# شناسایی کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف KPC در نمونه‌های بالینی در ایران

فرشته سادات هاشمی‌زاده[1]، بهنام زمان‌زاد[2]، سعید جهاندیده[3]، نجمه انصاری[4]، ابوالفضل قلی‌پور[5]، فروغ‌سادات هاشمی‌زاده[6]، رضا میرنژاد[7]

۱-دانشجوی دکترای پزشکی مولکولی، گروه زیست، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۲-دانشیار، گروه میکروب‌شناسی،دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۳-دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی دارویی،گروه بیوتکنولوژی دارویی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

۴-دانشجوی گروه میکروب‌شناسی،دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۵-استادیار، گروه میکروب‌شناسی،دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۶-دانشجو،گروه میکروب‌شناسی،دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.

۷-استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران.

یافته / دوره پانزدهم / شماره ۱ / بهار ۹۲ / مسلسل ۵۵

## چکیده

دریافت مقاله: ۹۱/۸/۳۰ ، پذیرش مقاله: ۹۱/۱۱/۹

**مقدمه:** امروزه کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو تولیدکننده بتالاکتامازها، یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی محسوب شده و مشکلات درمانی در دنیا ایجاد نموده‌اند. هدف از این مطالعه شناسایی کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف KPC ($bla_{kpc}$) در نمونه‌های بالینی در ایران می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** پس از تعیین هویت تا سطح گونه با استفاده از روش‌های کشت و بیوشیمیائی، تعیین حساسیت ۱۸۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه به ۱۴ آنتی‌بیوتیک مختلف با استفاده از روش دیسک دیفیوژن انجام گردید و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) برای مروپنم و ایمیپنم تعیین شد. سپس تمامی ایزوله‌های کلبسیلا برای وجود ژن $bla_{kpc}$ با روش مولکولی PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** در این تحقیق از ۲۰۲ ایزوله کلبسیلا، ۱۸۰ ایزوله (۸۹/۱٪) به عنوان کلبسیلا پنومونیه و ۲۲ ایزوله به عنوان کلبسیلا اکسی‌توکا (۱۰/۹٪) تعیین هویت شدند که بیش از ۵۵٪ کلبسیلا پنومونیه‌ها مقاوم به چند دارو بودند و به مروپنم و ایمیپنم مقاومت بالای ۴۰٪ نشان دادند. MIC ایزوله‌های مقاوم به کرباپنم‌ها بالای ۳۲ µg/ml بود. نتایج PCR نشان داد که ۲۲ مورد (۱۱/۹٪) از ایزوله‌ها دارای ژن $bla_{kpc}$ بودند که اغلب این ایزوله‌ها از نمونه‌های ادرار و خون بیماران بستری در ICU و بخش اطفال جداسازی شده بودند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به وجود ژن $bla_{kpc}$ در کلبسیلا پنومونیه و امکان انتقال افقی این ژنها به باکتری‌های دیگر، بایستی ضمن تغییر در الگوی مصرف آنتی بیوتیک‌ها، به معیارهای کنترل عفونت‌های بیمارستانی توجه بیشتری گردد.

**واژه‌های کلیدی:** کلبسیلا پنومونیه، عفونت بیمارستانی، مقاومت چند دارویی، کرباپنم، $bla_{kpc}$ ، PCR

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

پست الکترونیک: rmirnejadreza@yahoo.com



Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 9:33 +0330 on Sunday December 24th 2017

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 9:33 +0330 on Sunday December 24th 2017

## مقدمه

کلبسیلاها، باسیل‌های گرم منفی متعلق به خانواده بزرگ انتروباکتریاسه هستند که دارای رابطه ژنتیکی نسبتا نزدیکی با سایر جنس‌های این خانواده نظیر اشریشیا، سالمونلا، شیگلا و یرسینیا می‌باشند(۱). این ارگانیسم‌ها جزیی از میکروفلور طبیعی بدن انسان را تشکیل می‌دهند و حدود یک سوم افراد، ناقل روده‌ای این میکروب هستند. میزان استقرار این باکتری‌ها در بیماران بستری شده در بیمارستان بیشتر از بیماران سرپایی می‌باشد. آنها عامل طیف وسیعی از عفونت‌ها شامل سپتی‌سمی، پنومونی، عفونت مجاری ادراری، مننژیت و آبسه‌های چرکی در اندام‌های مختلف به خصوص آبسه‌های کبدی هستند(۲،۳). پنومونی کلبسیلایی بخش کوچکی از موارد پنومونی را تشکیل می‌دهد، ولی میزان مرگ‌ومیر ناشی از آن بالا و حدود ۹۰٪ است( ۷-۴).

آنچه در مورد این باکتری بیشتر جلب توجه می‌کند، مقاومت بالای آنها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و گسترش سریع آنها در بخش‌های مختلف به خصوص در بخش نوزادان می‌باشد که سبب سپتی‌سمی و مرگ‌ومیر بالایی می‌گردند (۹،۸). متأسفانه مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در دهه‌های اخیر باعث افزایش ظهور این سویه‌های مقاوم شده است(۱۰). آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی جهت درمان عفونت‌های این باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرد، ولی کاربانم‌ها شامل مروپنم و ایمیپنم تکیه‌گاه درمان عفونت‌های وخیم با این پاتوژن‌ها هستند.

هرچندکه مطالعات مختلف نشان دادند که این باکتری‌ها به این آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مقاوم شده‌اند، که این خود زنگ خطری در درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم می‌باشد (۱۰،۱۱). چندین مکانیسم مقاومت به کاربانم‌ها تا به حال گزارش شده‌است که کاربانمازها (یک نوع بتالاکتاماز وسیع الطیف) از مهم‌ترین آنزیم‌هایی هستند که در ایجاد مقاومت دخیلند و در کلاس‌های مختلف A، B و غیره دسته‌بندی می‌شوند.

کاربانمازهای کلاس A که شامل $bla_{kpc}$،NMC، $bla_{\text{NDM-1}}$،SME1-3، IMI1 و GES هستند در بین بسیاری از اعضای خانواده انتروباکتریاسه به خصوص کلبسیلاها، اسینتوباکترها و به‌ندرت در سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شده‌اند(۱۴-۱۳). ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه‌های حاوی $bla_{kpc}$ به علت مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی به آنتی‌بیوتیک‌های روتین و انتقال پلاسمیدی این ژن‌ها به گونه‌ها و جنس‌های دیگر انتروباکتریاسه، در سال‌های اخیر مسئول طغیان‌های عفونت بیمارستانی زیادی در دنیا بوده‌اند، به طوری‌که امروزه جداسازی و شناسایی سویه‌های دارای $bla_{kpc}$ چالشی واقعی برای آزمایشگاهای تشخیصی هستند (۱۵،۱۶). به‌همین دلیل و با توجه به این که میزان وجود ژن $bla_{kpc}$ در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه در ایران مشخص نشده است، این مطالعه برای اولین بار در ایران با هدف تعیین الگو مقاومت دارویی و بررسی وجود ژن $bla_{kpc}$ در سویه‌های مقاوم به چند دارو کلبسیلا پنومونیه با روش مولکولی PCR انجام گردید.

## مواد و روش‌ها

### ایزوله‌های باکتریایی

در مجموع، هزار نمونه ادرار، خون، مایع مغزی– نخاعی، زخم، خلط، مایع صفاق، ترشحات چشم و آبسه داخل شکمی بیماران بستری در بیمارستان‌های هاجر و کاشانی و سایر مراکز بهداشتی درمانی شهرکرد در طی سال‌های ۹۱-۱۳۸۹ جمع‌آوری شد. در آزمایشگاه ۲۰۲ ایزوله کلبسیلا شامل ۱۸۰ سویه کلبسیلا پنومونیه و ۲۲ سویه کلبسیلا اکسی توکا توسط روش‌های متداول بیوشیمیایی و میکروسکوپی شناسایی شدند.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 9:33 +0330 on Sunday December 24th 2017

بیشترین نمونه‌ها را ادرار ۹۸ مورد (۴۸/۵٪) و نمونه خون ۳۱ مورد (۱۵/۳٪) به خود اختصاص دادند، درحالی‌که مایع صفاقی با تعداد ۵ مورد (۲/۵٪) و ترشحات چشم نیز با ۵ مورد (۲/۵٪) کمترین میزان را در این میان دارا بودند (جدول ۱). همه ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه در۸۰- درجه سلسیوس در محیط TSB با ۱۰ ٪ گلیسرول تا زمان انجام کارهای مولکولی نگهداری شدند.

**جدول۱. توزیع فراوانی ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران مورد بررسی**

| نمونه بالینی | تعداد | درصد |
|---|---|---|
| ادرار | ۹۸ | ۴۸/۵ |
| خون | ۳۱ | ۱۵/۳ |
| زخم | ۲۵ | ۱۲/۴ |
| خلط | ۲۲ | ۱۰/۹ |
| آبسه شکمی | ۹ | ۴/۵ |
| مایع مغزی – نخاعی | ۷ | ۳/۵ |
| مایع صفاقی | ۵ | ۲/۵ |
| ترشحات چشم | ۵ | ۲/۵ |
| جمع | ۲۰۲ | ۱۰۰ |

## پروفایل آنتی‌بیوتیکی

حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هینتون آگار با توجه به دستورالعمل‌های CLSI انجام شد. ذکر این نکته لازم است از سویه استاندارد اشریشیا کلی ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه ATCC BAA-1705 به عنوان کنترل مثبت استفاده قرار شد (۱۷).

آنتی‌بیوتیک‌های ( *Mast* Diagnostics, *Mast group* Ltd., Merseyside, UK) مورد بررسی شامل آموکسی‌سیلین (بیست میکروگرم)، سفتازیدیم (سی میکروگرم)، سفتریاکسون (سی میکروگرم)، سفازولین (سی میکروگرم)، سفوتاکسیم (سی میکروگرم)، ایمیپنم (ده میکروگرم)، مروپنم (ده میکروگرم)، آزترونام (سی میکروگرم)، جنتامایسین (ده میکروگرم)، آمیکاسین (سی میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (پنج میکروگرم)، کوتریموکسازول (بیست‌وپنج میکروگرم)، نیتروفورانتوئین (سی میکروگرم) و تتراسایکلین (سی۰ میکروگرم) بودند. هم چنین MIC مروپنم، ایمیپنم، پاپیراسیلین-تازوباکتام با روش میکرودایلوشن براث تعیین گردید.

## تکثیر ژن $bla_{kpc}$

ژنوم تمام ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی با استفاده از کیت High pure PCR template preparation Kit (ساخت شرکت Roche کشور آلمان) استخراج شد. واکنش PCR در حجم نهائی ۳۰µL در نظر گرفته شد. هر نمونه شامل: ۱۵µL 2X Master mix (ساخته کمپانی Ampliqon III کشور دانمارک) حاوی $MgCl_2$ 1.5mM ، ۱ µgr DNA الگو، ۲۰pmol از هر پرایمر R و F و آب مقطر دوبار تقطیر استریل تا حجم۳۰ µL بود.

پرایمر ژن $bla_{kpc}$ مورد استفاده در تحقیق حاضر قادر به تکثیر یک قطعه ۳۹۹bp از تمام واریانت‌های $bla_{kpc}$ است. هم‌چنین به منظور بالا بردن کارایی و اطمینان از انجام چرخه PCR در نمونه‌هایی که از نظر ژن $bla_{kpc}$ منفی بوده و در الکتروفورز نهایی نیز فاقد باند بودند از پرایمرهای قطعه ژن $bla_{SHV-1a}$ که در تمامی باکتری‌های کلبسیلا وجود دارد به عنوان کنترل داخلی، به همراه پرایمرهای اختصاصی ژن $bla_{kpc}$ در واکنش PCR استفاده شد. پرایمرهای $bla_{SHV-1a}$ قطعه ۲۱۳ bp را تکثیر می‌کند (شکل ۱). مشخصات پرایمرها در جدول ۲ ارائه شده است.

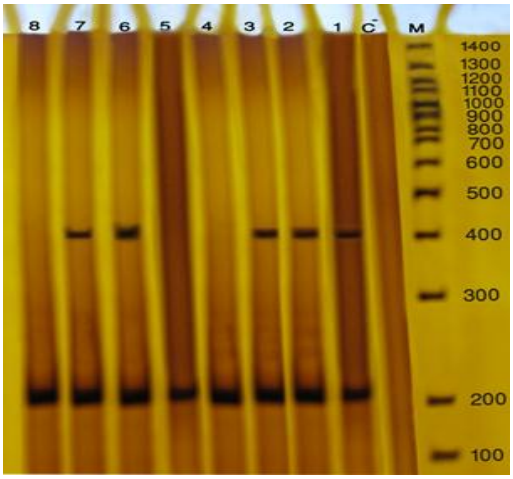
**جدول۲. ویژگی‌های پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR**

| ژن | توالی پرایمر | اندازه محصول (bp) |
|---|---|---|
| $bla_{kpc}$ | Forward: 5'-TCTGGACCGCTGGGAGCTGG-3'<br>Reverse: 5'-TGCCCGTTGACGCCCAATCCC-3' | ۳۹۹ |
| $bla_{SHV-1a}$ | Forward, 5'-ATCTGGTGGACTACTCGC-3'<br>Reverse, 5'-GCCTCATTCAGTTCCGTT-3' | ۲۱۳ |

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 9:33 +0330 on Sunday December 24th 2017

فرایند PCR در دستگاه ترموسایکلر شامل ده دقیقه ۹۵ درجه سلسیوس، بدنبال آن ۳۶ سیکل شصت ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، شصت ثانیه در ۶۲ درجه سلسیوس مرحله Annealing و شصت ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت پنج دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام گرفت. تمام آزمایشات بر روی محصولات PCR، دو بار تکرار شدند.

برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶٪ و رنگ آمیزی DNA با نیترات نقره استفاده گردید(شکل۱) ژل‌ها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت محصول، از جهت وجود ژن $bla_{kpc}$ تعیین توالی شدند. ژنوم استخراج شده سویه رفرانس کلبسیلا پنومونیه ATCC BAA-1705 به عنوان کنترل مثبت و کلبسیلا پنومونیهATCC BAA-1706 به عنوان کنترل منفی در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت.




**شکل۱. الکترفورز پلی‌اکریل‌آمید (PAGE)محصول تکثیرشده ژن $bla_{kpc}$ و $bla_{SHV-1a}$ سویه‌های کلبسیلا پنومونیه با PCR . ردیف M مارکر ( 100bp DNA ladder, SM#333)، ردیف C: محصولات تکثیرشده ژن $bla_{kpc}$ (۳۹۹bp ) و $bla_{SHV-1a}$ (۲۱۳bp) در سویه استاندارد. ردیف ۱ ،۲،۳،۶ و ۷ محصولات تکثیرشده ژن $bla_{kpc}$ و $bla_{SHV-1a}$ در کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده از نمونه‌های بالینی. ردیف ۴ ،۵ و۸ محصولات تکثیرشده ژن $bla_{SHV-1a}$ در کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده فاقد ژن $bla_{kpc}$ از نمونه‌های بالینی.**

## یافته‌ها

در این تحقیق از ۲۰۲ نمونه کلبسیلا ایزوله شده از هزار نمونه بیماران بستری، ۱۸۰ نمونه (۸۹/۱٪) به عنوان کلبسیلا پنومونیه و ۲۲ نمونه به عنوان کلبسیلا اکسی‌توکا (۱۰/۹٪) تعیین هویت شدند. در بررسی انجام شده از ۲۰۲ سویه کلبسیلایی ایزوله شده، ۱۳۵مورد (۶۶/۸٪) مربوط به عفونت‌های بیمارستانی ( بیماران بستری) و ۶۷ مورد (۳۳/۲٪) مربوط به بیماران سرپایی بودند. بیشترین بیمارانی که به عفونت کلبسیلایی مبتلا بودند در بخش مراقبت‌های ویژه (۲۸/۱ ٪) و کمترین بیماران در بخش قلب (۲/۲٪) بستری بودند. این نتایج اهمیت عفونت بیمارستانی را نشان می‌دهد. میزان مقاومت به ایمیپنم در بین ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه حدود ۲۲/۸٪ و به مروپنم حدود ۲۰/۳٪ بود (جدول ۳). این ایزوله‌های مقاوم به کرباپنم‌ها، در تست میکرودایلوشن MIC بالای ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان دادند.

از میان ۱۴ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی، کلبسیلا پنومونیه‌های ایزوله‌شده به آموکسی‌سیلین، سفازولین و نیتروفورانتوئین بالاترین مقاومت و به سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، ایمیپنم و مروپنم کمترین مقاومت را نشان دادند (جدول ۳). هم‌چنین در این مطالعه مشخص گردید که هیچ سویه ای از کلبسیلا پنومونیه مقاوم به همه آنتی بیوتیک‌ها ایزوله نشده و آنتی‌بیوتیکی وجود دارد که بروی آنها مؤثر باشد.

نتایج PCR برای شناسایی ژن کارباپنماز $bla_{kpc}$ در ۱۸۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه و ۲۲ ایزوله کلبسیلا اکسی‌توکا، نشان داد که از مجموع ۲۰۲ سویه کلبسیلا، ۲۴ مورد از نمونه‌ها از نظر وجود ژن $bla_{kpc}$ مثبت بودند، لذا شیوع ژن $bla_{kpc}$ با توجه به نتایج بدست آمده در این بررسی برابر ۱۱/۹ درصد بدست آمد. این ژن در سه مورد (۱۳/۶٪) از مجموع ۲۲ مورد سوش‌های کلبسیلا اکسی‌توکا شناسایی شد. هم چنین یازده تا از این سویه‌ها از ادرار، هفت مورد از خون، سه مورد از چشم و سه مورد از خلط ایزوله شدند و هیچ کلبسیلای حاوی $bla_{kpc}$ در نمونه‌های مایع صفاقی، مایع مغزی-نخاعی، آبسه شکمی و زخم یافت نشد. نتایج این

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 9:33 +0330 on Sunday December 24th 2017

بررسی نشان داد که اغلب موارد کلبسیلای حاوی $bla_{kpc}$ از بخش‌های ICU و بخش‌های اطفال و نوزادان ایزوله شده بود. هم چنین درصد ایزوله‌های کلبسیلا $bla_{kpc}$ مثبت در عفونت بیمارستانی تقریبا دو برابر درصد مذکور در عفونت کسب شده از جامعه بود. در نهایت بیشتر این افراد بوسیله تجویز چند آنتی‌بیوتیک درمان شدند.

**جدول ۳. توزیع فراوانی الگوی مقاومت دارویی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه ایزوله‌شده از بیماران مورد بررسی**

| ردیف | آنتی‌بیوتیک | | مقاوم | حد واسط | حساس |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | آموکسی‌سیلین | درصد | ۸۱/۷ | ۰/۵ | ۱۷/۸ |
| | | تعداد | ۱۶۵ | ۱ | ۳۶ |
| ۲ | نیتروفورانتوئین | درصد | ۶۸/۳ | ۱۰/۹ | ۲۰/۸ |
| | | تعداد | ۱۳۸ | ۲۲ | ۴۲ |
| ۳ | سفازولین | درصد | ۵۸/۹ | ۴ | ۳۷/۱ |
| | | تعداد | ۱۱۹ | ۸ | ۷۵ |
| ۴ | کوتریموکسازول | درصد | ۵۳/۵ | ۲/۵ | ۴۴/۱ |
| | | تعداد | ۱۰۸ | ۵ | ۸۹ |
| ۵ | سفتازیدیم | درصد | ۴۶ | ۲/۵ | ۵۱/۵ |
| | | تعداد | ۹۳ | ۵ | ۱۰۴ |
| ۶ | تتراسایکلین | درصد | ۴۳/۱ | ۲۸/۷ | ۲۸/۲ |
| | | تعداد | ۸۷ | ۵۸ | ۵۷ |
| ۷ | سفوتاکسیم | درصد | ۴۳/۱ | ۳ | ۵۳/۵ |
| | | تعداد | ۸۷ | ۶ | ۱۰۸ |
| ۸ | سفتریاکسون | درصد | ۴۰/۱ | ۲ | ۵۷/۹ |
| | | تعداد | ۸۱ | ۴ | ۱۱۷ |
| ۹ | آزترونام | درصد | ۴۰/۱ | ۶/۴ | ۵۳/۵ |
| | | تعداد | ۸۱ | ۱۳ | ۱۰۸ |
| ۱۰ | جنتامایسین | درصد | ۳۲/۲ | ۲ | ۶۵/۸ |
| | | | ۶۵ | ۴ | ۱۳۳ |
| ۱۱ | آمیکاسین | تعداد | ۱۹/۸ | ۳ | ۷۷/۲ |
| | | درصد | ۴۰ | ۶ | ۱۵۶ |
| ۱۲ | ایمیپنم | تعداد | ۲۲/۸ | ۲ | ۷۵/۲ |
| | | درصد | ۴۶ | ۴ | ۱۵۲ |
| ۱۳ | مروپنم | تعداد | ۲۰/۳ | ۰ | ۷۹/۷ |
| | | درصد | ۴۱ | ۰ | ۱۶۱ |
| ۱۴ | سیپروفلوکساسین | تعداد | ۱۵/۳ | ۷/۴ | ۷۷/۲ |
| | | درصد | ۳۱ | ۱۵ | ۱۵۶ |

## بحث و نتیجه‌گیری

کلبسیلا پنومونیه‌های حاوی ژن $bla_{kpc}$ به علت مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی به درمان‌های روتین و انتقال پلاسمیدی این ژن‌ها به گونه‌ها و جنس‌های دیگر انتروباکتریاسه، در سال‌های اخیر مسئول طغیان‌های عفونت بیمارستانی زیادی در دنیا بوده اند، به‌طوری‌که امروزه جداسازی و شناسایی سویه‌های دارای ژن $bla_{kpc}$ چالشی واقعی برای آزمایشگاههای تشخیصی است (۱۶-۱۳). به همین دلیل و با توجه به این که میزان وجود ژن $bla_{kpc}$ در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه در ایران مشخص نشده است، این مطالعه برای اولین بار در ایران با هدف تعیین الگو مقاومت دارویی و بررسی وجود ژن $bla_{kpc}$ در سویه‌های مقاوم به چند دارو کلبسیلا پنومونیه با روش مولکولی PCR انجام گردید.

نتایج مطالعه حاضر در مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های کلبسیلا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، نیتروفورانتوئین و کوتریموکسازول با نتایج مطالعه محمدی‌مهر و همکارانش در سال ۱۳۸۹ تقریباً یکسان، ولی در مورد آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین کمتر است که این مسئله می‌تواند ناشی از تفاوت الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها در مناطق جغرافیایی مختلف باشد (۱۸).

در مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های کلبسیلا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، کوتریموکسازول و تتراسایکلین با مطالعه اسلامی و همکارانش در سال ۸۹ در تهران تقریبا همخوانی دارد، ولی در مطالعه حاضر مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک های نیتروفورانتوئین، ایمیپنم، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، سفتازیدیم و جنتامایسین بیشتر بوده است (۱۹).

درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های کلبسیلا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، سفالوتین، نیتروفورانتوئین، کوتریموکسازول، آموکسی سیلین، جنتامایسین و تتراسایکلین در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعه لنگری زاده و همکاران در

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 9:33 +0330 on Sunday December 24th 2017

سال ۸۹ کمتر، ولی در مورد آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، سیپروفلوکساسین و ایمیپنم نتایج دو مطالعه تقریبا همخوانی دارد (۲۰).

از طرف دیگر نتایج مطالعه حاضر از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های کلبسیلا نسبت به سفتریاکسون، کوتریموکسازول و سفتازیدیم با مطالعه Barak و همکارانش در سال ۸۷ تقریباً همخوانی دارد، ولی درصد مقاومت به جنتامایسین در این مطالعه کمتر و مقاومت به سفازولین، مروپنم و سفوتاکسیم بیشتر بوده است (۲۱).

هم‌چنین در مطالعه حاضر نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمیپنم، مروپنم، سفتازیدیم در ایزوله‌های واجد $bla_{kpc}$ با نتایج مطالعات وود فورد و همکاران (۲۲)، براتو و همکاران (۲۳) و کاستانیرا و همکاران (۲۴) تقریباً هم‌خوانی دارد. در مطالعه مذکور تمام سویه‌های واجد $bla_{kpc}$ دارای حساسیت کاهش یافته به ایمیپنم، مروپنم، سفتازیدیم، پنی‌سیلین-تازوباکتام و جنتامایسین بوده، ولی به تتراسایکلین کاملاً حساس باقی مانده بودند. بالعکس در مطالعه حاضر تمام ایزوله‌های واجد $bla_{kpc}$ به تتراسایکلین مقاوم، ولی نیمی از ایزوله‌ها به جنتامایسین حساس باقی مانده‌اند.

در این مطالعه ۲۰۲ سویه کلبسیلا جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های هاجر و کاشانی شهرکرد از نظر وجود ژن $bla_{kpc}$ مورد بررسی قرار گرفتند که اولین گزارش بررسی این ژن در ایران محسوب می‌شود به همین خاطر پرایمر مورد استفاده از قسمتی از ژن $bla_{kpc}$ انتخاب شد که در تمام واریانت‌ها (KPC2-KPC11) یکسان باشد تا همه واریانت‌های ژن $bla_{kpc}$ شناسایی شود. در بررسی ژنوتیپی این ۲۰۲ ایزوله به روش PCR مشخص شد که ۱۱/۹٪ کل سویه‌های کلبسیلای جدا شده واجد ژن $bla_{kpc}$ بودند که این برخلاف نتایج Bratu و همکارانش می‌باشد که میزان جداسازی ژن $bla_{kpc}$ را در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه ۲۴٪ گزارش کرده‌بودند. لازم بذکر است که در مطالعه مذکور تمام ایزوله‌های حامل $bla_{kpc}$ به سفتازیدیم مقاوم بودند که با نتیجه مطالعه حاضر (۹۱/۷٪) مطابقت داشت (۲۳).

میزان جداسازی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه واجد ژن $bla_{kpc}$ در این مطالعه خیلی کمتر از مطالعه کاستانیرا و همکاران (۲۴) و مطالعه چن و همکاران (۲۵) می‌باشد که میزان جداسازی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه واجد ژن $bla_{kpc}$ به ترتیب ۵۱٪ و ۷۳/۵٪ گزارش نمودند که این تفاوت چشمگیر می‌تواند به‌دلیل تفاوت موقعیت جغرافیایی و هم‌چنین تفاوت منشا نمونه‌های دو مطالعه باشد. مثلاً در مطالعه حاضر اغلب موارد مثبت شامل موارد نمونه‌های بیمارستانی (۶۶/۸٪) و سرپایی (۳۳/۲٪) بودند، حال آن که در مطالعات مذکور تمام نمونه‌ها بیمارستانی و با مقاومت چندگانه بودند.

نتایج این مطالعه همانند بررسی کوزون و همکاران (۲۶) نشان داد که سویه‌های واجد ژن $bla_{kpc}$ مقاومت بالای به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها دارند، که این می‌تواند به دلیل وجود هم‌زمان چندین ژن بتالاکتاماز در این ایزوله‌ها باشد. نتایج مطالعه و همکاران (۲۶) نشان داد که سویه‌های $bla_{kpc}$ مثبت جداشده از پنج کشور متفاوت، دارای سایر ژنهای بتالاکتامازها مانند $bla_{SHV11}$، $bla_{OKP-A/B}$ ، $bla_{TEM}$ ، $bla_{CTX-M}$ و $bla_{OXA}$ می‌باشند. هم‌چنین در مطالعه Urban و همکارانش نشان داده شد که اکثر سویه‌های اشریشیا کلی حامل ژن $bla_{kpc}$ مثبت دارای بتالاکتاماز CTX-M هستند (۲۷).

بیشترین شیوع ایزوله‌های $bla_{kpc}$ در مطالعه حاضر در نمونه‌های چشم، خون، خلط و ادرار است که با مطالعه چن و همکاران (۲۵) مطابقت داشته، ولی با مطالعه Lopez و همکارانش (۲۸) در سال ۲۰۰۸ در فلسطین که بیشترین نمونه‌ها به ترتیب از ادرار، ترشحات تراکئال، آبسه شکمی و آبسه‌های بافت نرم جدا شده است و مطالعه چن در سال ۲۰۱۱ در چین (۲۵) که بیشترین نمونه‌ها به ترتیب مربوط به نمونه‌های ادرار، خلط، خون و زخم بوده است، هم‌خوانی ندارد که احتمالاً به دلیل تعداد کمتر نمونه‌های بالینی و بیماران مورد بررسی در تحقیق حاضر باشد.

در تحقیق حاضر بیشترین تعداد ایزوله‌های $bla_{kpc}$ مثبت در بخش‌های بستری به ترتیب در بخش‌های ICU (۳۱٪)، نوزادان و اطفال (۲۷/۲٪) بود که با مطالعه Geffen و همکارانش (۲۹) در سال ۲۰۱۰ و مطالعه کانتوپولو و همکاران در یونان (۳۰) تقریبا هم‌خوانی دارد که می‌تواند نشان‌دهنده خطر بالقوه این مقاومت در این بخش‌های بیمارستانی و لزوم توجه بیشتر به رعایت بهداشت توسط پرسنل بخش‌های مربوطه باشد.

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در بین گونه‌های شایع کلبسیلا، گونه پنومونیه نسبت به سایر گونه‌ها در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی شایع‌تر بوده و در این گونه در بیش از پنجاه درصد سویه مقاومت چندداروییی دارند، لذا معیارهای کنترل عفونت‌های بیمارستانی در بیمارستان‌های مورد مطالعه احساس می‌گردد. در این زمینه، به‌دلیل اینکه مقاومت چند دارویی در خانواده کلبسیلا پنومونیه در محیط بیمارستانی در پاسخ به افزایش بی‌رویه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد می‌شود، بنابراین کنترل مصرف آنتی‌بیوتیک، در بیمارستان‌ها نقش مهمی در جلوگیری از ظهور این گونه سوش‌ها و عفونت‌های ناشی از آنها دارد.

هم‌چنین با توجه به این که سویه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای ژن $bla_{kpc}$ از جمعیت میکروبی شهرکرد جداسازی شده و اغلب این سویه‌ها مقاوم به اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند و به دلیل انتقال پلاسمیدی و سریع این مقاومت‌ها بین اعضای انتروباکتریاسه خصوصاً کلبسیلا پنومونیه‌ها، درمان بسیار دشوار بیماران مبتلا به عفونت با این میکروارگانیسم‌ها و مرگ‌ومیر بالای این بیماران، تشخیص سریع این میکروارگانیسم‌ها و کنترل انتشار آنها یک اورژانس پزشکی محسوب می‌گردد.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، معاونت پژوهش، اساتید و کارکنان گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تشکر و قدردانی می‌شود.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 9:33 +0330 on Sunday December 24th 2017

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 9:33 +0330 on Sunday December 24th 2017

## References


1. Falade AG, Ayede AI. Epidemiology, etiology and management of childhood acute community-acquired pneumonia in developing countries--a review. Afr J Med Med Sci. 2011; 40(4):293-308.
2. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. Korean J Intern Med. 2012; 27(2):128-142.
3. Lu PL, Liu YC, Toh HS, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: 2009-2010 results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). Int J Antimicrob Agents. 2012; 40 Suppl: S37-43.
4. Marra AR, Wey SB, Castelo A, et al. Nosocomial bloodstream infections caused by Klebsiella pneumoniae: impact of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. BMC Infect Dis. 2006 14; 6:24.
5. Giobbia M, Scotton PG, Carniato A, Cruciani M, Farnia A, Daniotti E, Scarpa G, Vagliac A. Community-acquired Klebsiella pneumoniae bacteremia with meningitis and endophthalmitis in Italy. Int J Infect Dis. 2003; 7(3):234-235.
6. Tumbarello M, Spanu T, Sanguinetti M, et al. Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum-actamase-Producing Klebsiella pneumoniae: Risk Factors, Molecular Epidemiology, and Clinical Outcome. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(2):498-504.
7. Rapp RP, Urban C. Klebsiella pneumoniae carbapenemases in Enterobacteriaceae: history, evolution, and microbiology concerns. Pharmacotherapy. 2012; 32(5):399-407.
8. Chen LF, Chopra T, Kaye KS. Pathogens resistant to antibacterial agents. Infect Dis Clin North Am. 2009; 23(4):817-845.
9. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(6):1119-1125.
10. Gootz TD. The global problem of antibiotic resistance. Crit Rev Immunol. 2010; 30(1):79-93.
11. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-β-lactamases: a last frontier for β-lactams? Lancet Infect Dis. 2011; 11(5):381-393.
12. George A, Jacoby MD, Munoz LS. The New Beta lactamase. N Engl J Med. 2005 ;352(4):380-391
13. Cuzon G, Naas T, Nordmann P. KPC carbapenemases: what is at stake in clinical microbiology? Pathol Biol (Paris). 2010; 58 (1): 39-45.
14. Mirnejad R, Dehghani M, Masjedian F, Imani Fooladi AA, Haghighat S. Antimicrobial Susceptibility Patterns and Distribution of blaKPC Genes among A. baumannii isolated from Patients at Tehran - Iran Hospitals. Journal of pure and applied microbiology. 2012; 6(2):1-5.
15. da Silva RM, Traebert J, Galato D. Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 9:33 +0330 on Sunday December 24th 2017

producing Klebsiella pneumoniae: a review of epidemiological and clinical aspects. Expert Opin Biol Ther. 2012; 12(6):663-671.

16. Hussein K, Sprecher H, Mashiach T. Oren I, Kassis I, Finkelstein R. Carbapenem resistance among Klebsiella pneumoniae isolates: risk factors, molecular characteristics, and susceptibility patterns. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009; 30(7):666-671.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M100-S222012. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
18. Mohammadimehr M, Feizabadi MM, Bahadori A. Antibiotic resistance pattern of Gram negative Bacilli Caused nosocomial infections in ICUs in khanevadeh and golestan hospital in Tehran-2007. Iranian Journal of Microbiology. 2011; 8(4):283-290. (In Persian)
19. Eslami G, Seyedjavadi SS, Goudarzi H, Fallah F, Goudarzi M. Distribution of Integrons among Multidrug Resistant E. coli and Klebsiella Strains. Journal of the Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences.2010; 34 (1):61-65.(In Persian)
20. Langarizadeh N, Ahangarzadeh Rezaee M, Aghazadeh M, Hasani A. Prevalence of multi-drug resistant (MDR) klebsiella pneumoniae among children and adults with urinary tract infection referred to tabriz teaching hospitals. The Quarterly Journal of Biological Sciences. 2011; 1: (12): 9-17.(In Persian)
21. Barak M, Mamishi S, Siadati A, Salamati P, Khotaii GH, Mirzarahimi M. Risk Factors and Bacterial Etiologies of Nosocomial Infections in NICU and PICU Wards of Children's Medical Center and Bahrami Hospitals During 2008-2009. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11(2): 113-120. (In Persian)
22. Woodford N, Tierno PM JR, Young K, et al. Outbreak of Klebsiella pneumoniae Producing a New Carbapenem-Hydrolyzing Class A ß-Lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(12):4793-4799.
23. Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, 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.
24. Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo-b-lactamase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(2):570-573.
25. 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 β-Lactamases in Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae in a Teaching Hospital in China. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(5):2493-2494.
26. Cuzon G, Naas T, Truong H, et al. Worldwide diversity of Klebsiella pneumonia

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 9:33 +0330 on Sunday December 24th 2017

that produces β-lactamase blaKPC-2 gene. Emerg Infect Dis. 2010; 16(9):1349-1356.

27. Urban C, Bradford PA, Tuckman M, Segal-Maurer S, Wehbeh W, Grenner L. Carbapenem-resistant Escherichia coli harboring Klebsiella pneumoniae carbapenemase β-lactamases associated with long-term care facilities. Clin Infect Dis. 2008; 46(11): 127-130.
28. Lopez JA, Correa A, Navon-Venezia S, et al. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing Klebsiella pneumoniae strain. Clin Microbiol Infect.2011; 17(1): 52-56.
29. Geffena Y, Finkelstein R, Oren I, Shalaginov R, Tavleva I, Sprecher H. Changing epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae carriage during an outbreak of carbapenem-resistant Klebsiella pneumonia. J Hosp Infect. 2010; 76(4):355-356.
30. Kontopoulou K, Protonotariou E, Vasilakos K, et al. Hospital outbreak caused by Klebsiella pneumoniae producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin. J Hosp Infect. 2010; 76(1):70-73.