

تشخیص متالوبتالاکتامازها، بتالاکتامازهای با طیف وسیع و پورین‌های غشاء خارجی در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر تهران

دکتر علی هاشمی^۱، دکتر فاطمه فلاح^۲، دکتر آرزو طاهرپور^۳، دکتر حسین گودرزی^۴، سمیرا تراشی^۴، سرور عرفانی منش^۴، مهدانه روشنی^۴، مهرزاد صدرالدین امین^۴

hashemi1388@yahoo.com

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی

دریافت: ۹۳/۵/۱۱ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: 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. افزایش ظهور مقاومت چند دارویی در بین ایزوله‌های بیمارستانی کلبسیلا پنومونیه، گزینه‌های درمانی برای درمان عفونت‌های ایجاد شده بوسیله این باکتری را محدود کرده است لذا، هدف از این مطالعه شناسایی متالوبتالاکتامازها، بتالاکتامازهای با طیف وسیع، پورین‌های غشاء خارجی در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های طالقانی و مفید شهر تهران می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه از نوع توصیفی - مقطعی می‌باشد که از اسفندماه سال ۱۳۹۱ تا اسفندماه سال ۱۳۹۲ بر روی ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه انجام گرفت. تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن و براث میکرودايلوشن بر اساس دستورالعمل CLSI انجام شد. متالوبتالاکتامازها و بتالاکتامازهای با طیف وسیع با استفاده از روش دیسک ترکیبی شناسایی شدند. ژن‌های *bla_{AIM}*، *bla_{SPM}*، *bla_{DIM}*، *bla_{IMP}*، ژن‌های *bla_{CTX-M}* و *bla_{SHV}*، *bla_{TEM}*، *bla_{VIM}* و *OmpK35* با روش *PCR* و *Sequencing* مورد بررسی قرار گرفتند و پورین‌های غشای خارجی *OmpK36* و *OmpK35* با تکنیک‌های *SDS -PAGE*، *PCR* و *Sequencing* تشخیص داده شدند.

یافته‌ها: از ۱۰۰ سویه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان طالقانی و کودکان مفید، ۴۸ مورد (۴۸ درصد) بتالاکتاماز وسیع الطیف و ۳ (۳ درصد) متالوبتالاکتاماز تولید می‌کردند. ژن‌های *bla_{SHV}*، *bla_{TEM}* و *bla_{CTX-M}* به‌ترتیب در ۲۴ (۵۰ درصد)، ۳۰ (۶۲/۵ درصد) و ۲۸ (۵۸/۳۳ درصد) از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع الطیف شناسایی شد ولی بقیه ژن‌ها در ایزوله‌ها دیده نشد. با استفاده از تکنیک *SDS-PAGE*، *OmpK35* در ۳۰ (۶۲/۵ درصد) ایزوله و *OmpK36* در ۳۵ (۷۲/۹۱ درصد) ایزوله از ۴۸ سویه تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع الطیف شناسایی شد. در این مطالعه، ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به فسفومايسين و تایجی سیکلین حساسیت بیشتری را داشتند. **نتیجه گیری:** در این مطالعه، شیوع بتالاکتاماز با طیف وسیع در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه نگران کننده است و نیاز به اقدامات کنترل عفونت از جمله مدیریت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و شناسایی سریع ایزوله‌های مقاوم دارد.

واژگان کلیدی: بتالاکتاماز وسیع الطیف، پورین‌ها، کلبسیلا پنومونیه، متالوبتالاکتاماز

۱- دکترای تخصصی باکتری شناسی، استادیار گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۲- دکترای تخصصی میکروب شناسی، استاد گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳- دکترای تخصصی باکتری شناسی، استادیار گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

مقدمه

مقاومت چند دارویی در بین باکتری‌ها یک مساله‌ی قابل توجه در درمان بیماری‌های عفونی است. 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 به‌ویژه پنومونی، سپتی سمی، اسهال، ایجاد آبسه در کبد، اندوفتالمیت، مننژیت، عفونت‌های ادراری و باکتری می‌گردد. افزایش ظهور مقاومت چند دارویی در بین ایزوله‌های بیمارستانی کلبسیلا پنومونیه، گزینه‌های درمانی را برای درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله‌ی این باکتری محدود کرده است (۱). در بین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک، بتالاکتامازها به‌عنوان دفاع اصلی باکتری‌های گرم منفی به ویژه کلبسیلا پنومونیه در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام محسوب می‌شوند. بتالاکتامازها بر طبق نظر آمبرلر و بوش به چهار گروه تقسیم می‌شوند (۲). بتالاکتامازهای با طیف وسیع شامل گروهی از آنزیم‌ها هستند که توسط باکتری‌ها تولید می‌شوند و این آنزیم‌ها توانایی غیر فعال کردن آزترئونام و سفالوسپورین‌ها را دارند ولی با مهار کننده‌های بتالاکتاماز از قبیل کلاولانیک اسید مهار می‌شوند. ژن‌های تولید کننده‌ی بتالاکتامازهای با طیف وسیع اغلب بر روی پلاسمیدها قرار گرفته‌اند و بسیاری از آنها از جهش در ژن‌های SHV (Sulphydryl variable) و TEM (Temoneira) با جایگزینی اسید آمینه در جایگاه فعال ایجاد شده‌اند. کلبسیلا پنومونیه ممکن است علاوه بر SHV و TEM آنزیم CTX-M را تولید کند. بتالاکتامازهای CTX-M علیه سفتریاکسون و سفوتاکسیم نسبت به سفتازیدیم فعال‌تر هستند. تشخیص سریع و مناسب بتالاکتاماز با طیف وسیع برای کنترل عفونت و برای انتخاب درمان ضد میکروبی مناسب بسیار مهم است (۳).

بتالاکتامازهای با طیف وسیع به‌ویژه TEM, SHV و CTX-M در بسیاری از شهرهای ایران و جهان دیده شده است (۱). گروه دیگر آنزیم‌ها، متالوبتالاکتامازها هستند که متعلق به کلاس B بتالاکتامازها می‌باشند و دارای سه زیر کلاس اصلی هستند. در این آنزیم‌ها زیر کلاس B1 و B3 در مکان فعالیت خود دارای دو فلز روی می‌باشند و در زیر کلاس B2 فقط یک فلز روی قرار دارد. هر زیر کلاس دارای چندین نوع متفاوت از متالوبتالاکتامازها می‌باشد و بسیاری از آنان دارای تفاوت‌های آللی هستند. ژن‌های کد کننده‌ی متالوبتالاکتامازها بر روی کروموزوم یا عناصر متحرک ژنتیکی از قبیل پلاسمید قرار دارند (۴ و ۵). در باسیلوس‌ها، استنوتروفوموناس مالتوفیلا، آئروموناس، باکترئیدیس فراژیلیس، فلاوباکتریها و سودوموناس اوتیدیس بر روی کروموزوم قرار دارند که ذاتا به بتالاکتام‌ها مقاوم هستند. ژن‌های متالوبتالاکتامازی در انتروباکتریاسه، سودوموناس آئروژینوزا، اسیتوباکتر بامانی و دیگر باکتری‌های غیر تخمیری گرم منفی بر روی عناصر ژنتیکی متحرک قرار دارند. تقریباً همه‌ی انواع متالوبتالاکتامازهای کسب شده از طریق عناصر ژنتیکی متحرک متعلق به زیر کلاس B1 هستند که نسبت به زیر کلاس‌های دیگر انتشار بیشتری دارند. حداقل ۹ نوع از این متالوبتالاکتامازها شامل IMP, VIM, SPM, GIM, DIM, SIM, NDM, KHM, AIM شناسایی شده است (۶ و ۷). ژن IMP اولین بار در سال ۱۹۹۰ از کشور ژاپن در باکتری سراشیا و ژن VIM از کشور ایتالیا در باکتری سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شد. تاکنون در ایران ژن‌های متالوبتالاکتاماز در کلبسیلا پنومونیه دیده نشده است ولی ژن‌های IMP و VIM در سودوموناس آئروژینوزا و اسیتوباکتر بامانی شناسایی شده است (۵ و ۶). از دیگر مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها پورین‌های غشاء خارجی می‌باشند. پورین‌ها در مقادیر بالا در غشای خارجی

و Real-Time PCR می‌توان باکتری‌هایی که این پورین‌ها را بیان می‌کنند، شناسایی کرد (۱۰). هدف از این مطالعه، تعیین الگوی مقاومت دارویی و شناسایی متالوبتالاکتامازها، بتالاکتامازهای با طیف وسیع، پورین‌های OmpK35 و OmpK36 در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های طالقانی و مفید شهر تهران در سال ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۳ می‌باشد.

روش بررسی

نمونه‌گیری: این مطالعه که از نوع توصیفی مقطعی بود از اسفندماه سال ۱۳۹۱ تا اسفندماه سال ۱۳۹۲ بر روی ۱۰۰ ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه انجام گردید. در این پژوهش سویه‌های مشکوک به کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های مدفوع، خون، زخم، خلط، مایع مغزی- نخاعی و ... از بیماران بستری در بیمارستان‌های کودکان مفید و طالقانی جمع‌آوری شد. پس از انتقال نمونه‌های مشکوک به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، شناسایی تاییدی آن‌ها با روش‌های استاندارد و افتراقی میکروبیولوژی انجام شد.

جداسازی و تشخیص ایزوله‌ها: برای تایید، نمونه‌ها بر روی محیط کشت EMB و مکانیکی آگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از انکوباسیون از کلنی‌های مشکوک به کلبسیلا پنومونیه لام مستقیم تهیه کرده و در صورت مشاهده‌ی باسیل‌های گرم منفی، کارهای تشخیصی زیر انجام شد: از تست‌های مرسوم آزمایشگاهی شامل تست اکسیداز، کشت در محیط‌های TSI، MR، VP، لیزین دکربوکسیلاز، سیترات و اوره استفاده گردید (۳).

بررسی الگوی مقاومت دارویی: مقاومت دارویی سویه‌های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های (آزترونام، مروپنم، سیپروفلوکساسین، ایمپنم، تتراسیکلین، ارتاپنم، سفوتاکسیم،

حضور دارند. پورین‌های شناخته شده به لحاظ ساختاری مجموعه‌ای، از سه زنجیره‌ی بتا تشکیل شده‌اند که هریک از آن‌ها حاوی یک زنجیره‌ی پلی‌پتیدی منفرد می‌باشند. بیشتر مطالعات بر روی پورین‌های باکتری *اشریشیا کلی* K12 انجام شده است که دارای دو پورین اصلی OmpC و OmpF می‌باشد. در کلبسیلا پنومونیه دو پورین اصلی OmpK35 و OmpK36 وجود دارد که شبیه به پورین‌های OmpF و OmpC در *اشریشیاکلی* می‌باشد که OmpK35 در شرایط اسمولاریته‌ی بالا کاهش می‌یابد و OmpK36 در شرایط اسمولاریته‌ی بالا حاوی غلظت‌های بالای نمک افزایش می‌یابد. ژن‌های کد کننده‌ی پورین‌های کلبسیلا پنومونیه بر روی کروموزوم قرار دارند و در صورتی که پلاسמיד حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع به سویه‌ها وارد شود، با ایجاد جهش از بیان پورین‌ها جلوگیری می‌کند (۷). بیشتر ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده‌ی بتالاکتاماز با طیف وسیع، پورین OmpK36 را بیان می‌کنند، در حالی که اکثر ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه که بتالاکتاماز با طیف وسیع تولید نمی‌کنند هر دو پورین را بیان می‌کنند. عدم تولید پورین OmpK35 ممکن است یکی از عوامل مقاومت در ایزوله‌های تولید کننده‌ی بتالاکتاماز با طیف وسیع باشد که در نتیجه باعث مقاومت به سفنازیدیم می‌شود. گزارش‌هایی وجود دارد مبنی بر این که پورین OmpK36 نقش مهمی را در مقاومت یا حساسیت به کارباپنم‌ها در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه که بتالاکتامازهای ESBL و AmpC تولید می‌کنند، ایفا می‌کند. همچنین فقدان پورین OmpK36 مرتبط با مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفوکستین، سفالسپورین‌ها و فلوروکینولون‌ها می‌باشد (۹ و ۸). باکتری‌هایی که فاقد پورین و دارای بتالاکتاماز با طیف وسیع می‌باشند مقاومت متوسط نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم دارند. به‌عنوان مثال، ایزوله‌هایی که فاقد پورین و دارای بتالاکتاماز CTX-M می‌باشند به ایمپنم مقاوم هستند. با استفاده از روش‌های SDS-PAGE

ترکیب با (Sigma) EDTA استفاده شد (۱۲ و ۴). استخراج DNA: از روش فنل - کلروفرم - ایزوآمیل الکل برای استخراج DNA استفاده گردید (۱۳). انجام PCR: برای *bla_{SPM}*, *bla_{DIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* از *MasterMix 2x* و *bla_{AIM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* شرکت سیناکلون (CAT. NO.:PR901638) که شامل ۰/۴ میلی‌مول از هر dNTP، ۳ میلی‌مول از *MgCl₂*، ۰/۰۸ واحد از آنزیم Taq پلیمرز بود برای انجام PCR استفاده شد. به این ترتیب که ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس، ۱ میکرولیتر از پرایمر Forward، ۱ میکرولیتر از پرایمر Reverse، ۳ میکرولیتر از DNA و ۷/۵ میکرولیتر آب تزریقی اضافه گردید. برای تکثیر ناحیه‌ی درونی ژن‌های نام برده شده، مجموعه‌ای از پرایمرها مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرها با اطلاعات توالی نوکلئوتیدی موجود در Gene Bank (سیستم blast) چک گردید (جدول ۱). PCR بر اساس شرایط جدول ۲ انجام شد.

سفت‌زیدیم، سفتریاکسون، تیجیسیکلین، دوریپنم، کلیستین، سفپیم، جنتامایسین، آمیکاسین، پیراسیلین، پیراسیلین/تازوباکتام، آمپی‌سیلین، سفودوکسیم و فسفومایسین (MAST,UK) بر اساس رهنمودهای CLSI به روش انتشار دیسک در آگار (Disk Diffusion) و حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) به روش میکرودایلوشن برات انجام گردید. از سویه‌ی *E. Coli* ATCC25922 به عنوان کنترل استفاده شد (۷).

تعیین باکتری‌های مولد بتالاکتاماز با طیف وسیع (ESBL): جهت شناسایی باکتری‌های حاوی ESBL از روش دیسک ترکیبی با توجه به دستورالعمل CLSI استفاده شد. از کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع به عنوان سوش کنترل مثبت استفاده گردید (۱۱).

غربالگری باکتری‌های تولید کننده‌ی MBLs: جهت جداسازی سویه‌های تولید کننده‌ی متالوبتالاکتاماز از روش دیسک ایمی‌پنم، مروپنم، ارتاپنم و دوری پنم به تنهایی و در

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق (۱۹ و ۵)

نام پرایمر	ژن شناسایی شده	سکانس ژن	اندازه محصول BP
TEM-F TEM-R	<i>bla_{TEM}</i>	TCGGGGAAATGTGCGCG TGCTTAATCAGTGAGGCACC	972
SHV-F SHV-R	<i>bla_{SHV}</i>	TTAGCGTTCCCAGTGCTC GGTTATGCGTTATATTCGCC	865
CTX-M-F CTX-M-R	<i>Bla_{CTX-M}</i>	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA CGCTATCGTTGGTGGTGCCATA	544
SPM-F SPM-R	<i>bla_{SPM}</i>	AAAATCTGGGTACGCAAACG ACATTATCCGCTGGAACAGG	271
AIM-F AIM-R	<i>bla_{AIM}</i>	CTGAAGGTGTACGGAACAC GTTTCGGCCACCTCGAATTG	322
VIM-F VIM-R	<i>bla_{VIM}</i>	GATGGTGTGTTGGTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	390
DIM-F DIM-R	<i>Bla_{DIM}</i>	GCTTGTCTTCGCTTGCTAACG CGTTCGGCTGGATTGATTG	699
IMP-F IMP-R	<i>bla_{IMP}</i>	GAAGGCGTTTATGTTTCATAC GTAAGTTTCAAGAGTGATGC	587

جدول ۲: شرایط لازم برای انجام PCR

Factor	Tempreture(°C)		Time	
	Genes			
Step	AIM	CTX-M-15	AIM	CTX-M-15
	DIM	TEM	DIM	TEM
	SPM	SHV	SPM	SHV
	IMP		IMP	
	VIM		VIM	
Initial denaturation	94	94	5 min	10 min
Denaturation	94	94	60s	60s
Anealing	57-60	56-59	60 s	60 s
Extention	72	72	1 min	1 min
Final extention	72	72	5min	10min
Cycle	36	32	-----	

۱/۸ حل گردید. در مرحله ی بعدی ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ساکارز ۲۰ درصد به همراه ۳۰ میلی مولار Tris-Hcl با PH ۸/۸ به رسوب اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ نگهداری شد. ۳۰ میکرولیتر از لیزوزیم ۱ میلی لیتر بر میلی گرم به هر لوله اضافه شد و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شد و سپس روی یخ خشک و در جا یخی به مدت ۳۰ دقیقه دیگر نیز قرار داده شد. در این مرحله، ۱/۲۵ میلی لیتر از محلول ۳۰ میلی مولار EDTA و ۳ PH ۷/۷ اضافه شد و سلول ها، ورتکس شدند. محلول رویی در لوله ی جدیدی ریخته شد و به مدت ۴۵ دقیقه با سرعت 15k سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل شامل پروتئین های غشایی و محلول رویی حاوی مواد محلول بود. با حذف محلول های رویی، در ۱۰۰ میکرولیتر از بافر LUG حل شدند و تا زمان انجام SDS-PAGE در فریز نگهداری شدند (۱۵). سپس پس از تهیه ی ژل مخصوص، نمونه های پروتئینی استخراج شده از باکتری های کلبسیلا پنومونیه به مدت ۵ دقیقه در لوله اپندروف در بسته ای که اطراف آن ها نیز با پارافین کاملاً پوشیده شده بود در ظرف حاوی آب به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. به کمک سرنگ هالامیتون ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه ی پروتئینی استخراج و جوشانده شده به هر چاهک

انجام الکتروفورز: محصولات PCR را بر روی ژل آگاروز ۱ درصد با بافر Tris-Borate EDTA (TBE) الکتروفورز شده و سپس ژل با اتیدیوم بروماید (0.5 μg ml⁻¹) /۵/۰ میکروگرم بر میلی لیتر رنگ گردید. پس از پایان الکتروفورز، ژل با دستگاه (Gel Doc) و در طول موج ۲۸۰ نانومتر از نظر وجود باندهای هدف در کنار مارکر مولکولی و کنترل مثبت و منفی مورد بررسی قرار گرفت.

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، بعضی از سویه های حاوی ژن های TEM, SHV, CTX-M به شرکت Bioneer کشور کره جنوبی برای Sequencing ارسال شد و سپس نتایج با استفاده از نرم افزار Chromas 1.45 و Blast در NCBI مورد بررسی قرار گرفت (۴۱۴).

روش انجام SDS-PAGE: استخراج پروتئین کشت تازه ای از باکتری کلبسیلا پنومونیه در ۱۰ میلی لیتر محیط TSB برات تهیه شد و سپس به مدت یک شبانه روز در گرم خانه نگهداری گردید. لوله ی حاوی محیط کشت باکتری ها به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۵K سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل در ۱۰ میلی لیتر از محلول ۳۰ میلی مولار Tris-Hcl با PH

اضافه شد. هم زمان با تزریق نمونه‌ها از مارکر استاندارد فرمتاز اضافه شد تا به این ترتیب بتوان وزن مولکولی باندهای حاصل را تعیین نمود.

یافته‌ها

از اسفندماه سال ۱۳۹۱ تا اسفند ماه سال ۱۳۹۲، ۱۰۰ ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه جدا شد که در این میان، (۵۵ درصد) ۵۵ ایزوله از بیمارستان طالقانی و (۴۵ درصد) ۴۵ ایزوله از بیمارستان مفید بود که (۵۷ درصد) ۵۷ نفر از مردان، (۴۳ درصد) ۴۳ نفر از خانم‌ها جدا شده 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، ۴ ایزوله از واحد پیوند مغز استخوان، ۴ ایزوله از هماتولوژی، ۳ ایزوله از اندوکاردیت، ۳ ایزوله از واحد گوارش و ۷ ایزوله از قسمت‌های دیگر جدا شده بود. ۴۵ ایزوله از نمونه‌ی مدفوع، ۳۶ ایزوله از نمونه‌ی خون، ۱۲ ایزوله از نمونه‌ی زخم، ۱۲ ایزوله از نمونه‌ی خلط، ۱۸ ایزوله از نمونه‌ی خارج شکمی، ۳ ایزوله از مایع مغزی نخاعی و ۴ ایزوله از نمونه‌های دیگر بود.

جدول ۳. نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۱۰۰ ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های مفید و طالقانی شهر تهران، ایران

آنتی بیوتیک	مقاوم تعداد (%)	مقاومت بینابینی تعداد (%)	حساسیت تعداد (%)
آزترئونام (۱۰ میکروگرمی)	۵۶ (۵۶٪)	۸ (۸٪)	۳۶ (۳۶٪)
مروپنم (۱۰ میکروگرمی)	۲۰ (۲۰٪)	۱۰ (۱۰٪)	۷۰ (۷۰٪)
جنتامایسین (۱۰ میکروگرمی)	۳۶ (۳۶٪)	۴ (۴٪)	۶۰ (۶۰٪)
سیپروفلوکساسین (۳۰ میکروگرمی)	۵۳ (۵۳٪)	۷ (۷٪)	۴۰ (۴۰٪)
آمیکاسین (۳۰ میکروگرمی)	۲۶ (۲۶٪)	۴ (۴٪)	۷۰ (۷۰٪)
ایمی پنم (۱۰ میکروگرمی)	۲۰ (۲۰٪)	۱۰ (۱۰٪)	۷۰ (۷۰٪)
سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرمی)	۵۷ (۵۷٪)	۳ (۳٪)	۴۰ (۴۰٪)
سفیم (۳۰ میکروگرمی)	۳۷ (۳۷٪)	۱۰ (۱۰٪)	۵۳ (۵۳٪)
تتراسیکلین (۱۰ میکروگرمی)	۵۰ (۵۰٪)	۷ (۷٪)	۴۳ (۴۳٪)
آمپی سیلین (۱۰ میکروگرمی)	۷۳ (۷۳٪)	۷ (۷٪)	۲۰ (۲۰٪)
پپراسیلین (۱۰۰ میکروگرمی)	۵۷ (۵۷٪)	۳ (۳٪)	۴۰ (۴۰٪)
سفترایکسون (۳۰ میکروگرمی)	۵۶ (۵۶٪)	۴ (۴٪)	۴۰ (۴۰٪)
سفیدوکسیم (۳۰ میکروگرمی)	۶۴ (۶۴٪)	۶ (۶٪)	۳۰ (۳۰٪)
تایجی سیکلین (۱۵ میکروگرمی)	۵ (۵٪)	۳۰ (۳۰٪)	۶۵ (۶۵٪)
دوری پنم (۱۰ میکروگرمی)	۲۰ (۲۰٪)	۱۰ (۱۰٪)	۷۰ (۷۰٪)
ارتاپنم (۱۰ میکروگرمی)	۲۰ (۲۰٪)	۱۰ (۱۰٪)	۷۰ (۷۰٪)
پپراسیلین/تازوباکتام (۱۰۰ میکروگرمی)	۲۹ (۲۹٪)	۱۰ (۱۰٪)	۶۱ (۶۱٪)
فسفومایسین/ترومتامول (۲۰۰ میکروگرمی)	۳ (۳٪)	۱۲ (۱۲٪)	۸۵ (۸۵٪)
سفتازیدیم (۳۰ میکروگرمی)	۵۴ (۵۴٪)	۶ (۶٪)	۴۰ (۴۰٪)
کلیستین (۱۰ میکروگرمی)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	۱۰۰ (۱۰۰٪)

* اعداد به درصد بیان شده‌اند.

الگوی مقاومت دارویی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده در جدول ۳ و حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴: حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد عوامل متنوع آنتی‌بیوتیکی در ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه

MIC ₉₀	MIC ₅₀	محدوده MIC	آنتی بیوتیک
۳۲	۱	۰/۲۵-۲۵۶	مروپنم
۱۶	۱	۰/۲۵-۲۵۶	ایمی پنم
>۲۵۶	۶۴	۱->۲۵۶	سفتازیدیم
>۲۵۶	۱۶	۰/۵->۲۵۶	سفتریاکسون
>۲۵۶	۱۶	۰/۵->۲۵۶	سفپیم
>۲۵۶	۱۶	۰/۵->۲۵۶	سفوتاکسیم
۱۲۸	۴	۰/۲۵->۲۵۶	پیراسیلین/تازوباکتام
>۲۵۶	۲۵۶	۲->۲۵۶	آمپی سیلین

MHC50: حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد ۵۰ درصد از نمونه‌ها

MIC90: حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد ۹۰ درصد از نمونه‌ها

جدول ۵: ژن‌های مقاومت در کلبسیلا پنومونیه‌های جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های شهر تهران، ایران

ژن‌های ایجاد کننده مقاومت	تعداد (%)
<i>bla</i> _{CTX-M}	۲۸ (۵۸/۳۳٪)
<i>bla</i> _{TEM}	۲۴ (۵۰٪)
<i>bla</i> _{SHV}	۳۰ (۶۲/۵٪)
<i>bla</i> _{CTX-M} و <i>bla</i> _{TEM}	۸ (۱۶/۶۶٪)
<i>bla</i> _{TEM} و <i>bla</i> _{SHV}	۱۰ (۲۰/۸٪)
<i>bla</i> _{CTX-M} و <i>bla</i> _{SHV}	۱۶ (۳۳/۳۳٪)
<i>bla</i> _{SHV} و <i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M}	۲۰ (۴۱/۶۶٪)

نتایج حاصل از شناسایی متالوبتالاکتاماز: با استفاده از دیسک‌های ایمی‌پنم، مروپنم، ارتاپنم و دوری پنم به تنهایی و در ترکیب با EDTA فقط (۳ درصد) از ایزوله کلبسیلا پنومونیه دارای متالوبتالاکتاماز بودند.

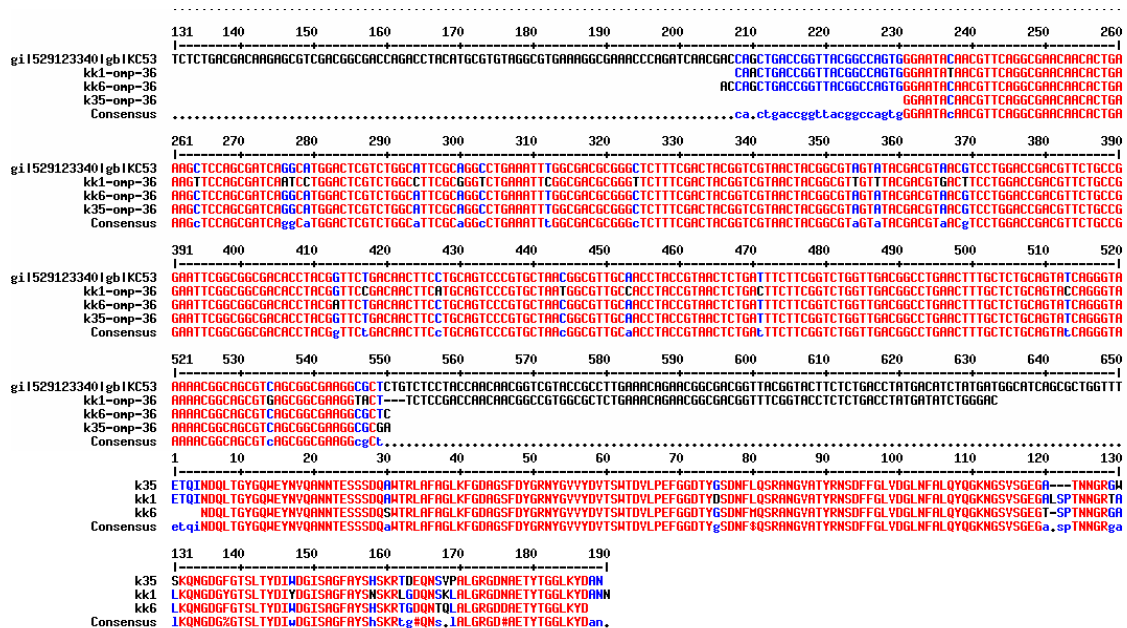
نتایج حاصل از PCR ژن‌های *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{DIM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{AIM}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} و *bla*_{CTX-M} ژن‌های *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} و *bla*_{CTX-M} به ترتیب در ۲۴

نتایج حاصل از شناسایی بتالاکتاماز با طیف وسیع: از ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیمارستان، (۴۸ درصد) از ایزوله‌ها با استفاده از دیسک سفوتاکسیم و سفتازیدیم به تنهایی و در ترکیب با کلارولانیک اسید دارای بتالاکتاماز با طیف وسیع بودند که در این میان ۲۸ ایزوله مربوط به بیمارستان طالقانی بود و ۲۰ ایزوله‌ی دیگر از بیمارستان بستری در بیمارستان مفید جدا شد.

نمونه‌های مقاوم به کارباینم در همگی پورین Ompk36 دیده شد، ولی پورین Ompk35 مشاهده نگردید. علاوه بر این با استفاده از روش‌های PCR و Sequencing همه‌ی نمونه‌ها درای هر دو ژن بودند. این پرایمرهای ویژه برای هر دو ژن، یک قطعه به طول ۴۲۶ جفت باز برای ژن Ompk35 و یک قطعه به طول ۶۷۲ برای ژن Ompk36 جفت باز تکثیر شد. سپس توالی‌ها برای هر ژن با Blast در NCBI چک گردید. در مورد ژن مربوط به Ompk36 نمونه‌ی مقاوم بیمارستان طالقانی دارای توالی ۱۰۰ درصد مشابه با توالی با شماره JQ781657.1 بود ولی در مورد نمونه‌ی بیمارستان HM000058.1 ۹۴ درصد شبیه به توالی با شماره‌ی Insertion Sequence:IS5 بود، که توسط (شکل ۱).

(۵۰ درصد)، ۳۰ (۶۲/۵ درصد) و ۲۸ (۵۸/۳۳ درصد) از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده‌ی بتالاکتاماز با طیف وسیع شناسایی شد ولی بقیه‌ی ژن‌ها در ایزوله‌ها دیده نشد (۷). ژن CTX-M در کلبسیلا پنومونیه با شماره‌ی دسترسی KF513160 به ثبت رسیده است (جدول ۵).

نتایج حاصل از SDS-PAGE، PCR و Sequencing پروتئین‌های غشایی خارجی (Ompk36, Ompk35): با استفاده از روش SDS-PAGE، Ompk35 در (۶۲/۵ درصد) ۳۰ نمونه از ۴۸ نمونه‌ی حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع تشخیص داده شد، در حالی که ژن Ompk36 در (۷۲/۹۱ درصد) ۳۵ نمونه از ایزوله‌های حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع مشاهده شد (۷). ولی در تمام نمونه‌های فاقد بتالاکتاماز با طیف وسیع هر دو پورین مشاهده گردید. در



شکل ۱: هم‌ترادفی کردن توالی‌ها برای Ompk36

۱۰۰ درصد شبیه به شماره‌ی HQ457036.1 بود (شکل ۲). ارتباط توالی‌ها ژن‌های Ompk35, Ompk36 با استفاده از درخت فیلوژنی در شکل ۳ نشان داده

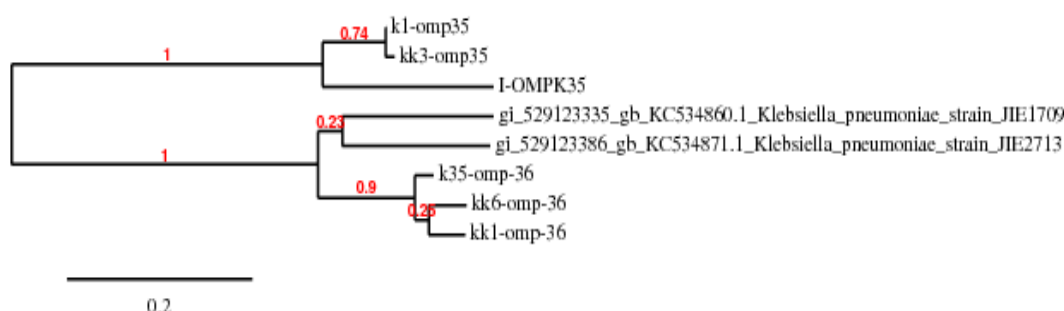
در مورد ژن Ompk35 نمونه‌ی جدا شده از بیمارستان طالقانی ۱۰۰ درصد شبیه به توالی JQ781653.1 بود و در مورد نمونه‌ی جدا شده از بیمارستان طالقانی

شماره‌های KF537683 و KF537684 در بانک ژن ثبت شده است.

Ompk36 و Ompk35. توالی ژن‌های ایزوله‌های جدا شده از بیمارستان طالقانی و مفید با

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
I-OMP35	ACTGGCCGTAGCCGATCACTGATCGTTGATCTGAGTTTCGCCTTTCAGGCCGATACGGGCATAGGTGGTATCGTCGCTGGTGTGCCATTGGTGGTCCACACGTGCTCGCCGACCATTTTTC													
kk3-omp35	TCCACTGACCGTAGCCGATCAGCTGATCGTTAATCTGAGTTTCGCCTTTCAGGCCGATACGGGCATAGGTGGTATCGTCGCTGGTGTGCCATTGGTGGTCCAGACGTGCTCGCCGACCATTTTTC													
kl-omp35	CCACTGGCCGTAGCCGATCAGCTGATCGTTGATCTGAGTTTCGCCTTTCAGGCCGATACGGGCATAGGTGGTATCGTCGCTGGTGTGCCATTGGTGGTCCAGACGTGCTCGCCGACCATTTTTC													
Consensus	..ccACTGGCCGTAGCCGATCAGCTGATCGTTGATCTGAGTTTCGCCTTTCAGGCCGATACGGGCATAGGTGGTATCGTCGCTGGTGTGCCATTGGTGGTCCAGACGTGCTCGCCGACCATTTTTC													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210					
I-OMP35	CATACAGTCCAGTTTGTGGCCGTTTTGTTATAGATTTCTGCAGCGTTGGCTGCACCGGTACACAGCAGGGCAGGGATC													
kk3-omp35	CATAGAGTCCAGTTTGTGGCCGTTTTGTTATAGATTTCTGCAGCGTTGGCTGCACCGGTACACAGCAGGGCAGGG													
kl-omp35	CATAGAGTCCAGTTTGTGGCCGTTTTGTTATAGATTTCTGCAGCGTTGGCTGCACCGGTACACAGCAGGGCAGGG													
Consensus	CATAGAGTCCAGTTTGTGGCCGTTTTGTTATAGATTTCTGCAGCGTTGGCTGCACCGGTACACAGCAGgggcagg....													

شکل ۲. هم تبادلی کردن توالی‌ها برای Ompk35



شکل ۳. ارتباط توالی‌ها ژن‌های Ompk35, Ompk36 با استفاده از درخت فیلوژنی

بحث

در این مطالعه پایین‌ترین میزان مقاومت در این ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فسفومايسين در ۳ مورد (۳ درصد) و تاییدی سیکلین در ۵ مورد (۵ درصد) دیده شده است، که این نتایج نشان می‌دهد آنتی‌بیوتیک‌های فسفومايسين و تاییدی سیکلین بهترین تاثیر را داشتند. از ۱۰۰ ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه جدا شده، ۴۸ ایزوله (۴۸ درصد) تولید کننده‌ی بتالاكتاماز با طیف وسیع بود. ۴۶ ایزوله تولید کننده‌ی بتالاكتاماز با طیف وسیع به‌طور هم زمان مقاوم به سفوتاکسیم و سفتازیدیم بودند. شیوع بالای ایزوله‌ی تولید کننده‌ی بتالاكتاماز با طیف وسیع و گسترش آن در ایران نگرانی بزرگی را ایجاد نموده است. در مطالعه‌ای که منصوری و همکاران در شهر کرمان انجام دادند، ۵۵/۳ درصد از

نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه و اشریشیاکلی دارای بتالاكتاماز با طیف وسیع بودند (۱۶). در مطالعه‌ای که غفوریان و همکاران در شهر ایلام انجام دادند، ۵۹/۲ درصد از نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای بتالاكتاماز با طیف وسیع بودند (۱۷). درصد شیوع بتالاكتاماز با طیف وسیع در مطالعه‌ی ما بسیار شبیه به مطالعاتی است که در شهر ایلام و کرمان انجام شده است. استفاده‌ی گسترده از داروها ممکن است باعث تسهیل گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی شود و از این رو کنترل باکتری‌های تولید کننده‌ی بتالاكتاماز با طیف وسیع به ویژه در بخش‌های مرتبط با کودکان باید جزء اولویت‌ها محسوب شود. در این مطالعه شیوع ژن‌های *bla*_{SHV}، *bla*_{TEM} و *bla*_{CTX-M} به‌ترتیب در ۲۴ مورد (۵۰ درصد)، ۳۰ مورد (۶۲/۵ درصد) و ۲۸ مورد (۵۸/۳۳ درصد)

ایزوله‌های تولید کننده بتالاکتاماز با طیف وسیع دیده شده است که این نتایج به‌خصوص در ایران که شیوع ایزوله‌های تولید کننده بتالاکتاماز با طیف بالا است بسیار نگران کننده می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط غفوریان و همکاران در سال ۲۰۱۱ در شهر ایلام انجام شد، ۱۶ نمونه (۲۳/۹) درصد دارای ژن CTX-M بودند (۱۷). در تحقیقی که فیض آبادی و همکاران در شهر تهران انجام دادند، ۵۴، ۶۷/۴ و ۴۶/۵۱ درصد از نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه به‌ترتیب دارای ژن‌های *bla*_{TEM}، *bla*_{SHV} و *bla*_{CTX-M} بودند (۱۸). درصد شیوع این ژن در مطالعه‌ی ما بیشتر از دو مطالعه‌ای می‌باشد که در ایران انجام شده است. ژن‌های نام برده در دیگر عضو خانواده انتروباکتریاسه هم یافت می‌شود. در مطالعه‌ای که گودرزی و همکاران در سال ۲۰۱۳ در شهر تهران انجام دادند، ۶۹ و ۷۴ درصد ایزوله‌ها حاوی ژن‌های *bla*_{TEM}، *bla*_{CTX-M} بودند (۱۹). این نتایج نشان می‌دهد که این ژن‌ها بر روی عناصر ژنتیکی قرار دارند و قادر به انتقال به دیگر باکتری‌ها می‌باشند. متالوبتالاکتامازها باعث مقاومت باکتری به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها بویژه کارباپنم‌ها می‌شود. یکی از آنتی‌بیوتیک‌هایی که بر روی باکتری‌های حاوی متالوبتالاکتاماز موثر بود، کلیستین است. البته آنتی‌بیوتیک‌های فسفومايسين و تایجيسیکلین هم اثر نسبتاً خوبی دارند (۲). تاکنون در ایران ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه که دارای متالوبتالاکتاماز باشد شناسایی نشده است و این اولین گزارش از وجود این آنزیم در باکتری کلبسیلا پنومونیه از ایران می‌باشد، تاکنون در ایران ژن‌های متالوبتالاکتاماز در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه دیده نشده است ولی در باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و اسیتوباکتر بامانی ژن‌های IMP, VIM دیده شده است (۱). در تحقیقی که فلاح و همکاران در شهر تهران در سال ۲۰۱۲ بر روی ایزوله‌ی سودوموناس آئروژینوزا انجام دادند، ۴۸ درصد ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده‌ی متالوبتالاکتاماز بودند که در این میان ۶ ایزوله ژن IMP را

داشتند (۴). همچنین در تحقیقی که کرامتی و همکاران در سال ۱۳۹۴ در شهر تبریز انجام دادند از ۳۵ سویه‌ی سودوموناس آئروژینوزای مولد متالوبتالاکتاماز، ۶ ایزوله دارای VIM بودند (۲۰). در تحقیق دیگری که همتی و همکاران در سال ۱۳۹۳ در شهر زنجان انجام دادند، از ۱۲۰ ایزوله‌ی سودوموناس آئروژینوزا، ۳۵ ایزوله تولید کننده‌ی متالوبتالاکتاماز بودند که از این تعداد ۲۸ ایزوله دارای ژن IMP، ۲۰ ایزوله دارای ژن SPM و ۵ ایزوله دارای ژن SIM بودند (۲۱).

در تحقیقی که فلاح و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تهران بر روی ایزوله‌های اسیتوباکتر بامانی انجام دادند، ۸۶/۶۶ درصد ایزوله‌ها دارای متالوبتالاکتاماز بودند که ۳/۸۴ و ۱۷/۴۴ درصد ایزوله‌ها به ترتیب ژن‌های IMP و VIM را داشتند (۲۲). پورین‌ها در واکنش متقابل محیط خارجی و باکتری‌ها نقش اساسی را ایفا می‌کنند و در مقادیر زیادی در غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی حضور دارند. نام اغلب پروتئین‌های غشای خارجی در کلبسیلا پنومونیه بر گرفته از وزن مولکولی آن‌ها می‌باشد. از جمله نقش‌هایی که برای پورین‌های اصلی کلبسیلا پنومونیه در نظر گرفته شده است کمک به نفوذپذیری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های از جمله سفتازیدیم و سفوتاکسیم می‌باشد. در این باکتری با ورود پلاسمیدهای کد کننده‌ی بتالاکتاماز با طیف وسیع شاهد مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ویژه به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام هستیم. در واقع در این باکتری پس از ورود پلاسمیدهای کد کننده‌ی بتالاکتاماز با طیف وسیع، موتاسیون در توالی ژنی این پورین‌ها ایجاد می‌شود که از بیان آن‌ها جلوگیری می‌کند. در صورت عدم بیان این پورین‌ها (ompk35, ompk36) به مقاومت سویه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام کمک قابل توجهی می‌نماید، زیرا همان‌طور که اشاره شد در تراوایی آنتی‌بیوتیک‌ها دخالت دارند. بنابراین فراوانی تولید این پورین‌ها را در سویه‌های حساس و سویه‌های مقاوم حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع را

که بتالاکتاماز با طیف وسیع ندارند بیشتر از سویه‌هایی می‌باشد که این آنزیم را تولید می‌کنند. از هر ژن شش نمونه‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک (از هر بیمارستان سه نمونه) برای تعیین توالی فرستاده شد. سپس توالی‌ها برای هر ژن با Blast چک گردید. در مورد ژن مربوط به ompk36 نمونه‌ی مقاوم بیمارستان طالقانی دارای توالی ۱۰۰ مشابه با توالی با شماره‌ی (GenBank Accession Number JQ781657) بود ولی در مورد نمونه‌ی بیمارستان مفید ۹۴ درصد شبیه به توالی با شماره‌ی (GenBank accession Number HM000058) بود که توسط Insertion Sequence:IS5 تخریب شده بود. در مورد ژن ompk35 نمونه‌ی جدا شده از بیمارستان طالقانی ۱۰۰ درصد شبیه به توالی (GenBank Accession Number JQ781653) بود و در مورد نمونه‌ی جدا شده از بیمارستان طالقانی ۱۰۰ درصد شبیه به شماره‌ی (GenBank Accession Number HQ457036) بود. در مورد ژن ompk36 توالی‌های دو نمونه از دو بیمارستان مشابه هم نبود.

نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص شد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و شیوع ژن‌های بتالاکتاماز با طیف وسیع در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه نگران کننده است و نیاز به اقدامات کنترل عفونت از جمله مدیریت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و شناسایی سریع ایزوله‌های مقاوم می‌باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از پرسنل مرکز تحقیقات اطفال بیمارستان مفید و همکاران بخش میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی شهر تهران کمال تشکر را داریم.

مورد بررسی قرار دادیم. در این تحقیق مشاهده شد که سویه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای بتالاکتاماز با طیف وسیع، ompk36 را بیشتر از ompk35 بیان می‌کنند ولی در سویه‌هایی که بتالاکتاماز با طیف وسیع را ندارند این پورین‌ها بیشتر بیان می‌شود در واقع در میان سویه‌ها که این آنزیم را تولید نمی‌کردند هر دو پورین صددرصد وجود داشت (۷). با استفاده از روش‌های مولکولی مشخص شد که تمام سویه‌هایی که حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع هستند یا فاقد این آنزیم بودند و یا دارای هر دو پورین بودند. در مطالعه‌ی ما، ۵ ایزوله‌ی مقاوم به ارتاپنم، پورین ompk35 را بیان نمی‌کردند ولی پورین ompk36 را بیان می‌کردند. همچنین ۹ ایزوله‌ی مقاوم به کارباپنم‌ها هر دو پورین را بیان نمی‌کردند. از دست دادن پورین یکی از مکانیسم‌هایی می‌باشد که باعث می‌شود نمونه‌های حاوی بتالاکتاماز نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شوند. در مطالعه‌ی تی سای و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داده شد که حذف و یا تغییر در این پورین‌ها علاوه بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی، در ویرولانسی هم نقش دارند و باعث افزایش ۱۰۰ برابری LD50 در موش‌ها می‌گردد (۹). هرناندز نیز در مطالعه‌ی خود در بررسی ارتباط بین تغییر غشای خارجی و حساسیت به عوامل ضد میکروبی در میان سویه‌های کلبسیلا پنومونیه دریافت که افزایش MIC برای آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون‌ها، تتراسیکلین‌ها و کلرامفنیکل در سویه‌هایی که نقص در پورین پیدا نمودند، مشاهده نشد، اما افزایش MIC نسبت به آمپی‌سیلین، سفالوتین، سفوکسیتین، سفوتاکسیم و سفتازیدیم برای سویه‌هایی که نقص در پورین داشتند مشاهده شد. بر این اساس نتیجه گرفتند نقص در پورین فاکتوری برای افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شود (۲۳). بنابراین مشخص می‌شود که فراوانی تولید این پورین‌ها در سویه‌هایی

References

- 1- Amraei S, Eslami G, Taherpour A, Goudarzi H, Hashemi A. Detection of FOXMOX, and ACT genes in ESBL- producing *Klebsiella Pneumoniae* strains. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2014; 24: 11-20.
- 2- Fallah F, Taherpour A, Vala MH, Hashemi A. Global spread of new delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). *Arch Clin Infect Dis*. 2012; 6: 171-7.
- 3- Fallah F, Vala MH, Goudarzi H, et al. Identification of extended-spectrum-beta-lactamases (ESBLs), metallo-beta-lactamases (MBLs), Amp-C and KPC β -lactamases among *Klebsiella pneumoniae* isolated from adults and pediatric patients in Iran. *Afr J Microbiol Res*. 2013; 7: 3254-61.
- 4- 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: 122-4
- 5- Hakemi Vala M, Hallajzadeh M, Hashemi A, et al. Detection of ambler class A, B and D β -lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolated from burn patients. *Ann Burns Fire Disasters*. 2014; 27: 8-13.
- 6- Fallah F, Taherpour A, Borhan R, Hashemi A, Habibi M, Nia RS. 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: 193.
- 7- 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: 355-8.
- 8- Hashemi A, Fallah F, Erfanimanesh S, Hamedani P, Alimehr S. Detection of β -lactamases and outer membrane porins among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Iran. *Scientifica*. 2014; 2014: 726179.
- 9- Tsai Y-K, Fung C-P, Lin J-C, et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 1485-93.
- 10- Landman D, Bratu S, Quale J. Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 2009; 58: 1303-8.
- 11- Hashemi A, Shams S, Kalantar D, Taherpour A, Barati M. Antibacterial effect of Methanolic extract of *Camellia Sinensis L.* on *Pseudomonas aeruginosa* strains producing β -lactamases. *J Gorgan Uni Med Sci*. 2012; 14: 136-42.
- 12- 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. *Arak Med Univ J*. 2011; 14: 104-12.
- 13- Shakibaei M, Shah CF, Hashemi A, ADELI N. Detection of TEM, SHV and PER type extended-spectrum β -lactamase gene among

- clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burnt patients at Sbafa-Hospital, Kerman, Iran. *Iran J Basic Med Sci.* 2008; 2: 104-111.
- 14- Jafari M, Fallah F, Borhan RS, 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; 2: 109-12.
- 15- Vala MH, Nowroozi J, Ghazi F, Tabatabai PN, Haghighi S. Comparing invasive and non-invasive of isolated *Shigella flexneri* by electron microscopy of cell culture, SDS-Page and congo red method. *Iran Biomed J.* 2007; 11: 47-52.
- 16- 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: 81-6.
- 17- Ghafourian S, Bin Sekawi Z, Sadeghifard N, et al. The prevalence of ESBLs producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in some major hospitals, Iran. *Open Microbiol J.* 2011; 5: 91-5.
- 18- Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, et al. Distribution of bla TEM, bla SHV, bla CTX-M genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafinejad hospital, Tehran, Iran. *Microb Drug Resist.* 2010; 16: 53-49.
- 19- Goudarzi H, Aghamohammad S, Hashemi A, Nikmanesh B, Noori M. Distribution of blaTEM, blaSHV and bla CTX-M genes among *Escherichia coli* isolates causing urinary tract infection in children. *Arch Clin Infect Dis.* 2013; 8: e1b207.
- 20- Keramati N, Zeighami H, Haghi F. Frequency of class I and II integrons in metalobetalactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*. *J Zanjan Univ Med Sci.* 2014; 22: 111-9.
- 21- Hemmati F, Soroori Zanjani R, Haghi F, Zeighami H. Determination of Antibiotic Resistance Profile and Frequency of Metallo-Beta- Lactamases in *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates. *J Zanjan Univ Med Sci.* 2014; 22: 77-85.
- 22- Fallah F, Noori M, Hashemi A, et al. Prevalence of bla NDM, bla PER, bla VEB, bla IMP, and bla VIM genes among *Acinetobacter baumannii* isolated from two hospitals of Tehran, Iran. *Scientifica.* 2014; 2014: 245162.
- 23- Hernández-Allés S, del Carmen Conejo M, Pascual A, Tomás JM, Benedí VJ, Martínez-Martínez L. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46: 273-7.

Detection of Metallo-beta-Lactamases, Extended-spectrum Beta-lactamases (ESBLs), Outer Membrane Porins among *Klebsiella Pneumoniae* Strains Isolated from Hospitalized Patients in Tehran

Hashemi A¹, Fallah F², Taherpour A³, Goudarzi H⁴, Tarashi S⁵, Erfanimanesh S⁶, Roshani M⁷, Amin MS⁸

¹Dept. of Microbiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

²Dept. of Microbiology, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

Corresponding Author: Hashemi A. Dept. of Microbiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

E_mail: hashemi1388@yahoo.com

Received: 2 Aug 2014 **Accepted:** 9 Feb 2015

Background and Objective: *Klebsiella pneumoniae* is one of the most important causative agents both in form of hospital acquired and community-acquired infections. This bacterium is one of the most prevalent pathogens that is isolated from hospitals and is associated with high mortality rates. The uprising trend of multi drug resistance among *Klebsiella pneumoniae* has limited the treatment options. The objective of this study was to detect Metallo-beta-Lactamases, Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and outer membrane porins among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Taleghani and Mofid hospitals.

Materials and Methods: This cross-sectional study was performed on 100 *Klebsiella pneumoniae* isolates from 2012 to 2013. Antibiotic susceptibility tests were performed via Kirby-Bauer disc diffusion and Broth Microdilution methods according to CLSI guidelines. Metallo-beta-Lactamases, Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing strains were detected by phenotypic confirmatory test and Combination Disk Diffusion Test (CDDT), respectively. The *bla*_{AIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{DIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes were detected using PCR and sequencing method. The outer membrane porins including OmpK35 and OmpK36 were analysed through SDS-PAGE, PCR and sequencing methods.

Results: Out of 100 *K. pneumoniae* isolates, 48 (48%) and 3(3%) were ESBL and MBL positive, respectively. The presence of *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M-15} was detected in 24 (50%), 30(62.5%) and 28 (58.33%) isolates respectively, while other genes were not detected. Outer Membrane Porins, OmpK35, was detected among 30 (62.5%) of 48 ESBL-producing isolates while OmpK36 was found in 35(72.91%) of 48 ESBL-producing isolates. In this study, Fosfomycin and Tigecycline were more effective than other antibiotics.

Conclusion: The high prevalence of ESBL-producing *K. pneumoniae* detected in this study is of great concern which requires infection control measures including antibacterial management and rapid detection of beta-lactamases-producing isolates.

Keywords: Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), Porins, *Klebsiella pneumoniae*, Metallo-beta-Lactamases