● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ ششم، شمارهٔ ۱، ص ۳۸-۲۹، ۱۳۷۷

مقالهٔ پژوهشی

بررسی مقاومت پلاسمیدی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و سفتی زوکسیم در ۱۰ سوش مقاوم کلبسیلا پنومونیه جمع آوری شده از بیمارستان‌های کرمان

دکتر محمدرضا شکیبایی[۱] و امیرهوشنگ غلامعلی‌بیگ[۲]

خلاصه

کلبسیلا پنومونیه یک باسیل گرم منفی می‌باشد که سوش‌های مقاوم به مواد ضد میکروبی آن اکنون عامل اکثر عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند. هدف از این پژوهش تعیین حساسیت دارویی سوش‌های کلبسیلا پنومونیه و بررسی علت مقاومت سوش‌ها از نظر وجود پلاسمید می‌باشد. بدین منظور ۱۰ سوش کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی خون، ادرار، مدفوع و زخم از بخش میکروب‌شناسی آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های کرمان ایزوله گردیده با استفاده از تست‌های تشخیصی باکتریولوژیک، جنس، گونه و وجود کپسول پلی‌ساکاریدی در سوش‌های ایزوله شده مورد تأیید قرار گرفت. حساسیت دارویی تمام سوش‌های ایزوله شده نسبت به دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به روش انتشار دیسک تعیین و کمترین مقدار غلظت دارویی بازدارنده از رشد (MIC) آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بررسی شد. همه سوش‌های ایزوله شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، پنی‌سیلین جی، کلوگزاسیلین، کوتریموکسازول، سفالکسین، سفالوتین و سفازولین مقاوم بودند، در حالی که مقاومت نسبت به تتراسیکلین و کلرآمفنیکل متغیر بود. در میان سوش‌های کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده، سوش‌های ۲، ۴، ۹ و ۱۰ بالاترین میزان MIC را نسبت به سفوتاکسیم و سفتی زوکسیم (MIC>۵۱۲mg/L) در شرایط In Vitro از خود نشان دادند. تکنیک کونژوگاسیون (Conjugation) با استفاده از فیلتر غشایی و جداسازی DNA پلاسمیدی از این ۱۰ سوش کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده از بیمارستان‌های کرمان و مشاهدهٔ DNA پلاسمیدی با استفاده از ژل آگارز ۰/۷٪ و به کمک دستگاه U.V. ترانس ایلومیناتور (Transilluminator) در طول موج بین ۳۰۰-۲۰۰nm، نشان داد که مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و سفتی زوکسیم در سوش شماره ۹ کلبسیلا پنومونیه مقاومتی پلاسمیدی است و قابل انتقال به سوش ۸ حساس کلبسیلا پنومونیه می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده، کونژوگاسیون بین سوش شماره ۹ و سوش استاندارد E. coli K12 SG20030.1 مقاوم به ریفامپین صورت نمی‌پذیرفت. وجود پلاسمید مسؤول مقاومت نسبت به سفوتاکسیم و سفتی زوکسیم در کلبسیلا پنومونیه برای اولین بار در ایران گزارش می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، آنتی‌بیوتیک، مقاومت دارویی، پلاسمید

۱- استادیار ژنتیک ملکولی، ۲- دانشجوی کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه باسیل گرم منفی فرصت طلب بیمارستانی متعلق به خانواده آنتروباکتریاسه است (۹). این باکتری عامل ذات‌الریه، عفونت‌های زخم، خون و مننژیت می‌باشد و در ۲۵ تا ۷۵ درصد بیماران مبتلا، خلط غلیظ و نکروز وسیع نسج ریه مشاهده می‌شود (۱۰). از بین باکتری‌های فرصت طلب بیمارستانی، کلبسیلا پنومونیه بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف از خود نشان می‌دهد (۶).

میچاد (Michoud) و همکارانش، سوش‌های کلبسیلا پنومونیه را از عفونت‌های بیمارستانی نظیر زخم‌های چرکین، باکتریمی و سپتی‌سمی که مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک از نسل سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف بودند، ایزوله کردند. مطالعه اپیدمیولوژیک آن‌ها نشان داد که مخزن این باکتری‌ها دستگاه گوارش بیماران بستری بوده است (۱۳).

جاکوبی (Jacoby) و همکاران، سوش‌های مقاوم به آزترونام، سفتی زوکسیم و سفوتاکسیم را در سوش‌های کلبسیلا پنومونیه و ایشریشیا کلی، گونه‌های سالمونلا و پروتئوس گزارش نمودند (۵).

لیورمور و یان (Livermore & Yuan)، با مطالعه روی گونه‌های کلبسیلا تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در ICU کشورهای اروپایی، متوجه شدند که در میان ۹۶۸ گونه ایزوله شده، ۷۱۸ مورد متعلق به کلبسیلا پنومونیه، ۲۴۸ مورد متعلق به کلبسیلا اکسی‌توکا و ۲ مورد متعلق به کلبسیلا اوزونی بودند (۸).

نکته مهم این که مقاومت زیادی که به سرعت بعد از تزریق آنتی‌بیوتیک جدید ظاهر می‌شود، نشان دهندهٔ این مطلب است که ژن‌های مقاوم اغلب در هر جای طبیعت قبل از استفاده بالینی وجود داشته‌اند و از طریق فرایندهای انتقال ژنی (کونژوگاسیون، ترانسفورماسیون، ترانس‌داکشن) به سوش‌ها و گونه‌های مختلف باکتری‌ها منتقل شده‌اند (۷).

کلبسیلاهای مقاوم به مواد ضد میکروبی مختلف در دههٔ اخیر افزایش پیدا کرده‌اند و این سوش‌های مقاوم اکنون عامل بیشتر عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند (۴). به عنوان مثال اغلب سوش‌های مقاوم کلبسیلاپنومونیه در منطقه Grampian اسکاتلند در سال ۱۹۹۲ تولید بتالاکتامازهای با طیف وسیع (EBSL) کرده‌اند که به بیمارستان‌های دیگر منتشر گردیده‌اند. DNA اکثر این سوش‌ها، نشان دهنده وجود پلاسمید مشترک، بین آن‌ها است.

بتالاکتامازهای با طیف وسیع از سوش‌های کلبسیلاپنومونیه مسؤول عفونت‌های فرصت‌طلب بیمارستانی به خصوص عفونت‌های ادراری می‌باشند که قادرند سفالوسپورین‌های نسل سوم را تخریب نمایند (۱۹).

بینگن (Bingen) و همکاران، در طول ۱۲ ماه بررسی عفونت ۴۳ کودک بستری در بیمارستان که به وسیله کلبسیلاپنومونیه آلوده شده بودند نشان دادند که اغلب آن‌ها تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف می‌کردند (۲). اپیدمولوژی این کانون عفونت به وسیله ژنتیک ملکولی شامل وجود پلاسمید بود و rDNA ribotyping آن‌ها نشان داد که انتشار ژن‌های مقاوم از طریق کونژوگاسیون بین گونه‌ای و به کمک آلودگی متقاطع بیمار به بیمار صورت می‌گرفت. ترکیب مطالعه پلاسمیدی و ribotyping کمک بزرگی به بررسی ریشه شیوع این سوش‌های مقاوم نمود.

امروزه اغلب سوش‌های کلبسیلاپنومونیه مقاوم به نسل سوم سفالوسپورین‌ها تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف از نوع CTX-1,SHV-2,SHV-3 می‌کنند که ژن‌های آن‌ها در روی پلاسمید واقع شده است (۲).

پلاسمیدهای مسؤول مقاومت، نسبت به سفوتاکسیم و سفتی‌زوکسیم از مناطق مختلف اروپا، آمریکا، آسیا و آفریقا جداسازی و مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۲).

یکی از مهم‌ترین جنبه‌های بررسی مقاومت دارویی، بررسی ژنتیک ملکولی آن است و معمولاً برای مشاهده پلاسمیدها از الکتروفورز DNA روی ژل آگارز استفاده می‌شود (۳). این بررسی‌ها در ایران کمتر مورد مطالعه و آزمایش قرارگرفته است و اطلاعات خیلی کمی در مورد نقش و وجود پلاسمیدهای مسؤول مقاومت دارویی در باکتری‌های فرصت طلب بیمارستانی وجود دارد. هدف اصلی این تحقیق در مرحله اول ایزوله کردن سوش‌های مقاوم کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان‌های کرمان و تعیین حساسیت دارویی و در مرحلهٔ دوم بررسی علت این مقاومت‌ها از لحاظ وجود پلاسمید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و محیط‌های کشت

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل پنی‌سیلین جی (PG)، کربنی - سیلین (Cb)، آمپی‌سیلین (Amp)، آموکسی‌سیلین (Amox)، سفالوتین (CT)، سیپروفلوکساسین (CIP)، سفوتاکسیم (CTX)، سفتی زوکسیم (CAZ)، کانامایسین (K)، تتراسیکلین (Te)، توبرامایسین (Tob)، آمیکاسین (AN)، جنتامایسین (Gm)، اریترومایسین (E)، کلرامفنیکل (C)، ونکومایسین (V)، نالیدیکسیک اسید (Nal)، نیتروفورانتوئین (Fm)، تری‌متوپریم و

سولفامتوکسازول (SXT) از شرکت پادتن طب ـ ایران خریداری گردیدند و برای تعیین حساسیت دارویی مورد استفاده قرار گرفتند. پودر آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین از کارخانه فارابی ایران، سفتی زوکسیم، سفوتاکسیم، سفازولین (CF)، پنی‌سیلین جی، آمیکاسین، جنتامایسین، سفالکسین (CN) و کلوگزاسیلین (ClOX) از کارخانه جابربن حیان (ایران)، ریفامپین (Rif)، کلرامفنیکل (Cm)، تتراسیکلین، از کارخانه داروسازی حکیم (ایران)، نالیدیکسیک اسید از البرز دارو (ایران) و اریترومایسین از کارخانه شیمی دارو (ایران) خریداری گردیدند. تریس هیدروکلرید (Tris-HCl)، آگارز، گلوکز، سوکروز، کلروفرم، فنل، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، مولرهینتون آگار (MHA)، اسیدبوریک، اسید استیک، لیزوزیم، بروموفتل بلو، استات پتاسیم و اتانول از شرکت مرک (آلمان) و محیط‌های کشت نوترینت برات و مولرهینتون برات (MHB) از شرکت Hi-media، برومید اتیدیوم از شرکت سیگما (آمریکا)، همچنین اتیلن دی‌آمین تتراستیک اسید (EDTA) از شرکت بیوژن (ایران) خریداری شدند. باکتری‌های استاندارد E.coli K12 HB101 (F^-,ProA,LeuB6,thi$^-$2,lacY,hsdsB20,reca$^-$,strp^{r}gpt$^-$,Lac$^-$) و E.coli K12 SG20030 (F^-,Li$^-$, λz2, His$^-$, recA$^-$, Lac$^-$) از شرکت سیناژن (ایران) تهیه گردیدند.

منابع باکتری

در این پژوهش ۱۰ سوش کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های خون، ادرار، مدفوع و عفونت زخم جمع‌آوری شده از بخش میکروب‌شناسی آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های کرمان-درمان، شهید باهنر، شفا، سوانح و سوختگی و راضیه فیروز ایزوله گردیدند. جنس و گونه کلبسیلا و وجود کپسول پلی‌ساکاریدی به کمک آزمایشات باکتریولوژیک تشخیص داده شد (۹).

تعیین حساسیت دارویی باکتری‌های ایزوله شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

۰/۱ml از سوش‌های کلبسیلا پنومونیه رشد یافته در محیط کشت مولرهینتون برات (MHB) را پس از رقیق کردن (10^6CFU/ml) به محیط مولرهینتون آگار (MHA) تلقیح نموده و به کمک سوآپ استریل در سطح پلیت حاوی مولرهینتون آگار پخش گردید. بعد از گذشت ۲ تا ۵ دقیقه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فواصل مشخص حداکثر تا ۱۲ دیسک، روی محیط کشت قرار داده شد، سپس پلیت‌ها را به مدت ۱۸ ساعت در گرمخانهٔ ۳۷°c قرار داده و نتایج روز بعد بررسی شد. اندازه هاله ممانعت از رشد به کمک روش کیبری ـ باثر اندازه گرفته شد و با اندازه هاله باکتری حساس استاندارد E.coli K12 HB101 مقایسه گردید (۶).

تعیین غلظت دارویی بازدارنده از رشد (MIC) به روش رقت لوله‌ای (روش ماکرو)

برای این منظور یک لوپ از کلنی‌های سوش‌های مختلف کلبسیلا پنومونیه به ارلن با گنجایش ۱۰۰ml حاوی ۲۰ml محیط مولرهینتون برات (MHB) استریل، تلقیح شد. پس از ۱۸ ساعت نگهداری در گرمخانه ۳۷°c، سوسپانسیون میکروبی با استاندارد ۰/۵ مک فارلند مقایسه و رقت آن به 5×10^5CFU/ml رسانده شد (۵). رقت‌های متفاوتی از آنتی‌بیوتیک‌ها بعد از حل کردن در حلال مربوطه از ۰/۵ تا ۵۱۲ میلی‌گرم در لیتر تهیه گردید و به لوله‌های حاوی ۱ml مولرهینتون برات استریل افزوده شد. سپس ۰/۱ml از سوسپانسیون میکروبی به هر لوله اضافه شده و آن گاه لوله‌ها در گرمخانه ۳۷°c به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. روز بعد کدورت هر لوله مورد بررسی قرار گرفت و برای هر کدام از سوش‌های ایزوله شده اولین رقتی از داروکه در آن رشد مشاهده نگردید به عنوان کمترین غلظت بازدارنده از رشد (MIC) در نظر گرفته شد.

MIC بنا به تعریف عبارتست از کمترین غلظت داروکه مانع رشد میکروب مورد نظر (Visible Turbidity) می‌شود (۸). حساسیت این سوش‌ها با سوش حساس استاندارد E.coli K12 HB101 مقایسه گردید.

نحوه ایجاد موتان مقاوم به ریفامپین

سوش‌های E.coli K12 HB101 و E.coli K12 SG20030 حساس نسبت به آنتی‌بیوتیک ریفامپین با (MIC>۶۴mg/L) به کمک تکنیک پلیت شیب‌دار، مقاوم گردیدند (۸،۱۶). در این روش مقدار ۱۰ml از محیط کشت نوترینت آگار در یک پلیت پتری استریل ریخته شد و به صورت شیب‌دار قرار گرفت و سرد گردید. سپس مقدار ۱۰ml دیگر از آگار Soft حاوی ۶۴μg/ml آنتی‌بیوتیک ریفامپین (این آنتی بیوتیک در دی متیل سولفوکسید [DMSO] حل گردید) روی آن ریخته شد و سرد گردید. ۰/۱ml سوسپانسیون میکروبی در غلظت 10^9CFU/ml به کمک سوآپ استریل در سطح پلیت پخش گردید. پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت نگهداری در گرمخانه ۳۷°c تعداد کلنی‌های رشد یافته شمارش شدند. کلنی‌هایی که در قسمت غلظت زیادتر دارو رشد یافته بودند ایزوله گردیده و دوباره به محیط کشت با

غلظت بیشتر ریفامپین اضافه شدند. دوباره این عمل با کلنی‌های مقاوم‌تر تکرار گردید و سپس این کلنی‌ها برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. سوش مقاوم به ریفامپین E.Coli K_{12} SG20030.1 نام گرفت.

کونژوگاسیون بوسیله روش فیلتر غشایی

۲۰ml محیط کشت مولرهینتون برات (MHB) استریل در ۲ ارلن به گنجایش ۱۰۰ml به طور جداگانه یکی برای رشد باکتری مقاوم دهنده و دیگری برای رشد باکتری حساس گیرنده مورد استفاده قرار گرفت. پس از تلقیح و نگهداری بمدت ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷°c، ۲ml از باکتری دهنده و ۳ml از باکتری‌های مقاوم به Nal و Rif گیرنده را در یک پلیت استریل مخلوط نموده و ۳ml از سوسپانسیون میکروبی را به کمک ظرف صافی استریل (Assembly membrane filter) از فیلترهایی با منافذی به قطر ۴۵٪ میکرون (سارتوریوس آلمان) گذرانده شد. سپس فیلترهای غشایی به کمک پنس استریل روی سطح مولرهینتون آگار (MHA) استریل فاقد هرگونه آنتی‌بیوتیکی قرار گرفت و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷°c نگهداری شد. فیلتر غشایی در ۲ml سرم فیزیولوژی استریل به شدت تکان داده شد و رقت‌هایی از 10^{-2} تا 10^{-8} به کمک سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید. از هر رقت ۰/۱ml بر روی محیط‌های کشت مولرهینتون آگار یکی حاوی نالیدیکسیک اسید و سفوتاکسیم (به ترتیب ۱۲۸mg/L و ۶۴mg/L) و دیگری حاوی نالیدیکسیک اسید و سفتی زوکسیم (به ترتیب ۱۲۸mg/L و ۶۴mg/L) تلقیح و با میله شیشه‌ای استریل در کل محیط پخش گردید، همچنین دو پلیت شاهد منفی در نظر گرفته شد (۱۶). روز بعد نتایج را با پلیت شاهد منفی مقایسه و پس از مشاهدهٔ پلیت کنترل، کلنی‌های ترانس کونژوگانت شمارش گردید. فرکانس کونژوگاسیون عبارتست از تعداد کلنی‌های باکتری ترانس کونژوگانت تقسیم بر تعداد کل کلنی‌های باکتری گیرنده، ضربدر ضریب رقت.

$$F.C = \frac{\text{تعداد کل کلنی‌های باکتری گیرنده}}{\text{تعداد کلنی‌های باکتری ترانس کونژوگانت}} \times \text{ضریب رقت}$$

استخراج DNA پلاسمیدی

جداسازی DNA پلاسمیدی بوسیله تکنیک Alkaline lysis در ۱۰ سوش کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده از بیمارستان‌های کرمان صورت گرفت (۲). یک لوپ از کلنی‌های رشد یافته در محیط‌های انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک به ۲۰ml محیط مولرهینتون برات (MHB) استریل حاوی آنتی‌بیوتیک، در ارلنی با گنجایش ۱۰۰ml تلقیح گردید. پس از نگهداری در گرمخانه ۳۷°c به مدت ۸ ساعت، ۱ml از سوسپانسیون میکروبی فازلگاریتمی را به کمک سانتریفوژ یخچال‌دار (آلمان ـ ۲۰۰۰، Hettich) داخل لوله‌های میکروفیوژ با دور ۸۰۰۰rpm در دمای ۴°c رسوب داده شد. محلول رویی را دور ریخته و رسوب سلول روی کاغذ بلاتینگ خشک شد. ۲۰۰μl از محلول I (گلوکز یا سوکروز ۰/۸۶۵g تریس هیدروکلراید، ۰/۳۲۰۸g EDTA، ۰/۳۲g و pH=۸) را درون لوله میکروفیوژ ریخته و به کمک ورتکس خوب تکان داده شد تا رسوب حل شود. آنگاه ۴۰μl محلول لیزوزیم (۱۰mg/ml) افزوده و در ظرف حاوی یخ پودر شده قرار داده شد. بعد از این مدت ۲۰۰μl محلول II (بافر لیزکننده ۰/۳۲g EDTA، ۲٪SDS، pH=۱۲/۵) درون لوله‌های میکروفیوژ ریخته و مدت ۲ دقیقه در بن ماری ۶۰°c قرار گرفت. سپس ۱۵۰μl از محلول III (استات پتاسیم ۲۹/۴g، اسید استیک گلاسیال ۱۱/۵ml و pH=۴) را به لوله میکروفیوژ افزوده و خیلی آرام تکان داده شد و به مدت ۱ ساعت در یخ پودر شده قرار گرفت. نمونه‌ها را در دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۶-۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی را جدا و رسوب دور ریخته شد. به محلول رویی ۲۰۰μl کلروفرم و فنل با نسبت‌های مساوی اضافه و سانتریفوژ گردید. محلول رویی جدا شده و در یک لوله میکروفیوژ جداگانه استریل ریخته شد. ۲ برابر حجم مایع رویی اتانول سرد ۹۵٪ افزوده شد و نمونه‌ها در فریزر ۲۰°c- به مدت ۱ ساعت نگهداری شدند. بعد از این مدت لوله میکروفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد. آنگاه ۶۰μl رنگ بروموفنل بلو (۰/۰۰۱g بروموفنل بلو، ۱/۵g سوکروز و ۱/۵μl گلیسرول و ۵۰ml آب مقطر استریل) به آن افزوده شد و پس از حل شدن برای الکتروفورز آماده گردید.

آگارز ژل الکتروفورز

۰/۷٪ (Wt/Vol) آگارز ژل در بافرتریس بورات (تریس ۸۹mM و اسید بوریک ۸۹mM و ۲/۵EDTA mM، pH=۸/۳) تهیه شد. ۶۰μl از محلول حاوی DNA را داخل هر چاهک ریخته و پس از ریختن بافرتریس بورات، تانک الکتروفورز را به مدت ۳ ساعت به منبعی با ولتاژ ۹۰V و شدت جریان ۳۰mA وصل گردید. سپس ژل را در محلول حاوی برومید اتیدیوم ۰/۵μg/ml به مدت ۵ دقیقه قرار داده و با آب شسته شد و محل پلاسمید به کمک دستگاه UV ترانس ایلومیناتور (آمریکا ـ Upland, CA 91786 Model TM-20) مشاهده گردید.

جدول ۱ : *تست‌های تشخیص آزمایشگاهی برای تشخیص جنس و گونه کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده از بیمارستان‌های کرمان*

خصوصیات	کلبسیلا پنومونیه	خصوصیات	کلبسیلا پنومونیه
رنگ‌آمیزی گرم	گرم منفی میله‌ای	حرکت	-
کاتالاز	+	لاکتوز	+
اکسیداز	-	لیزین دکربوکسیلاز	+
تولید اوره آز	-	رشد روی محیط (EMB)	+ کلنی موکوئیدی
اندول	-	ژلاتین (۲۲°)	-
متیل رد (MR)	-	مالونات	+
وژ پرسکوئر (VP)	+	موکات	+
سیمون سیترات	+	سدیم آلژینات	+
رشد روی محیط TSI	+ اسید	تولید گاز از دو لستیول	-

نتایج

۱ـ جداسازی سوش‌های مقاوم کلبسیلا پنومونیه و تست‌های تشخیصی

نتایج به دست آمده از تست‌های تشخیص آزمایشگاهی برای ۱۰ سوش مقاوم متعلق به باکتری کلبسیلا پنومونیه در جدول ۱ آمده است.

۲ـ تعیین حساسیت باکتری‌های مورد آزمایش نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

بررسی میانگین هاله‌های ممانعت از رشد در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و مقایسه آن با سوش استاندارد E.coliK12 HB101 نشان دهندهٔ مقاومت تمام سوش‌های باکتری مورد آزمایش نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های CN, CX, SXT, PG Amp, Amox و CF بود. در بین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، مقاومت نسبت به CTX ,Tc, Cm و CAZ متغیر بود، در حالی که تمام سوش‌های کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده نسبت به AN, Gm و CIP حساس بودند.

۳ـ تعیین کمترین غلظت باز دارنده از رشد (MIC)

جدول ۲ میزان MIC ۱۰ سوش ایزوله شده کلبسیلا پنومونیه را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود اغلب سوش‌ها نسبت به CTX, CAZ, CF, Clox, Amox, AmP, PG از خود مقاومت نشان دادند ولی MIC آن‌ها نسبت به AN, Rif و Gm نسبتاً کم بود. در میان سوش‌های ایزوله شده، کلبسیلا پنومونیه ۲، ۴، ۹ و ۱۰ دارای بیشترین مقدار MIC نسبت به CTX, CAZ (۵۱۲mg/L) بودند. این نتایج با MIC سوش موتان E. coli K12 HB101 که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های دیگر حساس بود مقایسه گردید.

۴ـ کونژوگاسیون

یکی از راه‌های پی بردن به وجود پلاسمید (DNA خارج کروموزومی) که حامل ژن‌های مقاومت دارویی نسبت به چند دارو است، فرآیند کونژوگاسیون می‌باشد. جدول ۳ نتیجه کونژوگاسیون و انتقال همزمان ژن‌های مقاوم از سوش ۹ کلبسیلا پنومونیه حساس به نالیدیکسیک اسید و سوش ۸ مقاوم به آن بود را نشان می‌دهد. نکته مهم انتقال همزمان مقاومت نسبت به CTX و CAZ از سوش مقاوم کلبسیلا پنومونیه ۹ به سوش ۸ حساس بود (آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی برای تشخیص و تأکید کلنی‌های ترانس کونژوگانت، Nal+CTX به ترتیب ۶۴mg/L و ۱۲۸mg/L و Nal+CAZ به ترتیب ۶۴mg/L و ۱۲۸mg/L بودند) ولی در کونژوگاسیون بین گونه‌ای بین کلبسیلا پنومونیه سوش ۹ (حساس به ریفامپین) و E.coli K12 SG20030.1 (مقاوم به ریفامپین) هیچ‌گونه انتقال مارکر مقاومت دارویی مشاهده نگردید.

همچنین کونژوگاسیون بین سوش مقاوم ۳ و سوش ۸ کلبسیلا پنومونیه انجام شد ولی هیچ گونه انتقال مقاومت دارویی مشاهده نگردید.

جدول ۲ : نتیجه MIC سوش‌های مختلف کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده از بیمارستان‌های کرمان

کلبسیلا پنومونیه	MIC (mg/L)														
	PG	CLOX	AMP	Amox	CF	CN	CTX	CAZ	AN	Gm	TC	E	Cm	Nal	Rif
سوش ۱ (زخم) باهنر	۴	۳۲	۶۴	۶۴	۲	<۰/۵	<۰/۵	<۰/۵	<۰/۵	<۰/۵	۴	۱۶	۱۶	۸	۴
سوش ۲ (ادرار) شفا	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۵۱۲	۸	>۵۱۲	۲۵۶	۵۱۲	۱۲۸	>۵۱۲	۱۶
سوش ۳ (خون) راضبه‌فیروز	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	ND	۶۴	۱۲۸	<۰/۵	۳۲	۱۲۸	۲۵۶	>۵۱۲	۸	۱۶
سوش ۴ (خون) راضبه‌فیروز	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۵۱۲	>۵۱۲	۵۱۲	۴	۱۲۸	۲۵۶	۵۱۲	>۵۱۲	۱۶	۳۲
سوش ۵ (ادرار) کرمان‌درمان	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۱۲۸	>۵۱۲	۲۵۶	۲۵۶	۰/۵	۶۴	۲۵۶	۲۵۶	۲۵۶	۵۱۲	۳۲
سوش ۶ (زخم) باهنر	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۲۵۶	۲۵۶	۸	۳۲	۱۲۸	۵۱۲	۲۵۶	۵۱۲	۳۲
سوش ۷ (خون) باهنر	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	<۰/۵	ND	۱۶	۱۶	<۰/۵	۳۲	۲	۸	۳۲	۳۲	۲
سوش ۸ (زخم) شفا	۱۲۸	۱۲۸	۶۴	۲۵۶	۳۲	۵۱۲	<۰/۵	۶۴	۱۶	۴	۲	۲۵۶	۸	۲۵۶	۶۴
سوش ۹ (ادرار) کرمان‌درمان	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۶۴	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۲	۶۴	۵۱۲	۵۱۲	۵۱۲	۳۲	۱۶
سوش ۱۰ (زخم) کرمان‌درمان	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۴	۶۴	۵۱۲	>۵۱۲	۲۵۶	۴	۳۲
E. coli K12 HB101	۱	۴	۲	۴	۰/۵	ND	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۱۶	۴	۸	۴
E.coli SG20030.1	۱۶	۸	۴	۸	۱	۱	<۰/۵	<۰/۵	ND	<۰/۵	۱۲۸	۳۲	<۰/۵	۲	>۵۱۲

MIC= Minimum Inhibitory Concertration

ND= Not determined

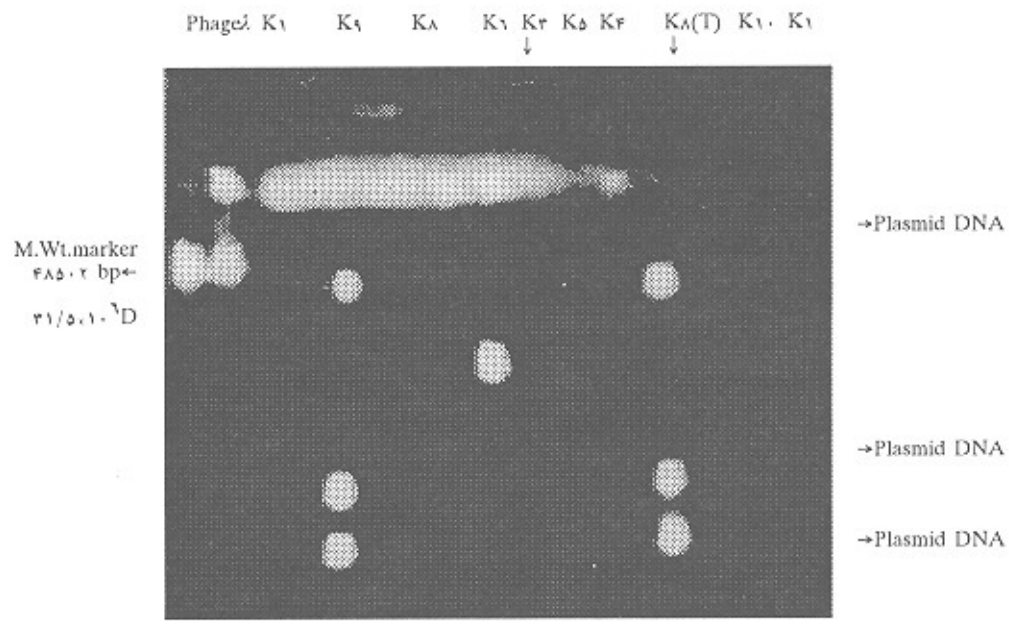
نتایج فوق معدل سه بار آزمایش و تعیین حساسیت است

جدول ۳ : نتیجه کونژوگاسیون به وسیله مند فیلتر غشایی بین باکتری کلبسیلا پنومونیه سوش ۸ مقاوم (گیرنده) و سوش ۹ (دهنده) حساس به نالیدیکسیک اسید و E. coli SG20030.1 بعد از ۷۲ ساعت در $37^{\circ}c$

باکتری دهنده	باکتری گیرنده	محیط رشد	تعداد کلنی‌های رشد کرده					فرکانس کونژوگاسیون	نتیجه به دست آمده	انتقال هم زمان ژن‌های مقاوم
			رقیق نشده	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-8}			
K-9	K-8	AmP+Nal	۴۰۰۰	۳۰۰۰	۰	۰	۰	7×10^{-2}	عدم انتقال پلاسمید	-
K-9	K-8	CTX+Nal	۵۰۰۰	۴۰۰۰	۲۰۰۰	۱۸۰۰	۲۰۰	$0/8\times10^{-4}$	انتقال پلاسمید	CAZ
K-9	K-8	Cm+Nal	۵	-	-	-	-	-	عدم انتقال پلاسمید	-
K-9	K-8	CAZ+Nal	۵۰۰۰	۴۰۰۰	۱۶۰۰	۱۲۰۰	۶۰۰	$0/79\times10^{-4}$	انتقال پلاسمید	CTX
-	K-8	Nal	۵۰۰۰	۴۵۰۰	۲۵۰۰	۱۳۰۰	۱۰۰۰	-		-
K-9	SG20030.1	CTX+Rif	۳۰۰۰	۷۰۰	۱۱۱	۵	-	-	عدم انتقال پلاسمید	-

کنترل کونژوگاسیون برای هر مارکر انجام گردید و هیچگونه موتان خودبخودی یافت نگردید.

آزمایش بالا برای سه بار تکرار شد و نتایج مشابهی به دست آمد.



شکل ۱ : *آگارز ژل الکتروفورز پلاسمیدهای ایزوله شده از سوش‌های کلبسیلا پنومونیه*

آگارز ژل الکتروفورز در ۳۰mA (۹۰V) به مدت ۳ ساعت انجام گردید و ژل با بروميداتيدیوم ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر رنگ شد. بندهای پلاسمید در زیر ژل مورد مطالعه قرار گرفت.
K۸(T) - سوش K۸ ترانس کونژوگانت که پلاسمید از سوش K9 دریافت نموده است.
K8(T)=Transconjugant Obtained Plasmid DNA from K9

۵ ـ جداسازی پلاسمید و آگارز ژل الکتروفورز

تکنیک جداسازی پلاسمید و انتقال آن از طریق کونژوگاسیون در ۱۰ سوش کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده از بیمارستان‌های کرمان نشان دهنده عدم وجود پلاسمید در سوش‌های ۱،۲،۴،۵،۶،۷،۸ و ۱۰ بود در حالی که سوش شماره ۳ حاوی یک پلاسمید و سوش ۹ حاوی ۳ پلاسمید است. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است، همچنین مشاهده پلاسمید در سوش ۸ ترانس کونژوگانت نشان‌دهنده این مطلب است که در اثر پروسه کونژوگاسیون، پلاسمیدهای موجود در سوش ۹ به سوش ۸ منتقل گردیده‌اند.

بحث و نتیجه گیری

به طور کلی چنین استنباط می‌شود که کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده از بیمارستان‌های کرمان به دلیل استعمال زیاد دارو و ایجاد محیط انتخابی به اغلب آنتی‌بیوتیک‌هایی که به طور روتین مورد استفاده قرار می‌گیرند مقاوم شده‌اند (۱،۴).

همان‌طور که نتایج نشان می‌دهند مقاومت نسبت به پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌های نسل اول بسیار شدیدتر از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. نکته مهم این که مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف نسل سوم نظیر سفوتاکسیم و سفتی زوکسیم در اغلب سوش‌های ایزوله شده مشاهده گردید، که حداقل در سوش ۹ کلبسیلا پنومونیه از نوع پلاسمیدی است.

هنگامی که آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین به بازار آمدند هیچ کس تصور نمی‌کرد که میکروب‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شوند و عملاً استفاده از برخی آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان غیر عملی گردد (۸).

امروزه پلاسمیدها به دلیل محیط انتخابی در بیمارستان‌ها به فراوانی یافت می‌شوند به طوری که سوش‌های مقاوم حامل پلاسمید علیه پنی‌سیلین و متی‌سیلین و آنتی‌بیوتیک‌های دیگر در استافیلوکوکوس آرئوس موجب مرگبار شدن این باکتری شده است (۷،۱۱).

در این تحقیق که به روش تجربی صورت گرفت مشخص شد که سوش‌های ۹ و ۳ کلبسیلا پنومونیه حاوی پلاسمید در درون خود می‌باشند ولی تنها سوش ۹ کلبسیلا پنومونیه توانایی انتقال آن را به سوش حساس گیرنده دارد. مطالعه همزمان انتقال مقاومت دارویی نشان داد که ژن‌های CTX,CAZ هر دو همزمان به سوش گیرنده کلبسیلا ۸ منتقل شده‌اند و احتمالاً نشان دهنده جایگاه مشترک آن‌ها روی پلاسمید می‌باشد.

نکته مهم این که انتقال فقط بین سوش‌های کلبسیلا پنومونیه صورت گرفت ولی هیچگونه انتقال ژنتیکی بین گونه‌ای مشاهده نشد. جداسازی پلاسمید و مطالعه آن روی آگارز ژل تأیید مطلب فوق است.

مقاومت دارویی علیه آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر پنی‌سیلین جی، کاناماسین، نئومایسین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل، تتراسیکلین و اریترومایسین در پلاسمیدها مستقر می‌باشد که قادرند از یک باکتری به باکتری دیگر از طریق کونژوگاسیون منتقل شوند. البته مقاومت کروموزومی نیز به طور وسیعی در بین سوش‌های مقاوم بیمارستانی وجود دارد (۱۷).

مارتینز (Martinez) و همکاران موتان‌هایی از کلبسیلا پنومونیه را ایزوله نمودند که نسبت به سفوکسیتین و سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مقاوم بودند (۱۰). همچنین شیپا (Shipa) و همکارانش، سوش‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سفتازیدیم (CZ) را از عفونت خون جدا و وجود پلاسمید را در برخی از آن‌ها نشان دادند (۱۵).

جاکوبی و یان (Jacoby & Yaun) نوع Amp-C بتالاکتاماز که مسؤول مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف است و ژن آن روی پلاسمید قرار دارد را گزارش کردند (۵).

شکیبایی و همکاران ژن‌های مربوط به Ag, Sd, Cm (نقره) Te و Amp که روی پلاسمید pUPI ۲۷۶ قرار داشتند را از یک آسینتوباکتر به آسینتوباکتر حساس دیگر و به E.coli منتقل کردند (۱۶).

امروزه جریان انتقال ژنتیکی ژن‌های مقاوم توسط فرآیند کونژوگاسیون نه تنها درمان را مشکل نموده بلکه هزینه‌های درمان را افزایش داده است به طوری که حدود ۲۵۰ میلیون دلار هر ساله در آمریکا جهت کنترل عفونت‌های ناشی از باکتری‌های فرصت طلب بیمارستانی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف هزینه می‌شود (۱۴,۱۸,۱۹).

در ایران به دلیل استفاده خودسرانه و بیش از حد دارو توسط بیماران، مقاومت دارویی به شدت و به نحو غیر قابل کنترلی افزایش یافته است و متأسفانه اطلاعات اندکی در این زمینه وجود دارد. این طرح پژوهشی راه را برای پی بردن به وجود پلاسمیدهای مقاوم به دارو در باکتری‌های فرصت‌طلب بیمارستانی بیمارستان‌های کرمان و مطالعه آن‌ها از لحاظ ژنتیک مولکولی هموار نموده است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از کلیهٔ همکاران در آزمایشگاه مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی کرمان و گروه میکروبشناسی که ما را یاری نموده‌اند و شورای پژوهشی و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که هزینه این طرح را تصویب و تقبل نموده‌اند سپاسگزاری می‌نماییم.

Summary

Plasmid- Mediated Cefotaxime and Ceftizoxime Resistance in Ten Strains of Klebsiella Pneumoniae Isolated from Hospitals in Kerman, Iran

MR. Shakibaie, PhD[1]; and AH. Gholamalibeig, MS[2]

1. Assistant Professor of Molecular Genetics, 2. Master of Microbiology, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran

Klebsiella pneumonia is a gram negative bacillus of which its resistant strains are a common source of nosocomial infections. The goal of this study is determination of drug sensitivity of these resistant strains, and study of causes involved in the resistnat especially the presence of plasmid. Ten different strains of klebsiella pneumoniae were isolated from clinical specimens collected from microbiology laboratories of different hospitals in kerman city, Iran. The strains were isolated from blood, urine, stool and wound infections. Genus and species of the organisms and the existence of large capsul were confirmed by bacteriological tests. The susceptibility of the strains of different antibiotics were determined by disk diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotics was also determined. All of the isolated bacteria were resistant to ampicillin, penicillin G., amoxycillin, cloxacillin, co-trimoxazole, cephalexin cefazoline, and cephalotin. Organisms were also exhibited moderate resistance to

tetracycline, chloramphenicol and erytromycine, while, they were senstive to amikacin, gentamycin, kanamycin and rifampicin. Among them, strains 2, 4, 9 and 10 showed highest MIC toward cefotaxime and ceftizoxime (MIC>512 mg/L). Conjugation technique with membrane filter along with plasmid isolation of these 10 isolated strains and observation of the plasmid band on the 0.7% agarose gel, revealed that resistance to cefotaxime and ceftizoxime are plasmid-mediated and can transferred from K-9 to K-8 by conjugation process with frequency of 0.8×10^{-4} and 0.7×10^{-4} respectively. Co-transfer studies indicated simultaneous transfer of CTX and CAZ genes to the recipient cells. Interspecies conjugation to E.coli S G20030.1, however, was negative.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 1999; 6(1): 29-38
Key Words: *Klebsiella pneumoniae, Antibiotic resistance, Plasmid*

منابع

۱. منصوری، شهلا: بررسی طیف ضد میکروبی سفتی زوکسیم و مقایسه آن با کلرامفنیکل، پنی‌سیلین G، سفالوتین، سفالکسین و سفازولین، مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۱۳۷۳، شماره ۴، ص ۱۷۶-۱۷۱.

2. Bingen EH, Desjardins P, Arlet G *et al.* Molecular epidemiology of plasmid spread among extended broad-spectrum B- laetamase- producing klebsiella pneumoniae isolates in a pediatric hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31(2): 179-184.
3. Birnboim HC and Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *NA Res* 1979; 7: 1513-1523.
4. Cassell GH. Emergent of antibiotic resistance, health risks and economic impact. *FEMS Immunol* 1997; 18: 271-274.
5. Jacoby GA and Han P. Detection of extended-spectrum beta-laetamases in clinical isolates of klebsiella pneumoniae and Escherichia Coli. *J Clin Microbiol* 1996; 34(4): 908-911.
6. Jorgensen JH. Laboratory issue in detection and reporting of antimicrobial resistance. *Infectious Disease Clinics of North America* 1997; 11(4): 785-802.
7. Levy SB. The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American* 1998; March: 46-58.
8. Livermore DM and Yuan M. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum B-lactamase amongst Klebsiella spp.from intensive care units in Europe. *Journal of Antimicrob Chemother* 1996; 38: 409-424.
9. Mohon CR and Manuselis JR: Enterobacteriaceae. In: Baron EJ and Finegold SM(Eds), Text book of diagnostic microbiology. Philadelphia, W.B. Saunders CO, 1995; pp 448-489.
10. Martinez L, Hernandez-Alles SA, Tomas JM, Benedi VJ and Jocoby GA. *In vitro* selection of porin defficient mutants of klebsiella pneumoniae with increased resistance to cefoxitin and expanded spectrum cephalosporins. Antimicrob agents chemother 1996; 40(2): 342-348.
11. McGowan JE and Tenover FC. Control of antimicrobial resistance in the health care system. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11(2): 297-302.
12 .Myer KS, Urban C, Berger B and Rahcal S. Nosocomial outbreak of klebsiella infection resistant to late-generation cephalosporins. *J Annals of Internal Medicine* 1993; 119: 353-358.
13. Michaud AD, Jallet C, Aubel D *et al.* R-Plasmid encoded adhesive factor in klebsiella pneumoniae strains responsible for human nosocomial infections. *Infect immunol* 1992; 60(1): 44-55.
14. Miller RV. Bacterial gene swapping in nature. *Scientific American* 1998; 67-71.
15. Schiappa DA, Hayden MK, Matushek MG *et al.* Ceftazidime-resistant klebsiella pneumoniae and Escherichia coli blood

stream infection. *J Infect Dis* 1996; 174(3): 529-536.
16. Shakibaie MR, Dhakephalkor PK, Kapadnis BP, Salajahe GA and Chopade BA. Plasmid mediated silver and antibiotic resistanse in Acinetobacter baumnnii BL54. *Iran J Med Sc* 1998; 23(1&2): 30-36.
17. Sirot DL, Goldstein FW, Soussy CJ *et al.* Resistance to cefotaxime and seven other beta-lactams in members of the family enterobacteriaceae: a 3-year survey in France. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36(8): 1677-1681.
18. Toltzis P, and Blumer JL. Antibiotic-resistant gram-negative bacteria in critical care setting. *Pediatr Clin North Am* 1995; 42(3): 687-702.
19. Weller TMA, Mackenzie FM and Forbes KJ. Molecular epidemiology of a large outbreak of multiresistant klebsiella Pneumoniae. *J Med Microbiol* 1997; 46: 921-926.