بررسی فراوانی پورین های Ompk35 و Ompk36 در سویه های کلبسیلاپنومونیه تولیدکننده بتالاکتاماز و فاقد بتالاکتاماز

پگاه شکیب[۱]، نورخدا صادقی فرد[*۲]، محمدرضا ذوالفقاری[۱]، سبحان غفوریان[۲]، عباس ملکی[۲]، رضا محبی[۲]، رضا رنجبر[۳]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

۲) مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

۳) مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۲۹ **تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱۶**

چکیده

مقدمه: کلبسیلاپنومونیه پاتوژن فرصت طلبی است که امروزه به عنوان یکی از مهم ترین باکتری های دخیل در عفونت های بیمارستانی است و سبب بیماری های مختلفی مانند عفونت دستگاه ادراری، سپتی سمی، پنـــومونی و عفونت های داخل شکمی در بیماران بستری در بیمارستان می گردد. در این مطالعه به بررسی بیان پورین های غشای خارجی در کلبسیلاپنومونیه و ارتباط آن با آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف پرداخته شد.

مواد و روش ها: ایزوله های باکتری با روش های مرسوم آزمایشگاهی شناسایی شدند. برای شناسایی سویه های تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف، حساسیت سویه ها به آنتی بیوتیک های بتالاکتام سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفپودوکسیم، آزوترونام اندازه گیری شد. سویه های تولیدکننده آنزیم های بتالاکتاماز با طیف گسترده با استفاده از دیسک های ترکیبی، سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید، سفوتاکسیم کلاوولانیک اسید، سفپودوکسیم/کلاوولانیک اسید تائید شدند. در مرحله بعد با استفاده از PCR و SDS-PAGE وجود و بیان این پورین ها در سویه های کلبسیلاپنومونیه تولید کننده بتالاکتاماز و فاقد بتالاکتاماز بررسی شد.

یافته های پژوهش: در بین ایزوله ها، ۴۲/۳۰ در صد با روش های تأییدی و PCR حاوی ESBL بودند. جهت مقایسه بیان پورین های OmpK35 و OmpK36 در سویه های تولید کننده ESBL و فاقد ESBL، به تعداد مساوی از آن ها انتخاب و مشاهده شد که بیان پورین های OmpK35 و OmpK36 در سویه های دارای ESBL به ترتیب ۵۴/۵۴ درصد و۷۲/۷۲ درصد است، در حالی که بیان پورین های OmpK35 و OmpK36 در سویه های فاقد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف به ترتیب ۹۵/۴۵ و ۱۰۰ درصد بود.

بحث و نتیجه گیری: تقریباً بیشتر ایزوله های بالینی کلبسیلاپنومونیه فاقد بتالاکتاماز وسیع الطیف هر دو پورین OmpK35 و OmpK36 را بیان می کردند، در حالی که درصد کمتری از ایزوله های کلبسیلاپنومونیه دارای ESBL، OmpK36 و OMPK35 را بیان می کردند. از این مطالعه می توان نتیجه گرفت که در سویه های تولید کننده ESBL بیان پورین ها کاهش می یابد به صورتی که ارتباط معکوس بین کاهش بیان پورین ها و افزایش مقاومت وجود دارد.

واژه های کلیدی: بتالاکتاماز وسیع الطیف(ESBL)، پورین OmpK35، OmpK36

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

Email: sadeghifard@gmail.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-18]

مقدمه

کلبسیلاپنومونیه پاتوژن فرصت طلبی است که امروزه به عنوان یکی از مهمترین باکتری های دخیل در عفونت های بیمارستانی شناخته می شود و سبب بیماری های مختلفی مانند عفونت دستگاه ادراری، سپتی سمی، پنومونی و عفونت های داخل شکمی در بیماران بستری در بیمارستان می گردد،(۲۱). عفونت های کلبسیلا در خارج از بیمارستان کمتر دیده می شود،(۲۱). این ارگانیسم به دلیل اکتساب پلاسمیدهای کدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف(ESBL) Extended Spectrum Beta (Lactamases)، به تعدادی از آنتی بیوتیک ها از جمله سفالوسپورین های وسیع الطیف مقاوم شده اند. از این رو درمان عفونت های ناشی از این باکتری علی رغم آسان بودن راه های شناسایی آن با شکست روبرو می شود. تولید بتالاکتاماز های وسیع الطیف Extended Spectrum Beta (Lactamases) با استفاده قبلی از آنتی بیوتیک ها مرتبط می باشد،(۳،۱۲،۲۱). بتالاکتامازهای وسیع الطیف در کلبسیلاپنومونیه اولین بار در سال ۱۹۸۳ در آلمان شناخته شدند،(۲۱). امبلر این آنزیم ها را بر اساس تشابه توالی و مکانیسم های کاتالیتیک به چهار گروه اصلی شامل کلاس های A، B، C و D تقسیم کردند،(۶). کلاس های A، C و D که در مکانیسم فعالیتشان یک سرین در جایگاه فعال خود دارند، در حالی که بتالاکتامازهای کلاس B به کاتیون های دو ظرفیتی(zn+2) برای هیدرولیز بتالاکتام نیاز دارند. آنزیم های بتالاکتاماز در تقسیم بندی دیگری توسط بوش، جاکوبی، و مدیروس بر اساس پروفایل سوبسترا، ممانعت کنندگی و خصوصیات فیزیکی نظیر وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، به چهار گروه ۱ تا ۴ طبقه بندی شده اند،(۲۱). نمونه های بالینی کلبسیلاپنومونیه بیشتر دارای بتالاکتامازهای وسیع الطیف TEM و SHV می باشند که متعلق به گروه دو بتالاکتامازها بر طبق تقسیم بندی بوش، جاکوبی، مدیروس و مطابق با گروه بندی امبلر در کلاس A قرار دارند،(۲،۱۷). این آنزیم ها در اصل موتانت های TEM-1، TEM-2 و SHV- 1 هستند. امروزه بیش از ۹۰ تیپ TEM و بیش از ۲۵ تیپ SHV وجود دارد. تیپ های TEM و SHV بتالاکتامازهای وسیع الطیف اغلب در اشریشیاکلی و کلبسیلاپنومونیه وجود دارند. برای مثال TEM-1 در کلبسیلا و بسیاری از سویه های دیگر، به تنهایی یا همراه با SHV- 1 انتشار یافته است.(۲)

اپیدمیولوژی مقاومت ناشی از بتالاکتاماز وسیع الطیف هدف چندین پروژه بوده است. تحقیقاتی که در طول سال های ۱۹۹۱-۱۹۸۷ انجام شده است، نشان می دهند که مقاومت به سفتازیدیم از ۱ درصد در سال های ۱۹۸۹-۱۹۸۷ به ۴۰ درصد در ۱۹۹۱-۱۹۹۰ رسیده است. در مطالعه ای که در نیویورک انجام شده است نشان می دهد که ۱۶ درصد کلبسیلاپنومونیه های جدا شده به سفتازیدیم مقاوم بودند. در کلبسیلاپنومونیه پلی ساکارید کپسولی، LPS، و برخی پروتئین های غشای خارجی (OMP) تعیین کننده بیماری زایی هستند، اما نقش پورین های کلبسیلاپنومونیه در مقاومت آنتی بیوتیکی تاکنون به طور دقیق بررسی نشده است،(۱). یک خانواده از این OMPs، پورین ها هستند که در مقادیر بالایی در غشای خارجی حضور دارند و همه پورین های شناخته شده به لحاظ ساختاری، مجموعه ای از ۳ بتابارل موازی هستند که هر یک از آن ها، حاوی یک زنجیره پلی پپتید منفرد می باشند،(۸). پورین های اصلی کلبسیلاپنومونیه OmpK35 و OmpK36 هستند که OmpK35 شبیه OmpF در باکتری اشریشیاکلی است که بیان آن در شرایط اسمولاریته بالا کاهش می یابد در حالی که OmpK36 مشابه OmpC در اشریشیاکلی است، که در شرایط اسمولاریته بالا که معمولاً به وسیله غلظت های بالای نمک ایجاد می شوند، بیان می شود،(۴،۱۱،۱۵،۱۸). پورین های غشا خارجی کلبسیلاپنومونیه در حفاظت در مقابل چالش کشندگی با گونه های همولوگ یا مشابه، در فعال سازی سیستم کمپلمان، در اکتساب آهن و در تراوایی برای عوامل آنتی میکروبی درگیر می شوند. در مقایسه با باکتری هایی همانند اشریشیاکلی، در مورد OMP های کلبسیلاپنومونیه کمتر مطالعه شده است،(۱۰). ژن پورین های اصلی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-18]

کلبسیلاپنومونیه Ompk36 و Ompk35 کروموزوم قرار داد و در صورت ورود پلاسمید حاوی آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف به سویه ها و ایجاد موتاسیون از بیان این پوریـــن ها جلوگیری می شود. پس با ورود ترانسپوزون ها به داخل ژن Ompk36، این ژن به خوبی بیان و پورین تولید نمی شود،(۱۹). در این مطالعه به بررسی فراوانی پورین های Ompk35 و Ompk36 در ایزوله های کلبسیلاپنومونیه تولید کننده ESBL و فاقد ESBL پرداخته شد.

مواد و روش ها

جداسازی و تشخیص باکتری: نمونه های بالینی از بیمارستان های امام خمینی(ره)، قائم و مصطفی خمینی شهر ایلام و بیمارستان میلاد تهران انجام شد. در این مطالعه ۵۲ سویه کلبسیلا پنومونیه از عـفـونت های مجاری ادراری جـداسازی شدند. کلیه سویه ها با استفاده از روش های استاندارد تشخیصی و بیوشیمیایی تائید شدند.

جداسازی باکتری های تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز: جدا سازی باکتری های تولید کننده آنزیم بتالاکتامـــــاز با اسـتـــفاده از روش دیـــسک دیفیـــوژن(Kirby-Baure) صـــــورت گـــــرفت. دیسک های تهیه شده از شرکت هایمدیا به شرح زیر می باشند: سفتازیدیم (30µg)، سفوتاکسیم(30µg)، سفودوکسـیم(30µg)، سفتریاکـــــسون(30µg) و آزترونام(30µg). بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد، نتـــــایج آنتی بیوگرام با استـفاده از جـــــدول استـــــانـــــدارد قـــــرائت گـــــردید.(NCCLS, Wayne,PA1998)

تست تائیدی فنوتیپی: در این روش کلیـــه سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک های بتالاکتام مورد استفاده در مرحله قبل مورد آزمایش قرار گرفتند. هدف از این آزمایش جداسازی سویه های تولید کننده آنزیم ESBL بود. دیسک های مورد استفاده در این مرحله، سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید، سفوتاکسیم کلاوولانیک اسید، سفپـــــودوکسیم/کلاوولانیک اسید(تهیه شده از شرکت های مدیا) بودند. بعد از انکوباسیون در ۳۷ درجه ســـــانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت چنان چه قطر هاله عدم رشد در حضـــــور دیسک های ترکیبی در مقایسه با دیسک های سفـــــالوسپوریـــــن ها ۵ میلی متر یا بیشتر باشد به عنـــــوان سویه تـــــولید کـــنـده ESBI مـــــدنظـــــر قـــرار می گیـــــرد.

بـــــررسی پورین های Ompk35 و Ompk36: با استفـــــاده از روش واکنش زنجیـــــره پلیمرازی وجـــــود ژن کدکننـــــده این پـــــورین ها در ســـــویه های کلبسیـــــــلاپنومونیه تـــــایید شد. تـــــوالی پرایمرهای مورد استفـــــاده در جـــــدول شـــماره ۱ نشـــــان داده شـــده است.

جدول شماره ۱ . توالی پرایمرهای مورد استفاده در روش PCR

primers	Sequence of primers	Size of amplicon
Ompk35	F: 5-ATGGCGACACCAGCAGCGAC - 3 R: 5-CGTAGCCGATGGACGGACGC - 3	717 bp
Ompk36	F: 5–ACAACGGTCGTGGCGCTCTG -3 R: 5- ACCGGCGCTGCGAGTGAAAT-3	512 bp

در مرحله بعد ایزوله های باکتری بر روی محیط نوترینت براث(عصاره گوشت، پپتون پروتئاز) به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند و هنگام رسیدن باکتری به فاز لگاریتمی سوسپانسیون باکتری با دور g ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوب را در ۲۰ میلی لیتر Tris-Mg حل گردید. سپس سونیکاسیون سلول های شناور به مدت ۱۵ ثانیه انجام گرفت. در ادامه با سانتریفیوژ محلول به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد، و رسوب را در محلول لوریل سدیم ۲ درصد به میزان ۱۰ میلی لیتر حل گردید. در مرحله بعد محلول به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. مجدداً محلول مورد نظر در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت سانتریفیوژ گردید و مایع رویی جدا شد. سپس به رسوب آب مقطر اضافه کرده و بدین ترتیـــب پروتئین های غشـــــای خارجی جداســـــازی شدند. در مـــــرحله بعـد با SDS- PAGE وجود پورین ها مورد بررسی قرار گرفتند.(۲۲)

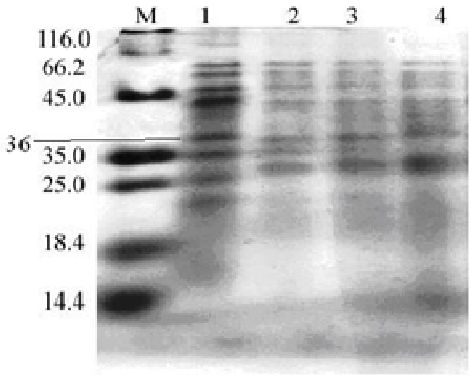
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-18]

یافته های پژوهش

در این بررسی به ترتیب ۴۶/۱۵ درصد، ۲۱/۱۵ درصد، ۲۱/۱۵ درصد، ۴۲/۳۰ درصد، ۴۲/۳۰ درصد از سویه ها به سفتازیدیم سفوتاکسیم و سفتریاکسون و سفپودوکسیم و آزوترونام، مقاوم بودند. از میان سویه هایی که مقاوم به یکی از سفالوسپورین های نسل سوم و آزوترونام بودند، با تست های تائیدی فنوتیپی(با استفاده از دیسک های ترکیبی) مشخص شد که از میان ۵۲ ایزوله، ۳۰ مورد تولیدکننده ESBL و ۲۲ مورد فاقد ESBL هستند.

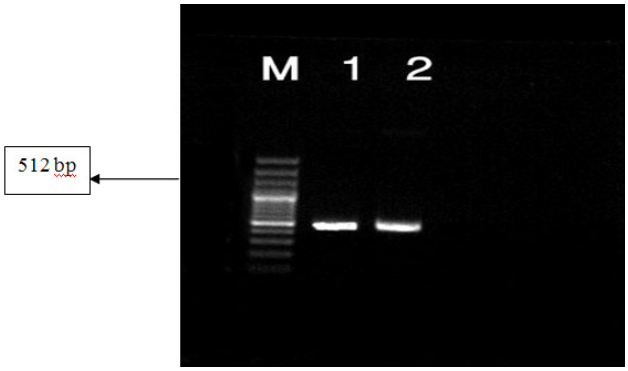
جهت مقایسه بیان پورین ها در سویه های تولیدکننده ESBL و سویه های فاقد ESBL به تعداد مساوی از این سویه ها انتخاب گردید. در بین ۲۲ سویه فاقد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف مورد آزمایش، تمامی سویه ها به جز یک مورد هر دو پورین Ompk35 و Ompk36 را بیان کردند(یک مورد فقط Ompk36 رابیان نمود).

به طور کلی باند 35KD و 36KD در ژل SDS برای همه سویه ها(جز یک مورد) مشاهده شد که نشان دهنده بیان این پورین ها در اکثر سویه های فاقد بتالاکتاماز وسیع الطیف(NON-ESBL) می باشد. اما در میان ۲۲ سویه تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف(ESBL)، ۱۲ سویه فقط پورین Ompk35 را بیان کردند و ۱۶ سویه نیز فقط پورین Ompk36 را بیان نمودند،(شکل شماره ۱). به طور کلی بیان پورین های Ompk35 و Ompk36 در سویه های تولید کننده آنزیم بتالاکتامازهای وسیع الطیف(ESBL) به ترتیب ۵۴/۵۴ درصد و ۷۲/۷۲ درصد بود. اما بیان این پورین ها(Ompk35 و Ompk36) در سویه هایی که فاقد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف(ESBL) بودند، به ترتیب ۹۵/۴۵ درصد و ۱۰۰ درصد بود. با روش PCR مشخص گردید همه سویه های کلبسیلاپنومونیا دارای ژن های Ompk35 و Ompk36 هستند.

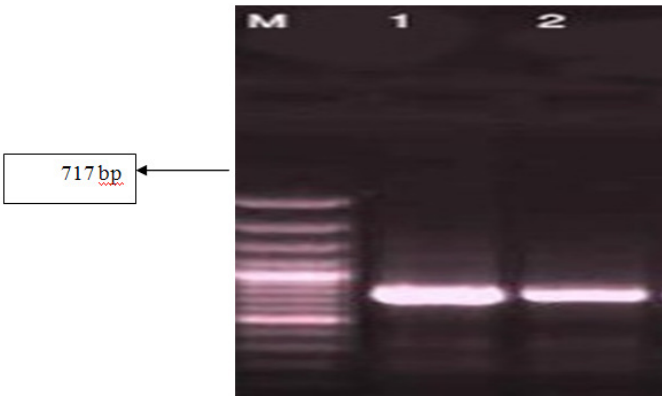


شکل شماره ۱. تصویر ژل SDS-PAGE پروتئین های غشاء خارجی ایزوله های کلبسیلاپنومونیه
ردیف M: مارکر (SM0431)
ردیف ۱و ۲ : سویه های تولید کننده هر دو پورین Ompk35 و Ompk36
ردیف ۳ و ۴ : سویه های تولید کننده پورین Ompk36

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-18]



شکل شماره ۲. تصویر الکتروفورز ژل محصول PCR مربوط به ژن Ompk36
ردیفM: مارکرمولکولی ۱۰۰ جفت بازی
ردیف ۱ : سویه‌کلبسیلاپنومونیه دارای ESBL
ردیف ۲ : سویه کلبسیلاپنومونیه فاقد ESBL



شکل شماره ۳. تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن Ompk35
ردیف M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی
ردیف ۱ : سویه‌کلبسیلاپنومونیه دارای ESBL
ردیف ۲ : سویه کلبسیلاپنومونیه فاقد ESBL

بحث و نتیجه گیری

پورین ها در کنش متقابل محیط خارجی و باکتری ها نقش اساسی را ایفا می کنند و در مقادیر زیادی در غشای خارجی باکتری های گرم منفی حضور دارند. از پورین های غشاء خارجی می توان به OmpC و OmpF در اشریشیاکلی و سایر انتروباکتریاسه ها اشاره نمود. در این تحقیق وجود دو پورین Ompk35 و Ompk36 با روش SDS-PAGE بررسی گردید. این پورین ها در مقادیر زیادی از سویه های کلبسیلاپنومونیه بدون در نظر گرفتن منبع جداسازی آن ها، یافت می شوند. نام اغلب پروتئین های غشای خارجی در کلبسیلاپنومونیه بر گرفته از وزن مولکولی آن ها می باشد، مانند Ompk35 و Ompk36 و Ompk37. از جمله نقش هایی که برای پورین های اصلی کلبسیلاپنومونیه در نظر گرفته شده است کمک به نفوذپذیری نسبت به آنتی بیوتیک های از جمله سفتازیدیم و سفوتاکسیم می باشد. در این باکتری با ورود پلاسمیدهای کدکننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف(ESBL) شاهد مقاومت آنتی بیوتیکی به ویژه به آنتی بیوتیک های بتالاکتام هستیم. در واقع در این باکتری پس از ورود پلاسمیدهای کدکننده ESBL، موتاسیون در سکانس ژنی این پورین ها ایجاد می شود که از بیان آن ها جلوگیری می کند. در صورت عدم

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-18]

بیان این پورین ها(Ompk35 و Ompk36) به مقاومت سویه ها در برابر آنتی بیوتیک های بتالاکتام کمک قابل توجهی می نماید، زیرا همان طور که اشاره شد در تراوایی آنتی بیوتیکی دخالت دارند. بنا بر این فراوانی تولید این پورین ها را در سویه های حساس و سویه های مقاوم با بتالاکتاماز را مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق مشاهده شد که سویه های کلبسیلاپنومویه دارای ESBL، Ompk36 بیشتر از Ompk35 بیان می نمایند و در سویه های فاقد ESBL نسبت به سویه های تولیدکننده ESBL این پورین ها بیشتر بیان می شوند. در میان سویه های فاقد ESBL تنها یک سویه یافت شد که Ompk35 را بیان نکرد و تمامی سویه ها Ompk36 را بیان کردند. در سویه های تولیدکننده ESBL تنها یک سویه فاقد هر دو پورین مشاهده شد. در بررسی هایی هم که در سال ۱۹۹۹ توسط مارتینز و همکاران در دانشگاه سویل بر روی پورین Ompk36 و مقاومت به کاربانم ها و سفالوسپورین ها انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که عدم بیان پورین ها از جمله Ompk36 به مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های دارای آنزیم های TEM و SHV کمک می کند و یا این که فقدان پورین همراه آنزیم AmpC باعث افزایش مقاومت به اگزاایمینو بتالاکتامام ها می شود،(۱۸). در سال ۲۰۰۷ در کره جنوبی لی و همکاران در بررسی روی ۴۲ نمونه اظهار کردند که کاهش حساسیت به ایمی پنم در میان سویه های کلبسیلاپنومونیه به خاطر حضور پلاسمید AmpC و کاهش بیان پورین های Ompk36 و Ompk35 می باشد،(۱۳). در مطالعه گولمز و همکاران در ترکیه در بررسی ایزوله های اشریشیاکلی و کلبسیلاپنومونیه دارای OXA-48 مشاهده نمودند که بیان پورین ها متوقف می شود و نتیجه گرفتند که به این نتیجه رسیدند که سویه های جدا شده دارای مقاومت بالا به کاربانم ها بوده و پورین های اصلی را بیان نمی کنند،(۹). هر ناندز نیز در مطالعه خود در بررسی ارتباط بین تغییر غشای خارجی و حساسیت به عوامل ضد میکروبی در میان سویه های کلبسیلاپنومونیه دریافت که افزایشMIC برای آمینوگلیکوزیدها، فلوروکوئینولون ها، تتراسایکلین و کلرامفنیکل در سویه هایی که نقص در پورین پیدا نمودند، مشاهده نشد، اما MIC نسبت به آمپی سیلین، سفالوتین، سفوکسیتین، سفوتاکسیم و سفتازیدیم برای سویه هایی که نقص در پورین مشاهده شد که نتیجه گرفتند نقص در پورین فاکتوری برای افزایش مقاومت به عوامل ضد میکروبی نیست اما همراه با تولید بتالاکتامازها باعث افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام می شود،(۱۵). بنا بر این، با توجه به نتایج این مطالعه و مقایسه با نتایج مطالعات گذشته که به مواردی از آن ها اشاره شد، همواره در سویه های تولیدکننده ESBL فراوانی تولید پورین های اصلی کلبسیلاپنومونیه(Ompk35 و Ompk36) کمتر از سویه های فاقد ESBL می باشد.

References

1-Albertí S, Rodríquez-Quiñones F, Schirmer T, Rummel G, Tomás JM, Rosenbusch JP, et al. A Porin from klebsiella pneumoniae: Sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. Infect Immun 1995; 63:903-10.

2-Carmen Conejo M, Hernández R, Pascual Á. Effect of porin loss on the activity of tigecycline againstKlebsiella pneumoniae producing extended-spectrum β-lactamases or plasmid-mediated AmpC-type β-lactamases. Diagnostic Microbiology Infectious Disease 2008;61:343-5.

3-Corvec S, Caroff N, Cosano D. Increased resistance to β- lactams in a Klebsiella pneumoniae strain: role of a deletion downstream of the pribnow box in the bla shv-1 promoter. Int J Antimicrobial Agents 2006;28:308-12.

4-Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, del Carmen Conejo M, Pascual A, Tomás JM, et al. Role of klebsiella pneumoniae OmpK35 Porin in Antimicrobial Resistance. Antimicrob Agents Chemother 2003;47: 3332-5.

5-Dutzler R, Rummel G, Albertí S, Hernández-Allés S, Phale P, Rosenbusch J,

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-18]

et al. Crystal structureand functional characterizationof OmpK36, the nosmoporin of klebsiella pneumoniae. Structure 1999;7:425-34.
6-Fahd K, Isabel C, Timothy G. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. Int J Med Microbiol 2002;292: 127-37.
7-Fukigai S, Alba J, Kimura S. Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in a general hospital in Japan. Int J Antimicrobial Agents 2007;29:306-10.
8-Georg E. The structure of bacterial outer membrane proteins. Biochimica Biophysica Acta 2002;1565:308-17.
9-Gülmez D, Woodford N, Palepou M, Mushtaq S. Carbapenem-resistant escherichia coli and klebsiella pneumoniae isolates from turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. Int J Antimicrobial Agents 2008;31:523-6.
10-Hernandez S, Albert S, Jose Gil. Porin expression in clinical isolates of Klebsiella pneurnoniae. Microbiology1999;145:673-9.
11-Hernández-Allés S, Conejo M , Pascual A. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of klebsiella pneumoniae. J Antimicrobial Chemotherapy 2000;46:273-7.
12-K. Poole. Resistance to b-lactam antibiotics, CMLS 2004;2200-223.
13-Lee K, Yong D, Choi Y. Reduced imipenem susceptibility in klebsiella pneumoniae clinical isolates with plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1 β-lactamases co-mediated by porin loss. Int J Antimicrobial Agents 2007;29:201-6.
14-Martínez-Martínez L, Pascual A, Hernández-Allés S, et al. Roles of β-Lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1669-73.
15-Ngoc Nguyen T, Samuelson P. Chromosomal sequencing using a PCR-based biotin-capture method allowed isolation of the complete gene for the outer membrane protein A of klebsiella pneumoniae. Gene 1998;210:93-101.
16-Podschun R and U. Ullmann. Klebsiella spp as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998; 11:589-603.
17-Essack SY, Hall LM, Livermore DM. Klebsiella pneumoniae isolate from south africa with multiple TEM,SHV and β-lactamase. Int J Antimicrob Agents 2004; 23:398-400.
18-Škopková M, Siebor E, Rovná D. Outer membrane protein profiles of clonally related Klebsiella pneumonia e isolates that differ in cefoxitin resistance. FEMS Microbiology Letters 2005;243:197-203.
19-Song W. In vivo selection of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae by OmpK36 loss during meropenem treatment. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2009; 65:447-9.
20-Soo Parka Y, Yoob S, Seoc M, Kima J. Risk factors and clinical features of infections caused by plasmid-mediated AmpC β-lactamase-producing enterobacteriaceae. Int J Antimicrobial Agents 2009;34:38-43.
21-Urbanb C. Klebsiella and extended spectrum β-lactamases. Int J Antimicrobial Agents1999;8:2045-60.
22-Vicente BJ, Luis MM. Outter Membrane Profiles of Clonally Related Klebsiella pneumoniae. Methods Mol Med 2001;48: 189-197.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-18]

Frequency of Ompk35 And Ompk36 in Strains of Klebsiella Pneumonia Producing Extended Spectrum Beta-lactamases And Non-extended Spectrum Beta-lactamases

Shakib P[1], Sadeghifard N[2], Zolfaghary M.R[1], Gafouryan S[2], Maleki A[2], Mohebi R[2], Ranjbar R[3]*

(Received: 20 Sep. 2010 Accepted: 7 Dec. 2011)

Abstract

Introduction: Klebsiella pneumonia is a major nosocomial pathogen causing pneumonia, urinary tract infections, and bacteremia, particularly in immune-compromised patients. The aim of our study was expression of OMPK36 and OMPK35 in ESBLs production and non-ESBLs K.pneumoniae.

Materials & Methods: Clinical isolates of K.pneumoniae were identified. ESBLs were assayed by Phenotypic (screening and confirming) and genotypic (PCR) methods. OMPK35 and OMPK36 were tested by polymerase chain reaction and SDS- PAGE.

Findings: Our findings showed that 42.3% of K.pneumoniae were ESBLs positive. Twenty-two K.pneumoniae producing ESBLS and Twenty-two non-ESBLs K.pneumoniae were selected for porines detection. We found out that 54.54% and 72.72% of K.pneumoniae producing ESBLS were positive for Ompk35 and Ompk36 respectively, while our findings in non-ESBLs K.pneumoniae showed that 95.94% and 100% of isolates were positive for Ompk35 and Ompk36, respectively.

Discussion & Conclusion: Many of clinical isolates of non- ESBL K. pneumoniae had expressed both Ompk35 and Ompk36 porins, while our results in ESBLs positive K.pneumoniae had only showed expression of Ompk36. A few of non-ESBLs and ESBLs K.pneumoniae were found as negative for both OMPK35 and OMPK36. Our findings released that lack of porins in K.pneumoniae are defined as an antibiotic- resistant mechanism in many isolates.

Keywords: ESBLs(Extended spectrum beta-lactamases), Ompk35, Ompk36

1. Dept of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad Uuiversity of Qom, Qom, Iran
2. Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
3. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
**(corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-18]