بررسی میزان مقاومت به داروهای کارباپنم و تولید آنزیم کارباپنماز KPC در سویه های کلبسیلاپنومونیه جدا شده از نمونه های بالینی و تعیین الگوی مقاومت اکتسابی آن ها

داریوش شکری[1]، محمد ربانی خوراسگانی[1*]

1) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/٤/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹٤/٦/۱۵

چکیده

مقدمه: وجود مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های کلبسیلاپنومونیه یکی از چالش ها و نگرانی های سلامتی انسان است. اهداف این مطالعه بررسی فراوانی مقاومت به داروهای کارباپنم در سویه های کلبسیلاپنومونیه و تعیین الگوی مقاومت اکتسابی آن ها به منظور به دست آوردن کاراترین آنتی بیوتیک ها و بررسی فنوتیپی فراوانی آنزیم کارباپنماز KPC بود.

مواد و روش ها: این مطالعه مقطعی-توصیفی بر روی نمونه های بالینی شامل ادرار میانی، نمونه های تنفسی، مایعات استریل و خون جمع آوری شده از بیمارستان الزهرا(س) شهر اصفهان در طی یک سال انجام شد. الگوی مقاومت اکتسابی سویه های جدا شده کلبسیلاپنومونیه نسبت به ۳۱ آنتی بیوتیک مختلف از ۱۷ کلاس آنتی بیوتیکی محاسبه شد و تعداد سویه های مقاوم چند دارویی(MDR)، مقاوم دارویی گسترده(XDR) و مقاوم دارویی همه جانبه(PDR) طبق تعریف جدید CDC تعیین گردید. تمامی اطلاعات توسط نرم افزار WHOnet 5.6 تجزیه و تحلیل گردید. در سویه های مقاوم به کارباپنم ها، کمترین غلظت ممانعتی(MIC) به روش E-test برای ایمی پنم و مروپنم محاسبه گردید و میزان مقاومت آنزیم KPC به روش فنوتیپی هاچ اصلاح شده بررسی شد.

یافته های پژوهش: موثرترین آنتی بیوتیک ها بر علیه ۹۸ سویه کلبسیلاپنومونیه جدا سازی شده به ترتیب کولسیتین، تیگسیکلین و کلرامفینیکل بودند. هم چنین نتایج نشان داد که ۹۹ درصد سویه ها MDR و تقریباً ۶ درصد نیز XDR بودند ولی هیچ سویه PDR یافت نشد. مقاومت به آنتی بیوتیک های خانواده کارباپنم برای دوری پنم برابر ۶۴/۳، برای ارتاپنم برابر ۶۹/۴، برای ایمیپنم برابر ۵۵/۱ (به روش Etest) و ۵۸/۲ (به روش انتشار از دیسک) و برای مروپنم برابر ۶۵/۳ (به روش Etest) و ۶۴/۳ (به روش انتشار از دیسک) بود. تست فنوتیپی آنزیم کارباپنماز KPC برای ۷۰ سویه(۷۱ درصد) از سویه های کلبسیلاپنومونیه مثبت بود.

بحث و نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان دهنده فراوانی بسیار بالای سویه های MDR، مقاومت بالا به داروهای کارباپنم و میزان بالای آنزیم کارباپنماز KPC در سویه های کلبسیلاپنومونیه است که نیاز فوری به بازنگری و اصلاح الگوی مصرف آنتی بیوتیک ها را نشان می دهد.

واژه های کلیدی: کلبسیلاپنومونیه، کارباپنم ها، آنزیم کلبسیلاپنومونیه کارباپنماز(KPC)

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Email:m.rabbani@biol.ui.ac.ir

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.3.18]

مقدمه

سازمان بهداشت جهانی باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها را جزو مهم ترین خطرات تهدیدکننده بهداشت جهانی معرفی کرده است که درصد فراوانی از مرگ و میرهای سالانه بیمارستانی را به خود اختصاص می دهند(۱). از میان این باکتری ها، باکتری های خانواده انتروباکتریاسه با توجه به فراوانی بالای آن ها اهمیت بیشتری دارند و از این خانواده، جنس کلبسیلاپنومونیه با توجه به فراوانی بالا و ایجاد عفونت های مختلف و نیز مقاومت بالا به آنتی بیوتیک ها دارای اهمیت ویژه ای است(۲). داروهای کارباپنم (شامل ارتاپنم، ایمی پنم، دوری پنم و مروپنم) در درمان بیماری های ناشی از باکتری های مقاوم به بتالاکتام بسیار موثر بوده‌اند(۵-۳). به دلیل طیف وسیع فعالیت آن ها و پایداری در مقابل هیدرولیز توسط اغلب بتالاکتامازها، کارباپنم ها داروهای انتخابی برای درمان عفونت های ناشی از باسیل های گرم منفی مقاوم به پنی سیلین یا سفالوسپورین می باشند(۴). شیوه عمل کارباپنم ها مهار سنتز دیواره سلولی در باکتری ها می باشد و باعث افزایش نفوذپذیری غشای خارجی سلول ها و اثر روی سیستم پمپ آن ها می شوند(۴،۵). با این وجود ظهور بتالاکتامازهای هیدرولیز کننده کارباپنم با واسطه پلاسمید و انتشار آن ها در میان باکتری های گرم منفی به خصوص خانواده انتروباکتریاسه در حال افزایش است(۵).

مکانیسم مقاومت به کارباپنم به کاهش بیان پروتئین های غشای خارجی، افزایش فعالیت سیستم پمپ و تولید بتالاکتامازهای کارباپنماز که می توانند کارباپنم ها را با عمل هیدرولیز غیر فعال کنند، نسبت داده شده است(۳،۴). آنزیم KPC (مخفف کلبسیلا پنومونیه کارباپنماز) یکی از آنزیم های هیدرولیزکننده کارباپنم است که بر روی پلاسمیدهای قابل انتقال یافت شده است و بنا بر این می تواند به سرعت در بین باکتری های مختلف مبادله شده و باعث ایجاد مقاومت شدید شود(۴،۵). تشخیص باکتری های مقاوم و بررسی نوع و مکانیسم مقاومت آن ها به منظور دستیابی به بهترین راهکار برای حذف آن ها قابل اهمیت است. از طرف دیگر به کمک تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی این باکتری ها می توان برای دستیابی به آنتی بیوتیک های کارا و قابل استفاده بر علیه آن ها در درمان آن ها بهره گرفت.

دسته بندی های مختلفی برای ارگانیسم های مقاوم در مقالات پزشکی یافت می شود که مهم ترین آن ها شامل سه دسته مقاومت دارویی چندگانه، مقاومت دارویی گسترده و مقاومت دارویی همه جانبه می باشد(۱،۶). تا سال ۲۰۱۱ میلادی تعریف استانداردی برای این مفاهیم وجود نداشت و تعاریف بسیار مختلفی از آن ها ارائه شده بود، اما در این سال یک الگوی استاندارد مقاومت در چند باکتری اصلی مقاوم از جمله در خانواده انتروباکتریاسه توسط مرکز کنترل بیماری ها پیشنهاد شد. برای این خانواده توسط ۳۱ آنتی بیوتیک مختلف از ۱۷ کلاس آنتی بیوتیکی این استانداردسازی انجام گرفت و با توجه به نوع باکتری و آنتی بیوتیک های پیشنهاد شده توسط موسسه استاندارد آزمایشگاهی و کلینیکی الگوهای MDR، XDR و PDR تعیین گردید(۶،۷). تاکنون این استانداردسازی برای باکتری کلبسیلاپنومونیه در ایران انجام نشده است و محققان ایرانی از تعاریف مختلفی در مقالات و تحقیقات خود بهره جسته اند. بهره گیری از اصطلاحات بین المللی استاندارد برای تعریف ارگانیسم های مقاوم و ارتقای مقایسه الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی و استفاده از آن ها در مطالعات اپیدمیولوژیکی بومی، منطقه ای و جهانی، این استانداردسازی را ضروری می سازد. این امر به شناسایی بهتر باکتری های مهم دارای مقاومت در کشور و مقایسه آن ها با باکتری های مشابه دیگر در جهان و اتخاذ تصمیم مناسب در مورد نحوه برخورد با آن ها تاثیر می گذارد و به دستیابی به آنتی بیوتیک های کارآمد کمک می کند.

با توجه به اهمیت ویژه داروهای کارباپنم در درمان عفونت های غیر قابل درمان با آنتی بیوتیک های معمول و نیز لزوم دستیابی به آنتی بیوتیک های کارآمد دیگر برای درمان این عفونت ها، این مطالعه با هدف بررسی فراوانی مقاومت به داروهای کارباپنم در سویه های کلبسیلاپنومونیه و تعیین الگوی مقاومت اکتسابی آن ها بر طبق تعریف جدید مرکز کنترل بیماری ها و

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.3.18]

هم چنین بررسی فنوتیپی فراوانی آنزیم کارباپنماز کلبسیلاپنومونیه در این سویه ها صورت گرفته است.

مواد و روش ها

الف) جداسازی و شناسایی باکتری ها: این مطالعه مقطعی-توصیفی بر روی نمونه های بالینی شامل نمونه های ادرار میانی، تنفسی، مایعات استریل شامل مایع مغزی-نخایی، مایع شکمی(پریتوئن)، مایع پریکاردیال و همین طور نمونه خون به انجام رسید. سویه های مختلف باکتری کلبسیلاپنومونیه در طی یک سال(فروردین ۹۳ تا فروردین ۹۴) از نمونه های مختلف بالینی فوق از بیمارستان الزهرا(س) شهر اصفهان جداسازی و شناسایی شدند. شناسایی جدایه ها به کمک آزمون های فنوتیپی و بیوشیمیایی شامل تست های TSI، MR، VP، سیمون سیترات، اوره‌از، SIM، لیزین دکربوکسیلاز، اورنیتین دکربوکسیلاز، فنیل آلانین دآمیناز و ONPG انجام شد(۸).

ب) تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی و الگوهای مقاومت PDR، MDR و XDR: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی به آنتی بیوتیک های رایج مورد استفاده در سویه های جداسازی شده با توجه به راهنمای سال ۲۰۱۳ CLSI و دستورالعمل سال ۲۰۱۱ CDC توسط روش دیسک دیفیوژن(کربی-بائر) تعیین گردید که شامل ۳۱ آنتی بیوتیک مختلف از ۱۷ کلاس آنتی بیوتیکی بود و در جدول شماره ۱ لیست آن ها آمده است(۶،۷). بر طبق این جدول الگوهای مقاومت جدید PDR، MDR و XDR بدین ترتیب تعریف گردید: یک باکتری MDR، به عنوان باکتری غیرحساس به حداقل یک عامل در سه یا تعداد بیشتری از دسته های ضدمیکروبی در نظر گرفته می شود، باکتری XDR، باکتری غیرحساس به حداقل یک عامل در همه دسته های ضدمیکروبی به جز دو یا یک دسته می باشد(یعنی سویه باکتری حساس به یک یا دو دسته باقی می ماند) و PDR غیرحساس به همه عوامل در همه دسته های ضدمیکروبی(یعنی هیچ عامل به عنوان حساس برای آن ارگانیسم در نظر گرفته نمی شود). بنا بر این یک سویه باکتریایی که به عنوان XDR در نظر گرفته می شود، MDR نیز می باشد(۶).

جدول شماره ۱. دسته ها و عوامل ضدمیکروبی مورد استفاده برای تعریف PDR، MDR و XDR در خانواده انتروباکتریاسه(٦)

دسته آنتی بیوتیک ها	انواع
آمینوگلیکوزیدها	جنتامایسین، توبرامایسین، آمیکاسین، نتیل‌مایسین
سفالوسپورین‌های ضد MRSA	سفتارولین
پنی سیلین های ضد سودوموناسی+ مهارکننده‌های بتالاکتاماز	تیکارسیلین-کلاوونیک اسید، پیپیراسیلین-تازوباکتام
کارباپنم ها	ارتاپنم، ایمیپنم، مروپنم، دوری پنم
سفالوسپورین های غیر وسیع الطیف نسل اول و دوم	سفازولین، سفوروکسیم
سفالوسپورین های وسیع الطیف نسل سوم و چهارم	سفوتاکسیم، سفتازیدیم سفپیم
سفامایسین ها	سفوکسیتین، سفوتتان
فلوروکوئینولون ها	سیپروفلوکساسین
مهارکننده‌های مسیر فولات	تری‌متوپریم- سولفامتوکسازول
گلی سیکلین ها	تیگسیکلین
منوباکتام ها	آزترونام
پنی سیلین ها	آمپی سیلین
پنی سیلین ها+ مهارکننده های بتالاکتامازها	آموکسی سیلین-کلاوونیک اسید، آمپی‌سیلین-سولباکتام
فنیکول ها	کلرامفینیکل (برای عفونت‌های غیرادراری)
فسفونیک اسیدها	فسفومایسین
پلی میکسین ها	کلسیتین
تتراسیکلین ها	تتراسیکلین، داکسی‌سیکلین، مینوسیکلین

MDR: غیرحساس به حداقل یک عامل در ۳ یا تعداد بیشتری از دسته های آنتی بیوتیکی لیست شده در این جدول

XDR: غیرحساس به حداقل یک عامل در همه دسته های آنتی بیوتیک به جز یک یا دو دسته

PDR: غیرحساس به همه عوامل آنتی میکروبیال در همه دسته‌های لیست شده

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.3.18]

ج)بررسی فنوتیپی مقاومت KPC: بر اساس پیشنهاد CLSI برای بررسی فنوتیپی مقاومت KPC در سویه های جداسازی شده عدم حساسیت(مقاومت و یا نیمه حساس بودن) به یکی یا تعداد بیشتری از آنتی بیوتیک های خانواده کاربانم و یا مقاومت به یکی یا تعداد بیشتری از سفالوسپورین های نسل سوم از جمله سفوتاکسیم و سفتازیدیم برای شناسایی اولیه باکتری های احتمالی دارای مقاومت KPC مورد استفاده قرار گرفت و تست تاییدی تولید آنزیم توسط آزمون تغییر یافته هاج انجام شد(۷،۹). در این روش ابتدا تعلیق باکتری استاندارد E.coli ATCC 25922 به غلظت نیم مک فارلند تهیه و به کمک سرم فیزیولوژی به غلظت یک دهم رسانده شد. سپس با استفاده از سوآب در سطح محیط مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد و دیسک آنتی بیوتیکی ارتاپنم ۱۰µg در مرکز محیط قرار داده شد. در مرحله بعد از باکتری های جدا شده مشکوک به وجود آنزیم کاربانماز، به کمک سواپ از لبه دیسک ارتاپنم(گذاشته شده در مرکز) تا لبه پلیت به صورت یک خط مستقیم کشیده و در نهایت پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سویه های تولیدکننده آنزیم کاربانماز باعث می‌شوند که هاله عدم رشد اطراف دیسک مرکزی به صورت مضرسی شکل درآید(نمای برگ شبدری) در حالی که سویه های منفی تغییری در این هاله به وجود نمی آورند و هاله اطراف آن ها یک دست باقی می ماند.

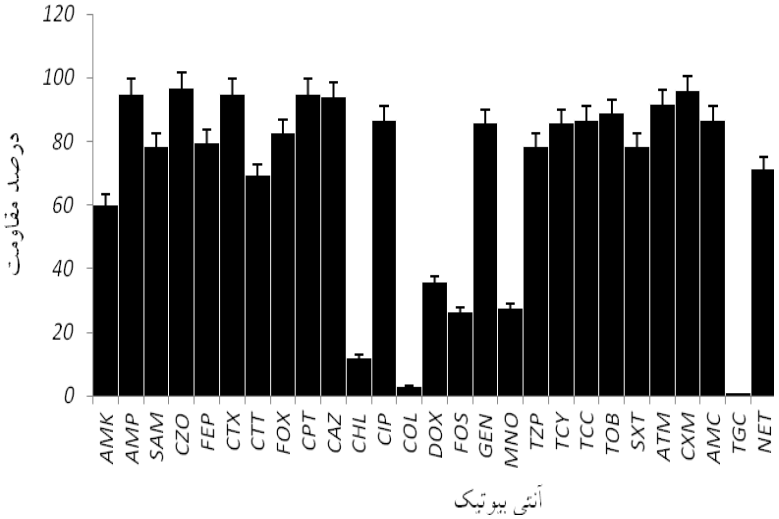
د) تعیین کمترین غلظت ممانعت کننده به روش Etest: تست تاییدی مقاومت به کاربانم ها با روش تعیین کمترین غلظت ممانعت کننده یا MIC به روش Etest برای آنتی بیوتیک های مروپنم و ایمی پنم به انجام رسید که به این منظور ابتدا غلظتی برابر نیم مک فارلند از جدایه هایی که به یکی از دیسک های کاربانم مقاومت داشتند تهیه گردیده و بر روی محیط مولر هینتون آگار به روش کشت چمنی به کمک سواب استریل کشت داده شدند و بعد از چند دقیقه دو نوار Etest از ایمی پنم و مروپنم بر روی پلیت قرار گرفتند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و سپس عدد MIC آن ها قرائت گردید.

یافته های پژوهش

از نمونه های بالینی مختلف در طی یک سال مطالعه تعداد ۹۸ سویه مختلف باکتری کلبسیلاپنومونیه جداسازی و شناسایی شدند که شامل ادرار میانی(۲۲ عدد)، نمونه های تنفسی(۵۸ عدد)، مایعات استریل بدن (۸ عدد) و نمونه خون(۱۰ عدد) بودند. نتایج الگوی مقاومت سویه های باکتری کلبسیلاپنومونیه به آنتی بیوتیک های استفاده شده به کمک نرم افزار WHOnet 5.6 طبق الگوی جدید CDC در شکل شماره ۱ آمده است. همان طور که از این شکل مشخص است موثرترین آنتی بیوتیک ها بر علیه سویه های کلبسیلاپنومونیه به ترتیب آنتی بیوتیک های کولسیتین(۹۶/۹ درصد حساس)، تیگسیکلین(۹۶/۹ درصد حساس) و کلرامفینیکل(۸۴/۷ درصد حساس) بودند و مقاومت بسیار بالا(بالای ۹۰ درصد مقاومت) در مورد آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، سفازولین، سفتارولین، سفوروکسیم، سفتازیدیم، سفوتاکسیم و آزترئونام دیده شد. هم چنین نتایج به دست آمده توسط نرم افزار WHOnet 5.6 نشان داد که از بین ۹۸ سویه جداسازی شده ۹۷ سویه(۹۹ درصد) MDR بودند و ۶ سویه(تقریباً ۶ درصد) نیز XDR بودند و هیچ سویه PDR یافت نشد.

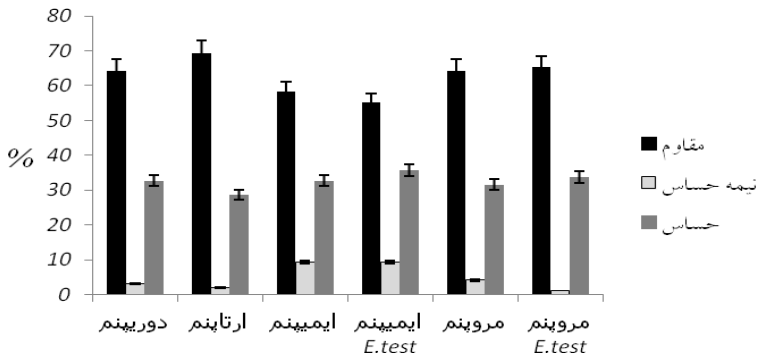
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.3.18]



شکل شماره ۱. نتایج الگوی مقاومت سویه های کلبسیلاپنومونیه به کمک نرم افزار WHOnet 5.6 طبق الگوی جدید CDC. AMK: آمیکاسین، AMP: آمپی سیلین، SAM: آمپی سیلین/سولباکتام، CZO: سفازولین، FEP: سفپیم، CTX: سفوتاکسیم، CTT: سفوتتان، FOX: سفوکسیتین، CPT: سفتارولین، CAZ: سفتازیدیم، CHL: کلرآمفینیکل، CIP: سیپروفلوکساسین، COL: کولیستین، DOX: داکسی سیکلین، FOS: فسفومایسین، MNO: مینوسیکلین، TZP: پیپیراسیلین/تازوباکتام، TCY: تتراسایکلین، TCC: تیکارسیلین/کلاوونیک اسید، TOB: توبرامایسین، SXT: کوتریموکسازول، ATM: آزترئونام، CXM: سفوروکسیم، AMC: آمپی سیلین/کلاوونیک اسید، TGC: تیگسیکلین، NET: نتیل‌مایسین

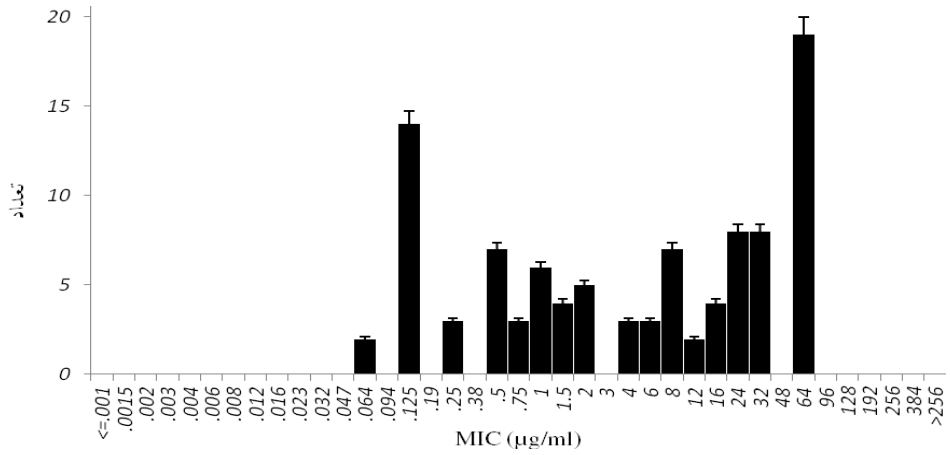
سنجش مقاومت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های خانواده کارباپنم شامل ایمی پنم، مروپنم، دوری پنم و ارتاپنم نشان می دهد که درصد سویه های مقاوم برای دوری پنم برابر ۶۴/۳، برای ارتاپنم برابر ۶۹/۴، برای ایمی پنم برابر ۵۵/۱ (به روش Etest) و ۵۸/۲ (به روش انتشار از دیسک) و برای مروپنم برابر ۶۵/۳ (به روش Etest) و ۶۴/۳ (به روش انتشار از دیسک) بود(شکل شماره ۲). محدوده عدد کمترین غلظت ممانعت کننده یا MIC و تعداد سویه ها در شکل شماره ۳- الف و ۳- ب برای آنتی بیوتیک های ایمی پنم و مروپنم مشخص است و در شکل شماره ۴ یک نمونه از محاسبه MIC به روش Etest آمده است. همان طور که از این شکل معلوم است بیشترین غلظت مهاری در مورد هر دو آنتی بیوتیک غلظت ۶۴ می - باشد که میزان بالای مقاومت را نشان می دهد. در مورد هر دو آنتی بیوتیک محدوده MIC از عدد ۰/۰۶۴ تا ۶۴ میکروگرم در میکرولیتر متغیر است اما اکثر سویه ها در محدوده مقاوم قرار دارند.



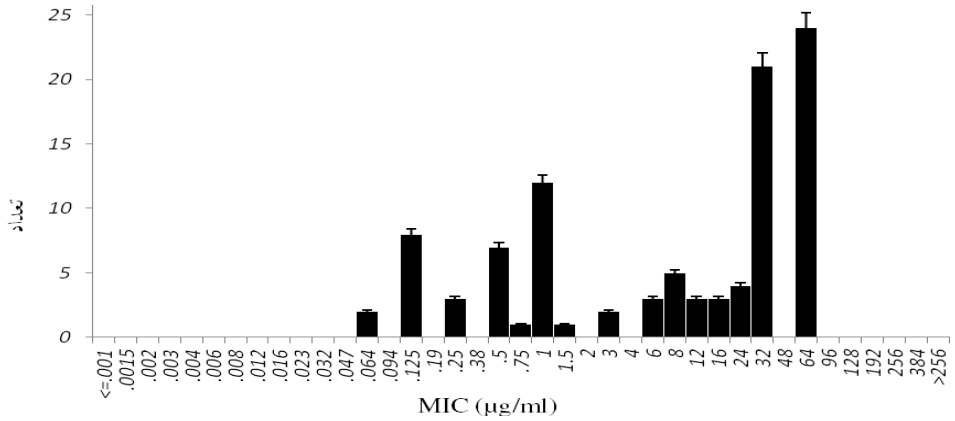
شکل شماره ۲. درصد سویه های مقاوم، نیمه حساس و حساس به آنتی بیوتیک های خانواده کارباپنم در سویه های کلبسیلاپنومونیه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.3.18]

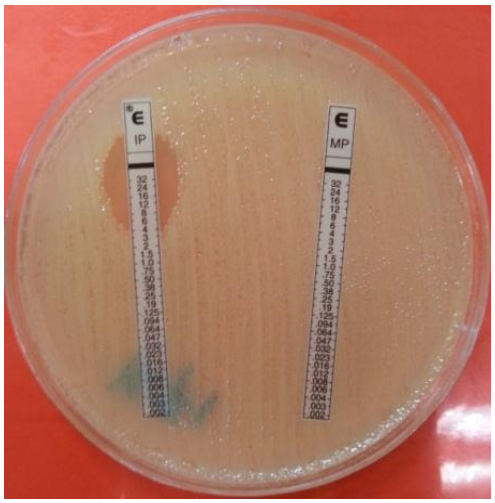


(الف)



(ب)

شکل شماره ۳ . محدوده MIC ایمی پنم(الف) و مروپنم(ب) برحسب میکروگرم در میلی لیتر در مورد سویه های کلبسیلاپنومونیه. محور X نشان دهنده عدد MIC و محور Y تعداد سویه های دارای هر عدد MIC است.

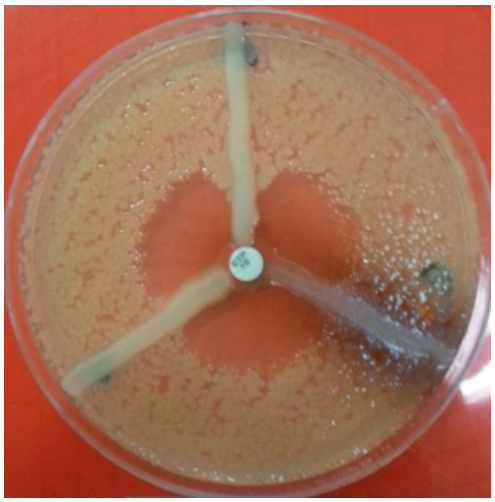


شکل شماره ٤. عدد MIC در این سویه کلبسیلا پنومونیه برای مروپنم بیشتر از ۳۲ و برای ایمی پنم برابر با ٤ می باشد. عدد MIC نقطه ای است که دو طرف هاله عدم رشد همدیگر را قطع کرده اند.

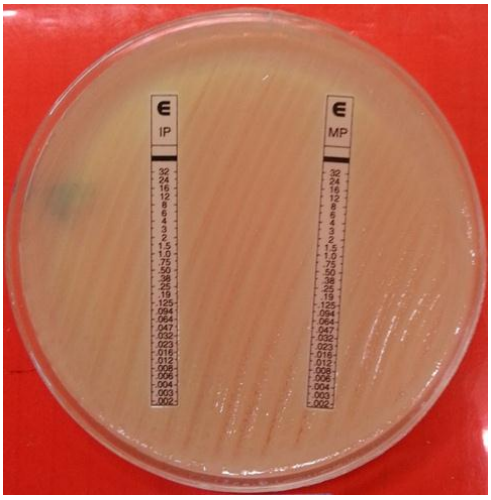
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.3.18]

نتایج نشان داد که تست فنوتیپی آنزیم کارباپنماز KPC برای ۷۰ سویه(۷۱ درصد) از سویه های کلبسیلا پنومونیه مثبت بود(شکل شماره ۴) و تست تاییدی مقاومت به کارباپنم ها با روش تعیین کمترین غلظت ممانعتی(MIC) به روش Etest نیز تاییدکننده این مقاومت بود(شکل شماره ۵).



شکل شماره ٤. نتیجه مثبت آزمون هاج تغییریافته به شکل مضرسی و برگ شبدری در مورد سه سویه کلبسیلاپنومونیه در اینجا مشخص است.



شکل شماره ۵. تست تاییدی مقاومت به کارباپنم ها با روش تعیین کمترین غلظت ممانعتی(MIC) به روش Etest در مورد دو آنتی بیوتیک مروپنم و ایمی‌پنم. همان طور که دیده می شود هیچ هاله عدم رشدی وجود ندارد و بنا بر این عدد MIC برای هر دو آنتی بیوتیک بیشتر از ۳۲ می باشد.

بحث و نتیجه گیری

باکتری کلبسیلاپنومونیه یک باکتری گرم منفی متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است که به عنوان یکی از شایع ترین عوامل ایجاد کننده عفونت های انسانی شناخته می شود و به علت مقاومت دارویی بالا بسیار مورد توجه است(۱۰،۱۱). با توجه به افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری به خصوص در مورد سویه هایی که آنتی بیوتیک های موثر قبلی دیگر بر علیه آن ها اثر درمانی نداشتند معرفی داروهای خانواده کارباپنم با توجه به طیف اثر وسیع مورد توجه قرار گرفتند اما مقاومت به آن ها نیز در مطالعات متعددی گزارش شده است(۱۵-۹). در مطالعه حاضر

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.3.18]

میزان مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی و نیز مقاومت به خانواده داروهای کارباپنم و الگوی اکتسابی آنتی بیوتیکی در سویه های کلبسیلاپنومونیه مورد بررسی قرار گرفت. الگوی مقاومت اکتسابی آنتی بیوتیکی در این سویه ها بر طبق تفاسیر جدید ارائه شده توسط CDC در دسته های مختلف آنتی بیوتیکی تعیین گردید و بر طبق این تفسیر جدید میزان سویه های MDR، XDR و PDR در این سویه ها مشخص گردید. با توجه به بررسی های انجام شده تعیین میزان سویه های MDR، XDR و PDR مطابق با استاندارد بین المللی تاکنون در مورد سویه های کلبسیلاپنومونیه در ایران اعلام نشده است. هر چند در مطالعات زیادی در ایران الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی و میزان مقاومت دارویی چندگانه(MDR) در این باکتری بررسی شده است. در مطالعه لنگری زاده و همکاران کلرامفنیکل، نورفلوکساسین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین و ایمی پنم دارای بیشترین تاثیر بر روی سویه های کلبسیلاپنومونیه در یک بیمارستان در شهر تبریز بودند و ۹۸/۶۱ درصد سویه ها دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند(۱۶). مطالعه هاشمی زاده و همکاران نشان داد که بیش از ۵۵ درصد از باکتری های کلبسیلاپنومونیه جداسازی شده در شهر شهرکرد مقاوم به چند دارو بودند(۱۷). هم چنین مطالعه فاضلی و همکاران در شهر اصفهان در سال ۲۰۱۴ که بر روی ۱۴۲ سویه کلبسیلاپنومونیه به انجام رسید نشان داد ۱۲۰ عدد(۸۴ درصد) از سویه ها MDR بودند و بالاترین درصد مقاومت به دیسک های پیپیراسیلین(۸۰ درصد)، سفتازیدیم(۷۶ درصد) و سفوتاکسیم(۷۳ درصد) مشاهده شد(۱۸). مطالعه ما نشان داد موثرترین آنتی بیوتیک ها بر علیه سویه های کلبسیلاپنومونیه به ترتیب آنتی بیوتیک های کولسیتین، تیگسیکلین و کلرامفینیکل بودند و مقاومت بسیار بالا در مورد آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، سفازولین، سفتارولین، سفوروکسیم، سفتازیدیم، سفوتاکسیم و آزترونام دیده شد. هم چنین این مطالعه نشان داد ۹۹ درصد از سویه های این باکتری دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند که از تمامی مطالعات ذکر شده درصد بالاتری بود که نگرانی زیادی را به وجود می آورد. هر چند میزان مقاومت XDR تقریباً ۶ درصد بود و هیچ سویه PDR در مطالعه ما یافت نشد اما همین تعداد سویه XDR که فقط به داروهای کولیستین و کلرامفنیکل و یا تیگسیکلین حساس بودند که داروهایی با عوارض جانبی بالایی هستند(به خصوص کولیستین)، توجه به الگوی صحیح مصرف آنتی بیوتیکی را در بیمارستان های ایران را یادآور می شود. مطالعه ژاپنی نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تهران نشان دهنده مقاومت بالای سویه های کلبسیلاپنومونیه در آنتی بیوتیک های مختلف بود که با مطالعه ما تا حدودی مطابقت داشت و هم چنین آن ها نشان دادند که در سویه های مقاوم به کارباپنم ها ۱۰۰ درصد حساسیت به کولیستین وجود دارد که کاملاً با مطالعه ما مطابقت دارد(۱۹). در مقایسه با کشورهای دیگر هم چنین می توان گفت میزان MDR مطالعه ما در مقایسه با نتایج اعلام شده توسط سوبا و همکاران از هند که در سال ۲۰۰۱ میزان مقاومت دارویی چندگانه ایزوله های کلبسیلاپنومونیه را ۱۰۰ درصد گزارش کرده بودند کمتر است اما از نتایج یولا و همکاران که در سال ۲۰۰۹ میزان شیوع سویه های این باکتری را ۷۳/۷۱ درصد گزارش کرده اند بیشتر است(۲۰،۲۱). مطالعه سانچز و همکاران در طول ۱۲ سال در ایالات متحده بر روی ۳۱۳۲۳۵۴ نمونه کلبسیلاپنومونیه نشان دهنده مقاومت در حال افزایش این سویه ها به آنتی بیوتیک های کوتریموکسازول، آزترئونام، ایمی پنم، مروپنم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم، جنتامایسین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، توب رامایسین، پیپیراسین/تازوباکتام و تتراسایکلین بود ولی در تمامی این آنتی بیوتیک ها میزان مقاومت بسیار پایین تر از مطالعه ما بود(۲۲). افزایش شیوع این سویه های مقاوم دارای دلایل متعددی از قبیل اثر تجویز ناصحیح آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت های مختلف و یا انتقال ژن های مقاومت توسط عوامل منتقل کننده گوناگون مانند پلاسمیدهای مقاومت، باکتریوفاژها، ترانسپوزون ها و اینتگرون ها می تواند باشد(۲۳).

با توجه به اهمیت داروهای کارباپنم در درمان سویه های مقاوم باکتری کلبسیلاپنومونیه به خصوص در سویه هایی که دارای آنزیم های بتالاکتاماز وسیع

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.3.18]

الطیف(ESBLs) هستند در این مطالعه میزان مقاومت به این دسته به طور اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه حاضر نشان داد که میزان مقاومت از محدوده ۵۵/۱ درصد برای ایمی پنم تا ۶۹/۴ درصد برای ارتاپنم بود که میزان نسبتاً بالایی را نشان می دهد. مطالعه قبلی ما نشان داده بود که از بین ۷۵ عدد سویه کلبسیلاپنومونیه به ترتیب ۹۵ و ۹۴ درصد مقاومت به دیسک های ایمی پنم و مروپنم وجود دارد(۲۴) که میزان بسیار بالاتری بود که این می تواند به این دلیل برگردد که در مطالعه مقطعی حاضر تمامی سویه های کلبسیلاپنومونیه با الگوهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است اما در مطالعه قبلی سویه هایی با مقاومت بالاتر انتخاب شدند. مطالعه هاشمی زاده و همکاران نشان داد که در سویه های این باکتری که از شهر شهرکرد جداسازی شده بود بالای ۴۰ درصد مقاومت به دیسک های مروپنم و ایمی پنم وجود دارد و MIC آن ها بالاتر از ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر بود(۱۷). در مطالعه ای در شهر تهران که توسط عظیمی و همکاران صورت گرفت میزان مقاومت به کارباپنم ها برابر با ۶۴ درصد به دست آمد(۲۵). در مطالعه فیض آبادی و همکاران(۲۶) در طول یک سال (۵-۲۰۰۴) در دو بیمارستان شهر تهران الگوی حساسیت ۱۲۸ سویه کلبسیلاپنومونیه به ۲۱ دسته آنتی بیوتیکی مورد مطالعه قرار گرفت که مقاومت نسبتاً بالا به آنتی بیوتیک های مختلف مشاهده شد ولی مقاومتی به داروهای کارباپنم مشاهده نک ردند که البته از ده سال پیش که این مطالعه صورت گرفته است تاکنون طبیعی است که میزان این مقاومت افزایش یافته باشد. در مطالعه فاضلی و همکاران(۱۸) در شهر اصفهان یک سال قبل از مطالعه ما که در بیمارستان هدف ما یعنی بیمارستان الزهرا(س) اصفهان مطالعه مشابهی بر روی سویه های کلبسیلاپنومونیه انجام داده بودند میزان مقاومت به داروهای کارباپنم به ترتیب زیر بود: ارتاپنم: ۵۰/۷ درصد، مروپنم: ۴۴/۸ درصد و ایمی پنم: ۳۵/۸ درصد که نسبت به مطالعه ما میزان نسبتاً کمتری را نشان می داد که این مسئله نشان دهنده این است که در طول یک سال میزان افزایش مقاومت به کارباپنم ها معنی دار و رو به افزایش بوده است.

تمامی سویه های مقاوم به کارباپنم باکتری های فوق، به سه داروی کلرآمفینیکل، کولیستین و تیگسیکلین دارای حساسیت کامل بودند و بنا بر این می توان از این داروها به عنوان جایگزین کارباپنم ها در این باکتری های مقاوم نام برد. در مطالعات مشابهی در جهان اثر آنتی بیوتیک های پلی میکسین و تیگسیکلین بر روی سویه های مقاوم به کارباپنم این باکتری نشان داده شده است. برای مثال در یک مطالعه میزان حساسیت سویه های کلبسیلاپنومونیه مقاوم به کارباپنم ها که حاوی ژن KPC بودند به آنتی بیوتیک تیگسیکلین ۱۰۰ درصد گزارش شده است و در همین مطالعه نشان داده شده است که ۸۸ درصد سویه ها به پلی میکسین B و ۷۳ درصد به آمیکاسین و ۵۰ درصد به تتراسایکلین حساسیت داشته اند(۲۷). در مطالعه دیگر در ۱۰ بیمارستان شهر بروکلین بر روی ۹۶ سویه مقاوم به کارباپنم ها نشان داده شد که همگی آن ها به تیگسیکلین حساس بودند و ۹۱ درصد حساسیت به پلی میکسین B، ۶۶ درصد حساسیت به داکسی سیکلین و مقاومت نسبتاً بالا به آنتی بیوتیک های دیگر مشاهده شد(۲۸).

در این مطالعه وجود آنزیم کارباپنماز KPC (مخفف کلبسیلاپنومونیه کارباپنماز) با روش فنوتیپی تست هاج تغییر یافته(MHT) مورد بررسی قرار گرفت. گزارشات زیادی از سویه های انتروباکتریاسه تولید کننده آنزیم های KPC که بر روی پلاسمید حمل می شوند در جهان گزارش شده است که این آنزیم ها غالباً در کلبسیلاپنومونیه یافت شده اند(۱۵-۱۲). مطالعه قبلی ما در شهر اصفهان نشان داده بود که از بین ۷۵ سویه کلبسیلاپنومونیه ۶۵ سویه(۸۷ درصد) این تست در موردشان مثبت بود(۲۴). از بین مطالعات انجام گرفته در ایران هاشمی‌زاده و همکاران نشان دادند که ۹/۱۱ درصد از باکتری های کلبسیلاپنومونیه جداسازی شده در شهر شهرکرد دارای ژن KPC بودند(۱۷). هم چنین عظیمی و همکاران در شهر تهران نشان دادند تمامی سویه های این باکتری که دارای مقاومت به کارباپنم ها بودند تست هاج تغییریافته مثبت داشتند ولی بررسی ژنوتیپی آن ها نشان داد که ژن KPC حضور نداشت(۲۵). بررسی بینا و همکاران نیز نشان دهنده

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.3.18]

میزان ۸۰/۵ درصد آنزیم KPC در سویه های این باکتری بود ولی حضور ژن آن در این سویه ها منفی بود(۲۹). مطالعه حاضر ما نشان داد ۷۰ سویه(۷۱ درصد) از سویه های جداسازی شده کلبسیلاپنومونیه واجد آنزیم KPC هستند هر چند تست نهایی وجود این آنزیم بایستی با روش مولکولی PCR تایید گردد و همان طور که در بالا نیز به آن اشاره شد و در مطالعات مختلفی نیز نشان داده شده است صرف مثبت بودن این تست فنوتیپی به هیچ عنوان نشان دهنده وجود ژن KPC نمی باشد و ممکن است در مقاومت های دیگر کاربانم ها نیز این تست فنوتیپی مثبت گردد(۱۵-۱۳). در مورد سویه هایی که به دیسک های کاربانم مقاومت داشتند اما آزمون KPC در مورد آن ها منفی شده بود احتمالاً مکانیسم های دیگر مقاومت به کاربانم ها از جمله وجود آنزیم های متالوبتالاکتاماز درگیر هستند که برای این موارد بایستی تست های شناسایی این مکانیسم ها به انجام برسد(۱۳). نتایج این مطالعه همانند بررسی های دیگر محققین از جمله کازون و همکاران(۳۰) و پاستران و همکاران(۳۱) و نیز مطالعات اشاره شده در بالا نشان داد سویه های واجد آنزیم KPC مقاومت بالایی به سایر آنتی بیوتیک ها از جمله آمپی سیلین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفپیم، پیپراسیلین/تازوباکتام(تازوسین)، سفوتاکسیم و سفتازیدیم دارند که این می تواند به دلیل وجود هم زمان چندین ژن بتالاکتاماز در این ایزوله ها باشد و اهمیت و لزوم بررسی این آنزیم و ژن آن را در نمونه های مختلف گوشزد می کند.

مطالعه حاضر نشان دهنده فراوانی بسیار بالای سویه های MDR، مقاومت بالا به داروهای کاربانم و میزان بالای آنزیم کاربانماز KPC در سویه های باکتری کلبسیلاپنومونیه است که نیاز فوری به بازنگری و اصلاح الگوی مصرف آنتی بیوتیک ها را گوشزد می کند چرا که مصرف بی رویه و بدون نظارت آنتی بیوتیک های مختلف در آینده نزدیک باعث ظهور سویه های PDR این باکتری و باکتری های دیگر خواهد شد که دیگر هیچ آنتی بیوتیکی برای درمان آن ها را باقی نخواهد گذاشت. با توجه به میزان مصرف بالای داروهای خانواده کاربانم در بیمارستان های ایران که در بسیاری از مواقع بدون انجام تست تعیین حساسیت میکروبی و به عنوان خط اول درمان مورد استفاده قرار می گیرند می توان انتظار داشت که در آینده نزدیک شاهد افزایش روزافزون مقاومت به این دسته آنتی بیوتیکی باشیم لذا اتخاذ تدابیر لازم جهت اصلاح نحوه تجویز و مصرف آنتی بیوتیک ها ضرورت دارد.

سپاسگزاری

از حوزه معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه اصفهان به خاطر حمایت مالی و همکاری گروه زیست شناسی تشکر می شود.

References

1. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Management of multidrug-resistant organisms in health care setting. Am J Infect Control 2007;35:165-93.
2. Johann DDP, Laupland KB. Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis2008; 8:159-66.
3. Jesudason MV. Comparison of two methods to detect carbapenemase and metallo-betalactamase production in clinical isolates. Indian J Med Res2005;121 :780-3.
4. Meletis G. Emergence of Klebsiella pneumoniae carrying blaVIM and blaKPC genes. HIPPOKRATIA2010;14:139-40.
5. Queenan AM. Carbapenemases the versatile β- lactamases. Clin Microbiol Rev 2007;20:440-58.
6. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug resistant and pandrug-resistant bacteria an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2011;18:268-81.
7. Sun Z, Li L, Zhu X, Ma Y, Li J, Shen Z, Jin S. Analysis on antimicrobial resistance of clinical bacteria isolated from county hospitals and a teaching hospital. J Huazhong Uni Sci Technol Med2006;26:386-8.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.3.18]

8. Forbes BA, Saham DF, Wesisfeld AS. Diagnostic Microbiology. 3th ed. USA Mosby: Chicago;1998. p.641-725.
9. Fazeli H, Norouzibarough M, Ahadi AM, Shokri D, Solgi H. Detection of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-1 (NDM-1) in carbapenem- resistant Klebsiella pneumoniae isolated from a university hospital in Iran. Hippokratia2015;19:205-9.
10. 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; 48:2402-6.
11.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;56:128-32.
12. 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;458:2723-5.
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; 65:249-51.
14.Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. Emergence of Serratia marcescens, Klebsiella pneumoniae, and Escherichia coli isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β-lactamase KPC-2 in intensive care units of Chinese hospital. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2014-8.
15.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;56:367-72.
16. Langarzadeh N, Ahangarzadeh M, Aghazadeh M, Hasani A. [Comparison of the prevalence of multi-drug resistant Klebsiella Pneumoniae in children and adults with urinary tract infection admitted to hospitals in Tabriz]. J Biol Sci Islam Azad Uni Zanjan 2010;4:17-19.(Persian)
17. Hashemizadeh F, Zamanzad B, Jahandideh S, Ansari N, Gholipor A, Hashemizadeh F, et al. [KPC-producing Klebsiella pneumoniae ESBL detection in clinical samples in Iran]. J Lorestan Uni Med 2013;15:104-14.(Persian)
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. Japoninejad A, Ghaznavirad E, Belkum A. Characterization of Plasmid-mediated AmpC and Carbapenemases among Iranain Nosocomial isolates of Klebsiella pneumoniae using phenotyping and genotyping methods. Osong Public Health Res Perspect 2014;5:333-8.
20. Subha A, Ananthan S. Extended spectrum beta-lactamase production and multi-drug resistance in Klebsiella species isolated from children under five with intestinal and extraintestinal infections. Indi J Med Res 2001;113:181-5.
21. 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. Afric J Microb Res 2009;3:676-80.
22. Sanchez GV, Master RN, Clark RB, Fyyaz M, Duvvuri P, Ekta G, Bordon J. Klebsiella pneumoniae antimicrobial drug resistance United States 1998-2010. Emerg Infect Diseases 2013;19:133-8.
23. Martinez JL, Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity epidemicity and antibiotic resistance. Clin Microb Rev 2002;4:647-79.
24. Shokri D, Mobasherizadeh S, Norouzi 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; 31:1247-56.(Persian)
25. Azimi L, Rastegar Lari AA, Talebi M, Ebrahimzadehnamvar AM, Soleymanzadeh S. Evaluation of phenotypic methods for

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.3.18]

detection of Klebsiellae pneumoniae carbapenemase producing K. pneumoniae in Tehran Iran. J Med Bacteriol 2013;2:26-31.
26. Feizabadi MM, Etemadi G, Yadegarinia D, Rahmati M, Shabanpoor S, Bokaei S. Antibiotic-resistance patterns and frequency of extended-spectrum beta-lactamase-producing isolates of Klebsiella pneumoniae in Tehran. Pol J Radiol 2006;12:362-5.
27. Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase and metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Antimicrob Agents Chemother2008;52:570-3.
28. Gupta V, Kumarasamy K, Gulati N, Garg R, Krishnan P, Chander J. AmpC β-lactamases in nosocomial isolates of Klebsiella pneumoniae from India. Indian J Med Res2012 Aug;136:237-41.
29. 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;10:199-205.
30. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y. Worldwide diversity of Klebsiella pneumonia that produces β-lactamase blaKPC-2 gene. Emerg Infect Dis 2010;16:1349-56.
31. 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;47:1631-9.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.3.18]

Evaluation of Carbapenems Resistance and Frequency of Klebsiella pneumoniae Carbapenemase (KPC) Enzyme in Klebsiella pneumoniae Strains Isolated from Clinical Samples and Determination of their Acquired Resistant profiles

Shokri D[1], Rabbanikhorasgani M[2]*

(Received: July 20, 2015 Accepted: September 6, 2015)

Abstract

Introduction: The resistance of Klebsiella pneumoniae strains to antibiotics is an important challenge for human health. The aims of this study were evaluation of the carbapenemase resistance and Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) enzyme in Klebsiella pneumoniae isolates and determination of their acquired resistance profiles.

Materials & methods: In a cross-sectional study, Klebsiella pneumoniae strains were isolated from different clinical specimens during one year. Their acquired resistance profiles were determined by 31 antibiotics from 17 classes and the numbers of Multi-drug resistance (MDR), extended drug resistance (XDR) and pan drug resistant (PDR) strains were determined. In carbapenem resistant strains, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of imipenem and meropenem were calculated by Epsilometer test (Etest) method. Prevalence of the KPC enzyme in these strains was determined by phenotype method using Modified Hodge Test.

Findings: Among the 98 isolated Klebsiella pneumoniae strains, the most effective antibiotics were colistin, tigecycline and chloramphenicol respectively. The 99% of strains were MDR and 6% were XDR and no PDR strain was detected. Resistance to carbapenems in these strains were 64.3% for Doripenem, 69.4% for Ertapenem, 58.2% for imipenem (55.1% in E-test method) and 64.3 for meropenem (65.3% in E-test method). Expression of KPC enzymes in 71% of strains was identified.

Discussion & Conclusions: This study demonstrates the high prevalence of MDR strains and carbapenem drugs resistance and also high frequency of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) enzyme in the Klebsiella pneumoniae isolates that it shows the urgent revision of the patterns of antibiotics consumption is necessary.

Keywords: Carbapenem, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)

1. Dept of Biology, Faculty of Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran
** Correspondin author E.mail: m.rabbani@biol.ui.ac.ir*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.3.18]