مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۴۸/هفته دوم مهر ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۲۷

جداسازی و شناسایی سویه‌های انتروباکتریاسه تولید کننده آنزیم کارباپنماز KPC و تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها

داریوش شکری[۱]، سینا مباشری‌زاده[۱]، معصومه نوروزی باروق[۲]، دکتر مجید یاران[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی سویه‌های انتروباکتریاسه‌ی تولید کننده‌ی آنزیم کارباپنماز KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase) و تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در آن‌ها در چند بیمارستان شهر اصفهان بود که به طور جامع بررسی نشده بود.

روش‌ها: به منظور بررسی وجود آنزیم کارباپنماز KPC از آزمون هاج تغییر یافته (MHT یا Modified Hodge test) و آزمون تأییدی آن توسط تعیین کمترین غلظت ممانعتی (MIC یا Minimum inhibitory concentration) به روش Etest (Epsilometer test) برای ایمی‌پنم استفاده شد و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها توسط روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) تعیین گردید.

یافته‌ها: تعداد ۴۷۵ سویه انتروباکتریاسه از نمونه‌های بالینی مختلف در طی ۹ ماه (تیر ۱۳۹۱ تا فروردین ۱۳۹۲) از سه بیمارستان شهر اصفهان جداسازی شدند که از این تعداد، ۲۸۵ ایزوله (۶۰ درصد) اشرشیاکلی، ۱۲۸ ایزوله (۲۷ درصد) کلبسیلا (۷۵ عدد کلبسیلا پنومونیه)، ۱۶ ایزوله (۳/۴ درصد) انتروباکتر ائروژنز، ۱۲ ایزوله (۲/۵ درصد) پروتئوس ولگاریس، ۹ ایزوله (۱/۹ درصد) انتروباکترکلواسه‌آ، ۸ ایزوله (۱/۷ درصد) سیتروباکتر فروندی، ۴ ایزوله (۰/۸۴ درصد) پروتئوس میرابیلیس، ۴ ایزوله (۰/۸۴ درصد) شیگلا سونئی، ۳ ایزوله (۰/۶ درصد) سیتروباکتر دایورسوس، ۳ ایزوله (۰/۶ درصد) سراشیا مارسه سنس، ۲ ایزوله (۰/۴۲ درصد) سالمونلا پاراتیفی A و یک ایزوله (۰/۲ درصد) هم پرووایدانسیا استوارتی بودند. برای باکتری اشرشیاکلی مقاومت به دو دیسک سفتازیدیم و سفوتاکسیم و نیز میزان غیر حساس بودن (نیمه حساس یا مقاوم) برای دو دیسک ایمی‌پنم و مروپنم به ترتیب ۶۰، ۶۳، ۶ و ۹ درصد، برای باکتری کلبسیلا به ترتیب ۷۰، ۷۵، ۵۵ و ۵۸ درصد و در مورد گونه کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰، ۹۵ و ۹۴ درصد و برای دیگر سویه‌ها به ترتیب ۲۰، ۱۷، ۵ و ۳ درصد بود. آزمون آنزیم کارباپنماز KPC برای ۲ سویه (۰/۷ درصد) از سویه‌های اشرشیاکلی، ۶۵ سویه (۸۷ درصد) از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و یک سویه پروتئوس ولگاریس (۶ درصد) از سویه‌های پروتئوس مثبت بود. همگی سویه‌هایی که آزمون هاج تغییر یافته‌ی آن‌ها در مرحله‌ی قبلی مثبت بود، MIC ایمی‌پنم آن‌ها نیز در محدوده‌ی مقاوم بود و بنابراین، مقاومت به کارباپنم در آن‌ها ثابت شد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که در بین گونه‌های شایع انتروباکتریاسه، باکتری کلبسیلا پنومونیه نسبت به سایر باکتری‌ها حاوی میزان بالاتری از آنزیم KPC بود و اغلب گونه‌های آن دارای مقاومت چند دارویی بالایی بودند.

واژگان کلیدی: انتروباکتریاسه، کلبسیلا پنومونیه، آنزیم کلبسیلا پنومونیه کاربابنماز (KPC)، روش Etest، آزمون هاج تغییر یافته (MHT)

ارجاع: شکری داریوش، مباشری‌زاده سینا، نوروزی باروق معصومه، یاران مجید. **جداسازی و شناسایی سویه‌های انتروباکتریاسه تولید کننده آنزیم کاربابنماز KPC و تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۴۸): ۱۲۵۶-۱۲۴۷

۱- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی دکتری، گروه پزشکی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۳- مسؤول فنی آزمایشگاه، مرکز تحقیقات بیماری‌های گرمسیری و عفونی. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: داریوش شکری
Email: dariush.shokri61@yahoo.com

مقدمه

مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها جزء مهم‌ترین خطرات تهدید کننده‌ی بهداشت جهانی توسط سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization یا WHO) معرفی شده است که درصد فراوانی از مرگ و میرهای سالانه‌ی بیمارستانی را به خود اختصاص می‌دهد (۱). از این میان، باکتری‌های موجود در خانواده‌ی انتروباکتریاسه با توجه به فراوانی بسیار بالای آن‌ها در جوامع مختلف، دارای اهمیت بیشتری می‌باشند (۲). مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در این خانواده، با مکانیسم‌های مختلفی ایجاد می‌شود که از این میان، تولید آنزیم کارباپنماز مهم‌ترین این مکانسیم‌ها می‌باشد (۳). معرفی کاربا‌پنم‌ها (شامل ارتاپنم، ایمی‌پنم، دوری‌پنم و مروپنم) به دنیای پزشکی، پیشرفت بزرگی در درمان بیماری‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به بتالاکتام بوده است (۴).

کاربا‌پنم‌ها به دلیل طیف وسیع فعالیت و پایداری در مقابل هیدرولیز توسط اغلب بتالاکتامازها، داروهای انتخابی برای درمان عفونت‌های ناشی از باسیل‌های گرم منفی مقاوم به پنی‌سیلین یا سفالوسپورین می‌باشند (۴، ۱). با این وجود، ظهور بتالاکتامازهای هیدرولیز کننده‌ی کاربا‌پنم با واسطه‌ی پلاسمید و انتشار آن‌ها در میان باکتری‌های گرم منفی به خصوص کلبسیلا پنومونیه، تهدیدی برای سلامتی جامعه است (۵). شیوه‌ی عمل کاربا‌پنم‌ها مهار سنتز دیواره‌ی سلولی در باکتری‌ها می‌باشد و باعث افزایش نفوذ پذیری غشای خارجی سلول‌ها و اثر روی سیستم Efflux آن‌ها می‌شوند (۵-۴).

مقاومت به کاربا‌پنم به دلایل مختلفی از قبیل کاهش بیان پروتئین‌های غشای خارجی، افزایش فعالیت سیستم Efflux و تولید بتالاکتامازهای کاربا‌پنماز که می‌توانند کاربا‌پنم‌ها را با عمل هیدرولیز غیر فعال کنند، نسبت داده شده است (۵). بر اساس طبقه‌بندی مولکولی Ambler، آنزیم‌های هیدرولیز کننده‌ی کاربا‌پنم به سه گروه مجزا تقسیم می‌شوند: گروه‌های A، B و D. سه خانواده‌ی اصلی گروه A، سرین کاربا‌پنمازها شامل آنزیم‌های IMI/NMC (Imipenemase/non- metallocarbapenemase)، SME (Serratia marcescens enzyme) و KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase) می‌باشند که مکانیسم عمل هیدرولیز آن‌ها نیازمند یک جایگاه فعال سرین در موقعیت ۷۰ می‌باشد (۵، ۲). آنزیم‌های KPC بر روی پلاسمیدهای قابل انتقال یافت شده‌اند و بنابراین، می‌توانند به سرعت در بین باکتری‌های مختلف مبادله شوند و باعث ایجاد مقاومت شدید گردند (۴).

با وجود آن که این آنزیم‌ها اغلب در کلبسیلا پنومونیه یافت شده‌اند، گزارش‌هایی نیز در انتروباکتر، سالمونلا، سراشیا و سایر باکتری‌های خانواده‌ی انتروباکتریاسه وجود دارد (۶). اولین عضو از خانواده‌ی KPC در یک ایزوله‌ی بالینی کلبسیلا پنومونیه از کارولینای شمالی در سال ۱۹۹۷ گزارش شد که این ایزوله به تمام بتالاکتام‌های مورد آزمایش مقاوم بود؛ اما بعدها چندین گروه مختلف از این آنزیم‌ها در سراسر دنیا گزارش شد (۵-۳، ۱).

بنابراین، تشخیص نوع این باکتری‌ها و بررسی نوع مکانیسم مقاومت در آن‌ها به منظور دستیابی به بهترین راهکار برای حذف آن‌ها قابل اهمیت است. از طرف دیگر، تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی این باکتری‌ها، به منظور به دست آوردن آنتی بیوتیک‌های

کارا و قابل استفاده علیه این باکتری‌ها، امر اساسی در درمان آن‌ها می‌باشد.

هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی سویه‌های انتروباکتریاسه تولید کننده‌ی آنزیم کارباپنماز KPC و تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در آن‌ها در چند بیمارستان شهر اصفهان بود.

روش‌ها

در ابتدا سویه‌های مختلف خانواده‌ی انتروباکتریاسه از نمونه‌های مختلف بالینی جداسازی و شناسایی شدند. شناسایی ایزوله‌ها به روش‌های فنوتایپیک انجام شد (۶).

الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک در سویه‌های جداسازی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، مروپنم، آمپی‌سیلین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفپیم، پیپراسیلین/ تازوباکتام (تازوسین)، سفوتاکسیم و سفتازیدیم (خریداری شده از شرکت Mast انگلیس) به روش Disk diffusion و با روش استاندارد Kirby-Bauer بر اساس راهنمای مؤسسه‌ی استاندارد آزمایشگاهی و کلینیکی (CLSI یا Clinical and Laboratory Standards Institute) تعیین گردید (۷).

بر اساس پیشنهاد CLSI، در سویه‌های جداسازی شده، عدم حساسیت (مقاومت و یا نیمه حساس بودن) به یکی یا تعداد بیشتری از آنتی بیوتیک‌های خانواده‌ی کارباپنم از جمله ایمی‌پنم، ارتاپنم و مروپنم و یا مقاومت به یکی یا تعداد بیشتری از سفالوسپورین‌های نسل سوم از جمله سفوتاکسیم و سفتازیدیم برای شناسایی اولیه‌ی باکتری‌های احتمالی دارای مقاومت KPC مورد استفاده قرار گرفت (۷).

آزمون تأییدی تولید آنزیم توسط آزمون هاج تغییر یافته (Modified Hodge test) انجام شد (۸). در این روش، ابتدا سوسپانسیونی از باکتری استاندارد E. coli ATCC ۲۵۹۲۲ (اشرشیاکلی) که به غلظت ۰/۵ مک فارلند رسیده بود، تهیه گشت و به کمک نرمال سالین به غلظت ۰/۱ مک فارلند رسانده شد. سپس با استفاده از سوآب در سطح محیط مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد و دیسک آنتی‌بیوتیکی ارتاپنم ۱۰ µg در مرکز محیط قرار داده شد.

در مرحله‌ی بعد، از باکتری‌های جدا شده‌ی مشکوک به وجود آنزیم کارباپنماز، به کمک سواب از لبه‌ی دیسک ارتاپنم (گذاشته شده در مرکز) تا لبه‌ی پلیت به صورت یک خط مستقیم کشیده شد و در نهایت، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سویه‌های تولید کننده‌ی آنزیم کارباپنماز باعث می‌شوند که هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک مرکزی به صورت مضرسی شکل در آید (نمای برگ شبدری)؛ در حالی که سویه‌های منفی تغییری در این هاله به وجود نمی‌آورند و هاله‌ی اطراف آن‌ها یکدست باقی می‌ماند.

تست تأییدی نهایی مقاومت به کارباپنم‌ها با روش تعیین کمترین غلظت ممانعتی (MIC یا Minimum inhibitory concentration) به روش Etest (Epsilometer test) برای دیسک ایمی‌پنم به انجام رسید که به این منظور، ابتدا غلظتی برابر ۰/۵ مک فارلند از ایزوله‌هایی که آزمون هاج آن‌ها مثبت شده بود، تهیه گردید و بر روی محیط مولر هینتون آگار به روش کشت چمنی به کمک سواب استریل کشت داده شد. بعد از چند دقیقه، یک نوار Etest از ایمی‌پنم بر روی هر پلیت قرار گرفت و سپس به

مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس عدد MIC آن‌ها خوانده شد.

یافته‌ها

۴۷۵ باکتری جداسازی شده از نمونه‌های بالینی مختلف در طی ۹ ماه (تیر ۱۳۹۱ تا فروردین ۱۳۹۲) از سه بیمارستان شهر اصفهان به عنوان سویه‌های انتروباکتریاسه شناسایی گردید که لیست آن‌ها در جدول ۱ آمده است. همان‌طور که از جدول ۱ مشخص است، اغلب این نمونه‌ها از عفونت ادراری جداسازی گردیدند.

در مرحله‌ی بعد، الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها به روش دیسک دیفیوژن به انجام رسید. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی برای باکتری اشرشیاکلی آزمون شده با روش دیسک دیفیوژن و میزان مقاومت به یکی از دیسک‌های سفالوسپورین نسل سوم (سفتازیدیم و سفوتاکسیم) و نیز میزان غیر حساس بودن (نیمه حساس یا مقاوم) برای دو دیسک ایمی‌پنم و مروپنم به ترتیب ۱۷۱، ۱۸۰، ۱۷ و ۲۵ عدد (به ترتیب ۶۰، ۶۳، ۶ و ۹ درصد) بود.

جدول ۲. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی برای باکتری اشرشیاکلی آزمون شده با روش دیسک دیفیوژن

نام دیسک	حساس (درصد)	نیمه حساس (درصد)	مقاوم (درصد)
آمپی سیلین	۱۵	۳	۸۲
تازوسین	۹۰	–	۱۰
سفتازیدیم	۴۰	*۵	*۵۵
سفوتاکسیم	۳۷	*۳	*۶۰
ایمی‌پنم	۹۴	*۲	*۴
مروپنم	۹۱	*۴	*۵
آمیکاسین	۹۰	۴	۶
سیپروفلوکساسین	۴۸	۵	۴۷
نیتروفورانتوئین**	۸۹	۶	۵
سفپیم	۷۱	۳	۲۶

* برای بررسی وجود آنزیم Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) این سویه‌ها انتخاب شدند.

** فقط برای عفونت‌های ادراری استفاده شده است.

جدول ۱. لیست، تعداد، درصد و محل جداسازی باکتری‌های شناسایی شده در خانواده‌ی انتروباکتریاسه طی نه ماه

نام باکتری	تعداد باکتری (درصد)	محل جداسازی (تعداد)			
		ادرار	زخم	نمونه‌ی تنفسی	سایر نمونه‌ها
اشرشیاکلی	۲۸۵ (۶۰/۰۰)	۲۳۷	۳۳	۵	۱۰
کلبسیلا	۱۲۸ (۲۷/۰۰)	۵۵	۲۰	۴۵	۸
انتروباکتر ائروژنز	۱۶ (۳/۴۰)	۱۲	۲	۱	۱
انتروباکتر کلواسه‌آ	۹ (۱/۹۰)	۸	۰	۰	۱
پروتئوس ولگاریس	۱۲ (۲/۵۰)	۸	۲	۰	۲
پروتئوس میرابیلیس	۴ (۰/۸۳)	۴	۰	۰	۰
سیتروباکتر فروندی	۸ (۱/۷۰)	۶	۱	۰	۱
سیتروباکتر دایورسوس	۳ (۰/۶۰)	۳	۰	۰	۰
سراشیا مارسه سنس	۳ (۰/۶۰)	۲	۰	۱	۰
پرووایدانسیا استارتی	۱ (۰/۲۱)	۱	۰	۰	۰
شیگلا سونئی	۴ (۰/۸۴)	۰	۰	۰	۴ (از مدفوع)
سالمونلا پاراتیفی A	۲ (۰/۴۲)	۰	۰	۰	۲ (از مدفوع)
جمع کل (درصد)	۴۷۵ (۱۰۰)	۳۳۶	۵۸	۵۲	۲۹

جدول ۳. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی برای باکتری کلبسیلای آزمون شده با روش دیسک دیفیوژن

نام دیسک	حساس (درصد)	نیمه حساس (درصد)	مقاوم (درصد)
آمپی سیلین	۲	۰	۹۸
تازوسین	۵۵	–	۴۵
سفتازیدیم	۳۰	*۵	*۶۵
سفوتاکسیم	۲۵	*۳	*۷۲
ایمی‌پنم	۴۵	*۳	*۵۲
مروپنم	۴۲	*۳	*۵۵
آمیکاسین	۴۰	۵	۵۵
سیپروفلوکساسین	۴۵	۷	۴۸
نیتروفورانتوئین**	۵۷	۳	۴۰
سفپیم	۵۷	۲	۴۱

* برای بررسی وجود آنزیم Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) این سویه‌ها انتخاب شدند.

** فقط برای عفونت‌های ادراری استفاده شده است.

جدول ۴. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی برای باکتری کلبسیلا پنومونیه‌ی آزمون شده با روش دیسک دیفیوژن

نام دیسک	حساس (درصد)	نیمه حساس (درصد)	مقاوم (درصد)
آمپی سیلین	۰	۰	۱۰۰
تازوسین	۱	–	۹۹
سفتازیدیم	۰	*۰	*۱۰۰
سفوتاکسیم	۰	*۰	*۱۰۰
ایمی‌پنم	۵	*۳	*۹۲
مروپنم	۶	*۴	*۹۰
آمیکاسین	۳	۲	۹۵
سیپروفلوکساسین	۲	۰	۹۸
نیتروفورانتوئین**	۳	۰	۹۷
سفپیم	۰	۰	۱۰۰

* برای بررسی وجود آنزیم Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) این سویه‌ها انتخاب شدند.

** فقط برای عفونت‌های ادراری استفاده شده است.

برای باکتری کلبسیلا، میزان مقاومت به یکی از دیسک‌های سفتازیدیم و سفوتاکسیم و نیز میزان غیر حساس بودن (نیمه حساس یا مقاوم) برای دو دیسک ایمی‌پنم و مروپنم به ترتیب ۹۰، ۹۶، ۷۰ و ۷۴ عدد (به ترتیب ۷۰، ۷۵، ۵۵ و ۵۸ درصد) بود (جدول ۳). این مقادیر در مورد گونه‌ی کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۷۵، ۷۵، ۷۱ و ۷۰ عدد (به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰، ۹۵ و ۹۴ درصد) (جدول ۴) و برای دیگر سویه‌های جداسازی شده‌ی انتروباکتریاسه، به ترتیب ۱۲، ۱۰، ۳ و ۲ عدد (به ترتیب ۲۰، ۱۷، ۵ و ۳ درصد) بود (جدول ۵).

جدول ۵. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی برای ایزوله‌های دیگر انتروباکتریاسه

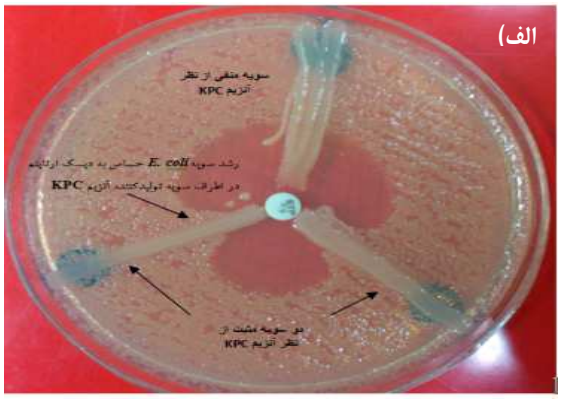
نام دیسک	حساس (درصد)	نیمه حساس (درصد)	مقاوم (درصد)
آمپی سیلین	۴۱	۱۱	۴۸
تازوسین	۸۷	–	۱۳
سفتازیدیم	۸۰	*۵	*۱۵
سفوتاکسیم	۸۳	*۳	*۱۴
ایمی‌پنم	۹۵	*۳	*۲
مروپنم	۹۷	*۱	*۲
آمیکاسین	۹۲	۱	۷
سیپروفلوکساسین	۶۸	۷	۲۵
نیتروفورانتوئین**	۸۵	۳	۱۲
سفپیم	۸۹	۵	۶

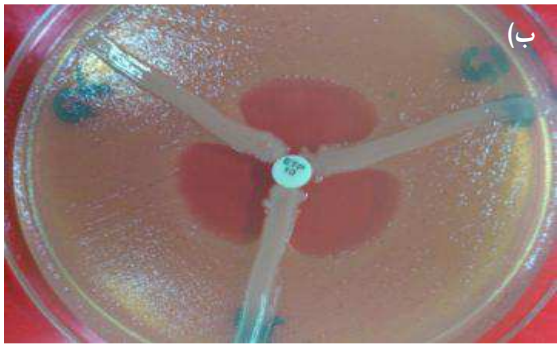
* برای بررسی وجود آنزیم Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) این سویه‌ها انتخاب شدند.

** فقط برای عفونت‌های ادراری استفاده شده است.

بیشترین مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم و کارباپنم در مورد باکتری کلبسیلا پنومونیه دیده شد. برای این سویه، آزمون شناسایی آنزیم کارباپنماز به انجام رسید. اشاره شد که سویه‌های مقاوم به یکی از سفالوسپورین‌های نسل سوم و یا غیر حساس به یکی از کارباپنم‌ها، به عنوان سویه‌ی احتمالی تولید کننده‌ی آنزیم کارباپنماز KPC در نظر گرفته شدند؛ این آزمون

در مواردی مثبت بود که به شکل نمای برگ شبدری مشخص بودند (شکل‌های ۱ الف و ۱ ب).





شکل ۱ الف. نتیجه‌ی آزمون هاج تغییر یافته برای ۶ سویه‌ی مختلف کلبسیلا پنومونیه

الف: در سویه‌ی سمت بالا نتیجه‌ی آزمون منفی است، چون هاله‌ی ایجاد شده توسط دیسک ارتاپنم بدون تغییر مانده است. اما در مورد دو سویه‌ی سمت پایین، این آزمون مثبت است که باکتری سویه‌ی استاندارد اشرشیاکلی، به شکل مضرسی یا برگ شبدری در اطراف سویه‌ی تولید کننده‌ی آنزیم KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase) رشد کرده است.

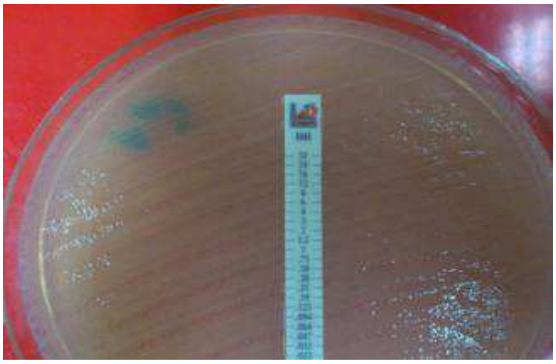
ب: در این سه سویه، کلبسیلا پنومونیه آزمون هاج تغییر یافته مثبت است.

در نهایت، آزمون تأییدی نهایی مقاومت به کاربابنم‌ها با روش تعیین کمترین غلظت ممانعتی (MIC) به روش Etest برای دیسک ایمی‌پنم از ایزوله‌هایی که آزمون هاج آن‌ها در مرحله‌ی قبلی مثبت شده بود، به انجام رسید که نتایج آن در جدول ۶ و شکل ۲ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که همگی سویه‌هایی که آزمون هاج تغییر یافته‌ی آن‌ها در مرحله‌ی قبلی مثبت بود، MIC ایمی‌پنم آن‌ها نیز در محدوده‌ی مقاوم بود و بنابراین، مقاومت به کاربابنم در آن‌ها ثابت شد.

جدول ۶. تعداد باکتری‌های مقاوم به ایمی‌پنم دارای آنزیم KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase) بررسی شده به روش هاج تغییر یافته و آزمون تأییدی آن به کمک روش Epsilometer test

نام باکتری	تعداد آزمون هاج مثبت (درصد)	تعداد مقاوم به ایمی‌پنم با روش Etest (درصد)
اشرشیاکلی	۲ سویه (۰/۷)	۲ سویه (۰/۷)
کلبسیلا پنومونیه	۶۵ سویه (۸۷)	۶۵ سویه (۸۷)
پروتئوس ولگاریس	۱ سویه (۶)	۱ سویه (۶)

درصد مقاوم هر باکتری نسبت به همان جنس باکتری آورده شده است.



شکل ۲. آزمون تأییدی نهایی مقاومت به کاربابنم‌ها با روش تعیین MIC (Minimum inhibitory concentration) به روش Epsilometer test

برای دیسک ایمی‌پنم از ایزوله‌هایی که آزمون هاج آن‌ها در مرحله‌ی قبلی مثبت شده بود، در یک سویه کلبسیلا پنومونیه نشان داده شده است که MIC آن برابر با ۳۲ می‌باشد و بنابراین به طور کامل مقاوم است.

بحث

در سال‌های اخیر، گزارش‌های زیادی از سویه‌های انتروباکتریاسه تولید کننده‌ی آنزیم‌های KPC در جهان گزارش شده است و با وجود آن که این آنزیم‌ها اغلب در کلبسیلا پنومونیه یافت شده‌اند، اما

گزارش‌هایی از این آنزیم‌ها در سایر باکتری‌های خانواده‌ی انتروباکتریاسه از جمله در انتروباکتر، سالمونلا و سراشیا وجود دارد (۱۱-۹). با توجه به این که این دسته از آنزیم‌های مقاومت بر روی پلاسمیدهای قابل انتقال وجود دارند و اغلب با عفونت‌های بیمارستانی همراه هستند، بنابراین می‌توانند به سرعت گسترده شوند و باعث ایجاد مقاومت وسیع گردند (۱۲).

از طرف دیگر، با توجه به این که باکتری‌های خانواده‌ی انتروباکتریاسه هنوز به عنوان شایع‌ترین عفونت‌های انسانی در بین باکتری‌ها شناخته می‌شوند و ایجاد مقاومت در آن‌ها به خصوص اگر این مقاومت بر روی پلاسمید حمل شود، می‌تواند به سرعت در بین جمعیت گسترده گردد؛ بنابراین بررسی آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای در کنترل عفونت بیمارستانی برخوردار است (۱۳). در این مطالعه، به طور گسترده‌ای باکتری‌های این خانواده به منظور بررسی وجود آنزیم کارباپنماز KPC در چند بیمارستان شهر اصفهان مورد مطالعه قرار گرفتند تا شیوع و نوع باکتری‌های حاوی این نوع مقاومت و نیز الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در آن‌ها مشخص گردد که تا زمان انجام پژوهش، بررسی گسترده‌ای در این زمینه انجام نشده بود. باکتری‌های جداسازی شده، دارای طیف گسترده‌ای بودند و همان‌طور که انتظار می‌رفت و در مطالعات دیگر نیز مشاهده شده بود (۱۳، ۱۱)، باکتری اشرشیاکلی دارای بیشترین فراوانی در بین آن‌ها بود.

بیشترین میزان حمل آنزیم KPC در باکتری کلبسیلا پنومونیه دیده شد که با مطالعات دیگر همخوانی داشت. Urban و همکاران (۱۴) نه مورد از باکتری اشرشیاکلی تولید کننده‌ی آنزیم KPC را در شهر نیویورک در بیمارستان کوئینز با روش Etest و روش مولکولی PCR گزارش کردند. همچنین، Zhang و همکاران (۱۵) در شهر Hangzhou چین، گزارشی از وجود آنزیم KPC۲ را در باکتری سراشیا مارسه سنس گزارش کردند. Tsakris و همکاران (۱۶) نیز در یکی از بیمارستان‌های یونان، آنزیم KPC۲ را در باکتری سراشیا مارسه سنس در سه بیمار بستری گزارش کردند. Cai و همکاران (۱۷) در چین ۲۱ عدد باکتری سراشیا مارسه سنس، ۱۰ سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه و یک ایزوله‌ی اشرشیاکلی را که دارای مقاومت به کارباپنم‌ها بودند، جداسازی کردند که در مطالعه‌ی آن‌ها بر خلاف مطالعه‌ی حاضر سویه‌ی غالب تولید کننده‌ی آنزیم کارباپنماز، سراشیا مارسه سنس بود که این امر به اختلاف منطقه‌ای در انتشار این آنزیم‌ها در بین سویه‌های مختلف انتروباکتریاسه بر می‌گردد.

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ۷۸ درصد از سویه‌های جداسازی شده‌ی کلبسیلا پنومونیه، واجد آنزیم KPC هستند که در مقایسه با مطالعات دیگر، میزان بالاتری بود. هر چند آزمون نهایی وجود این آنزیم‌ها با یستی با روش مولکولی PCR (Polymerase chain reaction) تأیید گردد. در یک مطالعه‌ی جامع انجام گرفته توسط Deshpande و همکاران (۱۸) در آمریکا، در بین ۸۸۸۵ سویه‌ی متعلق به خانواده‌ی انتروباکتریاسه، فقط ۵۱ سویه‌ی تولید کننده‌ی آنزیم کارباپنماز جداسازی گردید که نسبت به مطالعه‌ی حاضر درصد بسیار پایین‌تری بود. این امر نشان می‌دهد که میزان فراوانی آنزیم‌های کارباپنماز در شهر اصفهان بسیار بالا و نیازمند توجه

بیشتری است.

Bratu و همکاران (۱۲) نیز میزان جداسازی ژن KPC سویه‌های کلبسیلا پنومونیه را ۲۴ درصد گزارش کردند. در مورد سویه‌هایی که به دیسک‌های کارباپنم مقاومت داشتند، اما آزمون KPC در مورد آن‌ها منفی شده بود (برای مثال ۱۳ درصد باقی مانده‌ی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه)، احتمال می‌رود مکانیسم‌های دیگر مقاومت به کاربا‌پنم‌ها –از جمله وجود آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز– درگیر هستند که برای این موارد، بایستی آزمون‌های شناسایی این مکانیسم‌ها انجام گیرد (۱۹).

نتایج این مطالعه، همانند بررسی‌های دیگر محققین از جمله Cuzon و همکاران (۲۰) و نیز Pasteran و همکاران (۲۱) نشان داد که سویه‌های واجد ژن KPC، مقاومت بالایی به سایر آنتی بیوتیک‌ها از جمله آمپی‌سیلین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفپیم، پیپراسیلین/تازوباکتام (تازوسین)، سفوتاکسیم و سفتازیدیم دارند که این امر می‌تواند به دلیل وجود همزمان چندین ژن بتالاکتاماز در این ایزوله‌ها باشد.

به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که در بین گونه‌های شایع انتروباکتریاسه، باکتری کلبسیلا پنومونیه نسبت به سایر باکتری‌ها حاوی میزان بالاتری از آنزیم KPC بود و اغلب گونه‌های آن دارای مقاومت چند دارویی بالایی بودند و از آن جایی که این امر در پاسخ به افزایش بیش از نیاز مصرف آنتی بیوتیک‌ها ایجاد می‌شود، کنترل بهینه‌ی مصرف آنتی بیوتیک، نقش مهمی در جلوگیری از ظهور این گونه سوش‌های مقاوم خواهد داشت.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به انجام رسید. بدین وسیله از زحمات مسؤولین این مرکز تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2006.
2. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis 2008; 8(3): 159-66.
3. Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V. Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo-beta- lactamase production in clinical isolates. Indian J Med Res 2005; 121(6): 780-3.
4. Meletis G, Tzampaz E, Protonotariou E, Sofianou D. Emergence of Klebsiella pneumoniae carrying bla(VIM) and bla(KPC) genes. Hippokratia 2010; 14(2): 139-40.
5. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2007; 20(3): 440-58, table.
6. Forbes BA, Saham DF, Wesisfeld AS. Bailley and Scotte's diagnostic microbilogy. Philadelphia, PA: Mosby; 1998.
7. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A9. Wayne PA; Clinical and Laboratory Standards Institute: 2013.
8. Modified Hodge test for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2007.
9. Harris AD, McGregor JC, Johnson JA, Strauss SM, Moore AC, Standiford HC, et al. Risk factors for colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria and intensive care unit admission. Emerg Infect Dis 2007; 13(8): 1144-9.

10. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, et al. Evaluation of methods to identify the Klebsiella pneumoniae carbapenemase in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2007; 45(8): 2723-5.
11. Bulik CC, Fauntleroy KA, Jenkins SG, Abuali M, LaBombardi VJ, Nicolau DP, et al. Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae isolates by various testing methods. J Clin Microbiol 2010; 48(7): 2402-6.
12. 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): 128-32.
13. Carvalhaes CG, Picao RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in Klebsiella pneumoniae: be aware of false positive results. J Antimicrob Chemother 2010; 65(2): 249-51.
14. Urban C, Bradford PA, Tuckman M, Segal-Maurer S, Wehbeh W, Grenner L, et al. Carbapenem-resistant Escherichia coli harboring Klebsiella pneumoniae carbapenemase beta-lactamases associated with long-term care facilities. Clin Infect Dis 2008; 46(11): e127-e130.
15. Zhang R, Zhou HW, Cai JC, Chen GX. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in carbapenem-resistant Serratia marcescens isolates from Hangzhou, China. J Antimicrob Chemother 2007; 59(3): 574-6.
16. Tsakris A, Voulgari E, Poulou A, Kimouli M, Pournaras S, Ranellou K, et al. In vivo acquisition of a plasmid-mediated bla(KPC-2) gene among clonal isolates of Serratia marcescens. J Clin Microbiol 2010; 48(7): 2546-9.
17. Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. Emergence of Serratia marcescens, Klebsiella pneumoniae, and Escherichia coli Isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(6): 2014-8.
18. Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999-2005). Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 56(4): 367-72.
19. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis 2009; 9(4): 228-36.
20. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, et al. Worldwide diversity of Klebsiella pneumoniae that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. Emerg Infect Dis 2010; 16(9): 1349-56.
21. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2009; 47(6): 1631-9.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 27.04.2013
Vol. 31, No. 248, 2nd Week, October 2013
Accepted: 18.08.2013

Isolation and Identification of Carbapenemase KPC Producing Strains of *Enterobacteriaceae* and Determination of Their Antibiotic Susceptibility Patterns

Dariush Shokri MSc[1], Sina Mobasherizadeh MSc[1], Masoumeh Norouzi Baruq MSc[2], Majid Yaran MD[3]

Original Article

Abstract

Background: The aim of this study was to isolate and identify KPC (*Klebsiella pneumonia* carbapenemase) enzyme producing strains of *Enterobacteriaceae*, and determine their antibiotic susceptibility pattern in three hospitals of Isfahan, Iran. This subject has not previously been investigated comprehensively.

Methods: KPC detection was done by Modified Hodge Test (MHT) and their antibiotic susceptibility patterns were determined by disc diffusion method.

Findings: The total of 475 strains were isolated and detected as *Enterobacteriaceae* during the period of 9 months (July 2012-March 2013) in three hospitals in Isfahan province, Iran. These isolates contained *Escherichia coli*: 285 strains (60%), *Klebsiella*: 128 strains (27%), *Enterobacter aerogenes*: 16 strains (3.4%), *Enterobacter cloacae*: 9 strains (1.9%), *Proteus vulgaris*: 12 strains (2.5%), *Proteus mirabilis*: 4 strains (0.84%), *Citrobacter freundii*: 8 strains (1.7%), *Citrobacter diversus*: 3 strains (0.6%), *Serratia marcescens*: 3 strains (0.6%), *Shigella sonnei*: 4 strains (0.84%), *Salmonella paratyphi* A: 2 strains (0.42%), and *Providencia stuartii*: 1 strain (0.2%). Percentage resistant to ceftazidime and cefotaxime and non-susceptibility to imipenem and meropenem for above isolates were, respectively, as follows: for *Escherichia coli* isolates 60, 63, 6, and 9; for *Klebsiella* isolates 70, 75, 55, and 58; for *Klebsiella pneumoniae* 100, 100, 95, and 94; and for other *Enterobacteriaceae* isolates 20, 17, 5, and 3. Our results showed that KPC test was positive for 2 isolates (0.7%) among *Escherichia coli* strains, 65 (87%) isolates among *Klebsiella pneumoniae*, and 1 isolate (6%) among Proteus strains . This was approved by Etest based MIC method.

Conclusion: In general, our results showed that among *Enterobacteriaceae* isolates, *Klebsiella pneumoniae* isolates had higher KPC enzyme production, and most strains had multidrug resistant.

Keywords: *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), Etest method, Modified Hodge Test (MHT)

Citation: Shokri D, Mobasherizadeh S, Norouzi Baruq M, Yaran M. **Isolation and Identification of Carbapenemase KPC Producing Strains of *Enterobacteriaceae* and Determination of Their Antibiotic Susceptibility Patterns.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(248): 1247-1256

1- PhD Student, Nosocomial Infection Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- PhD Student, Department of Molecular Medicine, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
3- Technical Manager, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Dariush Shokri MSc, Email: dariush.shokri61@yahoo.com