

فراوانی نسبی سروتیپ‌های کپسولی K1 و K2 و الگوی مقاومت دارویی در جدایه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های شهر قزوین

نرگس حبیب اله پورزرشکی^۱، سمانه افشار قهرمانی^۲، امیر پیمانی^{۳*}

^۱ مرکز تحقیقات میکروپزشناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران، ^۲ گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: کلبسیلا پنومونیه از اعضای خانواده انتروباکتریاسه، یکی از مهم‌ترین باکتری‌های دخیل در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی است. کپسول پلی‌ساکاریدی مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی این ارگانیسم است که سروتیپ‌های کپسولی K1 و K2 از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های انسانی می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه، به تعیین سروتیپ‌های کپسولی K1 و K2 با جداسازی ژن‌های *wzc* و *orf10* که در فرآیند ساخت کپسول دخالت دارند، بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - مقطعی، ۱۴۹ جدایه کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی مختلف بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی شهر قزوین جمع‌آوری شدند. تمام جدایه‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد آزمایشگاهی تعیین هویت و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با انجام آزمون استاندارد کربی بائر بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI) سنجیده شد. سپس با جداسازی ژن‌های *wzc* و *orf10* از نظر حضور دو سروتیپ K1 و K2 با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی (تعیین فراوانی و درصد) و مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه، ۹۸ (۶۵/۸ درصد) جدایه‌ها الگوی مقاومت دارویی چند گانه (MDR) را نشان دادند که بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به سفنازیدیم (۶۱/۷ درصد) و سفوتاکسیم (۶۰/۴ درصد) و بیشترین میزان حساسیت نسبت به آمیکاسین (۶۶/۴ درصد) و سیپروفلوکساسین (۵۹/۱ درصد) گزارش شد. نتایج آزمون PCR نشان داد که ۷۹ (۵۳ درصد) جدایه مربوط به سروتیپ K1 و ۱۹ (۱۳ درصد) جدایه مربوط به سروتیپ K2 و ۵۱ (۳۴ درصد) جدایه مربوط به سروتیپ‌های غیر از K1/K2 بودند. در این مطالعه، ارتباط معنی‌داری ما بین حضور سروتیپ‌های کپسولی K1 و K2 و الگوی مقاومت دارویی چند گانه مشاهده شد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از بروز الگوی مقاومت دارویی چندگانه و حضور قابل توجه جدایه‌های بیماری‌زای کلبسیلا پنومونیه سروتیپ‌های K1 و K2 در بیمارستان‌های مورد مطالعه قزوین دارد. بنا به اهمیت حضور این سروتیپ‌های کپسولی در ایجاد بیماری‌های متنوع در کنار ماهیت مقاومت دارویی چندگانه، استفاده از ابزارهای مناسب کنترل عفونت و راه کارهای مناسب درمانی برای جلوگیری از انتشار بیشتر این ارگانیسم‌های مهاجم و مقاوم ضروری است.

واژه‌های کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، کپسول پلی‌ساکارید K1، کپسول پلی‌ساکارید K2، مقاومت دارویی چندگانه

* نویسنده مسئول: امیر پیمانی، قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات میکروپزشناسی پزشکی

Email: a.peymani@gmail.com

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه، باسیل گرم منفی متعلق به خانواده انتروباکتریاسه می باشد (۱). این ارگانیزم به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب، عامل عفونت های جدی در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستانی است و موجب ایجاد طیف وسیعی از عفونت های مهم بالینی از جمله سپتی سمی، پنومونی، عفونت مجاری ادراری، مننژیت و آبسه های چرکی در اندام های مختلف به خصوص در کبد می شود (۲ و ۳). قابلیت این ارگانیزم در ایجاد بیماری های متنوع به علت کاسته شدن دفاع میزبان در نتیجه اعمال جراحی پیچیده، طولانی و مصرف داروهای متنوع روبه ازدیاد می باشد و با افزایش میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها، در حال حاضر به عنوان یک تهدید جدی درمانی محسوب می شود (۴). بروز الگوی متنوع مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف و گسترش سریع آنها در بخش های مختلف بیمارستانی، سبب ایجاد سپتی سمی و مرگ و میر بالایی در بیماران می شود (۵). مقاومت این ارگانیزم نسبت به آنتی بیوتیک ها به دو صورت ذاتی و اکتسابی ایجاد می گردد که در حال حاضر آمار بالایی از مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک های مهم مصرفی در محیط های درمانی گزارش می شود. استفاده بیش از حد و نامناسب آنتی بیوتیک های وسیع الطیف منجر به بروز سویه هایی با الگوی مقاومت دارویی چندگانه (MDR) شده است که در پی آن درمان بیماران آلوده به این ارگانیزم های مقاوم، اغلب منجر به شکست می شود و افزایش مرگ و میر

بیماران و افزایش هزینه های درمانی را به همراه دارد (۶ و ۷).

فاکتورهای ویروالانس متعددی در بیماری زایی کلبسیلا پنومونیه نقش دارند. کپسول پلی ساکاریدی یکی از مهم ترین فاکتورهای بیماری زایی این ارگانیزم محسوب می گردد که ژن های مختلفی در سنتز آن نقش دارند. مطالعه های آزمایشگاهی نشان می دهد که وجود کپسول پلی ساکاریدی مانع از رسوب جزء C3 کمپلمان بر سطح باکتری شده و سبب کاهش اتصال فاگوسیتوز باکتری به وسیله ماکروفاژها و سلول های اپی تلیال می گردد (۸). وجود کپسول در سطح این ارگانیزم می تواند به عنوان یک سد محافظتی در مقابل پپتیدهای ضد میکروبی مانند لیزوزیم و لاکتوفورین باشد. کلبسیلا پنومونیه دارای ۷۷ سروتیپ کپسولی (آنتی ژن K) می باشد که سروتیپ های K1 و K2 دارای خاصیت بیماری زایی بیشتری در نمونه های انسانی و حیوانی می باشند (۹ و ۱۰). سروتیپ های کپسولی K1 و K2 در مقابل، فاگوسیتوز به واسطه ماکروفاژها مقاومت قابل توجهی از خود نشان می دهند و در مقابل ایزوله های فاقد این تیپ های کپسولی معمولاً مقاومتی در برابر فاگوسیتوز نداشته، لذا بیماری زایی کمتری دارند. ساخت کپسول پلی ساکاریدی در سروتیپ K1 توسط سیستم وابسته به ژن *wzy* صورت می گیرد که در فرآیند تاختورن و شکل گیری کپسول در فضای پری پلاسمی ارگانیزم

1- Multidrug Resistance

نقش دارد. در مرحله بعد پروتئین‌های *magA* و پروتئین‌های *Wzy polymerase* که شامل آنزیم فلیپاز یا *Wzx* و پروتئین‌های *Wza* و *Wzb*، *Wzc* هستند، کپسول را وارد غشاء لیپوپروتئینی می‌کند. جهش در ژن‌های *magA* و *Wzy* موجب تولید پروتئین‌هایی با کارایی ناقص یا محدود می‌شود که در سویه‌های حاصل از این جهش‌ها، کپسول فاقد ویژگی موکویسکوزیته و در نتیجه بیماری‌زایی کمتر می‌گردد (۱۱). ژن *orf10* که کد کننده پروتئین‌های داخل غشایی می‌باشد و به عنوان یکی دیگر از ژن‌های دخیل فرایند ساخت کپسول مربوط به سروتیپ K2 کلبسیلا پنومونیه است که بر روی کروموزوم باکتری قرار گرفته است (۱۲). سروتیپ K2 دومین سروتیپ شایع بعد از سروتیپ K1 در بیماری‌زایی انسانی است که تشخیص سریع آن بر اساس جداسازی ژن *orf10* به وسیله آزمون PCR امکان‌پذیر می‌باشد (۱۳). نظر به این که کلبسیلا پنومونیه در حال حاضر یکی از مهم‌ترین ارگانیسم‌های عامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی است و ظهور سویه‌هایی با قابلیت مقاومت به چند دارو مشکلات فراوانی را در درمان بیماران ایجاد کرده است، لذا شناسایی فاکتورهای دخیل در بیماری‌زایی این ارگانیسم و اطلاع از الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن به مدیریت مؤثر و کارآمد کنترل عفونت در بخش‌های درمانی کمک شایانی می‌کند. مطالعه حاضر، ضمن تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به بررسی فراوانی سروتیپ‌های کپسولی K1 و K2 در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه

جمع‌آوری شده از بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های آموزشی قزوین می‌پردازد و ارتباط احتمالی مابین الگوی مقاومت چندگانه دارویی و حضور این سروتیپ‌های کپسولی نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد.

روش بررسی

مطالعه حاضر به صورت مقطعی و به روش توصیفی - تحلیلی طی سال ۹۶ به مدت ۸ ماه انجام شد. این پژوهش به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین با کد IR.QUMS.REC.1396.292 قرار گرفت. در کلیه مراحل مطالعه، ملاحظات اخلاقی و حفظ محرمانه بودن اطلاعات اخذ شده رعایت گردید. در مجموع، ۱۴۹ جدایه کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی مختلف از جمله؛ ادرار، خون، ترشه و زخم جمع‌آوری شدند. تعیین هویت جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروب‌شناسی شامل؛ رنگ‌آمیزی گرم و بررسی میکروسکوپی، کشت بر روی محیط‌های مکانیکی آگار، تریپل شوگر آیرون آگار (TSI)^(۱)، سولفور-ایندول - موتیلیتی (SIM)^(۲) و آزمون‌های اکسیداز، لیزین دکربوکسیلاز، آرژنین، اورنتین دکربوکسیلاز، متیل رد و ووگس پروسکائر (ساخت شرکت مرک آلمان) انجام گرفت. تمام جدایه‌ها در محیط تریپتی کیز سوی براث (TSB)^(۳) با ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

1-Triple Sugar Iron
2- Sulfide Indole Motility
3-Tryptic Soy Broth

شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (Amplicon، ساخت کشور دانمارک)، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای فوروارد و ریورس، ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر DNA الگو تهیه گردید.

تکثیر ژن های *wzc* و *orf-10* جداگانه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystems، ساخت کشور آمریکا) و تحت شرایط زیر انجام شد، دمای واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل دمای واسرشت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمر ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای مربوط به ژن *wzc* و ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه مربوط به ژن *orf-10*، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در پایان دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصول های PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز (۱ درصد) و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید به وسیله سیستم ژل داگ (UVtec، ساخت شرکت انگلستان) مشاهده و بررسی شدند. در این آزمون از سویه استاندارد اشرشیاکلی ATCC۲۵۹۲۲ جهت کنترل انجام آزمون استفاده گردید.

تعدادی از محصول PCR مربوط به هر دو ژن جهت تعیین توالی و تأیید حضور ژن به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

تجزیه و تحلیل آماری با تعیین میانگین فراوانی و درصد ژن های مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. ارتباط احتمالی مابین حضور

الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی تمامی ایزوله ها بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاه بالینی (CLSI) و با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، جنتامایسین و آمیکاسین انجام شد (۱۴). دیسک های آنتی بیوتیکی از شرکت مست انگلستان خریداری شدند. جدایه های باکتریایی که هم زمان به سه کلاس آنتی بیوتیکی بتالاکتام، آمینوگلیکوزید و کینولون مقاوم باشند، به عنوان ایزوله های با الگوی مقاومت دارویی چندگانه در نظر گرفته شدند. برای انجام آزمون ابتدا محیط مولر هیتون آگار تهیه و pH آن بین ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم گردید. سوسپانسیون میکروبی استاندارد بر اساس نیم مک فارلند تهیه شد و به روش چمنی بر روی محیط مولر کشت داده شد. پس از قرار دادن دیسک های آنتی بیوتیکی، محیط های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس نتایج براساس دستورالعمل های مربوطه ثبت شدند. در این آزمون از سویه استاندارد اشرشیاکلی ATCC۲۵۹۲۲ جهت کنترل انجام آزمون استفاده گردید.

در ادامه تمام جدایه ها از نظر حضور ژن های *wzc* و *orf-10* مرتبط با ساخت سروتیپ های کپسولی K1 و K2 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). ابتدا استخراج DNA با استفاده از کیت بیونیر ساخت کشور کره جنوبی و بر اساس دستورالعمل مربوطه انجام شد. سپس واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر

سروتیپ‌های مورد مطالعه و الگوی مقاومت دارویی چندگانه با استفاده از آزمون مجذور کای انجام شد که با قبول سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

در این مطالعه، جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب از نمونه‌های ادرار ۷۶/۵۱ (درصد)، تراشه ۳۱/۲۰ (درصد)، خون ۲۳/۱۵ (درصد) و زخم ۹/۱۳ (درصد) و از بیماران بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه ۴۸/۴۵ (درصد)، داخلی ۴۴/۲۹ (درصد) و عفونی ۳۷/۲۴ (درصد) جمع‌آوری شدند. در مجموع ۹۳ جدایه (۶۳ درصد) از زنان و ۵۶ جدایه (۳۷ درصد) از مردان جداسازی شدند. محدوده سنی بیماران ۱۹ تا ۹۱ سال بود که میانگین سنی آن‌ها نیز 52 ± 17 سال تعیین شد. بررسی نتایج الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن آگار نشان داد که بیشترین میزان مقاومت نسبت به سفتازیدیم (۶۱/۷ درصد) و سفوتاکسیم (۶۰/۴ درصد) و بیشترین میزان حساسیت در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین (۶۶/۴ درصد)

وسپیروفلوکساسین (۵۹/۱ درصد) بودند (جدول ۲). در مجموع ۹۸/۶۵ (درصد) جدایه، هم‌زمان نسبت به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم بودند و الگوی مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند.

با انجام آزمون PCR، در مجموع ۹۸/۶۵ (درصد) جدایه مربوط به سروتیپ‌های K1 و K2 بودند که ۷۹/۵۳ (درصد) جدایه مربوط به سروتیپ K1 و ۱۹/۱۲ (درصد) جدایه سروتیپ K2 و ۵۱/۳۴ (درصد) جدایه مربوط به سروتیپ‌های غیر از K1/K2 بودند. جدایه‌های مربوط به سروتیپ K1 و K2 اغلب از نمونه‌های ادرار به میزان ۲۴ درصد و ۹ درصد جداسازی شدند. جدایه‌های مربوط به سروتیپ K1 اغلب از بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه ۳۶/۲۴ (درصد) و جدایه‌های مربوط به سروتیپ K2 اغلب از بخش عفونی ۹/۶ (درصد) جداسازی شدند (جدول ۳). در ادامه مشخص شد که ۵۸/۳۸ (درصد) جدایه با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه، از نظر حضور ژن‌های *wzc* و *orf-10* مثبت بودند و با انجام آزمون آماری، ارتباط معنی‌داری مابین حضور سروتیپ‌های کپسولی K1 و K2 و الگوی مقاومت دارویی چند گانه مشاهده شد ($p < 0.05$).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی ژن‌های *wzc* و *orf10* در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه

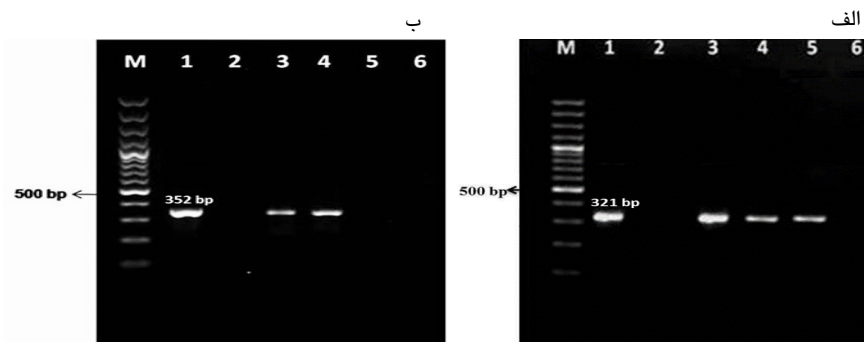
ژن	توالی پرایمر (3'-5')	اندازه محصول (جفت باز)
<i>wzc</i>	F: AGATAGAGGTGTATTGTCGC R: GAGCTCTATATGTTGGATGC	۳۵۲
<i>orf-10</i>	F: TCATACTTGACAGAGGGAGTAG R: ACGATCGTTACAGTGACAAG	۳۲۱

جدول ۲: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در جدایه های کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه

بخش های بیمارستانی	K1 تعداد (درصد)	K2 تعداد (درصد)	non-K1/K2 تعداد (درصد)
داخلی	۲۸ (۱۸)	۵ (۳)	۱۱ (۷)
عفونی	۱۵ (۱۰/۱)	۹ (۶)	۱۳ (۸)
مراقبت های ویژه	۳۶ (۲۴)	۵ (۳)	۲۷ (۱۸)
نمونه های بالینی			
خون	۱۲ (۸/۱)	۱ (۱)	۱۰ (۶)
تراشه	۲۰ (۱۳)	۰	۱۱ (۷)
زخم	۱۱ (۷)	۴ (۲)	۴ (۲)
ادرار	۳۶ (۲۴)	۱۴ (۹)	۲۶ (۱۷)
مجموع	۷۹ (۵۳/۱)	۱۹ (۱۲)	۵۱ (۳۴)

جدول ۳: فراوانی سروتیپ های کیسولی جدا شده در این مطالعه بر حسب نوع نمونه و بخش های بیمارستان های مورد مطالعه

آنتی بیوتیک	حساس تعداد (درصد)	مقاومت حدواسط تعداد (درصد)	مقاوم تعداد (درصد)
سفتازیدیم	۵۲ (۳۴/۹)	۵ (۳/۴)	۹۲ (۶۱/۷)
سفتواکسیم	۵۵ (۳۶/۹)	۴ (۲/۷)	۹۰ (۶۰/۴)
نالیدیکسیک اسید	۳۸ (۲۵/۵)	۳۳ (۲۲/۱)	۷۸ (۵۲/۳)
جنتامایسین	۶۷ (۴۵)	-	۸۰ (۵۳/۷)
سیپروفلوکساسین	۸۸ (۵۹/۱)	۱۵ (۱۰/۱)	۴۶ (۳۰/۹)
آمیکاسین	۹۹ (۶۶/۴)	۶ (۴)	۴۴ (۲۹/۵)



شکل ۱: نتایج مربوط محصول PCR از نظر حضور ژن های **wzc** و **orf-10** در جدایه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیمارستان های قزوین

بخش الف): محصول PCR از نظر حضور ژن **wzc**: ستون M: مارکر DNA (۱۰۰bp)، ستون ۱: کنترل مثبت (تأیید توالی شده)، ستون ۲: کنترل منفی (اشرشیاکلی ATCC 25922)، ستون های ۳ و ۴: ایزوله های مثبت بالینی، ستون ۵: ایزوله بالینی منفی از نظر حضور ژن، ستون ۶: کنترل آزمون PCR (بدون DNA الگو). بخش ب): محصول PCR از نظر حضور ژن **orf-10**: ستون M: مارکر DNA (۱۰۰bp)، ستون ۱: کنترل مثبت (تأیید توالی شده)، ستون ۲: کنترل منفی (اشرشیاکلی ATCC 25922)، ستون های ۳ تا ۵: ایزوله های بالینی مثبت از نظر حضور ژن، ستون ۶: کنترل آزمون PCR (بدون DNA الگو)

بحث

کلبسیلا پنومونیه به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده عفونت های بیمارستانی محسوب می شود که در ایجاد عفونت بالینی جدی در بیماران بستری در بخشهای مختلف نقش دارد (۱۵). مقاومت در برابر آنتی بیوتیکها یک چالش اساسی در درمان عفونت های ناشی از این ارگانیسم به حساب می آید که غالباً نتیجه استفاده بی رویه از داروهایی از جمله بتالاکتامها، آمینوگلیکوزیدها و کینولون ها و همچنین بستری طولانی مدت بیماران است. درمان بیماران آلوده به این ارگانیسم های مقاوم اغلب با شکست مواجه بوده که سبب افزایش هزینه های درمانی و مرگ و میر می گردد. مقاومت های دارویی نسبت به آنتی بیوتیک ها در مناطق مختلف ایران و جهان به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه های ایجاد کننده، تفاوت در میزان مصرف آنتی بیوتیک ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف متفاوت است (۱۶ و ۱۷).

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفنازیدیم (۶۱/۷ درصد) و سفوتاکسیم (۶۰/۴ درصد) و بیشترین میزان حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین (۶۶/۴ درصد) و سیپروفلوکساسین (۵۹/۱ درصد) بود. مقاومت نسبت به دو آنتی بیوتیک سفنازیدیم و سفوتاکسیم در سایر مطالعه های انجام شده در ایران نیز گزارش شد. در مطالعه ای که توسط فاضلی و همکاران در اصفهان بر

روی ۱۴۲ جدایه کلبسیلا پنومونیه انجام گرفت، مقاومت به سفنازیدیم را ۷۶ درصد و سفوتاکسیم را ۷۳ درصد گزارش شد (۱۸). همچنین سعادتیان فریور و همکاران در تهران نیز مقاومت به سفنازیدیم را ۷۸/۳ درصد و سفوتاکسیم را ۸۵/۵ درصد گزارش کردند (۱۹). در سایر کشورها، در هند، کومار و همکاران میزان حساسیت به آمیکاسین را ۸۸/۱ درصد و مقاومت به سفوتاکسیم را ۸۸/۸ درصد گزارش کردند (۲۰). در مطالعه ای با نتایج مشابه با مطالعه حاضر، شیلیا در هند حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین را ۶۶ درصد و سیپروفلوکساسین را ۶۸ درصد گزارش کردند (۲۱). در مطالعه حاضر، ۹۸ (۶۵/۸ درصد) جدایه ها، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه را نشان دادند. این الگوی مهم مقاومت دارویی در سایر مطالعه های انجام شده در ایران بر روی جدایه های بالینی کلبسیلا پنومونیه نیز گزارش گردید (۲۲ و ۱۹ و ۱۸). جدایه های کلبسیلا پنومونیه با الگوی مقاومت دارویی چندگانه در سایر کشورها نیز گزارش می شود. در مطالعه لینا و همکاران در بنگلادش، ۸۷ درصد از جدایه های کلبسیلا پنومونیه الگوی مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند (۲۳). یولاه و همکاران در پاکستان نیز میزان مقاومت دارویی چندگانه در جدایه های کلبسیلا پنومونیه را ۷۱/۷۳ درصد گزارش کردند (۲۴). در مصر هلمای و همکاران نیز نشان دادند که ۸۴/۷۵ درصد جدایه ها دارای مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه بودند (۲۵). به نظر می رسد استفاده بیش از حد از آنتی

بیوتیک های وسیع الطیف و عدم به کارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت از دلایل عمده بروز الگوی مقاومت دارویی چندگانه در این جدایه های بالینی است. همچنین نبود سیستم های جامع پیگیری مقاومت دارویی در سطوح ملی و استانی و عدم فعالیت مناسب کمیته های کنترل عفونت در مراکز درمانی از دیگر دلایل آمار بالای مقاومت دارویی در این ارگانیزم های بیمارستانی است.

در مطالعه حاضر، با استفاده از آزمون PCR مشخص شد که ۷۹ (۵۳ درصد) جدایه ها مربوط به سروتیپ K1 و ۱۹ (۱۳ درصد) جدایه ها مربوط به سروتیپ K2 و ۵۱ (۳۴ درصد) جدایه ها مربوط به سروتیپ های غیر از K1/K2 بودند که حاکی از حضور موفق این دو سروتیپ کیسولی کلبسیلا پنومونیه در بیمارستان های مورد مطالعه است. بر اساس تحقیقات انجام شده، در کلبسیلا پنومونیه، دو سروتیپ K1 و K2 عامل ۶۷ درصد از عفونت های مرتبط با این باکتری هستند (۲۸-۲۶). فیض آبادی و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تهران نشان دادند که فراوانی ژن های کد کننده سروتیپ های کیسولی K1 و K2 در جدایه های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۱۱/۲ درصد و ۱۴/۶ درصد می باشند (۱۳). اسدپور و همکاران در رشت نیز فراوانی سروتیپ های کیسولی K1 و K2 در جدایه های کلبسیلا پنومونیه را ۱۰/۷۷ درصد و ۶/۱۵ درصد گزارش کردند (۲۹). در سایر نقاط جهان، در مطالعه وصفی و همکاران در مصر مشخص شد که ۲۸ (۷۷/۷ درصد) جدایه ها دارای الگوی مقاومت دارویی

چندگانه بودند که ۸ (۲۸/۵ درصد) جدایه مربوط به سروتیپ K1 و ۲ (۷/۱۴ درصد) جدایه مربوط به سروتیپ K2 بودند. در این مطالعه جدایه های دارای سروتیپ K1 اغلب از نمونه های ادرار و خون و جدایه های K2 از نمونه های ادرار و زخم جمع آوری شدند (۳۰). در تایوان، در مطالعه یو و همکاران، فراوانی سروتیپ های K1، K2 و غیر از K1/K2 به ترتیب ۵۲ درصد، ۲۰ درصد و ۲۸ درصد گزارش شد (۳۱). در مطالعه دیگری در این کشور یه و همکاران بر روی بیماران مبتلا به آبسه کبدی نشان دادند که سروتیپ های K1 و K2 در میان سایر سروتیپ ها غالب بوده و فراوانی سروتیپ K1 و K2 را به ترتیب ۴۶/۶ درصد و ۲۰/۵ درصد گزارش کردند (۲۸). در مطالعه ای که در چین توسط ونگ و همکاران انجام گرفت، فراوانی سروتیپ های K1 و K2 به ترتیب ۴۲/۵۷ درصد و ۳۶/۶۳ درصد گزارش شد (۳۲).

در مجموع، نتایج حاصل از این مطالعه در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده در سایر نقاط جهان، حاکی از اهمیت و حضور قابل توجه سروتیپ های K1 و K2 در جدایه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران است. همچنین نشان داده شد که سروتیپ K1 با شیوع بیشتری نسبت به سروتیپ K2 در ایجاد بیماری های بالینی مختلف دخالت داشته است که در مجموع با توجه به ماهیت الگوی مقاومت دارویی چندگانه، درمان مناسب و بکارگیری ابزارهای کنترل عفونت ضروری به نظر می رسد.

در مطالعه حاضر، ۴۵ درصد از بیماران آلوده به این ارگانیزم های مقاوم در بخش مراقبت های

میکروپزشناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
به دلیل همکاری در اجرای این پروژه تشکر و قدردانی
به عمل می آید.

ویژه بستری بوده اند که ۲۴ درصد از موارد شناسایی
شده مربوط به سروتیپ K1 در این بخش بوده است.
همچنین مشخص شد که ایزوله های مربوط به
سروتیپ K1 و K2 اغلب از نمونه ادرار بیماران به
میزان ۲۴ درصد و ۹ درصد جداسازی شدند. به نظر
می رسد بستری طولانی مدت بیماران، سن بیماران،
و خامت حال بیماران و بکارگیری ابزارهای تهاجمی از
جمله کاتتر های ادراری در بیماران بستری در بخش
های مراقبت ویژه از دلایل عمده حضور این این
ارگانیسم های مقاوم و بیماری زا است.

نتیجه گیری

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر حاکی از
حضور موفق جدایه های کلبسیلا پنومونیه سروتیپ
های K1 و K2 با الگوی مقاومت دارویی چندگانه در
بیمارستان های مورد مطالعه است. با توجه به قابلیت
بالای این سروتیپ های بیماریزای کلبسیلا پنومونیه
در ایجاد بیماری های مختلف بالینی به ویژه در
بیماران بستری در بخش های مراقبت های ویژه و با
توجه به مقاومت دارویی در این ارگانیسم ها، به
کارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت و راهکارهای
مناسب درمانی جهت جلوگیری از انتشار بیشتر آنها
در بین بیماران ضروری است.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی
ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد
زنجان می باشد. از مدیریت و کارکنان مرکز تحقیقات

REFERENCES

1. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. Korean J Intern Med 2012;27(2):128-142.
2. Gupta P, Murali P, Murali MV, Faridi MMA, Kaul PB, Ramachandran VC, et al. Clinical profile of *Klebsiella septicaemia* in neonates. Indian J Paediatr 1993; 60(4): 565-72.
3. Lu PL, Liu YC, Toh HS, Lee YL, Liu YM, Ho CM, 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. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2017;41(3):252-275.
5. Chen LF, Chopra T, Kaye KS. Pathogens resistant to antibacterial agents. Infect Dis Clin North Am 2009; 23(4): 817-45.
6. Mendelson G, Hait V, Ben-Israel J, Gronich D, Granot E, Raz R. Prevalence and risk factors of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in an Israeli long-term care facility. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005; 24(1): 17-22.
7. Daikos GL, Kosmidis C, Tassios PT, Petrikos G, Vasilakopoulou A, Psychogiou M, et al. Enterobacteriaceae bloodstream infections: presence of integrons, risk factors, and outcome. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(7): 2366-72.
8. Karbasizadeh V, Badami N, Emtiazi G. Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. Afr J Biotech 2003; 2(10):379-83.
9. Brenner DJ, Krieg NR, Staley J T. Bergey's manual of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. New York: Springer-Verlag 2005; pp: 685-698.
10. Lin JC, Chang FY, Fung CP, Xu JZ, Cheng HP, Wang JJ, et al. High prevalence of phagocytic resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumonia* in liver abscess. Microbes Infect 2004;6(13):1191-8.
11. Lin TL, Yang FL, Yang AS, Peng HP, Li TL, Tsai MD, et al. Amino acid substitutions of magA in *Klebsiella pneumoniae* affect the biosynthesis of the capsular polysaccharide. PLoS One 2012;7(10):e46783.
12. Pan YJ, Fang HC, Yang HC, Lin TL, Hsieh PF, Tsai FC, et al. Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. J Clin Microbiol 2008;46(7):2231-40.
13. Feizabadi, MM, Raji N, Delfani S. Identification of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 capsular types by PCR and Quellung test. Jundishapur J Microbiol 2013; 6(9): e7585.
14. Wayne P. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2013; M100-S23.
15. Won SY, Munoz-Price LS, Lolans K, Hota B, Weinstein RA, Hayden MK. Emergence and rapid regional spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing enterobacteriaceae. Clin Infect Dis 2011;53(6):532-40.
16. Ahangarzadeh-Rezaee M, Langarizadeh N, Aghazadeh M. First report of class 1 and class 2 integrons in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from northwest Iran. Jpn J Infect Dis 2012;65(3):256-9.
17. Bouza E, Cercenado E. *Klebsiella* and *Enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications. Semin Respir Infect 2002;17(3):215-30.
18. Fazeli H, Dolatabadi RK, Taraghian A, Isfahani BN, Moghim S, Norouzi M. Carbapenem resistance pattern of multiple drug-resistant and extended-spectrum beta lactamase-positive *Klebsiella pneumonia* in Isfahan. Int J Ent Pathol 2014; 2:21-8.
19. Saadatian Farivar A, Nowroozi J, Eslami G, Sabokbar A. RAPD PCR profile, antibiotic resistance, prevalence of armA gene, and detection of KPC enzyme in *Klebsiella pneumoniae* Isolates. Can J Infect Dis Med Microbiol 2018; 2018: 6183162.
20. Kumar AR. Antimicrobial sensitivity pattern of *Klebsiella pneumonia* isolated from pus from tertiary care hospital and issues related to the rational selection of antimicrobials. J Chem Pharm Res 2013; 5(11):326-331.
21. Shilpa K, Ruby Thoma, Allavarapu R. Isolation and Antimicrobial sensitivity pattern of *Klebsiella pneumoniae* from sputum samples in a tertiary care hospital. Int J Biomed Adv Res 2016; 7(2): 53-57.

22. Bina M, Pournajaf A, Mirkalantari S, Talebi M, Irajian G. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in *K. pneumoniae* isolated from the clinical samples by the phenotypic and genotypic methods. Iran J Pathol 2015; 10(3): 199–205.
23. TT Lina, SR Rahman, DJ Gomes. Multiple-antibiotic resistance mediated by plasmids and integrons in uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Bangl J Microbiol 2007; 24(1): 19-23.
24. Ullah F, Malik SA, Ahmed J. Antimicrobial susceptibility pattern and ESBL prevalence in *Klebsiella pneumoniae* from urinary tract infections in the North-West of Pakistan. Afr J Microbiol Res 2009; 3(11): 676-680.
25. Helmy OM, Kashef MT. Different phenotypic and molecular mechanisms associated with multidrug resistance in Gram- negative clinical isolates from Egypt. Infect Drug Resist 2017; 10: 479-498.
26. Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, Liu KL. The Function of *wzy_K1* (*magA*), the serotype K1 polymerase gene in *Klebsiella pneumoniae* *cps* gene cluster. J Infect Dis 2010; 201(8): 1268-9.
27. Chuang YP, Fang CT, Lai SY, Chang SC, Wang JT. Genetic determinants for capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. J Infect Dis 2006; 193(5): 645-54.
28. Yeh KM, Kurup A, Siu LK, Koh YL, Fung CP, Lin JC, et al. Capsular serotype K1 or K2, rather than *magA* and *rmpA*, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. J Clin Microbiol 2007; 45(2): 466-71.
29. Akbari Rh, Asadpour L. Identification of capsular serotypes K1 and K2 in clinical isolates of *Klebsiella Pneumoniae* in North of Iran. mlgoums 2017; 11(1): 36-39.
30. Wasfi R, Elkhatib WF, Ashour HM. Molecular typing and virulence analysis of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from Egyptian hospitals. Sci Rep 2016; 6: 38929.
31. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. Diagn Microbiol Infect Dis 2008; 62(1): 1-6.
32. Wang J, Yan Y, Xue X, Wang K, Shen D. Comparison of pyogenic liver abscesses caused by hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* and non-*Klebsiella pneumoniae* pathogens in Beijing: a retrospective analysis. J Int Med Res 2013; 41(4): 1088-97.

Relative Frequency of Capsular Serotypes K1 and K2 and Antimicrobial Resistance Among *Klebsiella Pneumoniae* Isolated from Hospitals of Qazvin

Habibollah-Pourzereshki N¹, Afshar Ghahramani S², Peymani A^{1*}

¹Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran, ²Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

Received: 18 May 2018 Accepted: 12 Nov 2018

Abstract

Background & aim: *Klebsiella pneumoniae*, is the most significant member of the enterobacteriaceae, which is one of the most important pathogen involved in health care associate infections. The capsular polysaccharide is a prominent virulence factor in the pathogenesis of this organism and serotypes K1 and K2 are the most virulent types in human infections. The main aims of this study were to assess the antimicrobial susceptibility and to determine the distribution of serotypes K1, K2 by detecting of *wzc* and *orf10* genes in clinical isolates of *K. pneumoniae*.

Methods: In the present cross-sectional study, a total number of 149 clinical isolates of *K. pneumoniae* were collected from patients admitted to educational hospitals of Qazvin. Bacterial identification was performed by standard laboratory methods. Antimicrobial susceptibility was determined by standard Kirby–Bauer disk diffusion method according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. PCR assay was further performed for the detection of *wzc* and *orf10* genes related to serotypes K1 and K2, respectively. The data were analyzed by using descriptive statistics and chi-square.

Results: totally, 98 (65.8%) of isolates showed multidrug resistance (MDR) pattern among those ceftazidime (61.8%) and cefotaxime (60.4%) showed the highest rates of resistance whereas amikacin and ciprofloxacin revealed high susceptibility rates as 91.3% and 59.1%, respectively. Results of the PCR assay showed that 79 (53%) isolates related to K1 serotype, 19 (12%) to K2 serotype and 51 (34%) of isolates were belonged to non K1/ K2 serotypes. no significant association was seen between serotypes K1, K2 and MDR pattern ($P < 0.05$).

Conclusion: the present study indicated considerable rate of serotypes K1, K2 with MDR pattern among clinical isolates of *K. pneumoniae* collected from Qazvin hospitals. Considering the major role of these serotypes with high rates of drug resistance in different clinical infections, using of appropriate infection control measures and treatment strategies are essential to prevent further dissemination of these virulent and resistant isolates in studied hospitals.

Keyword: *Klebsiella pneumoniae*, capsular polysaccharide K1, capsular polysaccharide K2, multiple drug resistance

Corresponding author: Peymani A, Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Email: a.peymani@gmail.com

Please cite this article as follows:

Habibollah-Pourzereshki N, Afshar Ghahramani S, Peymani A. Relative Frequency of Capsular Serotypes K1 and K2 and Antimicrobial Resistance Among *Klebsiella Pneumoniae* Isolated from Hospitals of Qazvin. Armaghane-danesh 2018; 23(5): 643-655