیف وسیع (ESBLs)، یکی از عوامل موثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک های بتالاکتام از جمله خانواده سفالسپورین‌های وسیع طیف می‌باشند. میکروارگانیسم‌هایی که دارای این آنزیم‌ها هستند باعث افزایش مقاومت دارویی و در نتیجه بیماری‌زایی در بین بیماران می‌گردند و جامعه را با خطر جدی مواجه خواهند کرد. بنابراین تشخیص صحیح آزمایشگاهی عامل عفونت و انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب، برای جلوگیری از شکست درمان بسیار حائز اهمیت است(۲،۱). متأسفانه در کشور ما بروز مقاومت‌های باکتریایی و عوامل دخیل در افزایش این قبیل مقاومت‌ها مورد بررسی و توجه قرار نگرفته است لذا امروزه شاهد آن هستیم که عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های مربوط به کلبسیلا پنومونیه آمار قابل توجهی را به خود اختصاص داده‌اند. متأسفانه در اثر بروز ESBLs مقاومت به سفالسپورین‌ها افزایش پیدا کرده است. ژن‌های تولید کننده آنزیم‌های ESBL معمولاً بر روی عناصر ژنتیکی متحرک پلاسمید قرار دارند و قادر به هیدرولیز و غیرفعال نمودن تعداد زیادی از بتالاکتام‌ها مانند سفالوسپورین‌های نسل سوم، پنی سیلین و آزترئونام می‌باشند اما به مهارکننده‌های بتالاکتامازها مانند کلاولانات، سولباکتام و تازوباکتام حساس می‌باشند. بسیاری از تولیدکنندگان ESBL، ژن های حساس به دیگر عوامل ضدمیکروبی مانند آمینوگلیکوزیدها و فلوروکوئینولون‌ها را نیز حمل می‌کنند(۲،۱). در سال‌های اخیر بروز و شیوع بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف که قادر به هیدرولیز آنتی بیوتیک های سفالوسپورین‌ها و آزترئونام هستند، افزایش پیدا کرده است. به نظر می‌رسد که موقعیت جغرافیایی در نحوهٔ پراکنش و توزیع این ژن ها مؤثرند زیرا کشورهایی که به لحاظ موقعیت جغرافیایی به کشور ما نزدیک ترند، الگوی نسبتاً مشابهی از نظر توزیع ژن‌های CTX SHV و TEM نشان می‌دهند(۲۲،۲۱). به نظر می‌رسد سیاست درمانی و بهداشتی بیمارستان‌ها در کشورهای مختلف می‌تواند در توزیع و انتشار ژن‌های ذکر شده تأثیر بسزایی داشته باشد. در مجموع میکروارگانیسم‌هایی که دارای آنزیم‌های ESBL هستند باید نسبت به تمام سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مقاوم گزارش شوند مگر این که حساس بودن آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک مورد نظر اثبات شود. انتقال ژن‌های تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs که از لحاظ ژنوتیپی با هم مرتبط می‌باشند از یک بیمارستان به بیمارستان دیگر،از یک شهر به شهر دیگر و بالاخره از کشوری به کشور دیگر ثابت شده است(۲،۱). با توجه به مقاومتی که سویه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه در برابر سفالوسپورین‌های نسل سوم مانند سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتی زوکسیم و سفتریآکسون از خود نشان می‌دهند و با در نظر گرفتن این که مقاومت این سویه‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌های سفالوسپورینی با گذشت زمان افزایش پیدا می‌کند، استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم‌ها و هم‌چنین تجویز و ممارست در خصوص استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورینی خصوصاً سفالوسپورین های نسل سوم به جهت تأثیری

کـه در افـزایش خطـر پیـدایش و شـیوع ارگانیسـم‌هـای ESBL+ دارند تـا حـدی شـبهه برانگیـز اسـت و نیـاز بـه بحث‌های دقیق و موشکافانه دارد. اگر اقـدامات مـؤثری در زمینهٔ جلوگیری از روند ایجاد مقاومـت در برابـر ایـن آنتـی‌بیوتیـک‌هـا انجـام نگیـرد، چـه بسـا مقاومـت‌هـای باکتریـایی در مقابـل سفالوسـپورین‌هـا نیـز نظیـر کربنـی سیلین و پیپراسـیلین بـه مـرز ۱۰۰ درصـد خواهـد رسـید. باکتری‌های تولید کننـده بتالاکتامـاز بـا طیـف وسـیع بـه آنتی‌بیوتیک آزترونام مقاوم هستند(۲) و در تحقیق انجام شده ۶۲ درصد از ایزوله‌های جدا شده بـه آنتـی‌بیوتیـک آزترونـام مقـاوم بودنـد. در مطالعـه‌ای کـه منصـوری و همکاران در شـهر کرمـان انجـام دادنـد،۵۵/۳ درصـد از نمونـه‌هـای کلبسـیلا پنومونیـه و اشریشـیاکلی دارای بتالاکتاماز با طیـف وسـیع بودنـد(۲۳). در مطالعـه‌ای کـه غفوریـان و همکـاران در شـهر ایـلام انجـام دادنـد،۵۹/۲ درصد از نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای بتالاکتاماز بـا طیف وسیع بودنـد(۲۴). در مطالعـه ای از کشـور اسـپانیا، نتایج نشـان داد کـه ۱۳۳ بـالغ و ۲۹ کـودک بـا کلبسـیلا پنومونیه تولید کننـده بتالاکتامـاز بـا طیـف وسـیع آلـوده بودند(۲۵). درصـد شـیوع بتالاکتامـاز بـا طیـف وسـیع در مطالعه ما بسیار شبیه به مطالعاتی است که در شهر ایلام و کرمان انجام شده است. استفاده گسترده از داروها ممکـن است باعث تسهیل گسترش مقاومت آنتی‌بیـوتیکی شـود و از این رو کنترل باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتامـاز بـا طیف وسیع به ویژه در بخش‌های مرتبط با کودکان بایـد جزوه اولویت ها محسوب شود.

در این مطالعه۱۵ نفر از بالغین و ۹ نفر از کودکـان و درمجموع ۲۴ (۲۰ درصد) از بیماران آلـوده بـه کلبسـیلا پنومونیه تولید کننده آنزیم Amp-C بودند. شیوع Amp-C در ایران و جهان ناشناخته است، زیرا آزمایشگاه ها بـه درستی نمی تواننـد ایـن مکانیسـم مقاومـت را تشـخیص دهند. با توجه به این که ممکن است باکتری ها هم زمان چندین مکانیسم مقاومت به آنتی بیوتیـک داشـته باشـند، شناسایی فنوتیپی این آنـزیم بسـیار مشـکل اسـت و بهتـر اسـت از روش‌هـای مولکـولی بـرای شناسـایی اسـتفاده شود(۸). در مطالعه‌ای که منصـوری و همکـاران در سـال ۱۳۸۷ بر روی باکتری اشریشیاکلی انجام داد،۵/۷ درصد ایزوله ها با روش PCR تولیدکننده Amp-C بودنـد(۲۶). در تحقیقی که کلانتر و همکاران در شهر تهران در سال ۲۰۱۲ انجـام دادنـد، از ۷۵ ایزولـه کلبسـیلا پنومونیـه ۳۱ (۴۱/۳ درصـد) دارای بتالاکتامـاز بـا طیـف وسـیع، ۱۱ (۱۴/۶ درصـد) دارای آنـزیم Amp-C بودنـد(۲۳). در تحقیقی که کلانتـر و همکـاران در سـال ۲۰۱۴ در شـهر کرمان انجام دادنـد. از ۷۵ ایزولـه کلبسـیلا پنومونیـه، ۳۳ (۴۱۴ درصد) ایزوله حاوی بتالاکتاماز بـا طیـف وسـیع و ۲۱ (۲۳ درصد) ایزوله حاوی آنزیم Amp-C بودنـد(۲۲). در بین ایزوله‌های مـورد بررسـی ۱۶ (۱۳ درصـد) دارای ژن ACT، ۴۶ (۳۸/۳۳ درصـد) دارای ژن FOX و ۴۳ (۵۳/۸۳ درصـد) دارای ژن MOX بودنـد. در مطالعـه‌ای که توسط Shanthi وهمکاران در سـال ۲۰۱۴ در کشـور هنـد انجـام شـد. ۱۶ ایزولـه کلبسـیلا پنومونیـه حـاوی آنـزیم‌هـای Amp-C,MBL بـوده کـه در ایـن میـان ۲۵ درصـد از نمونـه‌هـا دارای ژن‌هـای MOX,FOX,ACT بـوده‌انـد(۲۷). در مطالعـه‌ای کـه توسـط Parveen و همکاران در سال ۲۰۱۲ در کشور هنـد انجـام گرفـت.از ۲۴۱ ایزوله، ۱۵۳ (۶۳/۴ درصد)شامل ۶۹ سـویه کلبسـیلا پنومونیه و ۸۴ سویه اشریشیاکلی حـاوی آنـزیم Amp-C بودنـد. ژن MOX در ۱۱ (۸۴/۶ درصـد) از ایزولـه‌هـای اشریشـیاکلی و ۲ (۱۵/۳ درصـد) ایزولـه‌هـای کلبسـیلا پنومونیـه شناسـایی شـد و همـه نمونـه‌هـا فاقـد ژن FOX بودند(۲۸). در مطالعه‌ای که توسـط Wassef و همکـاران در سال ۲۰۱۴ در کشور مصر انجام دادنـد. ۵۷/۷ درصـد از ایزوله‌ها تولیدکننده آنزیم Amp-c بودند و ۲۲ ایزولـه حاوی ژن تولیدکننـده آنـزیم Amp-C بودنـد کـه ۹ ژن مربـوط بـه خـانواده MOX,FOX و سـه نمونـه بـه طـور همزمان حاوی ژن‌های FOX,MOX و CIT بودند(۲۹).

مقاومت به آنتی‌بیوتیـک‌هـا بـه ویـژه در بیمارسـتان کودکان مفید بالا بـوده اسـت. پزشـکان بایـد در تجـویز

دارو دقت لازم را داشته باشند و نمونه مورد نظر را برای انجام تست آنتی‌بیوگرام به آزمایشگاه ارسال کنند تا بهترین گزینه دارویی برای بیمار مورد استفاده قرار گیرد. کارشناسان آزمایشگاه باید بر روی نمونه مورد نظر تست آنتی‌بیوگرام انجام دهند و در ضمن باید بتوانند مکانیسم‌های مقاومت به داروها را که مهم‌ترین آن‌ها بتالاکتامازها می‌باشند را شناسایی و به پزشکان اطلاع دهند. پرسنل آزمایشگاه و پرستاران و کسانی که با بیماران در بیمارستان در تماس هستند باید برای وجود این ایزوله‌های مقاوم مورد بررسی قرار گیرند تا زمانی که به این باکتری‌ها آلوده هستند، مورد درمان واقع شوند. در مطالعه حاضر شیوع بتالاکتامازهای با طیف وسیع و Amp-C بالا بوده است که لازم است پزشکان به بیماران آلوده بهترین دارو را تجویز کنند و کارشناسان آزمایشگاه نمونه های مقاوم به دارو را از لحاظ وجود بتالاکتامازها مورد بررسی قرار دهند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از پرسنل مرکز تحقیقات اطفال بیمارستان مفید و بیمارستان طالقانی، همکاران بخش میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و کارکنان بیمارستان امام حسین (ع) شهر تهران کمال تشکر را داریم.

References

1. Fallah F, Hakemi Vala M, Hashemi A, Shams S. Emergence of Novel Plasmid-mediated Beta-lactamase in klebsiella pneumonia. Qom Univ Med Sci J 2013; 6(4): 104-116 (Persian).
2. Fallah F, Taherpour A, Hakemi Vala M, Hashemi A. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase-1(NDM-1). Iran J Clin Infect Dis. 2011; 6(4):171-77.
3. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect 2008; 14(1): 42-52.
4. Fallah F, Hakemi Vala M, Goudarzi H, Hashemi A, Taherpour A, Bigdeli Shamloo K, et al. Identification of extended-spectrum-betalactamases (ESBLs), metallo-beta-lactamases (MBLs), Amp-C and KPC ß-lactamases among Klebsiella pneumoniae isolated from adults and pediatric patients in Iran. Afr J Microbiol Res 2013; 7(25): 3254-3261.
5. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin microb Rev 2009; 22(1): 161-182.
6. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemothe 2002; 46(1): 1-11.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-second informational supplement. Document M100-S22 Wayne, PA: CLSI; 2012; 32(3): 1-188.
8. Jafari M, Fallah F, Borhan RS, Navidinia M, Karimi A, Hashemi A, et al. The First Report of CMY, aac (6′)-Ib and 16S rRNA Methylase Genes Among Pseudomonas aeruginosa Isolates From Iran. Arch Pediatr Infect Dis 2013; 1(3): 109-112.
9. Shakibaie MR, Shahcheraghi F, Hashemi A, Adeli NS. Detection of TEM, SHV and PER Type Extended-Spectrum ß-Lactamase Genes among Clinical Strains of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Burnt Patients at Shafa-Hospital, Kerman, Iran. Iranian J Basic Med Sci 2008; 2(11): 104-111.
10. Hashemi A, Shams S, Barati M, Samedani A. Antibacterial effects of methanolic extracts of Zataria multiflora, Myrtus communis and Peganum harmala on Pseudomonas aeruginosa producing ESBL. J Arak Univ Med Sci 2011;

14(4): 104-112. (Persian).

11. Hashemi A, Shams S, Kalantar D, Taherpour A, Barati M. Antibacterial effect of Methanolic extract of Camellia Sinensis L. on Pseudomonas aeruginosa producing β-lactamases. J Gorgan Uni Med Sci 2012; 14(1): 136-142 (Persian).
12. 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): 2153-2162.
13. Fallah F, Borhan RS, Hashemi A. Detection of bla (IMP) and bla (VIM) metallo-beta-lactamases genes among Pseudomonas aeruginosa strains. Int J Burns Trauma 2013; 3(2): 122-124.
14. Fallah F, Taherpour A, Borhan RS, Hashemi A, Habibi M, Sajadi Nia R. Evaluation of Zataria MultiFlora Boiss and Carum copticum antibacterial activity on IMP-type metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa. Ann Burns Fire Disasters 2013; 26(4): 193-198.
15. Hakemi Vala M, Hallajzadeh M, Hashemi A, Goudarzi H, Tarhani M, Sattarzadeh Tabrizi M, et al. Detection of Ambler class A, B and D ss-lactamases among Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii clinical isolates from burn patients. Ann Burns Fire Disasters 2014; 27(1): 8-13.
16. Shahcheraghi F, Moezi H, Feizabadi MM. Distribution of TEM and SHV beta-lactamase genes among Klebsiella pneumoniae strains isolated from patients in Tehran. Med Sci Monit 2007; 13(11): BR247-250.
17. 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 Countries 2010; 4(10): 609-615.
18. Taherpour A, Hashemi A. Detection of OqxAB efflux pumps, OmpK35 and OmpK36 porins in ex-tended-spectrum-β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates from Iran. Hippokratia 2013; 17(4): 355-858.
19. Rastegar Lari A, Azimi L, Rahbar M, Fallah F, Alaghehbandan R. Phenotypic detection of Klebsiella pneumoniae carbapenemase among burns patients: first report from Iran. Burns 2013; 39(1): 174-176.
20. Shahcheraghi F, Nobari S, Rahmati Ghezelgeh F, Nasiri S, Owlia P, Nikbin VS, et al. First report of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing Klebsiella pneumoniae in Iran. Microb Drug Resist 2013; 19(1): 30-36.
21. Goudarzi H, Aghamohammad S, Hashemi A, Nikmanesh B, Noori M. Distribution of blaTEM, blaSHV and blaCTX-M Genes Among Escherichia coli Isolates Causing Urinary Tract Infection in Children. Arch Clin Infect Dis 2013; 8(3): e16207.
22. Mansouri S, Kalantar Neyestanaki D, Shokoohi M, Halimi S, Beigverdi R, Rezagholezadeh F, et al. Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs types of β-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumonia and Escherichia coli producing Extended Spectrum β-lactamases in Kerman, Iran. Jundishapur J Microbiol 2014; 7(2): e8756.
23. Mansouri S, Kalantar D, Asadollahi P, Taherikalani M, Emaneini M. Characterization of Klebsiella pneumoniae strains producing extended spectrum beta-lactamases and AMPC type beta-lactamases isolated from hospitalized patients in Kerman, Iran. Roum Arch Microbiol Immunol 2012; 71(2): 81-86.

24. Ghafourian S, Bin Sekawi Z, Sadeghifard N, Mohebi R, Kumari Neela V, Maleki A, et al. The Prevalence of ESBLs Producing Klebsiella pneumoniae Isolates in Some Major Hospitals, Iran. Open microbiol J 2011; 5: 91-95.
25. Ruiz de Alegria C, Rodriguez-Bano J, Cano ME, Hernandez-Bello JR, Calvo J, Roman E, et al. Klebsiella pneumoniae strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: microbiological and clinical features. J Clin Microbiol 2011; 49(3): 1134-1136.
26. Mansouri S, Chitsaz M, Hajihosseini R, Mirzaee M, Gheini MH. Determination of Resistance Pattern of Plasmid-Mediated AmpC β–Lactamases Producing Isolate of Escherichia coli. Daneshvar Medicine 2009; 16(80): 61-70 (Persian)
27. Shanthi J, Balagurunathan R. Characterisation of heteroresistant subcolonies for MBL, AmpC genes in Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter baumannii. Indian Journal of Medical Microbiology 2014; 32(2): 210-211.
28. Manoharan A, Sugumar M, Kumar A, Jose H, Mathai D, Khilnani GC, et al. Phenotypic & molecular characterization of AmpC β-lactamases among Escherichia coli, Klebsiella spp. & Enterobacter spp. from five Indian Medical Centers. Indian J Med Res 2012; 135: 359-364.
29. Wassef M, Behiry I, Younan M, El Guindy N, Mostafa S, Abada E. Genotypic Identification of AmpC β-Lactamases Production in Gram-Negative Bacilli Isolates. Jundishapur J Microbiol 2014; 7(1): e8556.