

شناسایی بتالاکتاماز نوع *AmpC* در جدایه های بالینی اشریشیاکلی در شهر کرمانشاه

مرضیه دخت شمس طلب^۱، محمدرضا مهربانی^{۲*}، محسن میرزایی^۲

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران

۲- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، بروجرد، ایران.

چکیده:

سابقه و هدف: بتالاکتامازهای نوع *AmpC*، آنتی بیوتیک هایی مانند پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و سفامایسین ها را هیدرولیز می کنند و به مهار کننده هایی مثل کلاوولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مقاومت نشان می دهند. در این مطالعه به بررسی شیوع آنزیم *AmpC* بتالاکتاماز تولید شده توسط جدایه های باکتری اشریشیاکلی از بیمارستان های کرمانشاه پرداخته شد.

مواد و روش ها: تعداد ۱۰۰ ایزوله بالینی اشریشیاکلی از بیمارستان های شهر کرمانشاه جمع آوری شد و پس از تعیین هویت، از نظر تولید بتالاکتاماز نوع *AmpC* با استفاده از روش انتشار از دیسک مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه هایی که از نظر فنوتیپی به صورت بلقوه واجد این بتالاکتاماز بودند به روش Multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفتند. هم چنین مقاومت آن ها به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، مروپنم و آزترونام به روش میکرو دایلوژن برای تعیین MIC (Minimal inhibitor concentration) سنجیده شد.

یافته ها: در این مطالعه ۴۴٪ از جدایه های بالینی از نظر فنوتیپی مولد بتالاکتاماز نوع *AmpC* بودند. پس از بررسی بیش تر این ۴۴ ایزوله با روش Multiplex PCR مشخص گردید ۴۴/۱٪ از آن ها دارای ژن *AmpC* بتالاکتاماز بودند.

نتیجه گیری: شیوع *AmpC* بتالاکتامازها به دلیل بی تأثیر نمودن تجویز سفالوسپورین های نسل سوم به یک چالش مهم در درمان بیماران تبدیل شده است. انجام آزمایش های فنوتیپی و روش های مولکولی تشخیص بتالاکتامازها مانند PCR می تواند بسیار مفید فایده باشد. این مطالعه حاکی از شیوع بالای *AmpC* بتالاکتاماز در شهر کرمانشاه است که دلیل احتمالی آن مصرف خودسرانه آنتی بیوتیک ها و یا عدم انجام آنتی بیوگرام قبل از آغاز درمان است. عدم آگاهی از روش های تاییدی تولید ESBL و مولکولی می تواند به گسترش مقاومت ناشی از *AmpC* بتالاکتاماز دامن بزند.

کلمات کلیدی: *AmpC* بتالاکتاماز، آنتی بیوگرام، اشریشیاکلی

مقدمه

اشریشیاکلی باعث عفونت های قابل توجهی در سراسر جهان می شود (۲). مکانیسم غالب برای مقاومت در برابر به آنتی بیوتیک های بتالاکتام در باکتری های گرم منفی سنتز بتالاکتاماز می باشد (۱۸). این مقاومت در باکتری اشریشیاکلی اغلب به واسطه تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) و یا *AmpC* بتالاکتامازها می باشد. بتالاکتامازهای *AmpC* در اواخر دهه ۱۹۷۰ شناسایی شدند. *AmpC* بتالاکتامازها متعلق به گروه C و یا گروه ۱ سفالوسپورینازها

نویسنده مسئول :

گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، بروجرد، ایران.

پست الکترونیکی: mehrabi.mehr@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۱۹

هستند، ولی تا حدی توانایی هیدرولیز سایر بتالاکتام ها را نیز دارند. این آنزیم ها سفالوسپورین های وسیع الطیف مانند سفنازیدیم، سفتریاکسون، سفپیوم و مونوباکتام هایی مانند آزترونام و سفامایسین ها را هیدرولیز کرده ولی توسط مهارکننده های معمولی مانند کلاولانات مهار نمی شوند (۱۲).

به طور کلی ساختار *AmpC* به بتالاکتامازهای کلاس A شباهت دارند با این تفاوت که جایگاه های اتصال در آنزیم های کلاس C بیش تر باز هستند و این ویژگی نشان می دهد که آنزیم های *AmpC* توانایی بیش تری برای جا دادن زنجیره های حجیم جانبی سفالوسپورین ها دارند (۸). در اشریشیاکلی بیان ساختاری *AmpC* بتالاکتاماز می تواند به دلیل آزادسازی ژن *AmpC* کروموزومی کدگذاری شده و یا به دلیل کسب یک ژن قابل انتقال *AmpC* روی پلاسمید یا دیگر عناصر انتقال پذیر باشد (۱۵).

AmpC به واسطه کروموزوم در طیف وسیعی از باسیل های گرم منفی از قبیل سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتر، اسپینتوباکتر، آئروموناس،

ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و سپس هاله های مقاومت اطراف دیسک ها با خط کش اندازه گیری شدند. برای تمام آزمایش های بررسی حساسیت ضد میکروبی از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC25922 به عنوان کنترل استفاده شد. علاوه بر این برای آزمایش تعیین تولید ESBLs از سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 به عنوان کنترل استفاده شد.

تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC): نمونه های باکتریایی مولد *AmpC* بتالاکتاماز به استناد اختلاف قطر هاله عدم رشد دیسک آنتی بیوتیک سفوکسیتین با و بدون اسید کلاوولانیک را انتخاب و با روش میکرو برات دایلووشن حداقل غلظت آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، مروپنم و آزترونام مورد بررسی قرار گرفتند. پودر آنتی بیوتیکی آمیکاسین از شرکت سیگما و پودر آنتی بیوتیکی سیپروفلوکساسین و آزترونام از شرکت Fluka پودر آنتی بیوتیکی مروپنم از شرکت Science Lab خریداری گردیدند و سپس با استفاده از آب مقطر از آن ها محلول ذخیره، تهیه شد. مقدار پودر آنتی بیوتیک موثر برای هر محلول ذخیره، سیپروفلوکساسین ۱ میکروگرم، آمیکاسین ۱/۳۶ میکروگرم، آزترونام ۱/۱ میکروگرم و مروپنم ۱ میکروگرم بود. لوله های محلول ذخیره ی آنتی بیوتیک ها تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند. محلول های ذخیره، آنتی بیوتیکی با محیط کشت مولر هینتون برات (مرک- آلمان) رقیق شدند. رقت های آنتی بیوتیکی استفاده شده در این آزمایش به صورت ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰/۱ در پلیت های ۹۶ خانه به صورت متوالی ریخته شدند. سپس از هر نمونه باکتری که از نظر فنوتیپ تولید آنتی بیوتیک بتالاکتاماز می کردند سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند که حاوی $10^8 \times 1/5$ باکتری است تهیه گردید، پس از آن، با افزودن سرم فیزیولوژی این سوسپانسیون به $1/1500$ رقیق و به مقدار 10^5 باکتری رسانده شد و درون چاهک پلیت های ۹۶ خانه پخش گردید. پس از ۱۸ ساعت انکوبه کردن پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رنگ تترازولیوم (۲۵ میکروگرم در ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل) که یک معرف رنگی رشد است و در حالت اکسید بی رنگ بوده، اما هنگامی که توسط میکروارگانیسم ها زنده احیا شود به علت تشکیل فورمازان قرمز می شود، به مقدار ۱۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و با بررسی تغییر رنگ چاهک ها یک غلظت بالاتر از آخرین غلظتی که رنگ قرمز را به خود گرفته بود به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک ها تعیین شد (۵).

روش PCR جهت شناسایی ژن های *AmpC*:

استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن (boiling) بعد از مشخص شدن جدایه های مقاوم صورت گرفت به این ترتیب که

اشریشیاکلی و دیگر باکتری ها شرح داده شده است. به طور احتمال دلیل مقاومت در این باکتری ها تولید بیش از حد *AmpC* بتالاکتاماز کروموزومی به وسیله جهش می باشد (۲۰). افزایش شیوع مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام بوسیله بتالاکتامازهای نوع *AmpC* در بین سویه های اشریشیاکلی به یک نگرانی بالینی تبدیل شده است. این ارگانیسم ها می توانند توانایی تولید *AmpC* بتالاکتاماز را بر روی پلاسمید کسب کنند. هم چنین می توانند *AmpC* بتالاکتاماز نوع کروموزومی را به مقدار زیاد تولید کنند در صورتی که در حالت طبیعی این آنزیم ها به مقدار کم تولید می شوند (۱۱-۱۶). هدف از این مطالعه شناسایی و بررسی شیوع بتالاکتاماز نوع *AmpC* در جدایه های بالینی اشریشیاکلی در شهر کرمانشاه می باشد.

مواد و روش ها:

تعداد ۱۰۰ ایزوله ی اشریشیاکلی از نمونه های بالینی ادرار از بیماران بیمارستان های امام رضا، طالقانی، محمد کرمانشاهی (کودکان) و امام خمینی کرمانشاه در فاصله زمانی ۲ ماه از اردیبهشت تا تیر ۱۳۹۳ جمع آوری شدند. پس از انجام آزمایش های تشخیصی متداول جدایه ها به طور دقیق تعیین هويت شدند. این تست ها شامل کشت روی محیط TSI (Triple sugar Iron Agar)، سایمون سیترات، آزمون اندول، تحرک، MR و VP بودند (۳). سپس این باکتری ها در محیط BHI (مرک- آلمان) برات حاوی ۲۰٪ گلیسرول تا زمان انجام آزمون های بعدی در ۲۰- درجه سانتی گراد فریز شدند.

آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی:

تمام جدایه ها توسط تست های تاییدی تولید ESBLs (Extended-Spectrum beta-Lactamases) و حساسیت به آنتی بیوتیک سفوکسیتین مورد بررسی قرار گرفتند. دیسک های استفاده شده عبارتند از سفتازیدیم (۳۰ μg) و سفتازیدیم/اسیدکلاوولانیک (۳۰ μg/۱۰ μg) و سفوتواکسیم (۳۰ μg) و سفوتواکسیم/اسید کلاوولانیک (۳۰ μg/۱۰ μg) و سفوکسیتین (۳۰ μg). در صورت وجود اختلاف قطر هاله عدم رشد دیسک ترکیبی با اسید کلاوولانیک با قطر هاله عدم رشد دیسک فاقد اسید کلاوولانیک به میزان بیش تر یا مساوی ۵ میلی متر، آن نمونه از نظر حضور ESBL مثبت در نظر گرفته شد. هم چنین اگر قطر هاله عدم رشد سفوکسیتین کم تر یا مساوی ۱۴ بود تولید کننده بلقوه *AmpC* در نظر گرفته شد (۴).

دیسک های مورد استفاده در این طرح از شرکت پادتن طب خریداری شد. ابتدا محیط مولر هینتون آگار (مرک- آلمان) ساخته شد و سپس سوسپانسیونی معادل استاندارد نیم مک فارلند تهیه و با استفاده از سواب استریل به صورت سفره ای بر روی محیط مولر کشت داده شد. پس از قرار دادن دیسک های مذکور به مدت ۲۴

برنامه مورد استفاده برای تکثیر ژن های *AmpC* در جدول شماره ۲ آورده شده است.

جدول ۲ برنامه دمایی- زمانی PCR ژن های *AmpC* (۱۱).

تعداد سیکل ها	زمان	دما	مراحل
۱	۳ دقیقه	۹۴ °C	شوک حرارتی اولیه
۲۵	۳۰ ثانیه ۳۰ ثانیه ۶۰ ثانیه	۹۴ °C ۷۴ °C ۷۲ °C	واسرشت (Denaturation)A جفت شدن پرایمر (Annealing) طویل شدن پرایمر (Extension)
۱	۷ دقیقه	۷۲ °C	طویل شدن نهایی
...	...	۴ °C	نگهداری

پس از اتمام کار دستگاه ترموسایکلر، الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ در حضور مارکر ۱۰۰ bp (سیناژن) و رنگ Safe Stain (سیناژن) در دستگاه الکتروفورز شرکت BIO RAD انجام شد. ژل حاصل را در دستگاه ژل داک شرکت Vilber قرار داده و از باند ها عکس تهیه و ثبت شد.

یافته ها:

فراوانی مکانی از ۱۰۰ جدایه های بالینی اشریشیاکلی جمع آوری شده از بخش های بیمارستان های امام رضا، طالقانی، محمد کرمانشاهی و امام خمینی عبارت بود از ۵۴٪ نمونه ها از بخش داخلی، ۲۷٪ از اورژانس، ۶٪ از بخش کودکان، ۵٪ از بخش ICU، ۴٪ از بخش قلب، ۲٪ از بخش CCU و ۱٪ از بخش های ارولوژی و سایر بخش ها. نتایج حاصل از آزمایش انتشار از دیسک روی باکتری های مورد بررسی نشان داد ۴۴٪ از آن ها بلقوه مولد *ESBLs* بودند (شکل ۱) که از این تعداد ۵۹/۱٪ (۲۶ نفر زن) و ۴۰/۹۰٪ (۱۸ نفر مرد) بودند.



تصویر ۱: شناسایی ایزوله های مولد *ESBLs* از نظر فنوتیپی به روش انتشار از دیسک

در تصویر شماره ۱ هاله های عدم رشد مربوط به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفنازیدیم فاقد اسید کلوانیک می باشد، در پایین تصویر دیسک های سفوتاکسیم و سفنازیدیم بعلاوه اسید کلوانیک مشاهده می شود.

پس از مطالعه ۴۴ ایزوله توسط روش Multiplex PCR ۴۴/۱٪ آن ها واجد ژن های بتالاکتاماز از نوع *AmpC* بودند. پس از مشاهده این ژن ها بر روی ژل آگارز ۱/۵٪، ۳۴/۸٪ جدایه ها باند هایی با وزن

ابتدا نمونه ها بر روی محیط بلاداآگار (مرک-آلمان) پاساژ داده شد، سپس یک کلنی از محیط را برداشته و در محیط BHI برات درون میکرو تیوپ ۱/۵ میلی متری حل و به مدت ۲۰ ساعت انکوبه کرده بعد میکرو تیوپ ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس مایع رویی را دور ریخته شد و رسوب در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به حالت سوسپانسیون درآمد. برای لیز سلول ها سوسپانسیون حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه قرار داده شد، پس از آن محلول در ۱۲۰۰۰ دور دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی حاوی DNA استخراج شده بود. پس از اندازه گیری غلظت DNA در جذب نوری ۲۸۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (eppendorf) از آن جهت انجام PCR به عنوان الگو استفاده شد (۱۵). سپس جدایه های تولید کننده *AmpC* بتالاکتاماز با استفاده از پرایمر های اختصاصی به روش Multiplex PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad) بررسی شدند (جدول ۱). واکنش Multiplex PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد شامل ۲۵ میکرولیتر از مسترمیکس (AMPLIQON) ۱ میکرولیتر از هر پرایمر رفت و برگشت اختصاصی (در مجموع ۱۲ میکرولیتر)، و ۹ میکرولیتر آب مقطر و ۴ میکرولیتر از DNA الگو بود. لازم به ذکر است که توالی پرایمرها از مقالات استخراج شد و پس از بلاست کردن در سایت NCBI جهت سنتز به شرکت پیشگام جهت سنتز سفارش داده شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن های *AmpC*

(۱۱).

منبع	آمپلیکون (bp)	اهداف	توالی (3' 5')	پرایمرها
	۵۲۰	CMY-1, CMY-8 to CMY-11, MOX-1, MOX-2	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG G	MOXM-F MOXM-R
(۱۱)	۴۶۲	BIL-1, CMY-2 to XMY-7, LAT-1 to LAT-4	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	CITM-F CITM-R
	۴۰۵	DHA-1, DHA-2	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	DHAM-F DHAM-R
	۳۴۶	ACC	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	ACCM-F ACCM-R
	۳۰۲	MIR-1T, ACT	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	EBCM-F EBCM-R
	۱۹۰	FOX-1 to FOX-5b	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	FOXM-F FOXM-R

جز سفپروم و سفپیم مقاومت بالینی نشان می دهد، علاوه بر این با از دست دادن پورین آن ها می توانند مقاومتی با واسطه کارباپنماز ها نیز داشته باشند (۷). این آنزیم ها به واسطه پلاسمید در میان بسیاری از جدایه های بالینی به ویژه خانواده انتروباکتریاسه منتشر شده و معضلات و افری را در جهت شناسایی آنزیم های بتالاکتامازی وسیع الطیف از طریق پوشاندن اثر آن ها در آزمایش های فنوتیپی تأییدی، اعمال می کنند.

امروزه تولید *ESBLs* و آنزیم های *AmpC* در جدایه های بالینی در حال افزایش است که این امر، مقاومت بالایی را نسبت به عوامل ضد میکروبی ایجاد کرده است.

شناسایی باکتری های مولد آنزیم های بتالاکتاماز نوع *AmpC* برای آزمایشگاه های بالینی میکروبیولوژی حائز اهمیت است. وجود این آنزیم ها بیماران عفونی در حال درمان با پنی سیلین های وسیع الطیف و سفالوسپورین را در معرض خطر توسعه مقاومت قرار می دهند (۱۳). برای درمان بهتر و تشخیص مولکولی بتالاکتامازها استفاده از PCR و تکنیک های تعیین توالی لازم می باشد، این تکنیک ها همیشه در دسترس نیستند و شیوع بتالاکتامازها در کشورهای در حال توسعه در حال گسترش بوده و آمار دقیقی از آن در دسترس نیست. برای کشف میزان شیوع آن ها در هر منطقه و درمان بهتر و به موقع عفونت های باکتریایی باید تحقیق های گسترده تری در این زمینه انجام شود (۱۰).

در تحقیق حاضر ۶۲٪ از نمونه ها از زنان و ۳۸٪ نمونه ها از مردان جدا شد شاید بتوان یکی از دلایل را آناتومی دستگاه تناسلی-ادراری زنان دانست هم چنین باکتری های جدا شده از زنان دارای درصد بالاتری از ژن مقاومت بودند، شاید دلیل آن درگیری بیش تر زنان با عفونت های دستگاه ادراری تناسلی و عدم انجام آنتی بیوگرام باشد. بیش تر بیماران در گروه سنی ۴۰ تا ۶۰ سال (۳۰٪) قرار داشتند اما به خاطر در دسترس نبودن اطلاعات کامل بیماران از جمله بیماری های زمینه ای، طبقه اجتماعی، شغل و ... نمی توان دلیل قطعی برای این موضوع ذکر کرد. در بین بخش های بیمارستانی بررسی شده بیش ترین مقاومت مربوط به بخش داخلی بود شاید به این علت که این بیماران بارها تحت درمان قرار گرفته اند یا اینکه دچار عفونت بیمارستانی شده باشند.

تحقیق های مختلفی در مقاطع زمانی و مکانی متفاوتی بر روی شیوع ژن *AmpC* انجام گردیده که می تواند به اطلاعات خوبی در خصوص مقاومت به بتالاکتامازها در دوره زمانی و سیر آن به ما بدهد. بر اساس نتایج این تحقیق ۴۴/۱٪ جدایه های مورد بررسی واجد ژن های بتالاکتاماز از نوع *AmpC* بودند. در مطالعه ای که توسط ماناهاران و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در کشور هند بر روی ۹۰۹ باکتری گرم منفی انجام گرفت، ۳۱۲ ایزوله به سفوکسیتین مقاوم

مولکولی به طور تقریبی ۴۸۰ bp به وجود آوردند که مربوط به پرایمر CITM با ژن های هدف LAT-۱ تا LAT-۴، BIL-۱ و CMY-۱ تا CMY-۷ بود. ۹/۳٪ از جدایه ها نیز باندهایی با وزن مولکولی به طور تقریبی ۱۹۰ bp مربوط به پرایمر FOXM با ژن های هدف FOX-۱ تا FOX-۵b به وجود آوردند (شکل ۲).



شکل ۲: ستون ۱ DNA Ladder ۱۰۰ bp. ستون های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ باند های اختصاصی ۴۸۰ bp مربوط به ژن CIT. ستون های ۸، ۱۱، ۱۲ باند های اختصاصی ۱۹۰ bp مربوط به ژن FOX. ستون های ۲، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۳ و ۱۴ عدم تشکیل باند و عدم حضور ژن. ستون ۱۵ مربوط به کنترل منفی نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی سوبه های مقاوم و نیمه مقاوم و حساس یه آنتی بیوتیک های سپروفلوکساسین، آمیکاسین، آزترونام و مروپنم در جدول زیر آورده شده است (جدول ۳).

براث دایلوژن

آنتی بیوتیک ها	R (مقاوم)		S (حساس)		I (نیمه حساس)	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
سیپروفلوکساسین	۴۰	۹۰/۹۰	۴	۹/۱	۰	۰
معیار تفسیر	۴ ≤		۲		≤ ۱	
آمیکاسین	۰	۰	۴۲	۹۵/۴۵	۲	۴/۵۵
معیار تفسیر	۱۶ ≤		۸		≤ ۴	
آزترونام	۴۴	۱۰۰	۰	۰	۰	۰
معیار تفسیر	۱۶ ≤		۸		≤ ۴	
مروپنم	۳۹	۸۸/۶۴	۵	۱۱/۲۶	۰	۰
معیار تفسیر	۴ ≤		۲		≤ ۱	

بحث:

اولین آنزیم بتالاکتامازی که پنی سیلین ها را تخریب کرد، *AmpC* بتالاکتاماز در باکتری اشیشیالی بود. یک محقق سوئدی در سال ۱۹۶۵ به تحقیق های سیستماتیک ژنتیکی باکتری اشیشیالی مقاوم به پنی سیلین پرداخت (۸).

AmpC بتالاکتامازها، از مهم ترین بتالاکتاماز های بالینی محسوب می شود که به طور طبیعی توسط تعدادی از باکتری ها گرم منفی تولید می شود. این آنزیم به پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها به

بودند و برای تایید فنوتیپی آن از روش دیسک ترکیبی استفاده کردند که ۱۱۴ (۳۶/۵٪) مولد *AmpC* در نظر گرفته شدند. پس از انجام PCR ۴۸ ایزوله (۴۲/۱٪) دارای ژن *AmpC* بودند (۱۴) که به طور تقریبی با بررسی حاضر مطابقت دارد.

تانجا و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در کشور هند بر روی ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی تحقیق هایی را انجام دادند که نتایج آن نشان داد ۵۹ ایزوله مولد *AmpC* در نظر گرفته شدند، پس از انجام PCR، ۵۶/۶٪ واجد ژن *AmpC* بودند (۱۹). هاکمن و همکارانش آزمایشی در سال ۲۰۱۳ در کشور غنا میان ۴۰۰ ایزوله باکتری انجام دادند، که ۵۰ نمونه مقاوم به سفوکسیتین بودند. از میان ۵۰ نمونه مقاوم سفوکسیتین، ۵ نمونه (۱۰٪) تولید کننده ی *AmpC* بتالاکتاماز بودند، یعنی تنها ۵ (۱/۳٪) ایزوله از ۴۰۰ ایزوله تولید *AmpC* بتالاکتاماز کرده اند (۶). مغایرت نتایج این تحقیق با سایر تحقیق های می تواند به دلیل تفاوت در منطقه جغرافیایی و ژنتیک افراد، متفاوت بودن سویه های باکتری و هم چنین تفاوت در نوع آنتی بیوتیک های تجویز شده و یا نحوه مصرف آن ها باشد. در تحقیق های سلطان دلال (۱۷) و منصور (۱۱) که در سال های ۱۳۸۹ و ۱۳۸۶ در تهران بر روی جدایه های اشریشیاکلی انجام گرفت و شیوع ژن های *AmpC* به ترتیب ۳/۰۹٪ و ۵/۷٪ گزارش شد که نتایج آن ها با تحقیق حاضر دارای تفاوت چشم گیری می باشند و می توان به این نتیجه رسید که طی گذشت این سال ها شیوع ژن های مقاومت در این باکتری ها در حال افزایش است و این موضوع باید بیش تر مورد بررسی قرار بگیرند که علت آن علاوه بر تفاوت در منطقه جغرافیایی تجویز اشتباه پزشکان یا مصرف خودسرانه و غیر اصولی بیماران و یا دلایل دیگر می باشد.

حساسیت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها به دلیل تجویز غیر اصولی آنتی بیوتیک ها، انتقال مقاومت از طریق پلاسمید ها و هم چنین جهش ها، به طور روز افزون روبه کاهش است. به همین دلیل تحقیق های در این زمینه و تجویز و مصرف صحیح آنتی بیوتیک ها امری ضروری و مهم می باشد. آموزش پزشکان و پرسنل درمانی برای استفاده از روش های فنوتیپی تشخیص جدایه های بالینی *AmpC* بتالاکتاماز اشریشیاکلی و در صورت امکان انجام PCR میتواند در کنار گسترش فرهنگ عدم استفاده خود سرانه از آنتی بیوتیک ها به کاهش نمونه های مقاوم کمک شایانی نماید.

پس از تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی آنتی بیوتیک ها در این مطالعه ۱۰۰٪ جدایه ها به آزترونام، ۹۰/۹۰٪ به سیپروفلوکساسین و ۸۸/۶۴٪ به مروپنم مقاومت نشان دادند و مقاومتی به آمیکاسین مشاهده نشد. در بررسی مشعوف و همکارانش در سال ۱۳۹۲ مقاومت به آزترونام ۴۳/۳٪، سیپروفلوکساسین ۱۶/۷٪ و ایمپی پنم ۰٪ گزارش شد (۲۱). در سال ۱۳۹۲ آرچین و همکارانش مقاومت

به سیپروفلوکساسین را ۱۹/۷٪ و مقاومت به ایمپی پنم را ۹/۴٪ گزارش دادند (۱). در طی تحقیقی در سال ۲۰۰۵ توسط *Kaddeh* و همکارانش حساسیت به آنتی بیوتیک های ایمپی پنم ۹۲٪، آمیکاسین ۷۲/۸٪ و ۵۸/۶٪ سیپروفلوکساسین نشان داده شد (۹). پدیده مقاومت های دارویی بلافاصله چند سال پس از مصرف انبوه آنتی بیوتیک ها در جوامع انسانی شناخته شده است و به صورت های مختلف تکی و یا چند دارویی دیده می شود. نتایج حداقل غلظت مهار کنندگی آنتی بیوتیک های مورد استفاده حاکی از این است که دز بالایی از این آنتی بیوتیک ها برای درمان باید استفاده شود. مقاومت پایین نسبت به آمیکاسین می تواند به خاطر تجویز کم تر آن به دلیل عوارضی که بر روی بخش حلزونی گوش و نارسایی کلیوی دارد، باشد.

نتیجه گیری:

بتالاکتامازها سیستم دفاعی اصلی باکتری های گرم منفی در برابر آنتی بیوتیک های بتالاکتام هستند. از زمانی که آنتی بیوتیک های بتالاکتام در بالین مورد استفاده قرار گرفتند، بتالاکتامازها به همراه آن ها تکامل یافتند و نقش اصلی را در شکست های درمانی در آنتی بیوتیک تراپی ایفا کردند. برای جلوگیری از شیوع بیش تر ژن های بتالاکتاماز و مقاومت بالاتر به آنتی بیوتیک ها پزشکان باید ضمن برگزاری دوره های بازآموزی، در رابطه با درمان های ترکیبی و استفاده از تست های آنتی بیوگرام قبل از تجویز دارو آموزش داده شوند و هم چنین آنتی بیوتیک هایی که مقاومت نسبت به آن ها زیاد گزارش شده و حساس می باشند از سوی پزشکان محتاطانه تجویز شوند.

سپاسگزاری:

این پژوهش با حمایت های مالی معاونت محترم دانشگاه آزاد اسلامی بروجرد انجام شده است که بدین وسیله از زحمات این معاونت تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع:

1. Archin T, Afzalian E, Kargar M and Ghasemi Y. Molecular Identification of *SHV*, *TEM*, *CTX-M* β lactamases Genes and Antibiotics Resistance Pattern of *K. pneumoniae* Isolates Collected from ICU Patients of Namazi Hospital, Shiraz, Iran. *Armaghane-danesh YUMSJ*, 2013; 18(10):816-825. (Persian in full text)
2. Baudry PJ, Nichol K, DeCorby M, Mataseje L, Mulvey MR, Hoban DJ and Zhanel GG. Comparison of antimicrobial resistance profiles among extended-spectrum β -lactamase producing- and acquired *AmpC* β -lactamase producing *Escherichia coli* from Canadian Intensive Care Units. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008; 52(5):1846-9.
3. Boyd K CR, Duberg DM, Dud R, Heuertz RM and Mister PC. Textbook of Diagnostic Microbiology. Fourth Edition, Saunders Company; Chapter19. 2011:51-459.
4. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-Third informational supplement. Clinical Laboratory Standards Institute Document M100-S23; 2013:33(1).
5. Eloff, J. Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial component from Plants. *J Ethno pharmacol*; 1998; 60(1), 1-8.
6. Hackman HK, Osei-Adjei G, Gordon A, Laryea E, Quaye S, Anison L, Charles A Brown and Kingsley Twum-Danso. Phenotypic Characterization of *AmpC* beta-lactamase among Cefoxitin Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Accra, Ghana. *J Biolo, Agric Health*, 2013;3(16):102-6.
7. Haldorsen B, Aasnaes B, Dahl KH, Hanssen A-M, Simonsen GS, Walsh TR, Sundsfjord A and Lundblad EW. The *AmpC* phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired ISEcp1-like *ampC* element or hyperproduction of the endogenous *AmpC*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008;62(4):694-702.
8. Jacoby GA. *AmpC* β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 2009; 22:161-82.
9. Kader AA and Kumar A. Prevalence and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital. *J Ann Saudi Med*, 2005;25(3):239-42.
10. Kiiru J, Kariuki S, Goddeeris BM and Butaye P. Analysis of β -lactamase phenotypes and carriage of selected β -lactamase genes among *Escherichia coli* strains obtained from Kenyan patients during an 18-year period. *J BMC Microbiol*, 2012;12(1):155.
11. Mansouri S, Chitsaz M, Hajihosseini R, Mirzaee M and Gheini M.H. Determination of Resistance Pattern of Plasmid-Mediated *AmpC*. *J Daneshvar Med*, 2010;16(80):61-70. (Persian in full text)
12. Mohamudha PR, Harish B and Parija S. Molecular description of plasmid-mediated *AmpC* β -lactamases among nosocomial isolates of *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* from six different hospitals in India. *Indian J Med Res*. 2012;135(1):114.
13. Mohammed SM. Modification of the three-dimensional method for the detection of *AmpC* β -lactamase in *Enterobacter spp.* and *Escherichia coli*. *J Univ Anbar for pure Sci*, 2010; 4(2).
14. Manoharan A, Sugumar M, Kumar A, Jose H, Mathai D and group I-Es. Phenotypic & molecular characterization of *AmpC* β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* & *Enterobacter spp.*

- from five Indian Medical Centers, Indian J Med Res. 2012; 135(3):359.
15. Pérez-Pérez FJ and Hanson ND. Detection of plasmid-mediated *AmpC* β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol, 2002;40(6):2153-62.
 16. Philippon, A, Arlet,G and Jacoby,G.A. Plasmid-determined *AmpC* type β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother, 2002; 46: 1–11.
 17. Soltan Dallal M, Mehrabadi J, Rastegar Lari A, Sabbaghi A, Eshraghian M R, Fard Sanei A, Bakhtiari R and Hanafi Abdar M. Molecular detection of *TEM* and *AmpC* (*DHA*, *MOX*) broad spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli*. J Tehran Univ Med J, 2010; 68(6):315-20. (Persian in full text)
 18. Susić E. Mechanisms of resistance in Enterobacteriaceae towards beta-lactamase antibiotics. Acta medica Croatica: Acta med. Croat, 2003;58(4):307-12
 19. Taneja N, Singh G, Singh M, Madhup S, Pahil S and Sharma M. High occurrence of *blaCMY-1 AmpC* lactamase producing *Escherichia coli* in cases of complicated urinary tract infection (UTI) from a tertiary health care centre in north India. Indian J Med Res, 2012;136(2):289.
 20. Yan J-J, Ko W-C, Jung Y-C, Chuang C-L and Wu J-J. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible *DHA-1* β -lactamase in a university hospital in Taiwan. J Clin Microbiol, 2002; 40(9):3121-6.
 21. Yousefi Mashouf R, Alijani P, Saidijam M, Alikhani M.Y and Rashidi H. Study of Antibiotic Resistance Pattern and Phenotypic Detection of ESBLs in *Klebsiella Pneumoniae* Strains Isolated from Clinical Samples and Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Imipenem and Ceftazidim Antibiotics. Sci J Hamadan Univ Med Sci.2014;20: 295 .(Persian in full text)

