

Determination of Carbapenemase-Producing OXA-48 and KPC Genes in Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli Isolated from Infectious Samples of Cardiovascular Patients Hospitalized in Sari Fatemeh Al-Zahra Heart Hospital

Mina Owrang¹,
Ebrahim Taheri Hossein Abad²,
Shakiba Shafaie³

¹ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Sari Branch, Iran

² MSc, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Sari Branch, Sari, Iran

³ PhD in Microbiology, Fatemeh Al-Zahra Hospital, Sari, Iran

(Received May 21, 2024; Accepted December 2, 2024)

Abstract

Background and purpose: Antibiotic resistance remains a serious problem for human health and continues to impact patients in hospitals worldwide. Carbapenem antibiotics are frequently used as the last line of treatment for infections caused by Gram-negative bacteria. The primary mechanism of resistance to carbapenems is the production of carbapenemase enzymes. This study aimed to determine the frequency of carbapenemase-encoding genes including *OXA-48* and *KPC*, in antibiotic-resistant Gram-negative bacilli isolated from infectious samples collected from cardiovascular patients hospitalized in the wards of Fatemeh Al-Zahra Heart Hospital in Sari in 2022.

Materials and methods: In this descriptive cross-sectional study, conducted from January 2022 to June 2022, 61 samples were collected from hospitalized cardiovascular patients. All bacterial isolates were identified using standard biochemical methods. The antimicrobial susceptibility pattern of the isolates was assessed using the disc diffusion test (DDT) in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Polymerase chain reaction (PCR) was employed to confirm the presence of *OXA-48* and *KPC* genes.

Results: A total of 61 clinical samples were analyzed. The most frequently collected samples from patients included urine (52.45%), trachea (29.50%), wound (11.47%), and surgical site secretions (3.27%). The most common types of bacteria isolated were *E. coli* (86.27%), *Enterobacter* (67.19%), *Pseudomonas* (67.19%), and *Citrobacter* (16.39%). Additionally, highest rates of bacterial resistance were observed against ceftazidime (100%) and imipenem (96.72%). The frequency of *OXA-48*-encoding genes was detected in 8 clinical isolates (13.11%). The bacteria harboring the *OXA-48* gene exhibited 100% resistance to ceftazidime and imipenem. In contrast, the *KPC* gene was not detected in any of the isolates. Among the bacterial species analyzed, the highest frequency of the *OXA-48* gene was observed in *Enterobacter* isolates.

Conclusion: The present study demonstrates that the rate of drug resistance as well as the production of beta-lactamase enzymes, is significantly high in Gram-negative strains, including members of the Enterobacteriaceae family and *Pseudomonas aeruginosa*. As a result, the management and treatment of infections caused by these bacteria may pose substantial challenges.

Keywords: cardiovascular patients, gram-negative bacilli resistant to antibiotics, carbapenemase, *KPC*, *OXA-48*

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 34 (240): 45-55 (Persian).

Corresponding Author: Mina Owrang- Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Sari, Iran.
(E-mail: mi_owrang@yahoo.com)

فراوانی ژن‌های *OXA48* و *KPC* در باسیل‌های گرم منفی مقاوم به کارباپنم جدا شده از بیماران قلبی- عروقی بستری در بیمارستان فاطمه زهرا ساری

مینا اورنگ^۱ابراهیم طاهری حسین آباد^۲شکیبا شفایی^۳

چکیده

سابقه و هدف: مقاومت آنتی‌بیوتیکی همواره به عنوان یک مشکل جدی برای سلامت انسان مطرح بوده است و بیماران را در بیمارستان‌های سراسر جهان تحت تاثیر قرار می‌دهند؛ آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم اغلب به عنوان آخرین خط درمانی برای عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های گرم منفی مورد استفاده قرار می‌گیرند که مهم‌ترین مکانیسم مقاومت به کارباپنم‌ها تولید آنزیم‌های کارباپنماز می‌باشد. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ژن‌های کدکننده کارباپنماز شامل *OXA-48* و *KPC* در باسیل‌های گرم منفی مقاوم به آنتی‌بیوتیک، در نمونه‌های عفونی جمع‌آوری شده از بیماران قلبی و عروقی بستری در بخش‌های بیمارستان قلب فاطمه‌الزهرا ساری در سال‌های ۱۴۰۱ الی ۱۴۰۲ انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، از دی ماه ۱۴۰۱ تا خرداد ۱۴۰۲، ۶۱ نمونه از بیماران قلبی و عروقی بستری در بخش‌های بیمارستان قلب فاطمه‌الزهرا ساری گرفته شد. با استفاده از روش‌های استاندارد بیوشیمیایی، تمامی باکتری‌های جدا شده شناسایی شدند. الگوی حساسیت پادزیستی ایزوله‌ها، به روش DDT (Test Diffusion Disc) با استفاده از دستورالعمل CLSI انجام شد و برای تأیید حضور ژن‌های *OXA-48* و *KPC*، روش PCR انجام شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، در مجموع تعداد ۶۱ نمونه بالینی به دست آمد که بیش‌ترین نمونه‌های جمع‌آوری شده از بیماران، نمونه ادرار (۵۲/۴۵ درصد)، تراشه (۲۹/۵۰ درصد)، زخم (۱۱/۴۷ درصد) و ترشحات ناحیه جراحی (۳/۲۷ درصد) بوده است و بیش‌ترین نوع باکتری‌های جدا شده مربوط به *E. coli* (۲۷/۸۶ درصد)، *Enterobacter* (۱۹/۶۷ درصد)، *Pseudomonas* (۱۹/۶۷ درصد)، *Citrobacter* (۱۶/۳۹ درصد) بوده است. هم‌چنین بیش‌ترین مقاومت باکتری‌ها، نسبت به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم (۱۰۰ درصد) و ایمپنم (۹۶/۷۲ درصد) بود. فراوانی ژن‌های *OXA-48* در ۸ ایزوله (۱۳/۱۱ درصد) بالینی نشان داده شده است. بیش‌ترین مقاومت باکتری دارای ژن *OXA-48* نسبت به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم و ایمپنم (۱۰۰ درصد) بود. ژن *KPC* در هیچ یک از ایزوله‌ها یافت نشد. هم‌چنین بیش‌ترین فراوانی ژن *OXA-48* در ایزوله‌های انتروباکتر بوده است.

استنتاج: مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میزان مقاومت دارویی و هم‌چنین تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز در سویه‌های گرم منفی مانند خانواده انتروباکتریاسه و سودوموناس آئروجینوزا بالا است، بنابراین درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها ممکن است دشوار باشد.

واژه‌های کلیدی: بیماران قلبی- عروقی، باسیل‌های گرم منفی مقاوم به آنتی‌بیوتیک، کارباپنماز، *OXA-48*، *KPC*

E-mail: mi_owrang@yahoo.com

مؤلف مسئول: مینا اورنگ- ساری: دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری

۱. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

۲. کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

۳. دکتری میکروبیولوژی، بیمارستان فاطمه‌الزهرا، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۴/۲ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۹/۱۰

مقدمه

مقاومت آنتی‌بیوتیکی همواره به عنوان یک مشکل جدی برای سلامت انسان مطرح بوده است و بیماران را در بیمارستان‌های سراسر جهان تحت تاثیر قرار می‌دهد. از این رو سازمان بهداشت جهانی سال ۲۰۱۱ را به عنوان سال مقاومت آنتی‌بیوتیکی نامید. داروهای کاربایپنم با ارزش‌ترین داروها برای درمان عفونت‌های باکتری‌های گرم منفی مقاوم به چند دارو (Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: MDR-GNB) هستند و در ۱۰ سال گذشته مورد استفاده قرار گرفته اند. با این حال، رشد قابل توجهی از ارگانسیم‌های مقاوم به کاربایپنم وجود دارد که آسیب شدیدی به سلامت عمومی وارد می‌کند (۲،۱). این کاربایپنم‌ها که شامل مروپنم، ارتاپنم و ایمپی پنم می‌شوند، در دسته آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام قرار می‌گیرند و دارای حلقه بتالاکتام بوده و وسیع‌الطیف هستند. این آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان آخرین خط دفاعی برای درمان عفونت‌های ناشی از MDR-GNB و هم‌چنین ارگانسیم‌هایی که بتالاکتام‌ها با طیف گسترده تولید می‌کنند، استفاده می‌شوند که برای غربالگری مقاومت به کاربایپنم در آزمایشگاه‌ها و بررسی بروز مقاومت از طریق انتقال ژن یا جهش استفاده می‌شوند (۴،۳). مقاومت به کاربایپنم‌ها را به دلایل مختلفی از قبیل کاهش بیان پروتئین‌های غشای خارجی، افزایش فعالیت سیستم Efflux و تولید بتالاکتام‌های کاربایپنم‌ها که می‌توانند کاربایپنم‌ها را با عمل هیدرولیز غیر فعال کنند، مرتبط می‌دانند. مقاومت کاربایپنمی عمدتاً به دلیل بیان آنزیم کاربایپنماز، پمپ افلاکس یا از دست دادن منافذ ورودی یا پورین است. در این میان مهم‌ترین و دشوارترین مکانیسم، تولید آنزیم کاربایپنماز است، زیرا روی عناصر ژنتیکی متحرک وجود دارد که به راحتی از یک باکتری به باکتری دیگر مانند سودوموناس، اسینتوباکتر، اشرشیاکلی و گونه‌های کلبسیلا قابل انتقال است. بسیاری از محققان روش‌های مختلف تشخیص مقاومت به کاربایپنم از جمله

کاربایپنمازها را مطالعه کرده‌اند (۷-۵). روش‌های تشخیص مقاومت به کاربایپنم‌ها، از روش‌های متداول انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum inhibitory concentration: MIC)، تا روش‌های تشخیص پیشرفته و سریع مانند روش‌های ژنتیکی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) را در بر می‌گیرد. به علت ارتباط کاربایپنمازها با مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و ارتباط با سایر کلاس‌های آنتی‌بیوتیک‌ها، مانند فلوروکینولون‌ها، کوتریموکسازول و آمینوگلیکوزیدها، این مسئله در حال حاضر به یک نگرانی فزاینده در مراکز بهداشتی درمانی در سراسر جهان تبدیل شده است (۱۰-۸). بدین منظور این مطالعه با هدف تعیین میزان مقاومت *Enterobacteriaceae*‌ها و باکتری‌های گرم منفی غیر تخمیری جدا شده از نمونه‌های بالینی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کاربایپنم و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و هم‌چنین بررسی ژن‌های کاربایپنمازی *KPC* و *OXA-48* در میان باکتری‌های گرم منفی مقاوم به کاربایپنم در بیماران قلبی و عروقی بیمارستان فاطمه‌الزهراساری انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۶۱ ایزوله‌ی مقاوم به کاربایپنم از دی ماه ۱۴۰۱ تا خرداد ۱۴۰۲ از نمونه‌های بالینی بیماران قلبی و عروقی بستری در بخش‌های بیمارستان فاطمه‌الزهراساری جمع‌آوری شد و با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی تشخیص داده شدند. پژوهش حاضر دارای کد اخلاق با شناسه IR.IAU.SARI.REC.1402.159 می‌باشد.

آزمایش‌های تشخیص فنوتیپی و تعیین هویت باکتری‌های انتروباکتریاسه

تمامی نمونه‌ها با استفاده از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نظیر اکسیداز، تست

SIM، سیمون سیرتات، واکنش TSI، اوره آز و MR-VP تعیین هویت شدند. جدایه های تعیین هویت شده در محیط عصاره قلب- مغز آگار (BHI) (مرک، آلمان) کشت داده شد و به مدت یک شب در انکوباتور 37°C نهاده شدند. سپس در روز بعد، نمونه ها در محیط LB Broth حاوی ۲۰ درصد گلیسرول کشت داده شد و در فریزر 70°C - نگهداری شدند تا در مراحل بعدی کار مورد استفاده قرار گیرند (۱۲، ۱۱).

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی نمونه های جمع آوری شده با آزمون آنتی بیوگرام و با روش دیسک دیفیوژن، بر روی محیط مولر هیتون آگار و بر طبق دستورالعمل CLSI 2021 انجام شد. دیسک های مورد استفاده شامل، سفوتاکسیم ($30\ \mu\text{g}$)، سولفامتو کسازول ($30\ \mu\text{g}$)، سفازیدیم ($30\ \mu\text{g}$)، ایمپی پنم ($10\ \mu\text{g}$)، مروپنم ($10\ \mu\text{g}$)، تریمتوپریم ($10\ \mu\text{g}$)، از ترون نام ($10\ \mu\text{g}$)، جنتامایسین ($10\ \mu\text{g}$)، آمیکاسین ($30\ \mu\text{g}$)، سفپیم و سفوکسیتین ($30\ \mu\text{g}$) بودند. سوسپانسیون میکروبی استاندارد با مقایسه لوله نیم مک فارلند تهیه و به روش کشت چمنی، کشت داده شد و پس از گذاشتن دیسک های مذکور به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای 35°C انکوبه شدند. قطر هاله عدم رشد هر دیسک با توجه به معیارهای CLSI 2021 اندازه گیری و تفسیر شدند. جهت کنترل کیفی در این آزمون از سویه *E.coli* ATCC 25922 استفاده شد.

استخراج DNA

استخراج DNA سویه های باکتری، با استفاده از کیت (شرکت پویا ژن آزما) و پس از یک دوره انکوباسیون سویه های مورد نظر در محیط نوترینت براث به مدت یک شبانه روز در دمای 37°C انجام شد (۹).

تست PCR

به منظور شناسایی ژن های مورد نظر، واکنش

PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که واکنش PCR شامل ۱۲/۵ میکرولیتر premix (حاوی dNTP و MgCl_2 و آنزیم Taq) (شرکت Ampliqon دانمارک) و ۱ میکرولیتر پرایمر forward (متابیون آلمان)، ۱ میکرولیتر پرایمر reverse (متابیون آلمان)، ۱۰ میکرولیتر آب مقطر free nase و ۵۰۰ نانو گرم DNA الگو می باشد. تکثیر ژن مذکور تحت شرایط استاندارد با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر (senso quest آلمان) انجام شد. تمامی واکنش ها در ۳۰ سیکل انجام گردید. توالی پرایمرها با اطلاعات توالی نوکلئوتیدی موجود در gene bank مورد بررسی و تایید قرار گرفت که مشخصات آن در مطالعات قبلی نیز آورده شده است. جدول شماره ۱، توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه را نشان می دهد (۱۳).

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

SEQUENCE (5->3)	نام ژن
F: TGGTGGCATCGATTATCG	48- OXA-F
R: AGCACTTCTTTGTGATG	48- OXA-R
F: TCGAACAGGACTTTGGC	KPC-F
R: GAACACGGCATTTTTG	KPC-R

الکتروفورز

پس از انجام PCR، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد، حاوی ماده safe ed (Korea, INTRON) به همراه بافر TBE به مدت ۵۰ دقیقه و با ولتاژ ۷ v ۱۱۰ الکتروفورز شد. سپس ژل را در دستگاه UV transilluminator قرار داده و با استفاده از طول موج ۳۱۲ نانومتر، باندهای مورد نظر در کنار مارکر مولکولی و کنترل مثبت و منفی مورد بررسی قرار گرفت. داده های پژوهش با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰۲۳ مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به صورت آمار توصیفی (عدد و درصد) گزارش شد.

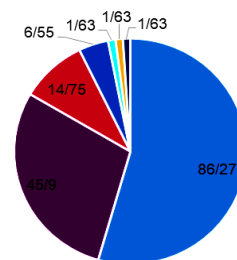
یافته ها

در مجموع تعداد ۶۱ نمونه بالینی از بیماران قلبی و عروقی بستری بیمارستان های ساری به دست آمد.

جنتامایسین (۷۵ درصد) و سولفامتو کسازول (۷۵ درصد) و بیشترین حساسیت باکتری، نسبت به آنتی‌بیوتیک سفپیم (۳۳/۳ درصد) مشاهده گردید. بیشترین مقاومت باکتری *Acinetobacter* نسبت به آنتی‌بیوتیک سفپیم، لوفلوکسازین، آزترونام، آمیکاسین، ایمپنم و سفنازیدیم (۱۰۰ درصد) و بیشترین حساسیت باکتری، نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین، پیراسیلین، مروپنم، جنتامایسین، سفوتاکسیم (۲۰ درصد) مشاهده گردید. بیشترین مقاومت باکتری *Citrobacter* نسبت به آنتی‌بیوتیک لوفلوکسازین، سولفامتو کسازول، ایمپنم و سفنازیدیم (۱۰۰ درصد) و بیشترین حساسیت باکتری، نسبت به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین (۵۰ درصد) مشاهده گردید. بیشترین مقاومت باکتری *Kelebsiella* نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین، جنتامایسین، ایمپنم و سفنازیدیم (۱۰۰ درصد) و بیشترین حساسیت باکتری، نسبت به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین (۴۰ درصد) مشاهده گردید. بیشترین مقاومت باکتری *E. coli* نسبت به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم، ایمپنم (۹۴/۱۱ درصد)، لوفلوکسازین (۸۸/۲۳ درصد) و آزترونام، سفوتاکسیم و سولفامتو کسازول (۸۲/۳۵ درصد) و بیشترین حساسیت باکتری، نسبت به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین و مروپنم (۴۱/۱۷ درصد) مشاهده گردید. بیشترین مقاومت باکتری *Psodomonas* نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین، سفنازیدیم (۱۰۰ درصد)، سولفامتو کسازول و ایمپنم (۹۱/۶۶ درصد) و بیشترین حساسیت باکتری، نسبت به آنتی‌بیوتیک پیراسیلین (۵۸/۳۳ درصد) مشاهده گردید (جدول شماره ۲).

فراوانی ژن‌های *OXA-48* و *KPC* در کل ایزوله‌های بالینی در بررسی فراوانی ژن‌های *OXA-48* و *KPC* در ایزوله‌های بالینی، تقریباً ۱۳/۱۱ درصد از ایزوله‌ها دارای ژن *OXA-48* بودند (جدول شماره ۳ و تصویر شماره ۱). بیشترین فراوانی ژن *OXA-48* در ایزوله‌های انتروباکتر بوده است. ژن *KPC* در هیچ‌یک از ایزوله‌ها یافت نشد (جدول شماره ۴).

میانگین سنی کل بیماران ۶۶/۰۳ سال بود. تعداد ۲۳ بیمار (۳۷/۷۰ درصد) مرد و ۳۸ بیمار (۶۲/۲۹ درصد) زن بودند. میانگین سنی در مردان و زنان به ترتیب برابر با ۶۶/۵۶ و ۶۵/۵ سال بوده است. از این لحاظ تفاوت معنی‌داری بین دو گروه از لحاظ میانگین سنی مشاهده نگردید ($P=0/07$). بیشترین نمونه‌های به دست آمده به ترتیب مربوط به بخش‌های CCU (۴۵/۹ درصد)، CICU (۸۶/۲۷ درصد)، ICU (۱۴/۷۵)، اورژانس (۶/۵۵ درصد) بوده است (نمودار شماره ۱). کمترین فراوانی به ترتیب مربوط به نمونه حاصل از بخش قلب (۱/۶۳ درصد)، بخش جراحی (۱/۶۳ درصد)، POST CCU (۱/۶۳ درصد) بود. بیشترین نوع نمونه مربوط به کشت نمونه‌های ادرار (۵۲/۴۵ درصد) بوده است. پس از آن هم نمونه‌های تراشه (۲۹/۵۰ درصد)، زخم (۱۱/۴۷ درصد) و ترشحات ناحیه جراحی (۳/۲۷ درصد) بیشترین فراوانی را داشتند. کمترین فراوانی مربوط به نمونه‌های ترشحات استرنوم (۱/۶۳ درصد) و کاتتر (۱/۶۳ درصد) بود. بیشترین نوع باکتری مربوط به *E. coli* (۲۷/۸۶ درصد)، *Entrobacter* (۱۹/۶۷ درصد)، *Pseudomonas* (۱۹/۶۷ درصد)، *Citrobacter* (۱۶/۳۹ درصد) و کمترین فراوانی مربوط به *Kelebsiella* (۸/۱۹ درصد) و *Acinetobacter* (۸/۱۹ درصد) بود.



نمودار شماره ۱: فراوانی نمونه‌های بالینی حاصل از بخش‌های مختلف بیمارستان‌های مورد مطالعه

بیشترین مقاومت باکتری *Entrobacter* نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم و سفنازیدیم (۱۰۰ درصد)،

جدول شماره ۲: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های بالینی جدا شده از بیماران بر اساس نوع باکتری

آنتی بیوتیک	Enterobacter	Acinetobacter	Citrobacter	Kelebsciella	E. coli	Psodomonas
تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)
سفیمن	۶۶/۷۸	۱۰۰/۵	۸۰/۴	۸۰/۴	۵۸/۲۱	۶۶/۶۸
لوفلوکسازول	۷۵/۸	۱۰۰/۵	۱۰۰/۱۰	۸۰/۴	۸۸/۳۳	۶۶/۶۸
سفتوکیسین	۷۵/۸	۸۰/۴	۸۰/۸	۱۰۰/۵	۴۷/۰۵	۱۰۰/۱۲
پیراسیلین	۵۸/۳۳	۸۰/۴	۷۰/۷	۸۰/۴	۳۵/۲۹	۳۳/۳۴
آزترونام	۶۶/۷۸	۱۰۰/۵	۸۰/۸	۸۰/۴	۸۲/۳۵	۴۱/۶۶
مروپنم	۶۶/۷۸	۸۰/۴	۶۰/۶	۸۰/۴	۲۹/۴۱	۵۸/۳۳
سولفاموکسازول	۷۵/۸	۸۰/۴	۱۰۰/۱۰	۸۰/۴	۸۲/۳۵	۹۱/۶۶
آمیکاسین	۶۶/۷۸	۱۰۰/۵	۵۰/۵	۶۰/۳	۴۱/۱۷	۵۸/۳۳
جتنامایسین	۷۵/۸	۸۰/۴	۹۰/۹	۱۰۰/۵	۵۲/۹۴	۴۱/۶۶
ایمی پنم	۱۰۰/۱۲	۱۰۰/۵	۱۰۰/۱۰	۱۰۰/۵	۹۴/۱۱	۹۱/۶۶
سفتازیدیم	۱۰۰/۱۲	۱۰۰/۵	۱۰۰/۱۰	۱۰۰/۵	۱۰۰/۱۷	۱۰۰/۱۲
سفتوتاکیم	۶۶/۷۸	۸۰/۴	۹۰/۹	۸۰/۴	۸۲/۳۵	۵۰/۶

جدول شماره ۳: فراوانی ژن های OXA-48 در ایزوله های بالینی

ژنها	Positive	Negative
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
OXA-48	۱۳/۱۱	۸۶/۸۸



تصویر شماره ۱: الکتروفورز ژن OXA-48

جدول شماره ۴: فراوانی ژن OXA-48 بر اساس نمونه های بالینی

باکتری ها	تراشه	ادرار	زخم	ترشحات ناحیه جراحی	ترشحات استروم	کاتتر
	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)
Enterobacter	۵۰/۱	۱۳۳/۳۳	۵۰/۱	.	.	.
Acinetobacter
Citrobacter	.	۳۳/۳۳
Kelebsciella
E.coli	.	۳۳/۳۳	.	۱۰۰/۱	.	.
Pseudomonas	۵۰/۱	.	۵۰/۱	.	.	.
جمع کل	۱۰۰/۲	۱۰۰/۳	۱۰۰/۲	۱۰۰/۱	.	.

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های بالینی دارای ژن OXA-48 جدا شده از بیماران نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف مورد بررسی قرار گرفت که بیشترین مقاومت باکتری دارای ژن OXA-48 نسبت

به آنتی بیوتیک سفتازیدیم و ایمی پنم (۱۰۰ درصد)، سولفاموکسازول و لوفلوکسازول (۸۷/۵ درصد) مشاهده گردید (جدول شماره ۵).

جدول شماره ۵: مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های جدا شده از بیماران دارای ژن OXA-48

آنتی بیوتیک	مقاوم	مقاوم حد واسط	حساس
	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)
سفیمن	۶۲/۵	.	۳/۵
لوفلوکسازول	۸۷/۵	۱/۲۵	.
سفتوکیسین	۷۵/۶	.	۲/۵
پیراسیلین	۶۲/۵	.	۳/۵
آزترونام	۶۲/۵	۲/۲۵	۱/۱۲
مروپنم	۶۲/۵	۲/۲۵	۱/۱۲
سولفاموکسازول	۸۷/۵	.	۱/۱۲
آمیکاسین	۶۲/۵	۱/۱۲	۲/۳۷
جتنامایسین	۷۵/۶	.	۲/۲۵
ایمی پنم	۱۰۰/۸	.	.
سفتازیدیم	۱۰۰/۸	.	.
سفتوتاکیم	۶۲/۵	۱/۱۲	۲/۱۲

بحث

مقاومت آنتی بیوتیکی از درمان موثر بیماران عفونی خصوصاً بیماران بستری در بیمارستان ها جلوگیری می کند. شیوع و اهمیت انتروباکتریاسه به عنوان پاتوژن هایی در بیماران بستری شده، تمایل برای انتقال ارگانسیم های مقاوم از یک بیمار به بیمار دیگر و انتقال فاکتورهای مقاومت (نظیر پلاسمید و ترانسپوزون) در بین ایزوله های مختلف باعث شده است تا نظارت و بازبینی مداوم و روتین حساسیت آنتی بیوتیکی در باکتری های پاتوژن، نسبت به همه ی کلاس های آنتی بیوتیکی ضروری و مهم قلمداد شود (۱۴). کاربایتم داروی انتخابی برای درمان عفونت های باکتریایی با بتا لاکتامازهای با طیف گسترده و ارگانسیم های MDR است. مقاومت به کاربایتم ها به تدریج مشاهده می شود؛ به ویژه در عفونت های بیمارستانی، که درمان آن دشوار است، بار اقتصادی زیادی ایجاد می کند و با افزایش مرگ و میر و عوارض همراه است (۱۵). برای کاهش خطر گسترش عفونت در بیمارستان و کاهش میزان مرگ و میر، این مطالعه با استفاده از روش های فنوتیپی، وجود ارگانسیم های مولد کاربایتم را شناسایی و با آزمایش

۴ ایزوله (۰/۸۴ درصد) شیگلا سونئی، ۳ ایزوله (۰/۶ درصد) سیتروباکتر دایورسوس، ۳ ایزوله (۰/۶ درصد) سراشیا مارسسنس، ۲ ایزوله (۰/۴۲ درصد) سالمونلا پاراتیفی A و یک ایزوله (۰/۲ درصد) هم پروویدنسیا استوارتی بودند. برای باکتری اشرشیا کلی مقاومت به دو دیسک سفنازیدیم و سفوتاکسیم و نیز میزان غیر حساس بودن (نیمه حساس یا مقاوم) برای دو دیسک ایمی پنم و مروپنم به ترتیب ۶۰، ۶۳، ۶ و ۹ درصد، برای باکتری کلبسیلا به ترتیب ۷۰، ۷۵، ۵۵ و ۵۸ درصد و در مورد گونه کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰، ۹۵ و ۹۴ درصد و برای دیگر سویه‌ها به ترتیب ۲۰، ۱۷، ۵ و ۳ درصد بود (۱۸). در مطالعه کشکوری و همکاران (۲۰۲۲) از ۱۵۰۲ (۶۴/۷) باسیل گرم منفی، ۳۷/۳ درصد ایزوله‌ها سودوموناس آئروژینوزا، ۳۰/۶ درصد اسیتوباکتر بومانی، ۱۶/۵ درصد کلبسیلا، ۹/۳ درصد اشرشیا کلی، ۰/۶ درصد ایزوله‌ها سودوموناس آئروژینوزا بودند، ۰/۶ درصد موارد سودوموناس بودند در حالی که ۳۹۷ ایزوله (۲۶/۵ درصد) باقیمانده به کاربایم مقاوم بودند که با نتایج مطالعه حاضر، مطابقت دارد (۱۹). در پژوهش حاضر فراوانی ژن‌های OXA-48 در ۸ ایزوله (۱۳/۱۱ درصد) بالینی نشان داده شده است. بیشترین مقاومت باکتری دارای ژن OXA-61 نسبت به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم و ایمی پنم (۱۰۰ درصد) بود. پس از آن بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سولفامتو کسازول و لووفلو کساسین (۸۷/۵ درصد) مشاهده گردید. Glupczynski و همکاران در سال ۲۰۱۲، ظهور و گسترش سریع ایزوله‌های انتروباکتریاسیه مقاوم به کاربایم و تولید کننده‌ی OXA-61 را در بیمارستان‌های بلژیک مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه از مجموع ۶۱ ایزوله‌ی بالینی، برای آنالیز مکانیسم مقاومت نسبت به عوامل بتالاکتام مورد بررسی قرار گرفت در این بین ژن OXA-61 به عنوان فراوانترین کاربایم‌ناز کد کننده در این ایزوله‌ها شناسایی شدند به طوری که ۸ ایزوله (۱۳/۱۱ درصد) از کل نمونه‌های

ژنوتیپی، توزیع ژن‌های کاربایم‌ناز را تعیین کرد. در این مطالعه بیشترین موارد جمع‌آوری شده از نمونه‌های ادرار (۵۲/۴۵ درصد)، تراشه (۲۹/۵۰ درصد)، زخم (۱۱/۴۷ درصد) و ترشحات ناحیه جراحی (۳/۲۷ درصد) بوده است که بیشترین نوع باکتری‌ها جدا شده مربوط به *E. coli* (۲۷/۸۶ درصد)، *Enterobacter* (۱۹/۶۷ درصد)، *Pseudomonas* (۱۹/۶۷ درصد)، *Citrobacter* (۱۶/۳۹ درصد) بوده است. کمترین فراوانی مربوط به *Kelebsiella* (۸/۱۹ درصد) و *Acinetobacter* (۸/۱۹ درصد) بود. در پژوهش حاضر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های بالینی جدا شده از بیماران نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، بیشترین مقاومت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم (۱۰۰ درصد) و ایمی پنم (۹۶/۷۲ درصد) بود. پس از آن بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سولفامتو کسازول (۵۸/۲۴ درصد) و لووفلو کساسین (۸۳/۶۰ درصد) مشاهده گردید. از طرفی دیگر، بیشترین حساسیت باکتری، نسبت به آنتی‌بیوتیک پیراسیلین (۳۱/۱۴ درصد) مشاهده شد. در گزارشی از شاهچراغی و همکاران که انتروباکتریاسه‌های جدا شده از بیمارستان‌های تهران را مورد مطالعه قرار دادند، ۳/۶ درصد نمونه‌ها به مروپنم، ۰/۳ درصد، به ارتاپنم و ۱/۱ درصد به ایمی پنم مقاوم بودند (۱۶). Solgi و همکاران دریافتند که ۸۸ درصد از سویه‌های انتروباکتریاسه، سودوموناس آئروژینوزا و اسیتوباکتر بومانی به ایمی پنم و مروپنم مقاوم هستند؛ نشان دهنده افزایش مقاومت باکتری‌ها به کاربایم‌ها در سال‌های اخیر است که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۷). در راستای پژوهش حاضر، شکری و همکاران (۱۳۹۲) از تعداد ۲۸۵ ایزوله، ۱۲۸ ایزوله (۶۰ درصد) اشرشیا کلی، ۷۵ ایزوله (۲۷ درصد) کلبسیلا پنومونیه، ۱۶ ایزوله (۳/۴ درصد) انتروباکتر آئروژینز، ۱۲ ایزوله (۲/۵ درصد) پروتئوس و لگاریس، ۹ ایزوله (۱/۹ درصد) انتروباکتر کلو آکه، ۸ ایزوله (۱/۷ درصد) سیتروباکتر فروئدی، ۴ ایزوله (۰/۸۴ درصد) پروتئوس میرابیلیس،

با و بدون *KPC*، *NDM* و یا شبیه *OXA-48* به درستی برای گونه‌ها و ژن‌های کاربایناماز شناسایی شدند (۲۳). بروز و شیوع انتروباکتریاسه‌های حساس به کارباینام (CSE) را می‌توان تحت تأثیر عوامل جغرافیایی قرار داد (۲۴، ۲۵). بر اساس گزارش‌های مکزیک و اوگاندا، شیوع CSE حدود ۱۰ درصد است. در حالی که نرخ CSE تقریباً ۰/۶ درصد در آسیا گزارش شده است، این نرخ ۲/۹۳ درصد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در ایالات متحده است (۲۶، ۲۷). بیماران مبتلا به بیماری‌های شدید، مانند بیمارانی که تحت تهویه مکانیکی، مراقبت‌های ویژه و پیوند قرار می‌گیرند، یا بیمارانی که برای مدت طولانی در بیمارستان بستری شده‌اند و از آنتی‌بیوتیک‌های طولانی مدت استفاده کرده‌اند، در معرض خطر عفونت‌های انتروباکتریاسه مقاوم به کارباینام (CRE) هستند (۲۸، ۲۹). این مطالعه، یک مطالعه تک مرکزی بود که در یک مرکز مراقبت‌های عالی انجام شد و تنها مقاومت به کارباینام‌ها توسط تولید کاربایناماز مورد مطالعه قرار گرفت. نقش سایر مکانیسم‌ها مانند از دست دادن پورین یا پمپ‌های افلاکس در ایجاد مقاومت کارباینام ارزیابی نشده است. ژن‌های کاربایناماز به دلیل افزایش شیوع انتقال به سرعت در سراسر جهان در حال گسترش هستند. از آنجایی که هیچ داروی جدیدی در دسترس نیست، و میزان شیوع مقاومت در منطقه متفاوت است، تشخیص این ژن‌ها بر اساس تست PCR برای تشخیص زود هنگام، توسعه پروتکل‌های کنترل عفونت و ترویج استفاده مناسب از آنتی‌بیوتیک مفید است.

سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری می‌باشد. از کلیه عزیزانی که در انجام این پروژه یاری نمودند تقدیر و تشکر به عمل می‌آوریم

جمع‌آوری شده (۳ ایزوله از سودوموناس، ۲ ایزوله از سیتروباکتر، ۲ ایزوله از آسیتروباکتر و ۱۱ ایزوله از اشرشیاکلی) حاوی این ژن بودند که شناسایی شدند (۲۰). نتایج این پژوهش با نتایج پژوهش حاضر همسو می‌باشد. هم‌چنین در راستای پژوهش حاضر، Solgi و همکاران، از مجموع ۴۴ سویه گرم منفی که به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند، ۱۷ سویه از نظر کاربایناماز مثبت بودند. در این میان، تنها چهار ایزوله دارای ژن *imp* بودند، در حالی که هیچ یک از ژن‌های دیگر (*kpc* و *spm ndm ges vim oxa-48*) در هیچ ایزوله‌ای شناسایی نشد (۱۷). Kumarasamy و همکاران در مطالعه‌ی خود نشان دادند که شیوع بتالاکتامازها (*imp* و *vim ndm1*) در بین انتروباکتریاسه‌های مقاوم به چند دارو بین ۳۱ تا ۵۵ درصد متغیر است (۲۱). خلاف نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، شکری و همکاران (۱۳۹۲) آزمون آنزیم کاربایناماز *KPC* برای ۲ سویه (۰/۷ درصد) از سویه‌های اشرشیاکلی، ۶۵ سویه (۸۷ درصد) از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و یک سویه پروتئوس و لگاریس (۶ درصد) از سویه‌های پروتئوس مثبت بود. همگی سویه‌هایی که آزمون‌های تغییر یافته‌ی آن‌ها در مرحله‌ی قبلی مثبت بود، MIC ایمی‌پنم آن‌ها نیز در محدوده‌ی مقاوم بود و بنابراین، مقاومت به کارباینام در آن‌ها ثابت شد (۱۸). در پژوهش Vamsi و همکاران (۲۰۲۲) نتایج نشان داد از بین ۱۰۹۳ باسیل گرم منفی شناسایی شده، ۲۲۰ باسیل به کارباینام‌ها مقاوم بودند. رایج‌ترین ژن‌های کاربایناماز شناسایی شده متالو-β-لاکتاماز دهلی نو و به دنبال آن هم‌زیستی ژن‌ها در ترکیب *NDM*، با متالو-β-لاکتاماز با واسطه اینتگرون ورونا، *VIM* و آنزیم‌های هیدرولیزکننده *اکزاسیلین-۴۸* و *OXA-48* بودند (۲۲). در پژوهشی Hatrongjit و همکاران (۲۰۲۳) از ۸۴۰ گونه انتروباکتر هدف، ۱۹۰ گونه *E. coli*، ۵۹۸ گونه *K. pneumoniae*، ۲۸ گونه *K. quasipneumoniae* و ۲۳ گونه *K. variicola*

References

1. Paveenkittiporn W, Lyman M, Biedron C, Chea N, Bunthi C, Kolwaite A, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacterales in Thailand, 2016-2018. *Antimicrob Resist Infect Control* 2021; 10(1): 88. PMID: 34090537.
2. Al-Ouqaili MTS, Al-Taei SA, Al-Najjar A. Molecular detection of medically important carbapenemase genes expressed by Metallo- β -lactamase producer isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Asian Journal of Pharmaceutics* 2018; 12(3): S991-S1001.
3. Eatemadi A, Al Risi E, Kasliwal AK, Al Zāabi A, Moradzadegan H, Aslani Z. A proposed evidence-based local guideline for definition of multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR) and pan drug-resistant (PDR) bacteria by the Microbiology Laboratory. *International Journal of Current Science Research and Review* 2021; 4(3): 146-153.
4. Rea-Neto A, Youssef NC, Tuche F, Brunkhorst F, Ranieri VM, Reinhart K, et al. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia: a systematic review of the literature. *Crit Care* 2008; 12(2): R56. PMID: 18426596.
5. Shugart A, Mahon G, Huang JY, Karlsson M, Valley A, Lasure M, et al. Carbapenemase production among less-common Enterobacterales genera: 10 US sites, 2018. *JAC Antimicrob Resist* 2021; 3(3): dlab137. PMID: 34514407.
6. Bouganim R, Dykman L, Fakeh O, Motro Y, Oren R, Daniel C, et al. The clinical and molecular epidemiology of noncarbapenemase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: A case-case-control matched analysis. *Open Forum Infect Dis* 2020; 7(8): ofaa 299. PMID: 32855986.
7. Gajdács M, Ábrók M, Lázár A, Jánvári L, Tóth Á, Terhes G, et al. Detection of VIM, NDM and OXA-48 producing carbapenem resistant Enterobacterales among clinical isolates in Southern Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2020; 67(4): 209-215. PMID: 33258795.
8. Dahiya S, Singla P, Chaudhary U, Singh B. Carbapenemases: A Review. *Int J Adv Health Sci* 2015; 2(4): 11-17.
9. Rodloff AC, Goldstein EJ, Torres A. Two decades of imipenem therapy. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(5): 916-929. PMID: 16997845.
10. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(3): 440-458. PMID: 17630334.
11. WHO. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2017–2018 (2018). Available at: www.apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/279656/9789241515061-eng.pdf?ua=1. Accessed May 2, 2023.
12. Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet* 2016; 387(10014): 176-187. PMID: 26603922.
13. Nowak P, Paluchowska P, Budak A. Distribution of blaOXA genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. *New Microbiol* 2012; 35(3): 317-325. PMID: 22842601.
14. Bebrone C, Bogaerts P, Delbrück H, Bennink S, Kupper MB, Rezende de Castro R, et al. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170

- residues. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(1): 396-401 PMID: 23114760.
15. Al-Ouqaili MTS, Khalaf EA, Al-Kubaisy SH. DNA sequence analysis of BlaVEB gene encoding multi-drug resistant and extended-spectrum β -lactamases producer isolates of Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. *The Open Microbiology Journal* 2020; 14: 40-47.
 16. Shahcheraghi F, Aslani MM, Mahmoudi H, Karimitabar Z, Solgi H, Bahador A, et al. Molecular study of carbapenemase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae resistant to carbapenems and determining their clonal relationship using pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* 2017; 66(5): 570-576. PMID: 28485708.
 17. Solgi H, Badmasti F, Aminzadeh Z, Giske CG, Pourahmad M, Vaziri F, et al. Molecular characterization of intestinal carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among inpatients at two Iranian university hospitals: first report of co-production of bla NDM-7 and bla OXA-48. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; 36(11): 2127-2135. PMID: 28639165.
 18. Shokri D, Mobasharizadeh S, Nowrozi M, Yaran M. Isolation and identification of Enterobacteriaceae strains producing KPC carbapenemase enzyme and determination of their antibiotic sensitivity pattern. *Journal of Isfahan Medical School* 2013; 31(248): 1256-1247 (Persian).
 19. Kashkouri N, Tabarsi P, Pourabdollah Toutkaboni M, Kazempour Dizaji M, Bahrami N, Narimani A, et al. The Prevalence of Carbapenemase Genes in Carbapenem-resistant Gram-negative Bacilli, Masih Daneshvari Hospital, Tehran, Iran, 2019-2020. *Iran J Med Microbiol* 2022; 16(6): 573-580.
 20. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C, Gérard M, et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39(2): 168-72. PMID: 22115539.
 21. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010; 10(9): 597-602. PMID: 20705517.
 22. Vamsi SK, Moorthy RS, Hemilamma MN, Chandra Reddy RB, Chanderakant DJ, Sirikonda S. Phenotypic and genotypic detection of carbapenemase production among gram negative bacteria isolated from hospital acquired infections. *Saudi Med J* 2022; 43(3): 236-243. PMID: 35256490.
 23. Hatrongjit R, Chopjitt P, Boueroy P, Kerdsin A. Multiplex PCR Detection of Common Carbapenemase Genes and Identification of Clinically Relevant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae Complex. *Antibiotics* 2023; 12(1): 76. PMID: 36671277.
 24. Rouhi S, Ramazanzadeh R. Prevalence of blaOxacillinase-23 and blaOxacillinase-24/40 carbapenemase genes in Pseudomonas aeruginosa isolated from patients with nosocomial and non-nosocomial infections in West of Iran. *Iran J Pathol* 2018; 13(3): 348-356.
 25. Lashtoo Aghae B, Alikhani MY, Van Leeuwen WB, Mojtahedi A, Kazemi S, Karami P. Conventional Treatment of Burn Wound Infections versus Phage Therapy. *Iran J Med Microbiol* 2022; 16(3): 186-196.

26. Guh AY, Bulens SN, Mu Y, Jacob JT, Reno J, Scott J, et al. Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in 7 US Communities, 2012-2013. *JAMA* 2015; 314(14): 1479-1487. PMID: 26436831.
27. Torres-Gonzalez P, Cervera-Hernandez ME, Niembro-Ortega MD, Leal-Vega F, Cruz-Hervert LP, Garcia-Garcia L, et al. Factors Associated to Prevalence and Incidence of Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae Fecal Carriage: A Cohort Study in a Mexican Tertiary Care Hospital. *PLoS One* 2015; 10(10): e0139883. PMID: 26431402.
28. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis* 2011; 53(1): 60-67. PMID: 21653305.
29. Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Lab Med* 2017; 37(2): 303-315. PMID: 28457352.