بررسي فراواني پورين هاي Ompk35 و Ompk36 در سويه های کلبسیلاپنومونیه تولیدکننده بتالاکتاماز و فاقد بتالاکتاماز

پگاه شکیب[1]، نورخدا صادقی فرد[2*]، فرضا ذوالفقاری[1]، سبحان غفوریان[2]، عباس ملکی[2]، رضا محبی[2]، رضا رنجبر[3]

1) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
2) مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
3) مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران

تاریخ دریافت: 89/6/29 **تاریخ پذیرش: 90/9/16**

چکیده

مقدمه: کلبسیلاپنومونیه پاتوژن فرصت طلبي است که امروزه به عنوان يكي از مهم ترين باكتری های دخيل در عفونت هاي بيمارستاني است و سبب بيماري هاي مختلفي مانند عفونت دستگاه ادراري، سپتي سمي، پنـــومـوني و عفونت هاي داخل شكمي در بيماران بستري در بيمارستان مي گردد. در اين مطالعه به بررسي بيان پورين هاي غشاي خارجي در کلبسیلاپنومونیه و ارتباط آن با آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف پرداخته شد.

مواد و روش ها: ایزوله های باکتری با روش هاي مرسوم آزمایشگاهی شناسايي شدند. براي شناسايي سويه هاي توليدكننده آنزيم بتالاكتاماز وسيع الطيف، حساسيت سويه ها به آنتي بيوتيك هاي بتالاكتام سفتازيديم، سفوتاكسيم، سفتريـاكسون، سفپودوكسيم، آزوترونام اندازه گیری شد. سويه هاي توليدكننده آنزيم هاي بتالاكتاماز با طيف گسترده با استفاده از ديسك هاي تركيبي، سفتازيديم/كلاوولانيك اسيد، سفوتاكسيم كلاوولانيك اسيد، سفپودوكسيم/كلاوولانيك اسيد تائيد شدند. در مرحله بعد با استفاده از PCR و SDS-PAGE وجود و بيان اين پورين ها در سويه های کلبسیلاپنومونیه توليد كننده بتالاكتاماز و فاقد بتالاكتاماز بررسی شد.

يافته هاي پژوهش: در بين ايزوله ها، 42/30 در صد با روش های تأییدی و PCR حاوی ESBL بودند. جهت مقایسه بیان پورین OmpK35، OmpK36 و فاقد ESBL، به تعداد مساوي از آن ها انتخاب و مشاهده شد که بيان پورين هاي OmpK35 و OmpK36 در سويه هاي داراي ESBL به ترتيب 54/54 درصد و 72/72 درصد است، در حالي كه

واژه های کلیدی: پورین OmpK35، OmpK36، ESBL

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
Email: sadeghifard@gmail.com

An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

مقدمه

كلبسيلاپنومونيه پاتوژن فرصت طلبي است كه امروزه به عنوان يكي از مهم ترين باكتری های دخيل در عفونت هاي بيمارستاني شناخته می شود و سبب بيماري هاي مختلفي مانند عفونت دستگاه ادراري، سپتي سمي، پنوموني و عفونت هاي داخل شكمي در بيماران بستري در بيمارستان مي گردد، (21). عفونت هاي كلبسيلا در خارج از بيمارستان كمتر ديده مي شود، (21). اين ارگانيسم به دليل اكتساب پلاسميدهاي كدكننده بتالاكتامازهاي وسيع الطيف (ESBL) Extended Spectrum (Beta Lactamases)، به تعدادي از آنتي بيوتيك ها از جمله سفالوسپورين هاي وسيع الطيف مقاوم شده اند. از اين رو درمان عفونت هاي ناشي از اين باكتري علي رغم آسان بودن راه هاي شناسايي آن با شكست روبرو مي شود. توليد بتالاكتامازهاي وسيع الطيف Extended Spectrum Beta Lactamases) با استفاده قبلي از آنتی بيوتيک ها مرتبط می باشد، (3،12،21).

بتالاكتامازهاي وسيع الطيف در كلبسيلاپنومونيه اولين بار در سال 1983 در آلمان شناخته شدند، (21). امبلر اين آنزيم ها را براساس تشابه توالي و مكانيسم هاي كاتاليتيك به چهار گروه اصلي شامل كلاس هاي A، B، C و D تقسيم كردند، (6). كلاس هاي A، C و D كه در مكانيسم فعاليتشان يك سرين در جايگاه فعال خود دارند، در حالي كه بتالاكتامازهای كلاس B به كاتيون هاي دو ظرفيتي (zn+2) براي هيدروليز بتالاكتام نياز دارند. آنزيم های بتالاكتاماز در تقسيم بندي ديگري توسط بوش، جاكوبي، و مديروس براساس پروفايل سوبسترا، ممانعت كنندگي و خصوصيات فيزيكي نظير وزن مولكولي، نقطه ايزوالكتريك، به چهار گروه 1 تا 4 طبقه بندي شده اند، (21). نمونه هاي باليني كلبسيلاپنومونيه بيشتر داراي بتالاكتامازهاي وسيع الطيف TEM و SHV مي باشند كه متعلق به گروه دو بتالاكتامازها بر طبق تقسيم بندي بوش، جاكوبي، مديروس و مطابق با گروه بندي امبلر در كلاس A قرار دارند، (2،17). اين آنزيم ها در اصل موتانت هاي TEM-1، TEM-2 و SHV- 1 هستند. امروزه بيش از 90 تيپ TEM و بيش از 25 تيپ SHV وجود دارد. تيپ هاي TEM و SHV بتالاكتامازهای وسيع الطيف اغلب در اشريشياكلي و كلبسيلاپنومونيه وجود دارند. براي مثال TEM-1 در كلبسيلا و بسياري از سويه هاي ديگر، به تنهايي يا همراه با SHV- 1 انتشار يافته است. (2)

اپيدميولوژي مقاومت ناشي از بتالاكتاماز وسيع الطيف هدف چندين پروژه

An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

بوده است. تحقیقاتی که در طول سال های 1991-1987 انجام شده است، نشان می دهند که مقاومت به سفتازیدیم از 1 درصد در سال های 1989-1987 به 40 درصد در 1991-1990 رسیده است. در مطالعه ای که در نیویورک انجام شده است نشان می دهد که 16 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، (1). 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 3 بتابارل موازی هستند که هر یک از آن ها، حاوی یک زنجیره پلی پپتید منفرد می باشند، (8). 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، (4،11،15،18). 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، (10). ژن پورین های اصلی 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 پورین ها جلوگیری می شود. پس با ورود ترانسپوزون ها به داخل ژن Ompk36، این ژن به خوبی بیان و پورین تولید نمی شود، (19). 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 52 سویه کلبسیلاپنومونیه از عفونت های مجاری ادراری جداسازی شدند. کلیه سویه ها با استفاده از روش های استاندارد

An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

تشخيصي و بيوشيميايي تائيد شدند.

جداسازي باكتري هاي توليد كننده آنزيم بتالاكتاماز: جدا سازي باكتري هاي توليد كننده آنزيم بتالاكتامـاز با استفاده از روش ديسك ديفيوژن (Kirby-Baure) صورت گرفت. ديسك هاي تهيه شده از شركت هايمديا به شرح زير مي باشند: سفتازيديم (30µg)، سفوتاكسيم (30µg)، سفودوكسيم (30µg)، سفترياكسون (30µg) و آزترونام (30µg). بعد از 24 ساعت انكوباسيون در 37 درجه سانتي گراد، نتايج آنتي بيوگرام با استفاده از جدول استاندارد قرائت گرديد. (NCCLS, Wayne,PA1998)

تست تائيدي فنوتيپي: در اين روش كليه سويه هاي مقاوم به آنتي بيوتيك هاي بتالاكتام مورد استفاده در مرحله قبل مورد آزمايش قرار گرفتند. هدف از اين آزمايش جداسازي سويه هاي توليد كننده آنزيم ESBL بود. ديسك هاي مورد استفاده در اين مرحله، سفتازيديم/كلاوولانيك اسيد، سفوتاكسيم كلاوولانيك اسيد، سفپودوكسيم/كلاوولانيك اسيد (تهيه شده از شركت هاي مديا) بودند. بعد از انكوباسيون در 37 درجه سانتي گراد به مدت 24 ساعت چنانچه قطر هاله عدم رشد در حضور ديسك هاي تركيبي در مقايسه با ديسك هاي سفالوسپورين ها 5 ميلي متر يا بيشتر باشد به عنوان سويه توليد كننده ESBI مدنظر قرار مي گيرد.

بررسي پورين هاي Ompk35 و Ompk36: با استفاده از روش واكنش زنجيره پليمرازي وجود ژن كدكننده اين پورين ها در سويه هاي كلبسيلاپنومونيه تاييد شد. توالي پرايمرهاي مورد استفاده در جدول شماره 1 نشان داده شده است.

جدول شماره 1 . توالي پرايمرهاي 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 ايزوله هاي باكتري بر روي محيط نوترينت براث (عصاره گوشت، پپتون پروتئاز) به مدت 18 ساعت انكوبه شدند و هنگام رسيدن باكتري به فاز لگاريتمي سوسپانسيون باكتري با دور g 10000 به مدت 20 دقيقه سانتريفوژ گرديد و رسوب را در 20

An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

میلي ليتر Tris-Mg حل گرديد. سپس سونيكاسيون سلول هاي شناور به مدت 15 ثانيه انجام گرفت. در ادامه با سانتريفيوژ محلول به مدت يك ساعت در دماي 4 درجه سانتي گراد، و رسوب را در محلول لوريل سديم 2 درصد به ميزان 10 ميلي ليتر حل گرديد. در مرحله بعد محلول به دست آمده به مدت 30 دقيقه در دماي اتاق نگهداری شد. مجدداً محلول

يافته های پژوهش

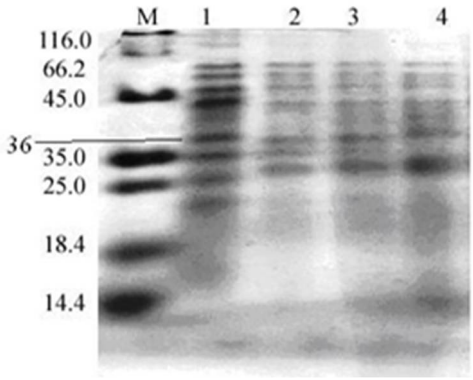
در اين بررسي به ترتيب 46/15 درصد، 21/15 درصد، 21/15 درصد، 42/30 درصد، 42/30 درصد از سويه ها به سفتازيديم سفوتاكسيم و سفتريا كسون و سفپودوكسيم و آزوترونام، مقاوم بودند. از ميان سويه هايي كه مقاوم به يكي از سفالوسپورين هاي نسل سوم و آزوترونام بودند، با تست هاي تائيدی فنوتيپي (با استفاده از ديسك هاي تركيبي) مشخص شد كه از ميان 52 ايزوله، 30 مورد توليدكننده ESBL و 22 مورد فاقد ESBL هستند.

جهت مقايسه بيان پورين ها در سويه هاي توليدكننده ESBL و سويه هاي فاقد ESBL به تعداد مساوي از اين سويه ها انتخاب گرديد. در بين 22 سويه فاقد آنزيم بتالاكتاماز وسيع الطيف مورد آزمايش، تمامي سويه ها به جز يک مورد هر دو پورين Ompk35 و Ompk36 را بيان كردند (يك مورد فقط Ompk36 رابيان نمود).

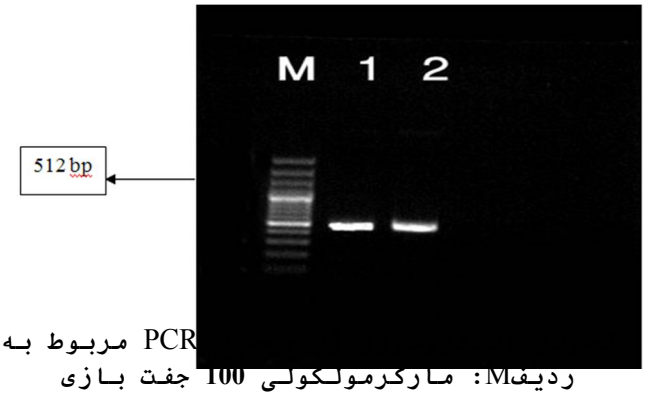
مورد نظر در دماي 4 درجه سانتي گراد به مدت يك ساعت سانتريفيوژ گرديد و مايع رويي جدا شد. سپس به رسوب آب مقطر اضافه كرده و بدين ترتيب پروتئين هاي غشاي خارجي جداسازي شدند. در مرحله بعد با SDS-PAGE وجود پورين ها مورد بررسي قرار گرفتند. (22)

به طور كلي باند 35KD و 36KD در ژل SDS براي همه سويه ها (جز يك مورد) مشاهده شد كه نشان دهنده بيان اين پورين ها در اكثر سويه هاي فاقد بتالاكتاماز وسيع الطيف (NON-ESBL) مي باشد. اما در ميان 22 سويه توليدكننده آنزيم بتالاكتاماز وسيع الطيف (ESBL)، 12 سويه فقط پورين Ompk35 را بيان كردند و 16 سويه نيز فقط پورين Ompk36 را بيان نمودند، (شكل شماره 1). به طور كلی بيان پورين هاي Ompk35 و Ompk36 در سويه هاي توليد كننده آنزيم بتالاكتامازهاي وسيع الطيف (ESBL) به ترتيب 54/54 درصد و 72/72 درصد بود. اما بيان اين پورين ها (Ompk35 و Ompk36) در سويه هايي كه فاقد آنزيم بتالاكتاماز وسيع الطيف (ESBL) بودند، به ترتيب 95/45 درصد و 100 درصد بود. با روش PCR مشخص گرديد همه سويه های كلبسيلاپنومونيا دارای ژن های Ompk35 و Ompk36 هستند.

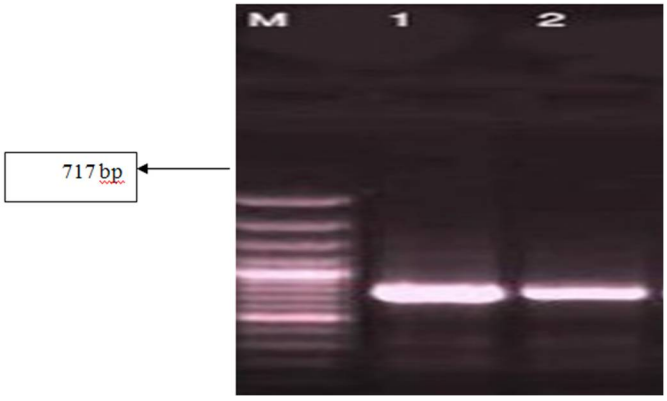
An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.



شكل شماره 1. تصوير ژل SDS-PAGE
پروتئين هاي غشاء خارجي ايزوله هاي كلبسيلاپنومونيه
رديف M: ماركر (SM0431)
رديف 1و 2 : سويه هاي توليد كننده هر دو پورين Ompk35 و Ompk36
رديف 3 و 4 : سويه هاي توليد كننده پورين Ompk36



شكل شماره 2 مربوط به ژن Ompk36 PCR
رديفM: ماركرمولكولي 100 جفت بازي
رديف 1 : سويهكلبسيلاپنومونيه داراي ESBL
رديف 2 : سويه كلبسيلاپنومونيه فاقد ESBL



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

شکل شماره 3. تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن Ompk35
ردیف M: مارکر مولکولی 100 جفت بازی
ردیف 1 : سویه‌کلبسیلاپنومونیه داراي ESBL
ردیف 2 : سویه کلبسیلاپنومونیه فاقد ESBL

بحث و نتیجه گیری

پورین ها در کنش متقابل محیط خارجي و باکتري ها نقش اساسي را ایفا مي کنند و در مقادیر زیادی در غشاي خارجي باکتري هاي گرم منفي حضور دارند. از پورین های غشاء خارجی می توان به OmpC و OmpF در اشریشیاکلي 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 زیادي از سویه های کلبسیلاپنومونیه بدون در نظر گرفتن منبع جداسازي آن ها، یافت مي 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 پلاسمیدهاي کدکننده ESBL، موتاسیون در سکانس ژني این پورین ها ایجاد می شود که از بیان آن ها جلوگیري می کند. در صورت عدم بیان این پورین ها (Ompk35 و Ompk36) به مقاومت سویه ها در برابر آنتي بیوتیك هاي بتالاکتام کمك قابل توجهی مي نماید، زیرا همان طور که اشاره شد در تراوایی آنتی بیوتیکی دخالت دارند. بنا بر این فراواني تولید این پورین ها را در سویه هاي حساس و سویه هاي مقاوم با بتالاکتاماز را مورد بررسي قرار گرفت. در این تحقیق مشاهده شد که سویه هاي کلبسیلاپنومویه داراي ESBL، Ompk36 بیشتر از Ompk35 بیان می نمایند و در سویه هاي فاقد ESBL نسبت به سویه های تولیدکننده ESBL این پورین ها بیشتر بیان می شوند. در میان سویه هاي فاقد ESBL تنها یك سویه یافت شد که Ompk35 را بیان نکرد و تمامي سویه ها Ompk36 را بیان کردند. در سویه هاي تولیدکننده ESBL تنها یك سویه فاقد هر دو پورین مشاهده شد. در بررسي هایي هم که در سال 1999 توسط مارتینز و همکاران در دانشگاه سویل بر روي 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

An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

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 اگزایمینو بتالاکتام ها می شود، (18). در سال 2007 در کره جنوبي لی و همکاران در بررسي روي 42 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، (13). در مطالعه گولمز و همکاران در ترکیه در بررسي ایزوله های اشریشیاکلي 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 کارباپنم ها بوده و پورین های اصلي را بیان نمي کنند، (9). هرناندز نیز در مطالعه خود در بررسي ارتباط بین تغییر غشای خارجي و حساسیت به عوامل ضد میکروبي در میان سویه های کلبسیلاپنومونیه دریافت که افزایشMIC برای آمینوگلیکوزیدها، فلوروکوئینولون ها، تتراسایکلین و کلرامفنیکل در سویه هایي که نقص در پورین پیدا نمودند، مشاهده نشد، اما MIC نسبت به آمپي سیلین، سفالوتین، سفوکسیتین، سفوتاکسیم و سفتازیدیم برای سویه هایي که نقص در پورین مشاهده شد که نتیجه گرفتند نقص در پورین فاکتوری برای افزایش مقاومت به عوامل ضد میکروبي نیست اما همراه با تولید بتالاکتامازها باعث افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام مي شود، (15). 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

An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

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, 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.

An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

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)*

An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.