

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۲ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۷، صفحات ۸-۱

شیوع ژن بتالاکتامازهای وسیع الطیف نوع AmpC در ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه

محمد نیاکان*، محسن چیت ساز، علیرضا مطوائی

گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

نویسنده مسئول: محمد نیاکان، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

تلفن: ۸۸۹۶۴۷۹۲ همراه: ۰۹۱۲۱۰۱۴۰۶۰ niakan@shahed.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۹/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۸

چکیده:

زمینه و اهداف: مواد ضد میکروبی بتالاکتام درحال حاضر رایج ترین درمان برای عفونت های باکتریایی می باشند. استفاده از آنها منجر به بروز مقاومت باکتری های گرم منفی در برابر آنتی بیوتیک های بتالاکتام در سراسر جهان می شود. آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) آنتی بیوتیک های بتالاکتام راهیدرولیز و غیرفعال می کنند. آنزیم های AmpC درکلاس C طبقه بندی ESBLs جای دارند. آنزیم های AmpC تپیک که سفا لوسپورینازهای مقاوم به اسید کلوانیک می باشند باعث مقاومت در برابر اغلب اکسی امینوسفالوسپورین ها می گردند. این آنزیم ها گروهی جداگانه از ESBLs می باشند، اما یک مشکل طبقه بندی درجهش یافته های AmpC رخ داده که منجر به افزایش فعالیت آنها در برابر سفپیم و سفپروم (سفالوسپورین های نسل چهارم) شده است. چنین جهش هایی در انواع کروموزومی جدایی ناپذیر AmpC رخ داده است، اما آنها می توانند به صورت همسان از انواع پلاسمیدی AmpC گسترش یافته و به طور فزاینده درگونه های کلبسیلا و/شریشیا کلی بسط پیدا کنند. هدف این مطالعه تعیین شیوع ژن های بتالاکتاماز وسیع الطیف AmpC در ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه بود.

روش بررسی: ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه مربوط به سه بیمارستان امام خمینی، مصطفی خمینی و مرکز طبی کودکان در تهران بود. روش فنوتیپی که برای تشخیص سویه های بالینی مولد ESBLs مورد استفاده قرار گرفت روش آگار دایلوژن بود. برای جداسازی ژن های AmpC از روش مالتی پلکس PCR استفاده شد.

یافته ها: از ۱۶۸ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه ۱۱۹ (۷۰٫۸٪) ایزوله در غربالگری اولیه، از نظر تولید ESBLs مثبت بودند که ۹۹ (۸۳٫۲٪) ایزوله در تست فنوتیپی تاییدی مثبت شدند و ۱۰ ایزوله (۸٫۴٪) دارای ژن های AmpC بودند.

نتیجه گیری: مطالعه نشان داد که در ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف و ژن AmpC وجود دارند، که بالطبع درمان را با مشکل مواجه می نماید. به نظر می رسد اینگونه مشکلات در بیمارستان های شهر تهران در حال گسترش باشد.

کلید واژه ها: کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتاماز وسیع الطیف، ژن AmpC

مقدمه :

ارگانیزم‌ها منتقل شده و مقاومتی شبیه به مقاومت بتالاکتام در انتروباکتر، به آنها بیخشند.

تاکنون بیش از بیست بتالاکتاماز مختلف نوع AmpC با واسطه پلاسمید شناسایی شده‌اند. آنزیم AmpC نسبت به مهار با اسیدکلاولانیک مقاوم بوده و از نظر بیولوژیک مقاومت به سفامایسین‌ها را به خوبی مقاومت به اکسی‌آمینوبتالاکتام‌ها ایجاد می‌کنند (۹). بیشتر آنزیم‌های AmpC، سفالوسپوریناز هستند ولی تا حدی توانایی هیدرولیز سایر بتالاکتام‌ها نظیر پنی‌سیلین‌ها را نیز دارا می‌باشند (۱۰).

در اواخر دهه ۱۹۸۰ این ژن‌های کروموزومی قابل‌القاء روی پلاسمید آشکار شدند و به سایر باکتری‌های فاقد آنها نظیر کلبسیلا، اشریشیا کلی و یا گونه‌های سالمونلا انتقال یافتند. تشخیص فنوتیپی میکروارگانیزم‌های واجد AmpC دشوار است. این مسأله کار افرادی را که در آزمایشگاه بیمارستان کار می‌کنند، مشکل می‌سازد. زیرا این آنزیم‌ها نظیر ESBLs ممکن است با روش‌های رایج تعیین حساسیت شناسایی نشوند (۱۱). لذا این مطالعه به منظور تشخیص و تعیین شیوع ژن AmpC در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنو مونه انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها :

۱) سویه‌های باکتریایی :

از ۱۶۸ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه به دست آمده از سه بیمارستان امام خمینی، مصطفی‌خیمینی و مرکز طبی کودکان در تهران که از بخش‌های مختلف بیمارستان به آزمایشگاه ارسال شده بود استفاده گردید.

۲) تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی :

بر اساس دستورالعمل CLSI (Clinical and laboratory standards institute) و از روش رقت در آگار برای اندازه‌گیری و تعیین MIC استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل سفنازیدیم، سفتریاکسون و سفوکسیتین به تنهایی و همراه با مهارکننده اسید کلاولانیک بود.

بتالاکتام‌ها آنزیم‌های باکتریایی هستند که آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، یعنی پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها، را با هیدرولیز حلقه بتالاکتام غیرفعال می‌کنند (۱).

یکی از مشکل‌سازترین مکانیزم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در رابطه با بتالاکتام‌ها می‌باشد. عوامل ضد میکروبی بتالاکتام شایع‌ترین درمان بر ضد عفونت‌های باکتریایی هستند (۴-۲). میزان مقاومت به عوامل ضد میکروبی به طور گسترده و جهانی در حال افزایش می‌باشد. تولید بتالاکتام‌ها شایع‌ترین مکانیزم مقاومت باکتریایی می‌باشد (۳، ۴). این آنزیم‌ها بی‌شمار هستند (تاکنون بیش از ۴۰۰ نوع مختلف بتالاکتاماز در نمونه‌های بالینی تعریف شده‌اند) و به علت مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها به طور مداوم جهش می‌یابند که منجر به گسترش و توسعه بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف می‌شوند (۵، ۶). بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف (ESBLs) نخستین بار در سال ۱۹۳۸ شناسایی و تعریف شدند و به طور کلی عبارتند از بتالاکتام‌هایی که قادر به هیدرولیز و غیرفعال کردن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام رایج از قبیل پنی‌سیلین‌ها، اکسی‌آمینوسفالوسپورین‌ها، منوباکتام‌ها و حتی کارباپنم‌ها می‌باشد. اما سفامایسین‌ها را نمی‌توانند هیدرولیز کنند و اثر آنها توسط مهارکننده اسید کلاولانیک مهار می‌شود (۷، ۸).

عفونت با باکتری‌های مولد بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف در انتشار وسیع این سویه‌ها، به ویژه در بیمارستان‌ها، باعث افزایش هزینه درمان و افزایش طول مدت بستری می‌گردد. امروزه وجود انتروباکتریاسه مولد ESBLs یک نگرانی بزرگ و در حال گسترش در دنیا محسوب می‌شود. بعلاوه، باکتری‌های مولد ESBLs به طور شایع به بسیاری از داروهای غیربتالاکتام مانند کینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدها، تری‌متوپریم و سولفامتوکسازول نیز مقاومت نشان می‌دهند که این امر باعث ایجاد مشکلات زیادی در درمان عفونت‌های ناشی از آنها می‌شود (۷).

مطالعه بر روی بتالاکتام‌های نوع AmpC از اواخر دهه ۱۹۷۰ شروع شد. آنزیم‌های AmpC که اغلب قابل‌القاء توسط بتالاکتام‌ها هستند به وسیله ژن‌های کروموزومی کد می‌شوند و در بسیاری از باسیل‌های گرم منفی وجود دارند. جهش‌هایی که موجب افزایش بیان ژن AmpC می‌شود مسئول ظهور سریع و آسان سویه‌های مقاوم فراوان نسبت به سفالوسپورین‌ها در انتروباکتر کلوآکه می‌باشد. آنزیم AmpC در باکتری اشریشیا کلی به مقدار کم بیان می‌شود. کروموزوم‌های کلبسیلا و سالمونلا فاقد ژن AmpC هستند. اما آنزیم‌های AmpC با واسطه پلاسمید می‌توانند به این

در دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله بقایای لاشه باکتری ها رسوب کرده و DNA آنها در مایع رویی به حالت محلول در می آید که برای تست PCR مورد استفاده قرار گرفت (۱۵ و ۱۴).

ترکیب مخلوط واکنش PCR برای یک تست ۵۰ تایی مالتی پلکس PCR به قرار زیر است:

آب مقطر استریل: ۱۰۹۸ μl ، PCR buffer 10x: ۲۵۰ μl و مخلوط dNTP: ۴۰۰ μl ، از هر جفت پرایمرهای MOXM و CITM و DHAM هر کدام ۶۰ μl ، از جفت پرایمر ACCM و EBCM هر کدام ۵۰ μl و از جفت پرایمر FOXM هر کدام ۴۰ μl و Taq DNA Polymerase: ۱۲/۵ μl .

برای تست PCR برای هر ایزوله از ۴۸ μl مخلوط واکنش به اضافه ۲ μl DNA الگو استفاده گردید. پرایمرها از شرکت Roche آلمان تهیه شدند. برنامه PCR برای ۲۵ سیکل تکثیر به دستگاه ترموسایکلر داده شد که شامل مراحل زیر بود:

مرحله اولیه جداسازی یا باز شدن دو رشته به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴۰ C، مرحله باز شدن دو رشته به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴۰ C (denaturation)، مرحله اتصال پرایمرها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۴۰ C (annealing)، مرحله طولیل شدن یا ساخته شدن رشته هدف به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۹۴۰ C (extention)، مرحله طولیل شدن نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲۰ C.

محصولات PCR توسط الکتروفورز با ژل آگاروز ۱/۵٪ در بافر TBE بررسی گردیدند. ژلها با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی و سپس محصولات PCR با نور UV مشاهده گردیدند.

در این مطالعه از شش جفت پرایمر اختصاصی برای شش خانواده مختلف ژنی بتالاکتامازهای AmpC استفاده شد. خصوصیات این پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

یافته ها:

نتایج تست فنوتیپی غربالگری اولیه MIC: از کل ۱۶۸ ایزوله بالینی که توسط تست MIC جهت مقاومت به سفنازیدیم و سفتریاکسون مورد بررسی قرار گرفتند ۱۱۹ (۷۰/۸٪) ایزوله بر اساس دستورالعمل CLSI به عنوان سویه های بالقوه تولید کننده ESBLs شناسایی شدند.

۳- تست فنوتیپی غربالگری اولیه تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs):

برای انجام این تست از پودر آنتی بیوتیک های سفتریاکسون و سفنازیدیم (ساخت شرکت Glaxo Smith Klin) یک سریال رقت ۱۵ تایی از ۱۰/۷۵ μl - ۱۲۸۰۰ μl تهیه شد.

۳-۱- قبل از انجام تست تعیین MIC برای آنتی بیوتیک ها به روش میکرو برات دایلوژن تست کنترل کیفی انجام شد. جهت صحت تست از سویه های استاندارد زیر استفاده گردید (۱۳، ۱۲):

استافیلوکوکوس اورئوس: ATCC ۲۹۲۱۳

اشریشیا کلی: ATCC ۲۵۹۲۲

کلیسیلا پنومونیه: ATCC ۷۰۰۶۲۲

۳-۲- آزمایش های تاییدی فنوتیپی تولید ESBLs:

در این مرحله به وسیله آنتی بیوتیک های سفنازیدیم و سفتریاکسون به همراه اسید کلاولانیک برای ایزوله ها به روش رقت در آگار تست تعیین MIC انجام شد (۱۳ و ۱۲).

۳-۳- آزمایش فنوتیپی تاییدی تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف نوع AmpC:

طبق تعریف ایزوله هایی که پس از انجام تست فنوتیپی غربالگری اولیه و تاییدی به عنوان تولید کننده ESBLs شناسایی شده و اثر بتالاکتاماز در آنها به وسیله مهار کننده کلاولانات مهار نمی شود و همچنین در برابر سفامایسین ها مقاوم هستند، تولید کننده بالقوه بتالاکتامازهای وسیع الطیف نوع AmpC محسوب می شوند. از این رو، برای تمامی ایزوله ها به روش رقت در آگار تست تعیین MIC انجام گرفت.

۴- تعیین ژن های بتالاکتاماز نوع AmpC:

از روش مالتی پلکس PCR جهت شناسایی AmpC بتالاکتاماز های پلاسمیدی استفاده شد. برای استخراج DNA باکتری از روش جوشاندن (boiling) استفاده شد. بدین ترتیب که پس از یک پاساژ از نمونه ها بر روی محیط بلاد آگار یک کلنی تک از هر ایزوله به پنج میلی لیتر محیط کشت مایع لوریا برتانی تلقیح شد و در دمای ۳۷۰ C به مدت ۲۰ ساعت بر روی شیکر انکوبه شد. پس از آن ۱/۵ میلی لیتر از محیط کشت حاوی باکتری درون لوله های اپندورف به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی دور ریخته شد و رسوب آن به وسیله ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر استریل به حالت سوسپانسیون در آمد و به وسیله دستگاه ترموبلاک به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵۰ C قرار گرفت. لوله های اپندورف مجدداً به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور

جدول ۱: خصوصیات پرایمرهای خانواده های مختلف ژنی AmpC بتالاکتامازها

Primer	PCR Product (bp)	Target(s)
MOXM	520	MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 to CMY-11
CITM	462	LAT-1 to LAT-4, BIL-1, CMY-2 to CMY-7
DHAM	405	DHA-1, DHA-2
ACCM	346	ACC
EBCM	302	MIR-1, ACT-1
FOX M	190	FOX-1 to FOX-5b

نتایج تست فنوتیپی تاییدی ESBLs :

در این مرحله MIC تمام ایزوله های بالینی در برابر آنتی بیوتیک سفنازیدیم و سفتریاکسون به همراه مهار کننده اسید کلاوولانیک مورد بررسی قرار گرفت که مشخص شد از بین ۱۱۹ ایزوله از ارگانسیم هایی که در تست غربالگری اولیه به صورت بالقوه تولید کننده ESBLs شناخته شده بودند، ۹۹ ایزوله (۸۳،۲٪) کاهش ۳ مرتبه یا بیشتر MIC در حضور مهار کننده کلاوولانات نشان دادند. یعنی تولید ESBLs در آنها تایید گردید.

نتیجه آزمایش تایید تولید ESBLs نوع AmpC :

پس از انجام تعیین MIC سفوکسیتین مشخص شد که از کل ۱۶۸ ایزوله کلبسیلا پنومونیه ۲۶ ایزوله (۱۵/۴٪) در برابر این آنتی بیوتیک حساس و تعداد ۱۴۲ ایزوله (۸۴/۶٪) مقاوم می باشند. یعنی به صورت بالقوه می توانند تولید کننده AmpC بتالاکتامازها در نظر گرفته شوند. زیرا که مکانیسم های دیگری به غیر از تولید AmpC جهت بروز مقاومت در برابر سفوکسیتین در باکتری ها وجود دارد.

نتایج تست مالتی پلکس PCR :

تست تشخیص ژنوتیپی AmpC نشان داد که از میان ۱۶۸ ایزوله بالینی تعداد ۱۰ ایزوله (۵/۹۵٪) دارای ژن های کد کننده آنزیم های بتالاکتاماز نوع AmpC بودند. این ژن ها به ترتیب متعلق به خانواده های زیر بودند:

FOX M (n=9), EBCM (n=1), DHAM (n=1), CITM (n=6)

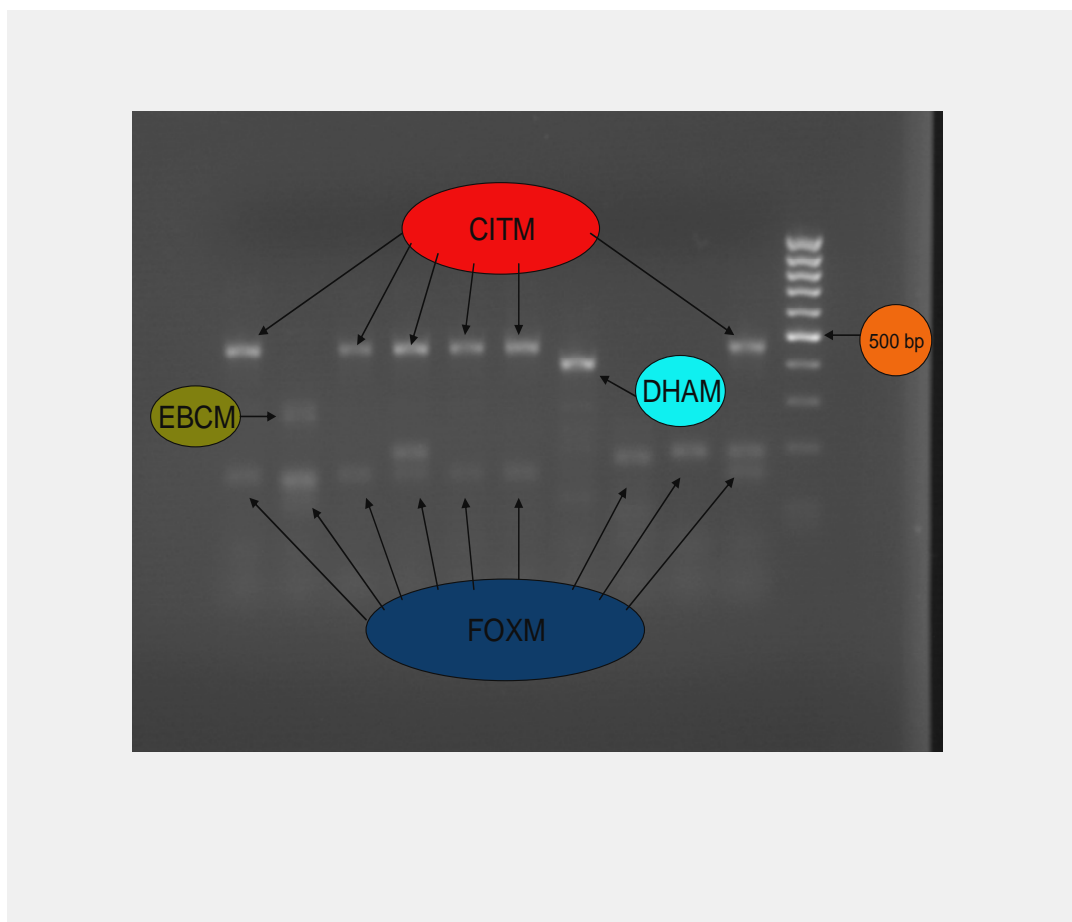
لازم به ذکر است که تعداد ۷ ایزوله واجد ۲ خانواده مختلف از

AmpC بتالاکتاماز بودند از جمله خانواده های :

CITM- FOX M (n=6)

EBCM- FOX M (n=1)

در مورد خانواده ژنی FOX M لازم به ذکر است که برخی از باندها در جایگاه سایز ۱۹۰ جفت بازی قرار نداشتند. از آنجا که این باندها پس از تکرار تست مالتی پلکس PCR و الکتروفورز با ژل های جدید باز هم مشاهده شدند، این نظریه وجود دارد که برخی از آنها ممکن است یک خانواده جدید از AmpC بتالاکتامازها باشند که در اثر جهش های ژنی بوجود آمده اند. زیراساسا گسترش خانواده های مختلف ژنی AmpC بتالاکتامازها در گذشته به همین شکل بوده است. از آنجا که برای ما در این مطالعه امکانات تعیین توالی این باندهای ژنی جدید و یا تکرار تست ها با کیت متفاوت دیگر و حتی استفاده از الکتروفورز با ژل پلی آکرلامید وجود نداشت، نمی توانیم در مورد ماهیت آنها اظهار نظر مطمئنی داشته باشیم. تمام این ۱۰ ایزوله قبلا در برابر آنتی بیوتیک سفوکسیتین مقاوم گزارش شده بودند و به صورت بالقوه تولید کننده بتالاکتامازها AmpC شناخته شده بودند (تصویر ۱).



شکل ۱: تصویر ژل حاوی باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات PCR استخراج شده از ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه

بحث:

سفالوسپورین ها عوامل ضد میکروبی هستند که رایج ترین درمان برای بسیاری از عفونت های باکتریایی می باشند (۱۸). امروزه وجود انتروباکتریاسه تولید کننده آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) یک نگرانی بزرگ و در حال گسترش محسوب می شود (۱۹).

از زمانی که پلاسمید های کد کننده ESBLs پدید آمدند ارگانسیم های واجد آن ها تا حد زیادی در هیدرولیز و غیر فعال کردن آنتی بیوتیک های بتالاکتام نظیر پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و آرترونام موثر شدند (۲۰).

جداسازی ارگانسیم های مولد ESBLs می تواند دشوار باشد زیرا حضور ESBLs در باکتری ها همواره منجر به بروز مقاومت فنوتیپی نمی شود. خصوصا اگر از روش های سنتی تعیین MIC یا دیسک دیفیوژن ساده برای تفسیر نتایج حساسیت به آنتی بیوتیک ها استفاده شود (۲۰). در نتیجه سویه ای که از نظر ESBLs حساس

در این مطالعه ۱۶۸ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه از سه مرکز بیمارستانی تهران از نظر وجود ESBLs به صورت فنوتیپی و از نظر وجود بتالاکتامازهای نوع AmpC به صورت فنوتیپی و ژنوتیپی بررسی شدند. تست های غربالگری و تاییدی فنوتیپی ESBLs نشان داد که ۸۴٫۶٪ ایزوله ها در برابر هر سه آنتی بیوتیک سفالوسپورین نسل سوم یعنی سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفوکسیتین مقاوم هستند. ۵٫۹۵٪ ایزوله ها واجد ژن های کد کننده آنزیم های بتالاکتاماز نوع AmpC بودند.

کلبسیلا پنومونیه یکی از باکتری های خانواده انتروباکتریاسه می باشد که به عنوان پاتوژن فرصت طلب شناخته و معرفی می شود و می تواند عامل عفونت های شدیدی در نقاط مختلف بدن باشد. اما اغلب در دستگاه ادراری و تنفسی عفونت ایجاد می کند (۱۶). به طور کلی گفته می شود که کلبسیلا پنومونیه عامل حدود ۸٪ عفونت های بیمارستانی است (۱۷). آنتی بیوتیک های بتالاکتاماز از جمله

عادی در دسترس آزمایشگاه های بالینی قرار ندارد. به همین خاطر یکی از عوامل مشکلات درمان و مرگ و میر از عفونت های بیمارستانی می تواند AmpC بتالاکتامازهای شناخته نشده می باشند .

نتیجه گیری :

با توجه به کم بودن تحقیقات در زمینه تعیین شیوع ESBLs در ایران و با توجه به گسترش روزافزون آن ها و اهمیت این گروه از آنزیم ها به خاطر اعطای سطح بالای مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های بتالاکتام به خصوص سفالوسپورین های نسل سوم که داروهایی بسیار رایج جهت درمان عفونت های بیمارستانی می باشند و به منظور جلوگیری از شکست های درمانی و کنترل عفونت های بیمارستانی ناشی از باکتری های حامل ESBLs ; توصیه می شود تحقیقات بیشتر و جامع تری در این زمینه انجام گیرد. با توجه به نتایج معتبر بدست آمده یک سری سیاست های کلی و عمومی جهت مقابله با گسترش و توسعه این آنزیم ها در پیش گرفته شود .

بهرتر است باکتری هایی که در برابر داروهای سفالوسپورین نسل سوم و کارباپنم مقاوم بوده و همچنین این مقاومت به وسیله مهارکننده های آنزیم های بتالاکتاماز از جمله اسید کلانولانیک مهار نمی شوند مورد بررسی مولکولی قرار گیرند و ژنوتیپ مقاومت آن ها مشخص گردد. این کار جهت جلوگیری از گسترش شیوع AmpC بتالاکتامازها که به وسیله پلاسمیدها براحتی به دیگر باکتری های حساس قابل انتقال هستند و ریسک درمانی بسیار بالایی را ایجاد می کنند، مفید و کارآمد می باشد.

گزارش می شود باید به وسیله تست های فنوتیپی استاندارد آزمایش شده باشد (۲۱). تشخیص فنوتیپی صحیح ESBLs روش خوبی جهت افتراق بین سویه های مولد ESBLs و سویه هایی است که از دیگر مکانیسم ها جهت مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام استفاده می کنند (۲۲).

مکانیسم های غیر آنزیمی مقاومت در برابر ESBLs نظیر نقص در کانال های پورینی غشاء خارجی باکتری و کاهش نفوذ پذیری آن در برابر آنتی بیوتیک ها و مکانیسم Efflux تفسیر حاصل از مقاومت باکتری ها را پیچیده می کند (۲۳). معمولا بسیاری از نمونه هایی که از عفونت های بیمارستانی بدست می آیند در برابر آنتی بیوتیک های متعددی مقاومت دارند (۲۴).

از نظر آماری شیوع ESBLs در ایران نسبت به سایر کشورهای جهان و حتی آسیا چشمگیرتر می باشد. یکی از مهم ترین دلایل آن می تواند استفاده بیش از حد و نابجا از داروهای بتالاکتام مخصوصا سفالوسپورین های وسیع الطیف باشد (۲۵). بنابراین یک اقدام مفید و موثر در زمینه کنترل عفونت های مقاوم به درمان می تواند کاهش مصرف نادرست این آنتی بیوتیک ها و استفاده اصولی از آنها باشد. تعدادی از ایزله ها در برابر اثر مهارکننده اسید کلانولانیک مقاوم بودند که به طور بالقوه می توانند واجد AmpC باشند و در تعدادی نیز ژن AmpC یافت شد، که از این نظر اهمیت زیادی دارند.

باید خاطر نشان کرد که امروزه راهنماهای قابل توجهی برای طراحی و اجرای تست های غربالگری و تایید AmpC در باکتری ها وجود ندارد . مثلا اگر یک ایزوله در برابر آنتی بیوتیک سفوکسیتین مقاوم باشد هر چند به طور کلی بالقوه می تواند دارای AmpC باشد

ولی این مسئله به طور کامل قطعیت ندارد و مقاومت می تواند ناشی از اختلال در نفوذپذیری غشاء خارجی باکتری باشد و منشا آنزیماتیک نداشته باشد (۲۶). بنابراین تشخیص و شناسایی مولکولی بتالاکتامازها به خصوص نوع AmpC برای بررسی مطمئن و دقیق مقاومت آنتی بیوتیکی لازم و ضروری است. یکی از بهترین روش های مولکولی تکنیک PCR می باشد .

هر چند مدت زیادی از کشف AmpC بتالاکتامازهای با واسطه پلاسمید می گذرد ولی متأسفانه هنوز اهمیت بالینی این آنزیم ها بدرستی درک نشده و سویه های واجد این آنزیم ها در آزمایشگاه بالینی، جداسازی و تشخیص داده نمی شوند. هر چند که روش مالتی پلکس PCR به عنوان یک ابزار تحقیقی سودمند برای تشخیص این آنزیم ها در دسترس است اما به صورت یک روش

فهرست مراجع :

- Bush K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*; 2001; **32**:1085-9.
- Albertini MT , Benoit C , Berardi L , Berroune Y , Boisivon A, and et al .Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase(ESBL) in Northern France : a five year multi-center incidences study. *J Hosp Infect*; 2002; **52**:107-13.
- Jawetz M. Ernest. *Medical Microbiology*, McGraw-Hill Company. Twenty-Third editions; 2004.
- Walker T. Stuart. *Microbiology*, Philadelphia USA, W.B. Saunders Company Chapter 3; 1998.
- Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. *N Engl J Med*; 2005; **352**:380-91.
- Gniadwski M. Evaluation and epidemiology of extended-spectrum β -lactamase (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect*; 2001; **7**:597-608.
- Bradford PA . Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*; 2001; **14**:933-51.
- Jiang X, Ni Y, Jiang F, Yuan L, Han L and et al. outbreak of infection caused by Enterobacter cloacae producing the novel VEB-3 Beta-lactamase in china. *J Clin Microbiol*; 2005; **43**; 826-31.
- Hanson ND, Sanders CC.Regulation of inducible AmpC β -lactamases expression among Enterobacteriaceae. *Current pharmaceutical Design*; 1999; **5**:881-884.
- Matthew A, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW.The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *J Gen Microbiol*; 1975 ; **88**:169-178.
- Barlow M , Hall , BG. Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*, *Antimicrob Agents Chemother*; 2002; **46**:1190-1198.
- Pitout J.D.D, Hosain A, Honson N.D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamase produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 5715-21.
- Hanson ND, Thomson KS, Moland ES, Sanders CC, Berthold G, Penn RG. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. *J Antimicrob Chemother* 1999; **44**: 377-80.
- Pitout JDD, Thomson K, Hanson N, Ehrhardt A, Moland E, Sander C. β -lactamase responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**:1350-1654.
- Moland E, Black J, Hanson N, Thomson K. Discovery of CTX-M like extended- spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from five U.S. states. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**:2382-83.
- Perilli M, Felici A, Franceschini N, De Santis A, Pagani L, Luzzaro F, Oratore A, Rossolini G, Knox J, Amicosante G. Characterization of a new TEM-derived beta-lactamases produced in a *Serratia marcescens* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**:2374-82.
- Marra AR, Pereira CA, Castela A. Health and economic outcomes of the detection of *Klebsiella pneumoniae* – produced extended – spectrum beta – lactamases (ESBLs) in a hospital with high prevalence of this infection. *Int J Infect Dis*; 2006; **10** (1): 56-60.
- Colodner R. Extended – Spectrum β -lactamases: A challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. *J Clin Microbiol Infect Dis*; 2006; **25** (1):49-51.
- NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eleventh informational supplement. National Committee for Clinical Laboratory Standards document. Wayne, PA: NCCLS Press. January; 2001.M100-S11.
- Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase-production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**:90-103.
- Baquero MR, Nilsson AI, Sandvang D, Galan J, Martinez JL. Polymorphic mutation frequencies in *Escherichia coli*: emergence of weak mutators in clinical isolates. *J Bacteriol*; 2004; **186**:5538-5542.

22. Barlow M, Hall, BG. Origin and evolution of the *AmpC* β -lactamases of *Citrobacter freundii*, *Antimicrob Agents Chemother*; 2002;**46**:1190-98.
23. Murray P, Jo baron E, H.Jorgensen J, A. faller M, H.Yolken R. Manual of clinical microbiology. 8th Ed. New York: ASM press; 2003. 110-120.
24. Ali Shah A, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics , epidemiology and clinical importance of gram negative bacilli producing extended – spectrum β –lactamases. *Research* ; **88**:304-317.
25. Lucet JC, Chevert S, Decre D, et al. Outbreak of multiply resistant entrobactriacae in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition. *Clinical Infectious Disease*; 1996; **22**:430-436.
26. mangeney N , Niel P , Paul G. A 5 year epidemiological study of extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a medium and long stay neurological unit. *J Appl Moicrobiol*; 2000
in Microbiology; 2004; **155**: 409-21.