(مقالهٔ پژوهشی)

بررسی فراوانی کلبسیلا پنومونیه مقاوم به کارباپنم در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان طالقانی آبادان سال ۹۳-۹۲

احمد فرجزاده شیخ[۱]، سیده زهره مؤمنی[۲*]، سجاد اصلانی حسین‌آباد[۳]، نبی جمعه‌زاده[۴]

چکیده

زمینه و هدف: متالوبتالاکتامازها (MBLs) یکی از آنزیم‌های هیدرولیز کنندهٔ پنی-سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها وکارباپنم‌ها می‌باشد. امروزه کلبسیلا پنومونیه مقاوم به کارباپنم‌ها یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی محسوب شده و مشکلات درمانی در دنیا ایجاد نموده‌اند. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی کلبسیلا پنومونیه تولید کنندهٔ متالوبتالاکتاماز و ژن bla_{kpc} در نمونه‌های بالینی بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان طالقانی آبادان در سال ۹۳- ۹۲ می‌باشد.

روش بررسی: ابتدا مقاومت کلنی‌های کلبسیلا پنومونیه در برابر نه آنتی‌بیوتیک رایج از طریق دیسک دیفیوژن و بر اساس پروتکل CLSI اقدام گردید. سپس تشخیص تولید متالوبتالاکتاماز (MBLs) با روش فنوتیپی دیسک ترکیبی IPM-EDTA مورد شناسایی قرار گرفتند. در نهایت حضور ژن bla_{kpc} تولید شده توسط سویه‌های جدا شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش PCR شناسایی گردید.

یافته‌ها: از ۱٤٤ مورد نمونهٔ باکتری کلبسیلای جدا شده، بیشترین و کمترین فراوانی مقاومت کلبسیلا پنومونیه به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین (۸۸/۱٪) ۱۲۷ مورد و آمیکایسین (۹/۲٪)۱۳ مورد می‌باشد. نتایج حاصل از روش دیسک ترکیبی نشان داد که تعداد (۱۸/۷۵٪) ۲۷ ایزوله از کل نمونه‌ها واجد متالو بتالاکتاماز می‌باشند، که از این تعداد (۵۱/۸٪) ۱٤ نمونه با روش PCR ژن bla_{kpc} را نشان دادند، که اغلب این ایزوله‌ها از نمونه‌های ادرار بیماران بستری در ICU و بخش اورولوژی جدا سازی شده بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به پیدایش متالوبتا لاکتامازها و با توجه به وجود ژن bla_{kpc} در کلبسیلا پنومونیه ضروری است تا ضمن تغییر در الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها از گسترش چنین عفونت‌هایی در بیمارستان‌ها جلوگیری شود.

کلید واژگان: کلبسیلا پنومونیه، کارباپنم، متالوبتالاکتاماز، روش دیسک ترکیبی Imipenem-EDTA، bla_{kpc}

۱-دانشیار گروه میکروب‌شناسی.
۲-کارشناس ارشد رشته میکروب شناسی.
۳- مربی گروه میکروب شناسی پزشکی.
۴- مربی گروه میکروب شناسی پزشکی.

۱و۳-گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۲و۴-گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه جندی شاپور اهواز، واحد بین الملل اروند آبادان.

* نویسندهٔ مسؤول:
سیده زهره مؤمنی؛ کارشناس ارشد رشته میکروب شناسی، دانشگاه جندی شاپور اهواز، واحد بین الملل اروند آبادان
تلفن: ۰۹۱۶۶۳۳۰۹۷۰
Email: sadra_abd @yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۱۵ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹٤/۱/۱٤ اعلام قبولی: ۱۳۹٤/۱/۱۷

مقدمه

کلبسیلا این جنس باکتریایی در خانوادهٔ انتروباکتریاسه قرار گرفته و به همراه انتروباکتر و سراشیا به گروه KES یعنی انتروباکتری‌های VP مثبت تعلق دارد (۱، ۲). این ارگانیسم‌ها جزیی از میکرو فلور طبیعی انسان را تشکیل می‌دهند و حدود یک سوم افراد ، ناقل روده‌ای این میکروب هستند (۳). کلبسیلا پنومونیه تولیدکنندهٔ بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) به عنوان یک مشکل جدی در حال افزایش در سرتاسر دنیا تبدیل شده است. میزان استقرار کلبسیلا پنومونیه در بیماران بستری شده در بیمارستان بیشتر از بیماران سرپایی است (٤). کاربابنم‌ها نقش مهمی در درمان عفونت‌های کلبسیلا پنومونیه که تولید ESBL می‌کنند، دارند. اگرچه مقاومت به کاربابنم‌ها در *کلبسیلا پنومونیه* شایع نیست اما بیان یک بتالاکتاماز وابسته به پلاسمید (PABCL) که به *Klebsiella pneumonia* Carbapenemase (KPC) مشهور است یا یک ESBL همراه با کاهش نفوذپذیری غشای خارجی به‌دلیل از دست دادن یا تغییر در پورین‌ها، یا وجود یک کاربابنماز زمینه را برای مقاومت به کاربابنم‌ها در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مهیا می‌سازد (۵). بتالاکتام‌ها گروهی از داروهای ضد میکروبی هستند که همگی دارای حلقهٔ بتالاکتام هستند و مکانیسم عمل آن‌ها بر روی دیوارهٔ سلولی یکسان است. این گروه شامل پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، کربابنم‌ها و مونوباکتام‌ها می‌باشند. ترکیب دیوارهٔ سلولی یک ترکیب منحصر به فرد است و تنها در پروکاریوت‌ها یافت می‌شود. لذا بتالاکتام‌ها دارای سمیت انتخابی می‌باشند. تفاوت دیوارهٔ سلولی در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی باعث می‌شود، طیف اثر دارو با هم فرق کند. بتالاکتام‌ها باکتریوسید هستند و موجب مرگ سلول می‌شوند (۸-٦). کاربابنم‌ها از اواسط ۱۹۷۰ وارد بازار شده‌اند. ایمیپنم اولین دارو از این گروه است که از استرپتومایسس کاتالیه به دست می‌آید. مادهٔ اولیه‌ای که از استرپتومایسس گرفته می‌شود، ناپایدار است و در حقیقت ایمیپنم مشتقی از این ماده می‌باشد. ایمیپنم بر علیه بسیاری از باسیل‌های گرم منفی، ارگانیزم‌های گرم مثبت و بی‌هوازی‌ها فعالیت خوبی دارد (۹). ایمیپنم فقط به صورت تزریقی مصرف می‌شود و به بافت‌ها و مایعات بدن از جمله به مایع مغزی نخاعی به خوبی نفوذ می‌کند(۹، ۱۰). به دلیل عوارض جانبی زیاد، این دارو اکثراً در عفونت‌های ناشی از ارگانیزم‌های مقاوم به سایر داروها مانند سودوموناس آئروژینوزا مصرف می‌شود. به دلیل اینکه سودوموناس‌ها به سرعت نسبت به این دارو مقاوم می‌شوند، معمولاً همراه با یک آمینوگلیکوزید مانند جنتامایسین تجویز می‌گردد. ایمیپنم به PBP2 متصل می‌شود و چون این گیرنده در سنتز دیوارهٔ سلولی دخالت دارد، فعالیت باکتریسیدال سریعی دارد(۹،۱۱). آنچه در مورد کلبسیلا پنومونیه مهم است، مقاومت بالای آنها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و گسترش آنها در بخش‌های مختلف بیمارستانی می‌باشد که سبب سپتی سمی و مرگ‌ومیر بالایی می‌گردند. کاربابنم‌ها شامل مروپنم و ایمیپنم اخیراً به عنوان داروی انتخابی برای درمان عفونت‌های شدید که توسط سویه‌های آنتروباکتریاسه تولیدکنندهٔ بتالاکتاماز که مقاومت به چند دارو دارد و همچنین آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) تولید می‌کنند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین اخیراً ظهور مقاومت به کاربابنم‌ها به واسطهٔ تولید کاربابنمازهای اکتسابی در حال افزایش و در بین آنتروباکتریاسیه نیز چنین وضعی دارد و یکی از موضوعات مهم بالینی است. کاربابنمازها (یکی از انواع بتا لاکتامازهای وسیع الطیف) از مهم‌ترین آنزیم‌هایی هستند که در ایجاد مقاومت نقش دارند و در کلاس‌های AوB دسته‌بندی می‌شوند. کاربابنمازهای کلاس A که شامل ژن‌های کدکنندهٔ bla ، NMC، bla $_{NDM-1}$، SME1-3، IMI1،GES

kpc هستند و در بین بسیاری از اعضای خانواده انتروباکتریاسه به خصوص کلبسیلاها شناسایی شده‌اند (۱۲)

ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه‌هایی که دارای ژن bla kpc هستند به علت مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی به آنتی-بیوتیک‌های معمول و انتقال پلاسمیدی این ژن‌ها به گونه‌ها و جنس‌های دیگر انتروباکتریاسه، در سال‌های اخیر مسؤول عفونت‌های بیمارستانی زیادی در دنیا بوده‌اند(۱۳). به همین دلیل هدف از این مطالعه بررسی فراوانی وجود ژن bla kpc در سویه‌های مقاوم به چند دارو کلبسیلا پنومونیه با روش مولکولی PCR در بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان طالقانی شهرستان آبادان می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه در سال‌های ۱۳۹۲– ۱۳۹۳ بر روی ۱٤٤ نمونهٔ ایزولهٔ کلبسیلا پنومونیه از آزمایشگاه بیمارستان طالقانی که از بیماران بستری و سرپایی مراجعه کننده جمع آوری شده بود، صورت پذیرفت. با مراجعهٔ هفتگی به مرکز نام برده سویه‌های ایزوله شده از بیمارانی که توسط آزمایشگاه مربوطه کلبسیلا پنومونیه تشخیص داده شده بودند، جمع‌آوری و پلیت‌ها به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی آبادان منتقل گردید. سویه‌ها از نمونه‌هایی هم‌چون مایع مغزی نخاعی، زخم، خلط، آبسه، ادرار و مایعات بدن ایزوله شده بودند. ابتدا از نمونه‌ها کشت مجدد تهیه شد و از ایزوله‌هایی که با آزمایش‌های رنگ‌آمیزی گرم، TSI(Triple Suger Iron Agar) با مشاهدهٔ اسید/ اسید، اندول منفی، حرکت منفی، VP مثبت، سیترات مثبت اوره آز مثبت، LIA مثبت تشخیص داده شده بودند، به‌عنوان کلبسیلا پنومونیه معرفی شدند (۱٤).

تمامی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه طبق دستورالعمل CLSI (۱۵) با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های) تتراسایکلین (۳۰ µg)، پنی‌سیلین (۳۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، ایمیپنم (۱۰ µg)، آموکسی‌سیلین (۳۰ µg)، جنتامایسین (۳۰ µg)، آمیکایسین(۳۰ µg)، مروپنم (۱۰ µg) غربالگری شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت (HiMedia) تهیه شد. به طور خلاصه از کلنی‌های موجود در محیط مکانکی اگار ۳ الی ٤ کلنی برداشته، سپس به لولهٔ استریل حاوی سرم فیزیولوژی انتقال داده و سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند تهیه شد. لوله‌ها به مدت ۲ الی ٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد و کدورت آن با نیم مک فارلند مقایسه و معادل گردید. یک سواب استریل را درون سوسپانسیون باکتریایی فرو برده و پس از گرفتن مایع اضافی در جدارهٔ لوله، بر روی محیط مولرهینتون آگار (شرکت مرک (Merck)، آلمان) در تمام جهات کشت داده تا سطح پلیت کاملاً پوشانده شد. پلیت‌ها را به مدت۳ دقیقه در دمای اتاق گذاشته تا رطوبت آنها گرفته و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به فاصله ۱۵ میلی‌متر از لبهٔ پلیت و ۱۵ میلی‌متر از یکدیگر در سطح پلیت قرار داده شد و به انکوباتور ۳۷ درجه انتقال داده و نتایج پس از ۱۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بر اساس حساس، مقاوم، بینابین گزارش شدند که اعداد مربوط به هر دیسک از جدول استاندارد CLSI قابل پی‌گیری است(۱۵). همهٔ ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تأیید شده جهت آزمایش ملکولی PCR در محیط TSB با ۲۰٪ گلیسرول در میکروتیوپ‌های ۱/۵cc در ۲۰– درجهٔ سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمون‌های بعدی نگهداری شدند.

به منظور شناسایی ایزوله‌های تولید کنندهٔ متالو بتا لاکتاماز از روش *Combined Disk(CD) Test* استفاده می‌شود. در این روش از دیسک ایمیپنم (۱۰ میکروگرمی) به تنهایی در مجاورت دیسک محتوی ایمیپنم (۱۰ میکروگرمی) و ۱۰ میکرولیتر EDTA (اتیلن دی‌آمین‌تترا اسید استیک) نیم مولار روی محیط قرار داده شد و محیط کشت را به انکوباتور به مدت ۱۸ ساعت منتقل گردید. نهایتاً بعد از گذشت این زمان اگر قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک ایمیپنم(IMP) به همراه EDTA ۷ میلی-متر بیشتر از قطر هاله عدم رشد در مقابل دیسک ایمیپنم به تنهایی باشد، نتیجهٔ تست مثبت در نظر گرفته شده و باکتری به عنوان تولید کنندهٔ متالوبتا لاکتاماز در نظر گرفته می‌شود. در آزمون تأییدی از E.coli ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و از Klebsiella pnenu monia ATCC 700603 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۶-۱۸).

برای نشان دادن ژن bla $_{kpc}$ ابتدا استخراج DNA تمامی ایزوله‌ها با استفاده از روش جوشاندن به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد و بعد از آن ۱۰ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند، سپس از مایع روئی که حاوی DNA بود در یک لولهٔ اپندورف استریل جمع‌آوری و در 20- درجه نگهداری شد (۱۹)

پرایمرها: پرایمرهای مورد استفاده (۲۰) در این مطالعه از شرکت سینا ژن خریداری شدند و دارای مشخصات زیر می‌باشند (جدول ۱).

روش شناسایی ژن*bla $_{kpc}$* در کلبسیلا پنومونیه

واکنش *PCR در حجم نهایی* ۲۵ µl *انجام شد.* هر واکنش *PCR شامل* dNTP 0.4µm،۲۵۰µm از هر پرایمر، 1.5 mM در لیتر$MgCl_2$، 0.12 Unit/ µl آنزیم Taq و ۵µl از DNA الگو می‌باشد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (ساخت شرکت Bio Rad، آمریکا) تحت شرایط دمایی با دمای دناتوراسیون اولیهٔ Initial denaturation (۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه)، ۳۵ سیکل حرارتی شامل دمای دناتوراسیون (۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه)، دمای اتصال پرایمر Annealing (٥٦ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه) و دمای تکثیر Extention (۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه) و در پایان دمای تکثیر نهایی Final extention (۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه) انجام شد.

محصولات PCR از نظر حضور ژن‌های مورد نظر با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و پس از رنگ-آمیزی با Safe Stain بررسی شدند. لازم به ذکر است که در این مطالعه از اشرشیا کلی ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و از سویهٔ کلبسیلا ۷۰۰٦۰۳ATCC واجد ژن bla $_{kpc}$ تهیه شده از انستیتو پاستور ایران به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. پس از پایان الکتروفورز ژل را از پلیت خارج کرده و توسط دستگاه ترانس لومیناتور (شرکت BioRad، آمریکا) قرار داده شد. وجود سایبر سیف با خاصیت فلورسنتی باعث ظاهر شدن باندهای حاوی DNA می‌شود.

جدول ۱: جدول پرایمرهای مورد استفاده در طرح

Gen Name	Sequence (5′ to 3′)	Gene(Product Size)
bla $_{kpc}$	F: TGT CAC TGT ATC GCC GTC R: CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC	۱۰۱۱- bp

یافته‌ها

پس از جمع‌آوری نمونه‌های ادرار، خون، زخم و خلط از بیماران بستری و سرپایی مراجعه‌کننده به بیمارستان طالقانی شهرستان آبادان، ۱۸۵ نمونهٔ مشکوک به باکتری کلبسیلا بودند که در میان آن‌ها، ۱٤٤(۷۸٪) نمونهٔ باکتری کلبسیلا پنومونیه، ۱۲(٦٪) نمونهٔ باکتری کلبسیلا اکسی‌توکا و ۲۹(۱٦٪) نمونهٔ باکتری‌های دیگر بود. فراوانی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از نمونه‌های ادرار، خلط، خون و زخم دارای باکتری *کلبسیلا پنومونیه* در جدول ۲ نشان داده شده است.

از ۱٤٤ مورد نمونهٔ دارای باکتری *کلبسیلا پنومونیه*، ۱۲٤(۸٦/۱٪) مورد از بیماران بستری و ۲۰(۱۳/۹٪) مورد از بیماران سرپایی از اورژانس بیمارستان جمع‌آوری شده‌اند. بیشترین ایزوله کلبسیلا پنومونیه از ادرار ۱۱٦(۸۰/۵٪) ایزوله و کمترین مورد از نمونه‌های زخم ۵ (۳/٤٪) ایزوله بود (جدول۲). نمونه‌های جمع‌آوری شده از بیماران بستری شده، در بخش‌های ICU، اطفال، داخلی، اورولوژی، جراحی، زنان و زایمان و بیماران سرپایی از اورژانس جمع‌آوری شدند که بیشترین مورد کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری شده مربوط به بخش ICU ٤۰(۲۷/۷٪) ایزوله و کمترین مورد مربوط به بخش اطفال ۵(۳/٤٪) مورد می‌باشد (جدول ۳)

الگوی حساسیت کلبسیلا پنومونیه

پس از انجام تست‌های آنتی‌بیوگرام برای ۱٤٤ ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه، توزیع فراوانی الگوی مقاومت دارویی آن‌ها در جدول ۵ نشان داده شده است. بر اساس نتایج، بیشترین فراوانی مقاومت کلبسیلا پنومونیه مربوط به آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین ۱۲۷(۸۸/۱٪) و کمترین فراوانی مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک آمیکایسین۱۳(۹/۲٪) می‌باشد. هم‌چنین در این مطالعه مشخص گردید که هیچ سویه‌ای از کلبسیلا پنومونیه مقاوم به همهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها نمی‌باشد وآنتی‌بیوتیکی وجود دارد که بر روی آنها مؤثر است.

از مجموع ۱٤٤نمونه کلبسیلا پنومونیه پس از آنتی-بیوگرام، تعداد ایزوله‌های مقاوم به ایمیپنم ۳۸ (۲٦/۳٪) مورد مشخص گردید که این تعداد با روش CD test از نظر تولید متالوبتالاکتاماز مورد بررسی قرار گرفتند که ۲۷ (۷۱/۰۵٪) ایزوله مولد متالوبتالاکتاماز تشخیص داده شدند (شکل۱). هم‌چنین ایزوله‌های تولید کنندهٔ متالوبتالاکتاماز غالباً از نمونه‌های ادرار ۱۷(۱۱/۸٪) مورد و از بیماران بستری در بخش ICU ۱٦(۱۱/۱٪) مورد جدا شدند (جدول ۵ و ٦).

EDTA باعث مهار آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز و تشکیل هالهٔ عدم رشد در اطراف دیسک ایمیپنم و EDTA گردیده است. A:Imipenem B: EDTA :Imipenem+ EDTA

در شکل ۱ نتایج حاصل از CD تست مشاهده می‌شود: تشخیص ژن bla_{kpc} در ایزوله‌های متالوبتالاکتاماز از ۲۷ ایزولهٔ متالوبتالاکتاماز تأیید شده به روش دیسک ترکیبی ۱٤(۵۱/۸٪) ایزوله داری ژن bla_{kpc} بودند (شکل۲) و همچنین (٤۸/۲٪) ۱۳ ایزوله‌ها از نظر ژن مورد نظر منفی بودند.

جدول ۲: فراوانی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از نمونه‌های ادرار، خلط، خون و زخم دارای باکتری *کلبسیلا پنومونیه* از بیماران بستری و سرپایی وابسته به جنس

نمونهٔ بیمار	جنسیت		مجموع
	مرد	زن	
ادرار	٦٢(٪٤٣/٥)	٥٤(٪٣٧/٥)	١١٦(٪٨٠/٥)
خون	٨(٪٥/٥)	٤(٪٢/٧)	١٢(٪٨/٣)
زخم	٤(٪٢/٧)	١(٪٠/٦)	٥(٪٣/٤)
خلط	١٠(٪٦/٩)	١(٪٠/٦)	١١(٪٧/٦)

جدول۳: فراوانی نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری شده از بخش‌های مختلف بیمارستان طالقانی

کلبسیلا پنومونیه	ICU تعداد(درصد)	داخلی تعداد(درصد)	جراحی تعداد(درصد)	زنان زایمان تعداد(درصد)	اورولوژی تعداد(درصد)	اورژانس تعداد(درصد)	اطفال تعداد(درصد)	مجموع تعداد (درصد)
مثبت	٤٠(٪٢٧/٧)	٢٥(٪١٧/٣)	١٠(٪٦/٩)	١٧(٪١١/٨)	٢٧(٪١٨/٧)	٢٠(٪١٣/٨)	٥(٪٣/٤)	١٤٤(٪١٠٠)

جدول ٤: توزیع فراوانی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه*

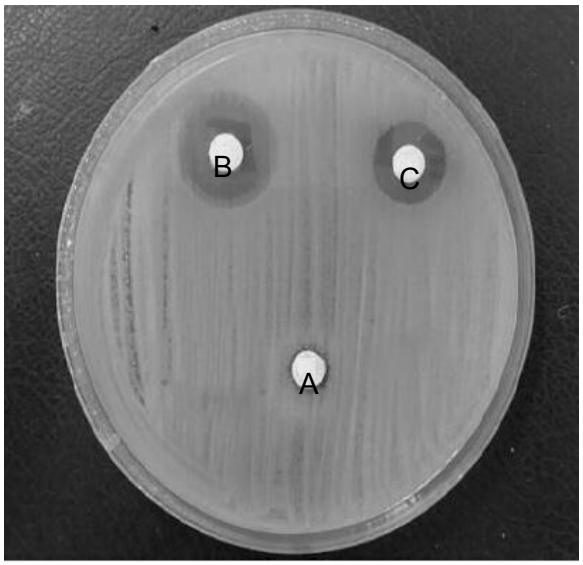
دیسک آنتی‌بیوتیک	مقاوم تعداد (٪)	حد واسط تعداد (٪)	حساس تعداد (٪)
آموکسی‌سیلین ۱۰ µg	١٢٧ (٨٨/١)	١ (٠/٦)	١٦ (١١/١)
سفتازیدیم ۳۰ µg	٦٠ (٤١/٦)	٣ (٢/٨)	٨١ (٥٦/٢)
پنی‌سیلین ۳۰ µg	١٢٥ (٨٦/٨)	١ (٠/٦)	١٨ (١٢/٥)
تتراسایکلین ۳۰ µg	٦٤ (٤٤/٤)	٣٩ (٢٧)	٤١ (٢٨/٤)
جنتامایسین ۳۰ µg	٤٢ (٢٩/١)	٦ (٤/١)	٩٦ (٦٦/٦)
آمیکاسین ۳۰ µg	١٣ (٩/٢)	٤ (٢/٧)	١٢٧ (٨٨/١)
ایمی‌پنم ۱۰ µg	٣٨ (٢٦/٣)	٤ (٢/٧)	١٠٢ (٧٠/٨)
مروپنم ۱۰ µg	٣٠ (٢٠/٨)	١ (٠/٦)	١١٣ (٧٨/٤)
سفوتاکسیم ۳۰ µg	٦٨ (٤٧/٢)	٨ (٥/٥)	٧٨ (٥٤/١)

جدول۵ : فراوانی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکنندهٔ متالوبتالاکتامازها (MBL) برحسب نمونه‌های بالینی مختلف

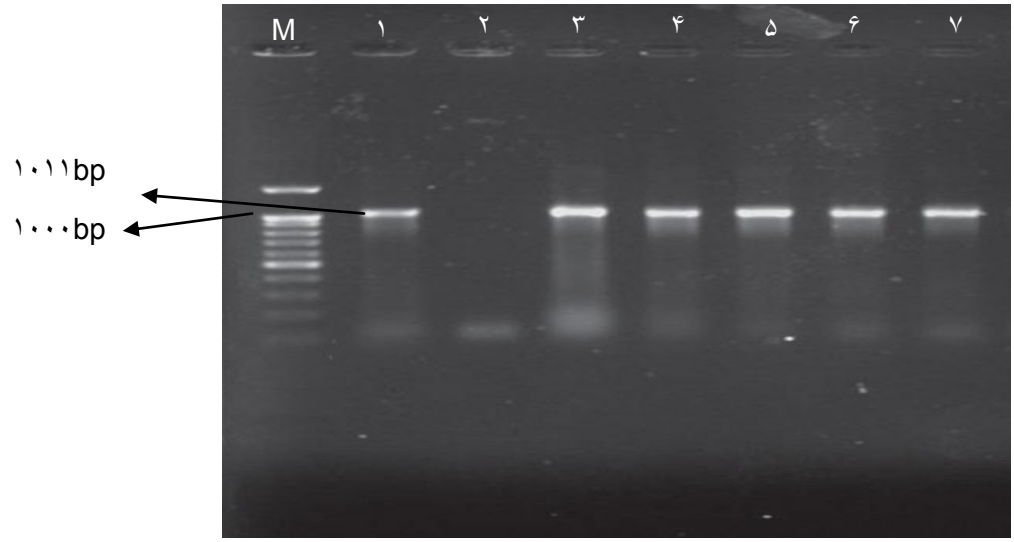
MBL	ادرار تعداد(درصد)	خون تعداد(درصد)	زخم تعداد(درصد)	خلط تعداد(درصد)	مجموع تعداد(درصد)
مثبت	(۱۱/۸)۱۷	(۱/۳)۲	(۲/۸)۳	(۳/٤)۵	(۱۸/۷۵)۲۷
منفی	(٦۸/۷)۹۹	(٦/۹)۱۰	(۱/۳)۲	(٤/۱)٦	(۸۱/۲)۱۱۷
مجموع	(۸۰/۵)۱۱٦	(۸/۳)۱۲	(۳/٤)۵	(۷/٦)۱۱	(٪۱۰۰)۱٤٤

جدول٦: فراوانی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکنندهٔ متالوبتالاکتامازها (MBL) در بخش‌های مختلف بیمارستان طالقانی

MBL	ICU تعداد(درصد)	داخلی تعداد(درصد)	جراحی تعداد(درصد)	زنان زایمان تعداد(درصد)	اورولوژی تعداد(درصد)	اورژانس تعداد(درصد)	اطفال تعداد(درصد)	مجموع تعداد(درصد)
مثبت	(۱۱/۱)۱٦	(۲/۸)۳	---------	(۰,٦)۱	(۲/۸)۳	(۳/٤)٤	------	(۱۸/۷)۲۷
منفی	(۱٦/٦)۲٤	(۱۵/۹)۲۳	(۱۸/۷)۲۷	(۱۱/۱)۱٦	(٤/۸)۷	(۱۱)۱٦	(۳/٤)۵	(۸۱/۲)۱۱۷
مجموع	(۲۷/۷)٤۰	(۱۷/۳)۲۵	(۱۸/۷)۲۷	(۱۱/۸)۱۷	(٦/۹)۱۰	(۱۳/۸)۲۰	(۳/٤)۵	(۱۰۰)۱٤٤



شکل ۱: کلبسیلا پنومونیه تولید کنندهٔ متالوبتالاکتاماز



شکل۲: محصول PCR ژن bla kpc ستون M: DNA مارکر (100bp) ستون ۱: کنترل مثبت Klebsiella 700603ATCC pnumoniae (کنترل مثبت ژن bla_{kpc}) ستون ۲: E.coli ATCC25922 (کنترل منفی) ستون‌های ۳،٤،٥،٦و۷ :ایزوله‌های بالینی مثبت از نظر حضور ژن bla_{kpc}

بحث

کلبسیلا پنومونیه، جز باکتری‌های گرم منفی، غیر متحرک و بی‌هوازی اختیاری می‌باشد. این ارگانیسم جزئی از میکروفلور طبیعی بدن انسان را تشکیل می‌دهند و حدود یک سوم افراد، حامل روده‌ای این میکروب هستند. میزان استقرار این باکتری‌ها در بیماران بستری شده در بیمارستان بیشتر از بیماران سرپایی می‌باشد. این باکتری عامل طیف وسیعی از عفونت‌ها شامل: سپتی‌سمی، پنومونی، عفونت مجاری ادراری، مننژیت و آبسه‌های چرکی در اندام‌های مختلف به خصوص آبسه‌های کبدی هستند. پنومونی کلبسیلایی بخش کوچکی از موارد پنومونی را تشکیل می‌دهد، و میزان مرگ ومیر ناشی از آن بالا و در حدود ۹۰٪ است (۲۱). علت اصلی مقاومت به کاربانم در این باکتری وجود آنزیم کاربانماز است که نوعی بتالاکتاماز می‌باشد. کاربانم‌ها (مانند: ایمیپنم، مروپنم، دوری پنم و ارتاپنم) کلاس مهمی از بتا لاکتام‌ها می‌باشند که عموماً در برابر بتالاکتامازها مقاوم هستند و در درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌هایی تولیدکنندهٔ ESBLs و AmpC که قادر به هیدرولیز سفالوسپورین‌ها و سفالوسپورین‌ها هستند، به کار می‌روند. تعداد آنزیم‌های بتالاکتامازی که کاربانم را هیدرولیز می‌کنند، رو به افزایش هستند. بروز مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در بین باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های گرم منفی ایجادکنندهٔ عفونت‌های بیمارستانی یک تهدید جدی در درمان عفونت‌های حاصل از آنهاست، به طوری که مطالعات اخیر نشان‌دهندهٔ افزایش مقاومت به این آنتی-بیوتیک‌ها به ویژه توسط متالوبتالاکتامازها می‌باشد و از طرفی رایج‌ترین این بتالاکتامازها *Klebsiella pneumonia*(KPC) Carbapenemase می‌باشد که آنزیمی پلاسمیدی می‌باشد. یکی از ژن رمزکنندهٔ کاربانماز

ژن bla_{kpc} می‌باشد که روی پلاسمید و یا کروموزوم باکتری قرار دارد (۲۲) از آنجایی که این ژن در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه در منطقهٔ آبادان مشخص نشده است. ما نیز در این تحقیق الگوی مقاومت دارویی را در ایزوله‌های کلبسیلا منطقهٔ آبادان تعیین کردیم و فراوانی کلبسیلا پنومونیه تولید کنندهٔ متالوبتالاکتاماز و هم‌چنین با استفاده از روش مولکولی وجود ژن *bla kpc* را در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به کاربانم بررسی کردیم.

در مطالعات گذشته محققان برای بررسی الگوی مقاومت بر روی جدایه‌ها تست آنتی‌بیوگرام انجام دادند که در میان آن‌ها سلگی و همکاران در سال۱۳۹۱ با بررسی ۲۸۷ ایزوله *کلبسیلاپنومونیه* به‌دست آورده از بیمارستان‌های اردبیل دریافتند که ۲۲۵(۷۸/۳٪) ایزولهٔ *کلبسیلا پنومونیه* حداقل به ۲ آنتی‌بیوتیک حساس هستند. ٦(۲/۰۹٪) ایزولهٔ مقاومت کامل داشتند و ۷(۳/۱٪) ایزوله که به کاربانم مقاوم بودند برای بررسی وجود متالوبتالاکتاماز به‌وسیلهٔ روش CD test مورد مطالعه بیشتر قرار گرفتند که ٥(۱/۷٤٪) ایزولهٔ متالوبتالاکتاماز مثبت بودند(۲۳). در این تحقیق ۱٤٤سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* را از بیماران بستری و بیماران سرپایی و از نمونه‌های خون، ادرار، خلط و زخم جدا کردیم در توزیع فراوانی الگوی مقاومت دارویی آنها بیشترین فراوانی مقاومت کلبسیلا پنومونیه مربوط به آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین ۱۲۷(۸۸/۱٪) و کمترین فراوانی مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک آمیکایسین ۱۳(۹/۲٪) می‌باشد. هم‌چنین تعداد ایزوله‌های مقاوم به ایمیپنم ۳۸(۲٦/۳٪) مورد مشخص گردید که این تعداد با روش CD test از نظر تولید متالوبتالاکتاماز مورد بررسی قرار گرفتند که ۲۷(۱۸/۷٥٪) ایزوله مولد متالوبتالاکتاماز تشخیص داده شدند که از فراوانی یافت شده توسط سلگی و همکاران در بیمارستان‌های اردبیل بیشتر است.

در صورتی که در مطالعهٔ حاضر نتایج مقاومت آنتی-بیوتیکی نسبت به ایمیپنم، مروپنم، سفتازیدیم در ایزوله‌های واجد ژن bla_{kpc} با نتایج مطالعهٔ فورد و همکاران (۲٤) تقریباً هم‌خوانی دارد.

هم‌چنین مطالعهٔ حاضر با نتایج براتو(Bratu) و همکاران متفاوت می‌باشد که میزان جداسازی ژن bla_{kpc} را در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه ۲٤٪ گزارش کرده بود (۲٥).

جهت بررسی ژن bla_{kpc} در *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه‌های بیمار، در سال ۱۳۹۱ هاشمی‌زاده و همکاران با بررسی ۱۰۰۰ نمونهٔ ادرار، خون، مایع مغزی نخاعی، زخم، خلط مایع صفاق، ترشحات و آبسه‌های شکمی که از بیمارستان‌های هاجر و کاشانی شهرکرد، موفق به جداسازی ۲۰۲ ایزولهٔ *کلبسیلا پنومونیه* و *کلبسیلا اکسی‌توکا* شدند که ۱۸۰(۸۹/۱٪) ایزوله به عنوان *کلبسیلا پنومونیه* و ۲۲ (۱۰/۹٪) ایزوله به عنوان *کلبسیلا اکسی‌توکا* تعیین هویت شدند. سپس تمامی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* برای وجود ژن bla_{kpc} مورد بررسی قرار گرفت. نتایج PCR نشان داد که ۲۲ (۱۱/۹٪) مورد از ایزوله‌ها دارای ژن bla_{kpc} بودند (۲٦). نتایج مطالعهٔ حاضر در مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، آمیکایسین وجنتامایسین با مطالعات هاشمی‌زاده و همکاران در سال ۱۳۹۱ تقریباً یکسان است، ولی در مورد آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفتازیدیم وایمیپنم بیشتر است که این مسأله می‌تواند ناشی از تفاوت الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها در مناطق جغرافیایی مختلف باشد و نتایج شناسایی ژن bla_{kp}

نشان داد که مطالعهٔ ما با نتایج حاصل از مطالعهٔ هاشمی‌زاده تقریباً هم‌خوانی دارد. کیم و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی انتروباکتریاسه‌های مقاوم به کاربانپم در کرهٔ جنوبی پرداختند. در مجموع ۲۲ ایزولهٔ مقاوم به کربانپم در این تحقیق از خون و ادرار جداسازی شد که ۱٦(۷۲/۷٪) ایزولهٔ آن *کلبسیلا پنومونیه* بودند. در تمام ایزوله‌ها ژن مقاومت بررسی شد و تنها در ۵(۳۱/۲۵٪) ایزولهٔ متالوبتا لاکتاماز شناسایی شد (۲۷). مطالعهٔ ما از ۷۹ (۵٤/۸٪) ایزولهٔ کلبسیلا پنومونیه جدا شده از ادرار و خون ۱۹(۲٤٪) مورد دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند که با نتایج مطالعهٔ کیم اختلاف دارد که این احتمالاً مربوط به منطقه و فرهنگ تفاوت در تجویز داروست.

بیشترین شیوع ایزوله‌های bla_{kpc} در مطالعهٔ حاضر در نمونه‌های ادرار، خون و خلط است که با مطالعهٔ چن و همکاران (۲۸) مطابقت دارد. در تحقیق حاضر بیشترین تعداد ایزوله‌های bla_{kpc} مثبت در بخش‌های بستری به ترتیب در بخش‌های ICU (۵۷/۱٪) و بخش داخلی (۱٤/۲٪) که با مطالعهٔ جفن (Geffen) و همکارانش (۲۹) در سال ۲۰۱۰ و مطالعهٔ کانتر پولو و همکاران در یونان (۳۰) تقریباً هم‌خوانی دارد که می‌تواند نشان‌دهندهٔ خطر بالقوهٔ این مقاومت در این بخش‌های بیمارستانی و لزوم توجه بیشتر به رعایت بهداشت توسط پرسنل بخش‌های مربوطه باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان شیوع کلبسیلا پنومونیه تولید کنندهٔ متالوبتالاکتاماز در بیماران مورد بررسی در منطقهٔ آبادان بیشتر از بعضی مناطق ایران و تعدادی از کشورهای دیگر است و چون بیشترین تعداد این باکتری‌ها از ادرار جدا شده‌اند، توجه به عفونت دستگاه ادراری Tract Urinary Infection (UTI) از مسائل قابل تأمل می‌باشد. از آنجایی که ایزوله‌های تولیدکنندهٔ متالوبتالاکتاماز می‌توانند به تمام آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم شوند، لذا شناسایی کلبسیلا پنومونیه مقاوم به کاربانپم که قادر به تولید متالوبتالاکتاماز هستند، ضروری بوده، و می‌تواند پزشک را در انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب جهت درمان اختصاصی‌تر بیماران مبتلا به عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها خصوصاً عفونت دستگاه ادراری کمک نماید.

قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی و کارکنان آزمایشگاه واحد بین‌الملل اروند آبادان و دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز تشکر وسپاس‌گزاری می‌نماییم.

منابع

1-Asadi A, Khavari Nejad R, Soltani N, Najafi F, Molaei Rad A. Physiological and antimicrobial characterizations of some cyanobacteria isolated from the rice fields in Iran. J Agri Technol 2011; 7(3): 649-663.

2-Katsanis G P, Sparqo J, Ferraro M J, Sutton l, Jakobi GA. Detection of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli strains producing extended-spectrum beta-lactamases. Journal of clinical microbiology 1994; 32(3): 691-696.

3-Rapp RP, Urban C. Klebsiella pneumoniae carbapenemases in Enterobacteriaceae: history, evolution, and microbiology concerns. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy 2012; 32(5): 399-407.

4-Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in Greece--a review of the current evidence. Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin 2008; 13(4): 1854-1861.

5-Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. Clinical Infectious Diseases 2001; 32(8): 1162-1171.

6-Fisher JF, Meroueh SO, Mobashery S. Bacterial resistance to β-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. Chemical reviews 2005;105(2): 395-424.

7-Rothstein JD, Kuncl RW. β-Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. Nature 2005; 433(7021): 73-77.

8-Wilke MS, AL Lovering, NC Strynadka. β-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. Current opinion in microbiology 2005; 8(5): 525-533.

9-Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstien E. Comparative review of the carbapenems. Drugs 2007; 67(7): 1027-1052.

10-DePestel DD, Beninger MS, Danziger L, Laplante KL, May C, Luskin A, "et al". Cephalosporin use in treatment of patients with penicillin allergies. Journal of the American Pharmacists Association: JAPhA 2007; 48(4): 530-540.

11-Petri W. Penicillins, cephalosporins, and other β-lactam antibiotics. Goodman & Gilman's, The Pharmacologic Basis of Therapeutics 2006; 1127-1154.

12-Cuzon G, Nass T , Nordmann p. KPC carbapenemases: what is at stake in clinical microbiology? Pathol Biol(Paris) 2010; 58(1): 39-45.

13-da Silva RM, Traebert J, Galato D. Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)producing klebsiella pneumoniae :a review of epidemiological and clinical aspects. Expert Opin Biol Ther 2012; 12(6): 663-671.

14- Benson AE. Microbiological Applications Lab Manual. 8 th ed. Newyork: McGraw−Hill; 2011.

15-CLSI. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing :Twentieth informao nal supplemented .CLSI document M100-S20.Wayne , PA: Clinical and Laboratory Standards Ins ute;2013

16-Bush K, Jacoby GA. *Updated functional classification of β-lactamases.* Antimicrobial Agents and chemotherapy 2010; 54(3): 969-976.

17- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology 1999; 155: 224-249.

18- Bartlett JM, Strling D. A short history of polymerase chain reaction. Methods Mol Biol 2003; 226: 3-6.

19-Sambrook J, Russel DW. Molecolar cloning a laboratory mannual. 3ed . New York: CSHL Press; 2001.

20-Rasheed JK, Biddle JW, Karen FA, Washer L, Chenowet C, Perrin J. Detection of the Klebsiella pneumoniae Carbapenemase Type 2 Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme in Clinical Isolates of Citrobacter freundii and K. oxytoca Carrying a Common Plasmid. J OURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2008 June; 46(6): 2066–2069.

21-LIU L, Chen GQ. Susceptibility, Classification and Distribution of Extended-spectrum βLactamases Produced by Klebsiella pneumoniae in China [J]. Chinese Journal of Nosoconmiology 2005; 9.

22-Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β-lactamases. Antimicrobial Agents and chemotherapy 2010; 54(3): 969-976.

23-Fazeli H, Akbari R, Moghim SH, Narimani T, Arabestani MR, Ghoddousi AR. Pattern of Antibiotic Resistance in Pesudomonas Aeruginosa Isolated from Intensive Care Unit, Isfahan, Iran. Journal of Isfahan Medical School 2013; (31): 232.

24-Wood ford N,Tiemo PM JR,Young K. Outbreak of Klebsiella pneumoniae Producing a New Carbapenem – Hydrolyzing ClassA beta-Lactamase,KPC -3,in a New York Medical Center. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(12): 4793-4799.

25- Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, "et al". Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Brooklyn , NY :Molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents . J Antimicrob Chemother 2005; 56(1):128-132.

26-Hashemizadeh FS, Zamanzad B, Jahandideh S, Ansari N, Gholipour A, Hashemizadeh FS," et al". Identification of KPC-producing Klebsiella pneumoniae in clinical samples in Iran. Yakhteh 2013; 15 (1) :105-114

27-Kim SY, Characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates from Korea. Diagnostic microbiology and infectious disease 2013 Aug; 76(4): 486-490.

28-Chen S, Hu F, Xu X, Liu Y, Wu W, Zhu D. High Prevalence of KPC-2-Type Carbapenemase Coupled with CTX-M-Type Extended-Spectrum beta-lactamases in Carbapenem –Resistant Klebsiella pneumoniae in a Teaching Hospital in China. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(5): 2493-2494.

29-Geffena Y, Finkelstein R, Oren I, Shalaginov R, Tavleva I, Sprecher H. Changing epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriace carriage during an outbreak of carbapenem-resistant Klebsiella pneumonia .J Hosp Infect 2010; 76(4): 355-356.

30-Kontopoulou K, Protonotariou E, Vasilakos K. Hospital outbreak caused by Klebsiella pnumoniae producing KPC-2 beta –lactamase resistant to colistin. J Hosp Infect 2010; 76(1): 70-73.

Prevalence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Patients Admitted to Taleghani Hospital of Abadan During 2014-2015

Ahmad Faraj Zadeh Sheikh[1], Seyedeh Zohreh Momeni[2*], Sajad Aslani Hoseinabad[3], Nabi Jomezadeh[4]

1-Associate Professor of Microbiology.
2-M.Sc. of Microbiology.
3-Lecturer in Microbiology.
4-Lecturer in Microbiology.

1,3-Department of Microbiology, School Of Medical, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
2,4-Department of Microbiology, International Branch of Arvand, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Abadan, Iran.

[*]Corresponding Author:
Seyedeh Zohreh Momeni; Department of Microbiology, International Branch of Arvand, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
Tel:+989166330970
Email: sadra_abd @yahoo.com

Abstract

Background and Objectives: Metallo-beta-lactamases (MBLs), are enzymes that hydrolyze penicillins, cephalosporins and carbapenems. Nowadays, the carbapenem-resistant Klebsiella *pneumoniae* is considered as one of the most important causes of nosocomial infections and has created various health problems in the world. The purpose of this study was to determine the prevalence of MBL producing *Klebsiella pneumoniae* and bla_{kpc} gene in clinical samples taken from patients referred to Taleghani hospital of Abadan in the period 2014-2015.

Subjects and Methods: Detection of *Klebsiella pneumoniae* colonies resistance to the common nine-antibiotics was performed by disk diffusion test, according to CLSI protocols. Identification of MBL was carried out using IPM- EDTA combined disk method. Finally, the bla_{kpc} gene produced by the isolated strains was identified using PCR method and specific primers.

Results: Among 144 cases of isolated Klebsiella bacteria, the highest and lowest frequencies of resistance in *Klebsiella pneumoniae* are related to antibiotic amoxicillin (127 cases, 88.1%) and amikacin (13 cases, 9.2%) respectively. The results of the combined disk method showed that 27 isolates (18.75%) of all samples are MBL producing, from which 14 cases (51.8%) showed the presence of bla_{kpc} gene. Most of the isolates were separated from urine samples of patients admitted to ICU and urology department.

Conclusion: The results of this study demonstrated that the emergence of MBLs and detection of the responsible gene in *Klebsiella pneumoniae* isolates among our patients is a warning finding and warrants to change the pattern of use of antibiotics in order to prevent the spread of such infections in hospitalized patients.

Keywords: Klebsiella pneumoniae, Carbapenem, Metallo-beta-lactamase, IPM- EDTA Combined disk method, $bla_{kpc.}$

►*Please cite this paper as:*
Faraj Zadeh Sheikh A, Momeni SZ, Aslani Hoseinabad S Jome Zadeh N. Prevalence of Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae in Patients Admitted to Taleghani Hospital of Abadan During 2014-2015. Jundishapur Sci Med J 2015; 14(2):209-221.

Received: Jan 5, 2015 **Revised: Apr 3, 2015** **Accepted: Apr 6, 2015**