بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه دامی و انسانی با استفاده از روش ERIC-PCR و تعیین الگو حساسیت آنتی‌بیوتیکی

احسان استبرقی[1]، تقی زهرایی‌صالحی[1*]، کیومرث امینی[2]، محمود جمشیدیان[1]

چکیده

کلبسیلا پنومونیه، از جمله پاتوژنهای فرصت طلب و عامل عفونت در انسان و حیوانات می‌باشد. مقاومت به آنتی بیوتیک در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه در حال افزایش است. تست حساسیت ضد میکروبی قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها، لازم به نظر می‌رسد. هدف از مطالعه حاضر تعیین تایپ جدایه‌های بالینی و دامی کلبسیلا پنومونیه و ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی بود. در مجموع ۱۰۰ جدایه بالینی و دامی کلبسیلا پنومونیه از شهرستان بابک جمع‌آوری شد. حساسیت آنتی بیوتیکی با روش کربی بائر با توجه به دستورالعمل CLSI انجام شد. سپس، استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت DNAانجام و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمر ERIC1 و ERIC2 انجام گردید. نتایج نشان داد که تمامی سویه‌های تحت مطالعه (100%) به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین و آمیکاسین مقاوم بودند. بیشترین و کمترین میزان مقاومت مربوط به تتراسیکلن (۵۳ سویه؛ ۸۸/۳٪) و ایمی پنم (۸ جدایه؛ ۱۳/۳٪) بود. نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای و ترسیم دندروگرام بر اساس شباهت‌های ژنتیکی، نمونه‌های مورد مطالعه را به هفده گروه مجزا تفکیک نموده است. با توجه به یافته های این مطالعه، مقاومت به آنتی بیوتیک در بین جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه در حال افزایش می‌باشد. علاوه بر این، توال‌های ERIC دارای جفت بازی هستند که حاوی تکرارهای معکوس و مرکزی به شدت حفاظت شده بوده و در نواحی خارج ژنی ژنوم باکتری‌ها قرار گرفته اند و در تعیین تنوع ژنتیکی میان تمامی جدایه پیچیدگی کمتری دارند اما تفکیک خوبی در سطح سویه ایجاد می‌کنند.

واژگان کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه، ERIC-PCR، مقاومت آنتی بیوتیکی.*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۵

مقدمه

کلبسیلا باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه میله‌ای شکل، غیرمتحرک و دارای کپسول پلی ساکاریدی است، که این کپسول تمام سطح سلول را می‌پوشاند و علیه بسیاری از مکانیسم های دفاعی میزبان مقاوت ایجاد می کند محل معمولی کلونیزاسیون این باکتری در انسان سالم دستگاه معدی ـ روده‌ای، چشم، دستگاه تنفسی و دستگاه ادراری، تناسلی است(۱۹و ۱۶). کلبسیلا پنومونیه به عنوان یک میکروارگانیسم ساپروفیت در نازوفارنکس و مجرای گوارشی انسان وجود دارد. میزان آن در نمونه‌های مدفوع ۳۸-۵ درصد و در نازوفارنکس ۶-۱ درصد می‌باشد. بطور کلی هنگامیکه باکتری کلبسیلا در روده به سر می‌برد زندگی همسفره دارد. از این رو ساکن شدن آنها در این محل، مخزن یا منبعی برای آلودگی و تولید بیماری در سایر نقاط از جمله شش‌ها و مجرای ادراری محسوب می‌شود. کلبسیلا از شایع‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی است که میزان مرگ و میر گزارش شده از این باکتری بالا می‌باشد و باعث بروز انواع مختلفی از عفونت‌ها مانند پنومونی (بویژه در نوزادان)، سپتی سمی، اسهال، ایجاد آبسه در کبد، اندوفتالمیت، منتژیت، عفونت‌های ادراری و باکتریمی می‌گردد. کلبسیلا پنومونیه به عنوان یکی از موارد مهم عفونت‌های اکتسابی بیمارستانی مخصوصاً در نوزادان بخش ICU است (۱۳). بین نوع سویه‌های مختلف باکتری و حساسیت دارویی در زمینه دامپزشکی اطلاعات کمی موجود می‌باشد. باکتری‌های کلی فرم گرم منفی شامل اشریشیاکلای، گونه های کلبسیلا و گونه های انترباکتر از عوامل مسبب ورم پستان محیطی هستند. عوامل مسبب ایجاد این نوع از ورم پستان بطور طبیعی بر روی پوست پستان و درون پستان زندگی نمی‌کنند. اما چنانچه پستان گاو با عوامل محیطی آلوده تماس یابد، ممکن است عوامل وارد پستان شوند. به عبارت دیگر این ورم پستان در نتیجه ورود باکتری از منبعی عفونی جدا از پستان (مانند محیط) به داخل پستان ایجاد می‌گردند و باعث ورم پستان می‌شوند .همچنین در گله‌های با مدیریت خوب و تعداد سلول‌های سوماتیک (SCC) پایین، ورم

* ۱- گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران(tsalehi@ut.ac.ir)
۲- گروه میکروبیولوژی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

پستان بالینی ایجاد شده توسط عوامل محیطی، بسیار شایع است. باکتری‌های این گروه نیازی به پستان آلوده جهت حضور ندارند. این باکتری‌ها در مدفوع، بستر، آب یا مواد بی جان آلوده حمل شوند و با ورود به پستان، ایجاد ورم پستان می‌کنند. ورم پستان ناشی از یک سلسله نارسائی‌ها و سوء مدیریت وعوامل محیطی نامطلوب است. عدم موفقیت در ریشه کن کردن ورم پستان نشانه عدم کفایت روش‌های کنترل وپیشگیری است. کنترل وپیشگیری تنها یک عمل نیست بلکه سیستمی است پیچیده و مخلوطی از کلیه اقدامات بهداشتی ومحیطی که باید قدم به قدم آن را انجام داد این اقدامات بایستی اقتصادی ودر شرایط مختلف محیطی و مدیریتی قابل اجرا باشد (١٤). باکتری کلبسیلا پنومونیه یکی از ارگانیسم‌های مهم تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) است(١٦ و ١٣). بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف آنزیم‌هایی با واسطه پلاسمیدی هستند که باعث هیدرولیز حلقه بتالاکتام در آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از قبیل سفالوسپورین‌های نسل سوم و آزترئونام می‌شوند(٢١). بنابراین باسیل‌های گرم منفی دارنده این پلاسمیدها دارای مقاومت چند دارویی هستند. از سوی دیگر این پلاسمیدها عناصر ژنتیکی متحرک (شاخص‌های متحرک ژنتیک) هستند و می‌توانند بین باسیل‌های گرم منفی گونه‌های مختلف در طبیعت انتقال پیدا کنند. بیش از ١٠٠ آنزیم ESBL مختلف شناسایی شده است که هر یک سوبسترای خاصی را ترجیح می‌دهند. مقاومت دارویی کلبسیلا پنومونیه در حال افزایش می‌باشد(٤). با توجه به اهمیت مقاومت آنتی بیوتیکی در عفونت‌های بیمارستانی به عنوان یک مشکل جدی برای بخش سلامت کشور مطرح بوده است و بیماران را در بیمارستان های سراسر جهان تحت تاثیر قرار می‌دهد و سالانه قربانی های زیادی را به خود اختصاص داده است و هزینه های درمانی فراوانی بر کشور تحمیل می‌کند. سویه‌های مختلف این باکتری حساسیت مختلفی از خود نشان می‌دهد (١٥و ٨). معمولا روش‌های مولکولی بر پایه PCR وابستگی کمتری به متغیرهای رشد باکتری‌ها داشته و ثبات بیشتری دارند. این روش‌ها در عین حال از اتلاف وقت جلوگیری کرده و برای تعیین ارتباطات بین جدایه‌های میکروبی کاربرد دارد. روش‌های مختلفی نظیر RFLP-PCR،RAPD-PCR، MLST، REP-PCR و ERIC-PCR جهت تعیین تایپینگ باکتری‌ها معرفی شده است. ERIC روشی جهت انگشت‌نگاری باکتری‌ها می‌باشد که در ابتدا فقط به بررسی توالی‌های تکرار شونده در خانواده انتروباکتریاسه اختصاص داشت ولی بعدها به طورگسترده‌ای جهت بررسی جدایه‌ها و تفرق بین آنها با استفاده از پرایمرهای ERIC و تکثیر و ازدیاد قطعات تکرار شوندهٔ داخل ژنومی DNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌پردازد. توالی‌های ERIC قسمت‌های ١٢٦ جفت بازی هستند که حاوی تکرارهای معکوس و مرکزی به شدت حفاظت شده بوده و در نواحی خارج ژنی ژنوم باکتری‌ها قرار گرفته‌اند. الگوهای ERIC معمولا پیچیدگی کمتری دارند اما تفکیک خوبی در سطح سویه ایجاد می‌کنند. شایان ذکر است که در حال حاضر ERIC PCR به یکی از روش‌های پرکاربرد در طبقه بندی باکتری‌ها تبدیل شده است (ERIC-PCR١٧،٢٣). به دلیل اختصاصیت بیشتر، سرعت بالاتر و قابلیت تکرار پذیری از اهمیت ویژه‌ای در این زمینه برخوردار شده اند. هدف از مطالعه حاضر مربوط به تایپینگ جدایه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های دامی و انسانی و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه‌ها و شناسایی فنوتیپی

در این تحقیق از ١٠٠ نمونه انسانی و دامی کلبسیلا پنومونیه به تعداد مساوی در یک مطالعه توصیفی- مقطعی در سال ١٣٩٤ در شهرستان بابک استفاده شده است. نمونه‌های انسانی شامل نمونه‌های تنفسی و ادراری بیماران از مراکز درمانی شهر بابک و حومه و جدایه‌های دامی از نمونه‌های شیرده‌ای مبتلا به ورم پستان جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه در محیط آگار

خوندار و مک کانکی آگار و EMB جهت شناسایی باکتری کلبسیلا پنومونیه کشت داده شد. این محیط‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت نگهداری شدند.

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی

تعیین حساسیت آنتی بیوتیک جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه بر اساس استانداردهای ۲۰۱۱ CLSI انجام شد. برای تعیین الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه به روش دیسک دیفیوژن از محیط مولر هینتون آگار-Muller) (Hinton-Agar-MHAاستفاده شد. برای انجام آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن از استاندارد نیم مک فارلند استفاده میشود. تعداد ۲-۱ کلنی از کشت ۲٤ ساعت باکتری مورد نظر در سرم فیزیولوژی تلقیح و با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند 5/1 ×cfu/ml810 تهیه شد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در تست دیسک دیفیوژن شامل سیپروفلوکساسین (۵ mg)، آمیکاسین(۳۰ mg)، تری متوپریم ـ سولفامتوکسازول (۲۵mg)، سفوتاکسیم(۳۰ mg)، آمپیسیلین (۱۰mg)، آزترونام (۳۰mg) ، ایمیپنم (۱۰mg)، جنتامایسین(۱۰mg)، سفتازیدیم (۳۰mg)، سفپیم (۳۰mg) و آنتی‌بیوتیک‌های دامی شامل لینکواسپکتین (۳۰mg)، فلورفنیکل (۳۰mg) و انروفلوکساسین (۳۰mg) می‌باشند(۲٤). جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات از سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه ATCC 17771 به عنوان کنترل مثبت استفاده می‌شود.

ERIC-PCR

استخراج DNA با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت سیناژن انجام شد. پس از استخراج DNA تکثیر PCR در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از پرایمرهای ERIC1 و ERIC2 انجام گرفت(۲٦ و ۲۵). واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت که هر واکنش شامل ۲,۵ میکرولیتر بافر10X ، 0.5 میکرولیتر ۲ Mgcl با غلظت100 mm ، 0.5 میکرولیتر dNTP با غلظت ۲۰ mm ، ۱۰pmol از هر یک از آغازگرها، یک واحد آنزیم Taq polymerase و یک میکرولیتر از DNA ژنومی که با آب مقطر دو بار تقطیر به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر رسید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، باز شدن دو رشته در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ٦۳ درجه سانتی‌گراد به مدت شصت 30ثانیه و پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه (تعداد سیکل ۳۵) و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تکثیر یافت. برای مشاهده نتیجه تکثیر هر یک از ژن‌های مورد مطالعه، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۲٪ در شرایط ۱۵۰ ولت در بافر TBE×10 تجاری (Fermentase) انجام شد. پس از مشاهده باندهای حاصل از تکثیر PCR در محدوده ٤۵۰ تا bp ۱۷۰۰ با استفاده از دستگاه Gel documentation و اسکن تصاویر آنها، الگوی باندی تمام جدایه ها، برای هر آغازگر به صورت جداگانه رسم و عمل امتیازدهی بر اساس حضور و یا عدم حضور باندهای DNAدر محدودهی باندی bp ٤۵۰ تا bp ۱۷۰۰ انجام شد. بدین‌ترتیب که در هر جمعیت در صورت حضور باند، امتیاز یک و در صورت عدم حضور باند، امتیاز صفر داده شد و ماتریس صفر و یک تشکیل گردید. بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک در نرم افزارExcel ، داده به نرم‌افزار Bionumeric منتقل شد و تجزیه خوشهای به روش WARD انجام گردید. برای بررسی دقیق تر الگوهای ژنوتایپینگ بدست آمده نمودار دندروگرام مربوطه رسم گردید. در ترسیم دندروگرام از روش خوشه بندی مبتنی بر فاصله UPGMA استفاده شد. جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات از سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه ATCC 17771 به عنوان کنترل مثبت استفاده می‌شود.

جدول ۱- سکانس‌های پرایمرهای مورد استفاده با روش ERIC-PCR

نام پرایمر	سکانس
ERIC1	F=5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3'
ERIC2	R=5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

نتایج

در این مطالعه ۵۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت‌های ادراری و تنفسی مراجعه کننده به بیمارستان ولی عصر و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرستان بابک و ۵۰ نمونه از شیرگاوهای مبتلا به ورم پستانی جدا شد. تمامی سویه‌های مطالعه با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفتند. پس از رشد باکتری بر روی محیط های اولیه جهت جداسازی، کلونی‌های مشکوک را بر روی محیطهای افتراقی از جمله سیمون سیترات (مثبت)، محیط (TSI) اسید/اسید (SIM)، حرکت، اندول و گاز منفی کشت داده و با انجام تست‌های بیوشیمیایی نظیر احیای نیترات (مثبت)، اکسیداز (منفی)، اوره آز (مثبت)، تست متیل رد (منفی) و ووگس پرسکوئر (مثبتMR– VP) تعیین هویت گردیدند.

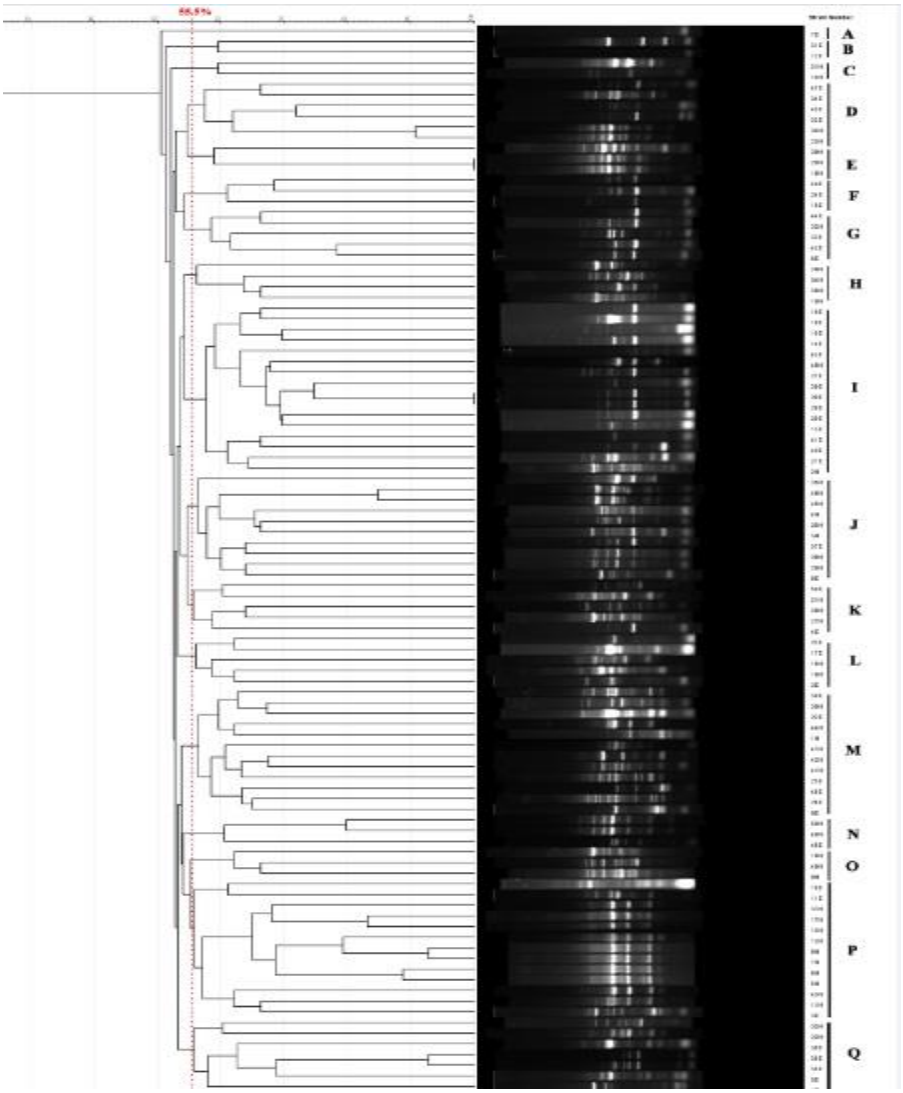
نتایج حساسیت آنتی بیوتیکی بر اساس قطر هاله عدم رشد مطابق پروتکل استاندارد CLSI ثبت شد. بر این اساس ۵۰ جدایه *کلبسیلاپنومونیه* جدا شده از نمونه‌های ادراری انسان بیشترین حساسیت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی پنم ۳۷ (۷۴٪)، سیپروفلوکساسین ۳۰ (۶۰٪)، سفپیم ۲۶ (۵۲٪) و نالیدیکسیک اسید ۲۲ (۴۴٪) نشان دادند، در حالیکه بیشترین مقاومت ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و سفالکسین با فراوانی مشابه ۳۲ (۶۴٪)، سپس کوتریماکسازول و سفوتاکسیم با درصد فراوانی مشابه ۳۰ (۶۰٪) مشاهده شد (جدول ۲). نتایج آنتی بیوگرام برای ۵۰ جدایه دامی *کلبسیلاپنومونیه*، بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم ۴۶ (۸۲٪)، سفتازیدیم ۲۳ (۴۶٪) ،جنتامایسین ۲۳ (۴۶٪) و سیپروفلوکساسین ۲۱ (۴۲٪) مشاهده شد. در حالیکه بیشترین مقاومت‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریماکسازول ۴۱(۸۲٪)، سفالکسین و سفپیم با فراوانی مشابه ۳۲ (۶۴٪)، و سیپروفلوکساسین ۲۸ (۵۶٪) مشاهده شد (جدول ۳). با استفاده از نرم‌افزار Bionumeric و تجزیه خوشه‌ای به روش WARD نتایج به شرح ذیل بدست آمد: گروه I گروه غالب بوده و ۱۶ نمونه را در خود جای داده است و ۱۶٪ از کل نمونه‌ها را شامل می‌شود. گروه P بعد از گروه I دارای بیشترین تعداد نمونه بوده و ۱۳٪ کل نمونه‌ها را شامل شده است. گروه M نیز ۱۲٪ نمونه‌ها و گروه J، ۱۰٪ نمونه‌ها و گروه Q، ۷٪ نمونه‌ها، گروه D، ۶٪ نمونه‌ها، گروه G، K و L، ۵٪ نمونه‌ها، گروه H ۴٪ نمونه‌ها، گروه‌های E، F، N و O، ۳٪ نمونه‌ها، گروه‌های B و C، ۲٪ نمونه‌ها و گروه A، ۱ درصد نمونه‌ها را شامل بود (شکل ۱).

جدول ۲- نتایج حساسیت دارویی ۵۰ جدایه بالینی انسانی*کلبسیلاپنومونیه* بر حسب تعداد و درصد

آنتی‌بیوتیک	S حساسیت	R مقاومت	I متوسط
جنتامایسین (GM)	۲۱ (۴۲٪)	۲۸ (۵۶٪)	۱ (۲٪)
کوتریماکسازول (SXT)	۲۰ (۴۰٪)	۳۰ (۶۰٪)	۰ ()
ایمی پنم (IMP)	۳۷ (۷۴٪)	۹ (۱۸٪)	۴ (۸٪)
سیپروفلوکساسین (CP)	۳۰ (۶۰٪)	۱۵ (۳۰٪)	۵ (۱۰٪)
سفوتاکسیم (CTX)	۱۸ (۳۶٪)	۳۰ (۶۰٪)	۲ (۴٪)
سفتازیدیم (CAZ)	۱۸ (۳۶٪)	۳۲ (۶۴٪)	۰ ()
(نالیدیکسیک اسیدNA)	۲۲ (۴۴٪)	۲۷ (۵۴٪)	۱ (۲٪)
سفالکسین (CN)	۱۸ (۳۶٪)	۳۲ (۶۴٪)	۰ ()
سفپیم (FEP)	۲۶ (۵۲٪)	۲۳ (۶۴٪)	۱ (۲٪)

جدول ۳- نتایج حساسیت دارویی ۵۰ جدایه دامی کلبسیلاپنومونیه بر حسب تعداد و درصد

آنتی‌بیوتیک	S حساسیت	R مقاومت	I متوسط
جنتامایسین (GM)	۲۳(٪٤٦)	۲٤(٪٤٨)	۳(٪٦)
کوتریماکسازول (SXT)	۹(٪۱۸)	٤۱(٪۸۲)	۰(٪۰)
ایمی پنم (IMP)	٤٦(٪۸۲)	۲(٪٤)	۲(٪٤)
سیپروفلوکساسین (CP)	۲۱(٪٤۲)	۲۸(٪٥٦)	۱(٪۲)
سفوتاکسیم (CTX)	۱۸(٪۳٦)	۲۷(٪٥٤)	٥(٪۱۰)
سفتازیدیم (CAZ)	۲۳(٪٤٦)	۲۲(٪٤٤)	٥(٪۱۰)
(نالیدیکسیک اسیدNA)	۱٤(٪۲۸)	۲۰(٪٤۰)	۱٦(٪۳۲)
سفالکسین (CN)	۱۳(٪۲٦)	۳۲(٪٦٤)	٥(٪۱۰)
سفپیم (FEP)	۱٥(٪۳۰)	۳۲(٪٦٤)	۳(٪٦)



نگاره ۱- تحلیل دندروگرام ۱۰۰ جدایه بالینی انسانی و دامی *کلبسیلا پنومونیه*

بحث

افزایش میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در باکتری‌ها در حال افزایش می‌باشد(۵). نتایج آزمون آنتی بیوگرام جدایه بالینی انسانی نشان داد که بیشترین حساسیت نسبت به ایمی پنم و سیپروفلوکساسین وجود داشته در حالیکه بیشترین مقاومت ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و سفالکسین گزارش گردید. همچنین برای ۵۰ جدایه دامی نیز بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی پنم مشاهده شد در حالیکه بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک کوتریماکسازول مشاهده شد. جلال پور در سال ۱۳۹۰ در اصفهان از آزمایشگاه های بیمارستان‌های الزهرا(س)، کاشانی، مهدیه و آزمایشگاه رفرانس اصفهان تعداد ۳۷۸ نمونه ادرار جمع‌آوری نمود و تست حساسیت آنتی بیوتیکی را با روش کربی ـ بائر انجام داد(۱۱). در مطالعه این محققین ۹۰/۵٪، ٦۵٪، ۵۷/۱٪، ٦۰٪، ٦/۳۱٪، ۳۵٪، ٦/۷۸٪، ۱۹٪ از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از ادرار بیماران بستری در برابر آمپی سیلین، سفوتاکسیم، سفپیم، آمیکاسین، ایمی پنم، سیپروفلوکساسین، کوتریموکسازول و نیتروفورانتوئین و ۷۰/٦٪، ٤۱/۷٪، ۲٤٪، ۱۵٪، ۰ ٪، ٤/۲۱٪، ٦/۲۸٪، ۸/۱۸٪، ۹/۲۵٪ و ۳٤/٦٪ از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران سرپایی در برابر آمپی سیلین، سفازولین، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، آمیکاسین، جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، کوتریموکسازول و نیتروفورانتوئین مقاوم بودند(۱۱). در تحقیقی که به وسیله پیروزی و همکاران بر روی کلبسیلا پنومونیه انجام شد، مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین را ۵۳/۵٪ گزارش نمودند، نتایج بدست آمده از این مطالعه میزان مقاومت به این آنتی بیوتیک را در بین سال‌های ۹۰-۸۸ به ترتیب ۵٤/۲٪، ۲/٤٤٪ و ۲۸/۹٪ نشان دادند. مقایسه نتایج نشان از افزایش مقاومت و ناکارآمدی آنتی بیوتیک در درمان عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه می‌باشد(۱۸). در مطالعه سلطان دلال و همکاران در شهر تهران (۲۰)، Amin و همکاران در کشور پاکستان(۲)، Al-shara و همکاران در اردن(۱)، Ishii در کشور ژاپن (۱۰) آنتی بیوتیک ایمیپنم را به عنوان یک آنتی‌بیوتیک موثر در درمان باکتری کلبسیلا پنومونیه معرفی کردند. بنابراین مقایسه نتایج بدست آمده نشان دهنده همخوانی نتایج بدست آمده با این مطالعه می‌باشد. در مطالعه Landmanو همکاران در آمریکا در سال ۲۰۰٤-۲۰۰۳، تعداد ۹٦ جدایه کلبسیلا پنومونیه از ۱۰ بیمارستان در بروکلین جمع‌آوری گردید، نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ایمیپنم ۹۹٪، مروپنم ۹۹ ٪، ارتاپنم ۱۰۰٪، سفتازیدیم ۹۸٪، سفپیم ۳۰٪، جنتامایسین ۳۳ ٪ گزارش کرد (۱۲). در اکثر موارد به علت استفاده بیرویه و خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها، شاهد موارد زیادی از مقاومت‌های داروئی در باکتری‌ها هستیم، که این خود سبب عدم موفقیت در درمان و پیدایش بسیاری از عوارض علیرغم صرف هزینه‌های زیاد درمانی می‌شود. مقاومت های داروئی نسبت به آنتی بیوتیک ها در مناطق مختلف ایران و جهان به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه‌های ایجاد کننده و تفاوت در میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و جدید متفاوت می‌باشند (۳). نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان میدهد که موثرترین آنتی‌بیوتیک برای سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های بالینی ایمیپنم می‌باشد. تکنیک ERIC-PCR یکی از سریع ترین روش‌های تایپینگ بوده که به آسانی قابل انجام است و در سال های اخیر به دلیل سادگی، حساسیت، تکرارپذیری، هزینهٔ نسبتاً پایین، سرعت بالا و قدرت افتراق بین سویه های، توجه زیادی به آن شده است (۷). توالی‌های ERIC در واقع توالی‌های ۱۲٤-۱۲۷ bp هستند که واجد یک ناحیه معکوس تکرار شونده مرکزی حفاظت شده بوده که به شکل خارج ژنی در ژنوم باکتری‌های رودهای موجود بوده و پرایمرهای مورد استفاده در ERIC-PCR مکمل این توالی‌های هستند و برای ژنوتایپینگ باکتری‌های گرم منفی رودهای مانند سالمونلا، کلبسیلا و

سودموناس بکار می‌رود (۲۲،۹،٦). تعداد باندهای ایجاد شده بین ۵ تا ۱۷ باند با وزن مولکولی ۱۰۰ تا ۳۲۰۰ بود.

در این مطالعه مقایسه الگوهای ERIC PCR در پایگاه اینترنتی انجام گرفت. بدین صورت که یک ماتریکس صفر و یک به منظور وجود یا عدم وجود باند تهیه و سپس در پایگاه اینترنتی ثبت شد. اساس محاسبه الگوها توسط پایگاه اینترنتی، نحوه قرارگیری آنها در ژل بر اساس وزن مولکولی آنها و مقایسه با مارکر مولکولی و شمارش باندها جهت هر نمونه می‌باشد. سپس دستجات (کلاسترهای) الگوهای ژنتیکی بر اساس شباهت شکل گرفت. پس از انجام کلیه مراحل ERIC بر روی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه دامی و انسانی مقایسه هرکدام از الگوها بصورت تک تک و با هم نشان داد که تمام ایزوله ها با این روش قابل تایپ بندی بودند. در کل برای ۱۰۰ جدایه بالینی و دامی در این مطالعه تعداد ۱۰۰ الگوی ژنتیکی مختلف یا ۱۰۰ ژنوتایپ مختلف از باکتری مشاهده شد. براساس شباهتهای مشاهده شده در این مطالعه نمونه‌هایی که در یک گروه قرار دارند دارای شباهت ژنتیکی ۵۵/۵٪ می‌باشند. هرچه سرشاخه ها از هم فاصله بیشتری داشته باشند دو نمونه یا نمونه‌های مورد مقایسه خویشاوندی کمتری با هم داشته و شباهت توالی در آنها کمتر است .بر اساس آنالیز دندوگرام نتایج حاصل از تجزیه خوشهای و ترسیم دندروگرام بر اساس شباهتهای ژنتیکی، نمونه‌های مورد مطالعه را به هفده گروه مجزا تفکیک نموده است (شکل-۱). نتایج ERIC-PCR نشان داد که ۱۰۰ جدایه باکتری جدا شده از نمونه‌های دامی و انسانی دارای تنوع ژنتیکی بسیار زیادی بودند .

جلوگیری از انتشار مقاومت های دارویی یکی از مسائل مهم درمان عفونت‌ها در جامعه محسوب می‌شود. ظهور مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها موضوعی است که باید جدی گرفته شده و لذا ارزیابی مستمر باکتریولوژی و خط صحیح درمان و استفاده مناسب از دیسک‌های آنتی بیوگرام در آزمایشگاه باید انجام گرفته و به منظور پیشگیری از مقاومت نسبت به داروهای جدید از مصرف بی‌رویه و نامنظم و تجویز آن قبل از آنتی بیوگرام خودداری شود تا میزان مقاومت کمتری داشته باشیم. روش ERIC-PCR کارایی مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه دارد. از آنجایی که اپیدمی‌های عفونت معمولا توسط یک کلون خاص و عفونت‌های تک گیر معمولا توسط کلوهای مختلف ایجاد می‌شوند، به همین دلیل باید همه جدایه‌ها توسط روش های تایپینگ مناسب انگشت نگاری شوند تا سویه‌های مربوط شناسایی و تعیین هویت شوند.

فهرست منابع

1. Al Shara, M. (2011): Emerging antimicrobial resistance of Klebsiella pneumoniae strains isolated from pediatric patients in jordan. Iraqi J Med. 7(2):29-32.
2. Amin, A., Ghumro, P., Hussain, S., Hameed, A. (2009). Prevalence of antibiotic resistance among clinical isolates of Klebsiella pneumoniaeisolated from a Tertiary Care Hospital in Pakistan. Malays J Microbiol. 5(2):81-6.
3. Bali, EB., Acik, L., Sultan, N. (2010): Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum beta-lactamase produced by Escherichia coli, Acinobacter baumannii and Klebsiella pneumoniae isolates in a Turkish hospital. Afr J Microbiol Res. 4(8):650-4.
4. Cuzon, G., Naas, T., Truong, H.,Villegas, M-V., Wisell, KT., Carmeli, Y., et al. (2010): Worldwide diversity of Klebsiella pneumoniae that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. Emerg Infect Dis. 16(9):1349-56.
5. Derde, LP., Dautzenberg, MJ., Bonten, MJ. (2012): Chlorhexidine body washing to control antimicrobial-resistant bacteria in intensive care units: a systematic review.Intensive Care Med. 38(6):931-9.

6. Drummond, A., Rodrigo, AG. (2000): Reconstructing genealogies of serial samples under the assumption of a molecular clock using serial-sample UPGMA. Mol Biol Evol. 17(12):1807-15.
7. Eckert, C., Gautier, V., Saladin-Allard,M., Hidri, N., Verdet, C., Ould-Hocine, Z., et al. (2004): Dissemination of CTX-M-type β-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. Antimicrob Agents chemother. 48(4):1249-55.
8. Feizabadi, MM., Etemadi, G., Yadegarinia, D., Rahmati, M., Shabanpoor, S., Bokaei, S. (2006): Antibiotic-resistance patterns andfrequency of extended-spectrum b-Lactamase-producing isolates of Klebsiella pneumoniae in Tehran. Med Sci Monitor. 12(11):BR362-BR5.
9. Ho, P-L., Wong, R., Chow, K-H., Yip, K., Wong, S., Que, T-L. (2008): CTX-M type beta-lactamases among fecal Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates in non-hospitalized children and adults. J Microbiol Immunol Infect. 41(5):428-32.
10. Ishii, Y., Alba, J., Kimura, S., Shiroto, K., Yamaguchi, K. (2005): Evaluation of antimicrobial activity of β-lactam antibiotics using Etest against clinical isolates from 60 medical centres in Japan. Int J Antimicrob Agents. 25(4):296-301.
11. Jalalpoor, S. (2011): Antibiotic Resistant Pattern in ESBLs Producer Klebsiella pneumoniae Strains Isolated of Hospitalized and Out Patients Acquired Urinary Tract Infection. J Isfahan Med Sch. 29(142).
12. Landman, D., Bratu, S., Quale, J. (2009): Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing Klebsiella pneumoniae. J Med Microbiol. 58(10):1303-8.
13. Lautenbach, E., Patel, JB., Bilker, WB., Edelstein, PH., Fishman, NO. (2001): Extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. Clin Infect Dis. 32(8):1162-71.
14. Munoz MA, Ahlström C, Rauch BJ, Zadoks RN. Fecal shedding of Klebsiella pneumoniae by dairy cows. J Dairy sci. 2006;89(9):3425-30.
15. Nasehi, L., Shahcheraghi, F., Nikbin, VS., Nematzadeh, S. (2010): PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae isolated from Tehran, Iran. Iranian J Basic Med Sci. 13(3):111-8.
16. 16. Patel,G., Huprikar, S., Factor, SH., Jenkins, SG., Calfee, DP. (2008): Outcomes of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. Infect Control Hosp Epidemiol. 29(12):1099-106.
17. Podschun, R., Ullmann, U. (1998): Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 11(4): 589-603.
18. Pirouzi, A., Jafari, M., Kargar, M., Mohsenzadeh, M., Feizabadi, MM., Afkari, R. (2012): Molecular Detection of Simultaneous Occurrence of Antibiotic-and Heavy Metal-Resistance in Klebsiella pneumoniae Isolated from Urinary Tract Infection. J Isfahan Med Sch. 30(186).
19. Prince, SE., Dominger, KA., Cunha, BA., Klein, NC. (1997): Klebsiella pneumoniae pneumonia. Heart & Lung: J Acute and Crit Care. 26(5):413-7.
20. Soltan Dalal, MM., Miremadi, SA., Sharify Yazdi, MK., Rastegar Lari, A., Rajabi, Z., Avadis Yans, S. (2012): Antimicrobial Resistance Trends Of Klebsiella pneumoniae Isolated From Patients In Imam Khomeini Hospital. Payavard Salamat. [Research]. 6(4):275-81.
21. Souli, M., Galani, I., Antoniadou, A., Papadomichelakis, E., Poulakou, G., Panagea, T., et al. (2010): An outbreak of infection due to β-lactamase Klebsiella pneumoniae carbapenemase 2–producing Klebsiella pneumoniae in a Greek university hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. Clin Infect Dis. 50(3):364-73.
22. Tankhiwale, SS., Jalgaonkar, SV., Ahamad, S., Hassani, U. (2004): Evaluation of extended spectrum beta lactamase in urinary isolates. Indian J Med Res. 120(6):553.

23. Turton, JF., Perry, C., Elgohari, S., Hampton, CV. (2010): PCR characterization and typing of Klebsiella pneumoniae using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulencegene targets. J Med Microbiol. 59(5):541-7.
24. Vading, M., Samuelsen, Ø., Haldorsen, B., Sundsfjord, A., Giske, C. (2001): Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. Clin Microbiol Infect. 17(5):668-741.
25. Ventura, M., Meylan, V., Zin, R. (2003): Identification and tracing of Bifidobacterium species by use of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences. Appl Environ Microbiol. 69(7):4296-301.
26. Wang, A., Yang, Y., Lu, Q., Wang, Y., Chen, Y., Deng, L., et al. (2008): Presence of qnr gene in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. BMC Infect Dis. 8(1):1.