

Original Article

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

Alisha Akya¹, Azam Elahi^{2*}, Roya Chegene Lorestani², Yazdan Hamzavi³

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

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

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

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

Email:
Azamelahi202@yahoo.com

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

Abstract

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

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

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

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

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

DOI: [10.29252/qums.12.11.5](https://doi.org/10.29252/qums.12.11.5)

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

علی‌شا اکیا^۱، اعظم الهی^{۲*}، رؤیا چگنه لرستانی^۲، یزدان حمزوی^۳

چکیده

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

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

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

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

کلیدواژه‌ها: کلبسیلا پنومونیه؛ مقاومت دارویی میکروبی؛ بتالاکتامازهای ای ام پی سی.

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

^۲گروه میکروپزشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

^۳گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

اعظم الهی؛ گروه میکروپزشناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
azamelahi202@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۰

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

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

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه به عنوان یک پاتوژن مهم، عامل عفونت‌هایی همچون باکتری، عفونت‌های دستگاه ادراری و دستگاه تنفسی می‌باشد (۱). ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در طول دهه‌های اخیر منجر به مشکلات جدی در درمان عفونت‌های این باکتری شده است (۲). یکی از مکانیسم‌های مهم ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در باکتری‌های گرم منفی از جمله کلبسیلا پنومونیه، تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی می‌باشد (۳). براساس این عملکرد، آنزیم‌های بتالاکتامازی در چهار گروه A، B، C و D طبقه‌بندی می‌شوند (۴). بتالاکتام‌های نوع AmpC در اواخر دهه ۱۹۷۰، شناسایی و مورد بررسی قرار گرفتند (۵). در انتروباکتریاسه، آنزیم AmpC توسط ژن‌های کروموزومی یا پلاسمیدی کد می‌شود. اکثر بتالاکتام‌های AmpC کروموزومی در انتروباکتر، سراشیا، سودوموناس، اسینتوباکتر و گونه‌های سیتروباکتر وجود دارند (۶). این آنزیم‌ها در تقسیم‌بندی آمبلر در گروه C قرار می‌گیرند و شامل: ژن‌های CMY، FOX، MOX، DHA، ACC، MIC، BIL/LAT (مرتبط با خانواده CIT) و MIR ACT (مرتبط با خانواده EBC) می‌باشند (۷-۸). این آنزیم‌ها اغلب توسط بتالاکتام‌ها قابل‌القا بوده و در بسیاری از باسیل‌های گرم‌منفی وجود دارند (۵). بیشتر این آنزیم‌ها سفالوسپوریناز هستند، ولی تا حدی توانایی هیدرولیز سایر بتالاکتام‌ها را نیز دارند و سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مانند سفنازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم و مونوباکتام‌هایی (مانند آرترونام و سفامایسین‌ها) را هیدرولیز می‌کنند، ولی به‌وسیله مهارکننده‌های بتالاکتاماز مانند کلاولانات مهار نمی‌شوند (۹،۴).

بتالاکتام‌های AmpC کروموزومی، قابل انتقال به پلاسمیدها هستند (۵)، و اولین بار در سال ۱۹۸۹ پلاسمید حاوی آن‌ها از کلبسیلا پنومونیه گزارش گردید (۱۰). دامنه فعالیت آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC، پلاسمیدی همچون آنزیم‌های AmpC کروموزومی است با این تفاوت که حساسیت آن‌ها نسبت به سفپیم، سفپروم و کارباپنم‌ها کمتر است (۴). تاکنون بیش از ۲۰ نوع بتالاکتاماز نوع AmpC با واسطه پلاسمید شناخته شده است (۵،۱۰). همچنین ژن‌های کدکننده AmpC بر روی پلاسمیدهایی با اندازه‌های مختلف از ۷-۱۸۰ کیلو بایت یافت شده است (۱۱).

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

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - مقطعی، تعداد ۱۰۰ نمونه مشکوک به کلبسیلا پنومونیه طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۲ از نمونه‌های مختلف بیماران از سه بیمارستان و یک آزمایشگاه تشخیص طبی شهر کرمانشاه جمع‌آوری شد. از کل نمونه‌ها، تعداد ۷۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه با استفاده از روش‌های باکتری‌شناسی، تست‌های افتراقی و در نهایت، کیت API-E20 (bioMérieux, France) جداسازی شدند. ایزوله‌ها در محیط نگه‌دارنده

TSB (Trypticase Soy Broth) (ساخت شرکت Merck آلمان)، همراه با گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها برای ۱۱ آنتی‌بیوتیک از چهار گروه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شامل: پنی‌سیلین‌ها (آمپی‌سیلین و پیراسیلین - تازوباکتام (۳۰ میکروگرم)، سفالوسپورین‌ها (سفازولین، سفنازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم) و سفپودوکسیم (۱۰ میکروگرم)، مونوباکتام آرترونام (۳۰ میکروگرم)، کارباپنم‌ها (ارتاپنم، مروپنم، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم) با استفاده از روش انتشار دیسک

(Disk diffusion, Mast Group, U.K) و براساس جداول

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

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

داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰، Excel و آزمون کای‌اسکوئر تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، کمتر یا مساوی ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

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

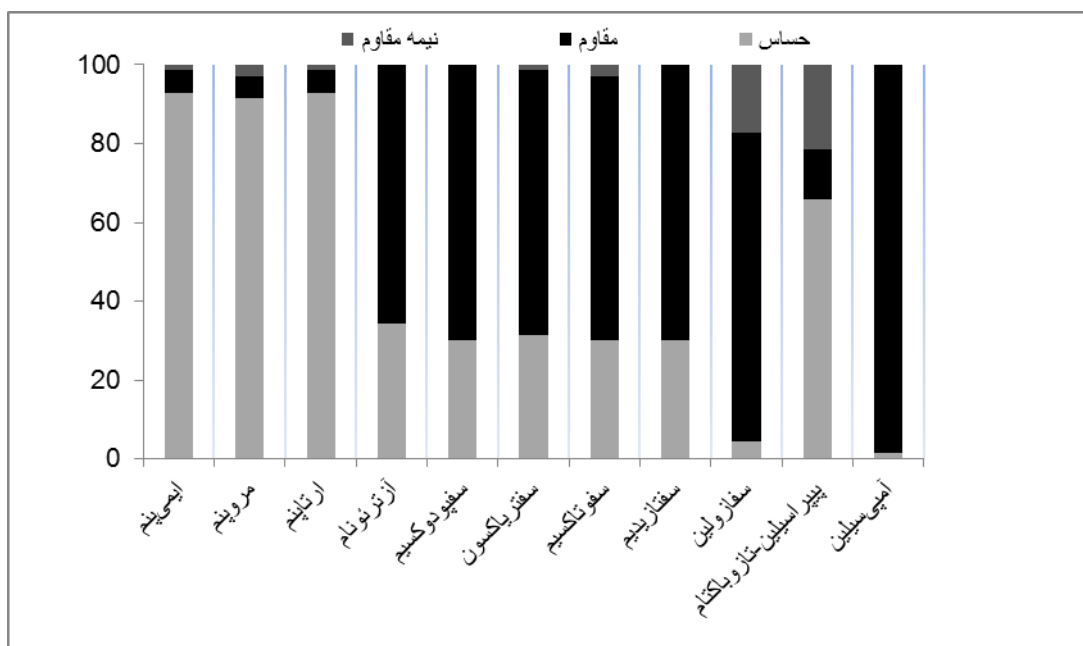
جدول شماره ۱: توالی پرایمرها و اندازه محصول آن‌ها

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

یافته‌ها

۱۱ نمونه (۱۵/۷٪)؛ خون، ۵ نمونه (۷/۱٪)؛ زخم، ۳ نمونه (۴/۲٪) و مایع آسیت، ۱ نمونه (۱/۴٪) جداسازی شدند. از مجموع بیماران، ۴۲ نفر (۶۰٪) زن و ۲۸ نفر (۴۰٪) مرد با میانگین سنی، ۳۹/۵±۲۶/۲ سال بودند. نتایج تست سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی در نمودار آمده است.

در این مطالعه از ۷۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۴۰ ایزوله (۵۷/۱٪) از بیمارستان امام خمینی، ۱۲ ایزوله (۱۷/۱٪) از آزمایشگاه رفرنس، ۹ ایزوله (۱۲/۸٪) از بیمارستان طالقانی و ۷ ایزوله (۱۰٪) از بیمارستان امام رضا جداسازی شد. ایزوله‌ها از نمونه‌های بالینی ادرا، ۳۶ نمونه (۵۱/۴٪)؛ سوختگی، ۱۴ نمونه (۲۰٪)؛ تراشه،



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

ژن‌های EBC و ACC در هیچ‌یک از ایزوله‌ها یافت نشد. تنها دو ایزوله (۲/۸٪) به‌طور همزمان دارای ۲ ژن FOX و MOX بودند. بیشترین فراوانی ژن‌های AmpC از بخش ICU بود (جدول شماره ۲).

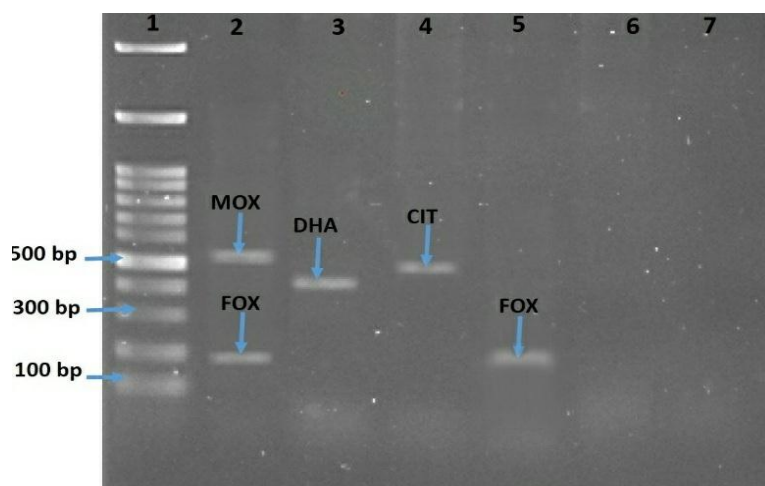
تعداد ۱۹ ایزوله (۲۷/۱٪) به‌صورت فنوتیپی و ۱۶ ایزوله (۲۲/۸٪) به‌صورت ژنوتیپی، تولیدکننده AmpC بودند. فراوانی ژن‌های FOX، CIT، MOX و DHA به‌ترتیب در ۸ ایزوله (۱۱/۴٪)، ۷ ایزوله (۱۰٪)، ۲ ایزوله (۲/۸٪) و ۱ ایزوله (۱/۴٪) گزارش شد، اما

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

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

یک ایزوله فاقد فنوتیپ و ژنوتیپ AmpC و یک ایزوله نسبت به سفوکسیتین نیمه‌مقاوم بود ($\leq 18\text{mm}$)، که به‌صورت فنوتیپی و ژنوتیپی AmpC را تولید می‌کرد (جدول شماره ۳). بین مقاومت به سفوکسیتین و فنوتیپ AmpC، ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p=0/001$).

مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین در ۱۰ ایزوله (۱۴/۲٪) وجود داشت ($\leq 14\text{mm}$)، که ۹ ایزوله به‌صورت فنوتیپی، تولیدکننده AmpC بودند (در بین این ۹ ایزوله، ۳ ایزوله ژن‌های تولیدکننده A داشتند).



شکل: الکتروفورز نتایج PCR ژن‌های AmpC در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه.

ردیف ۱: مارکر ۱۰۰، ردیف ۲-۵: نمونه‌های دارای ژن AmpC، ردیف ۶: نمونه کنترل منفی، ردیف ۷: نمونه منفی.

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

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

بحث

در ایران مطالعات محدودی روی بتالاکتامازهای AmpC انجام شده که این امر ضرورت تحقیقات بیشتر در زمینه این ژن‌ها و مقاومت‌های حاصل از آن‌ها را نشان می‌دهد (۲۱). در مطالعه حاضر، نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد بیش از ٪۷۰ کل ایزوله‌ها و بیش از ٪۸۰ ایزوله‌های دارای AmpC نسبت به سفالوسپورین‌ها مقاوم هستند. در سایر مطالعاتی که در ایران انجام شده نیز میزان مقاومت به سفالوسپورین‌ها در بین ایزوله‌های تولیدکننده بتالاکتاماز به‌طور میانگین، بالای ٪۸۰ گزارش شده است (۲۲-۲۴). از آنجایی که سفالوسپورین‌ها مهم‌ترین و رایج‌ترین دسته آنتی‌بیوتیکی در درمان عفونت‌ها، به‌خصوص در بیماران بستری می‌باشند؛ اگر اقدامات مؤثری در زمینه جلوگیری از این روند ایجاد مقاومت انجام نگیرد، ممکن است مقاومت در مقابل سفالوسپورین‌ها به سطح خیلی بالایی برسد. در مطالعه حاضر، بیشترین مقاومت ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بود (نزدیک به ٪۱۰۰) که عملاً این آنتی‌بیوتیک را از رده درمانی کلبسیلا پنومونیه خارج می‌سازد.

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

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

در این مطالعه میزان مقاومت به سفوکسیتین، ۱۴٪ بود و ارتباط معنی‌داری بین سفوکسیتین و فنوتیپ AmpC وجود داشت ($p=0/001$)، که در نتیجه مقاومت به سفوکسیتین تا حدی می‌تواند نشانه وجود ایزوله‌های مولد AmpC باشد. از آنجایی که تست‌های روتین برای غربالگری و تأیید AmpC در باکتری‌ها از دقت بالایی برخوردار نیستند، مقاومت به سفوکسیتین می‌تواند کمک‌کننده باشد (۱۸). همچنین در این مطالعه، مواردی از فنوتیپ مثبت و ژنوتیپ منفی در بین ایزوله‌ها مشاهده گردید که این امر ممکن است به دلیل امکان حضور سایر ژن‌های بتالاکتاماز AmpC باشد (۳۶). از سوی دیگر، ژن‌های AmpC ممکن است در باکتری وجود داشته باشند، اما به‌طور مؤثری بیان نشوند که در نتیجه ایزوله از نظر فنوتیپی منفی است (۱۲). در مطالعه حاضر، بیشترین درصد شیوع AmpC از ایزوله‌های بخش عفونی و مراقبت‌های ویژه گزارش شد که یکی از شایع‌ترین محل‌های عفونت‌های بیمارستانی است. همچنین سوش‌های خیلی مقاوم کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتاماز اغلب از بیماران بخش ICU بود و همان‌طور که قبلاً اشاره گردید این نتیجه می‌تواند ناشی از بستری طولانی‌مدت، مشکلات زمینه‌ای، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در طیف گسترده و درمان‌های تهاجمی باشد (۳۷).

نتیجه‌گیری

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

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

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

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

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

تشکر و قدردانی

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

References:

1. Gavrilu LC, Benea OE, Benea S. Antimicrobial resistance temporal trend of *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood. *J Med Life* 2016;9(4):419-23. PubMed
2. Kim J, Jo A, Chuksatirote E, Ahn J. Assessment of antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* exposed to sequential in vitro antibiotic treatments. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016;15:60. PubMed
3. Fallah F, Hakemi Vala M, Hashemi A, Shams S. Emergence of Novel Plasmid-mediated Beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae*. *Qom Univ Med Sci J* 2012;6(4):104-16. [Full Text in Persian] Link
4. Japoni-Nejad A, Fardmusavi N, Safari M, Kazemian H, Tabibnejad M, Nobaveh A, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -Lactamase genes in clinical isolates of *Klebsiella Pneumoniae* in Arak city, Iran. *J Isfahan Med Sch* 2013;31(249):1285-95. [Full Text in Persian] Link
5. Niakan M, Chitsaz M, Metvae AR. The prevalence of AmpC beta-lactamase gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27(10):915-21. PubMed
6. Mohd Khari FI, Karunakaran R, Rosli R, Tee Tay S. Genotypic and phenotypic detection of AmpC beta-lactamases in *Enterobacter* spp. Isolated from a teaching hospital in Malaysia. *PloS One* 2016;11(3):e0150643. PubMed
7. Farrokhazar E, Khaki P, Moradi Bidhendi S. Investigation of ampC & esbl genes in *Escherichia coli* isolated from human and poultry. *J Microbiol World* 2014;7(2):138-47. Link
8. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(1):161-82. PubMed
9. Japoni-Nejad AA, Ghaznavi-Rad E, van Belkum A. Characterization of Plasmid-mediated AmpC and carbapenemases among Iranian nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* using phenotyping and genotyping methods. *Osong Public Health Res Perspect* 2014;5(6):333-8. PubMed
10. Mansouri S, Chitsaz M, Haji Hossein R, Mirzaee M, Kenites MH. Determine the resistance patterns of clinical isolates of AmpC- producing *Escherichia coli* based on phenotypic and genotypic characteristics. *Daneshvar* 2009;16(80):61-70. [Full Text in Persian] Link
11. Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Sugiyama T, Wacharotayankun R, Ito H, et al. Characterization of a plasmid-borne and constitutively expressed blaMOX-1 gene encoding AmpC-type beta-lactamase. *Gene* 1994;139(1):93-8. PubMed
12. Helmy MM, Wasfi R. Phenotypic and molecular characterization of plasmid mediated AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infections in Egyptian hospitals. *BioMed Res Int* 2014:1-8. PubMed

13. Olusoga Ogbolu D, Terry Alli OA, Olanipekun LB, Ojo OI, Makinde OO. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing commensal *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from hospital out-patients in Southern Nigeria. *Afr J Med Med Sci* 2013;5(3):97-105. Link
14. M100-S24. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 24th informational supplement. 24th ed. New York: Nat'l Comm Clinical Lab Standards Pub; 2014.
15. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* *J Clin Microbiol* 2005;43(8):4163-7. PubMed
16. Li Y, Li Q, Du Y, Jiang X, Tang J, Wang J, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: First report of CMY-2-Type AmpC beta-lactamase resistance in China. *J Clin Microbiol* 2008;46(4):1317-21. PubMed
17. Daoud Z, Moubareck C, Hakime N, Doucet-Populaire F. Extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in Lebanese ICU patients: Epidemiology and patterns of resistance. *J Gen Appl Microbiol* 2006;52(3):169-78. PubMed
18. Jacoby GA. AmpC beta-Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(1):161-82. PubMed
19. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Bo Ttger EC, Hombach M. Practical approach for reliable detection of AmpC Beta-Lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2011;49(8):2798-803. PubMed
20. Schreckenberger PC. Conundrums in the laboratory detection of antimicrobial resistant Gram-negative bacteria. *Rev Med Microbiol* 2004;15(2):45-9. Link
21. Soltan Dallal MM, Molla Aghamirzaei H, Fallah Mehrbadi J, Rastegar Lari A, Sabbaghi A, Eshraghian MR, et al. Molecular detection of TEM and AmpC (Dha, mox) broad spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Tehran Univ Med J* 2010;68(6):315-20. [Full Text in Persian] Link
22. Barakzahi M, Hormozi B, Rashki A, Ghalehnoo Z. Prevalence of extended spectrum β -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae*. *Avicenna J Clin Microb Infec* 2014;1(3):e22934. Link
23. Feizabadi MM, Mahamadi-Yeganeh S, Mirsalehian A, Mirafshar SM, Mahboobi M, Nili F, et al. Genetic characterization of ESBL producing strains of *Klebsiella pneumoniae* from Tehran hospitals. *J Infect Dev Ctries* 2010;4(10):609-15. PubMed
24. Mehrgan H, Rahbar M, Arab-Halvahi Z. High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. *J Infect Dev Ctries* 2010;4(3):132-8. PubMed
25. Agha-Seyed Hosseini M, Firoozeh F, Piroozmand A, Gilasi HR. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains among clinical specimens in Kashan (2014-2015). *Kashan Univ Med Sci* 2016;20(3):267-73. Link
26. Nargesian M, Zargar M, Safari M. ESBL prevalence and molecular characterization of beta-lactamase gene blaTEM in urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Qom. *Sci Res Appl Biol* 2014;4(13):1-12. [Full Text in Persian] Link
27. Barzan M, Hoseyni-Doust R, Ghalavand Z. Investigation of frequency and antimicrobial pattern of gram-negative bacteria isolated from urine specimens of children with urinary tract infection in Tehran, Iran. *Iran J Med Microbiol* 2016;9(4):99-104. Link
28. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:165-74. PubMed
29. Woodford N, Reddy S, Fagan EJ, Hill RL, Hopkins KL, Kaufmann ME, et al. Wide geographic spread of diverse acquired AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in the UK and Ireland. *J Antimicrob Chemother* 2007;59(1):102-5. PubMed

30. Ding H, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, et al. The prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27(10):915-21. PubMed
31. Subha A, Devi VR, Ananthan S. AmpC beta-lactamase producing multidrug resistant strains of *Klebsiella* spp. & *Escherichia coli* isolated from children under five in Chennai. *Indian J Med Res* 2003;117:13-8. PubMed
32. Park MJ, Kim TK, Song W, Kim JS, Kim HS, Lee J. An Increase in the clinical isolation of acquired AmpC beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Korea from 2007 to 2010. *Ann Lab Med* 2013;33(5):353-5. PubMed
33. Yoo JS, Byeon J, Yang J, Yoo JI, Chung GT, Lee YS. High prevalence of extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from long-term care facilities in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;67(3):261-5. Link
34. Mansouri S, Kalantar Neyestanaki D, Shokoohi M, Halimi S, Beigverdi R, Rezagholezadeh F, et al. Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs types of beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* producing Extended Spectrum beta-lactamases in Kerman, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2014;7(2):e8756. PubMed
35. Amraei S, Eslami G, Taherpour A, Goudarzi H, Hashemi A. Detection of FOX, MOX, and ACT Genes in ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* Strains. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014;24(118):11-20. [Full Text in Persian] Link
36. Pitout JDD, Le PG, Moore KL, Church DL, Gregson DB. Detection of AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(2):165-70. PubMed
37. Rebuck JA, Olsen KM, Fey PD, Langnas AN, Rupp ME. Characterization of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric intensive care unite transplant population. *Clin Infect Dis* 2000;31(6):1368-72. PubMed