

مقایسه تشخیص فنوتیپی آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع طیف با استفاده از E-test ESBL و Combined disk method در کلبسیلا پنومونیه: گزارش کوتاه

چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۰۴ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۰۹ آنلاین: ۱۳۹۴/۰۳/۲۰

محمد معتمدی فر^۱

داود منصوری^{۳*}، هادی صدیق
ابراهیم سرایی^۱، جمال سروری^۱

۱- گروه باکتری و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. ۲- مرکز تحقیقات ایدز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. ۳- گروه باکتری و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. ۴- گروه علوم آزمایشگاهی، مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستان، مشهد، ایران.

* نویسنده مسئول: مشهد، گروه باکتری و ویروس

شناسی، بیمارستان قائم، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

تلفن: ۰۵۱-۳۸۰۲۲۶۵۲

E-mail: mansury154@yahoo.com

زمینه و هدف: تولید پنی‌سیلینازها و دیگر آنزیم‌های بتالاکتاماز اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در بین خانواده انتروباکتریاسه است. هدف مطالعه مقایسه تشخیص آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع طیف با استفاده از دو روش فنوتیپی در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه بود.

روش بررسی: در یک مطالعه مقطعی ۱۴۴ ایزوله کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی در یک دوره شش ماهه از آذر سال ۱۳۹۱ در شیراز ایزوله و شناسایی شدند. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی و بررسی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز به روش E-test ESBL و Combined disk method مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: مجموعاً ۳۸ ایزوله تولیدکننده ESBL به کمک روش E-test ESBL سفتازیدیم شناسایی شدند. به کمک دیسک‌های ترکیبی سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید، سفوتاکسیم/کلاوولانیک اسید و سفپودکسیم/کلاوولانیک اسید به ترتیب ۳۵، ۳۴ و ۳۱ ایزوله مولد بتالاکتاماز شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع بالای باکتری‌های مولد ESBL غربالگری این باکتری‌ها از نظر تولید ESBL می‌تواند در درمان و انتخاب داروهای موثر مهم باشد.

کلمات کلیدی: مطالعه مقطعی، بتالاکتاماز، کلبسیلا پنومونیه، عفونت.

مقدمه

داخلی و غشای خارجی دیواره سلولی واقع شده‌اند.^۲ شناسایی سوبه‌های مولد این آنزیم‌ها با روش معمول آزمایش حساسیت در برابر عوامل ضد میکروبی به سختی امکان‌پذیر می‌باشد و از طرف دیگر، این آنزیم‌ها توسط ژن‌های پلاسمیدی در میان باکتری‌ها به سرعت انتقال می‌یابند.^۳ هدف از این مطالعه مقایسه تشخیص فنوتیپی آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع طیف (ESBL) با استفاده از E-test ESBL و Combined disk method در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی در مدت شش ماه از آذر ماه ۱۳۹۱ تا

طیف بیماری‌زایی کلبسیلا پنومونیه معمولاً وسیع بوده شامل باکتری، پنومونی، عفونت مجاری ادراری می‌باشد. در بیمارستان همه‌گیری شدید بین نوزادان و عفونت‌های آندمیک در بخش بیماران کلیوی رخ می‌دهد. پنومونی کلبسیلایی بخش کوچک از موارد پنومونی را تشکیل می‌دهد ولی میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا و حدود ۹۰٪ است.

این باکتری بیش از پنوموکک تمایل به ایجاد نکروز دارد.^۱ تولید پنی‌سیلینازها و دیگر آنزیم‌های بتالاکتاماز اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در بین خانواده انتروباکتریاسه است. آنزیم‌های بتالاکتاماز در فضای پری‌پلاسمیک در بین غشای

یافته‌ها

الگوی حساسیت به ۱۴ آنتی‌بیوتیک برای ۱۴۴ ایزوله کلبسیلا پنومونیه در جدول ۱ نشان داده شد. تمامی ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین و تعداد ۱۷ ایزوله به همه آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند. بیشترین میزان مقاومت مربوط به سفوتاکسیم (۵۰٪) و کمترین مقاومت مربوط به مروپنم (۱۱/۸٪) بود.

پس از انجام آنتی‌بیوگرام برای دیسک‌های انتخابی، ۷۲ ایزوله که حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام نیمه حساس یا مقاوم بودند جهت تایید ایزوله‌های مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف با استفاده از دیسک‌های ترکیبی سفوتاکسیم+کلاوولانیک اسید، سفودکسیم+کلاوولانیک اسید، سفنازیدیم+کلاوولانیک اسید و E-test ESBL سفنازیدیم مورد آزمایش قرار گرفتند.

ESBL (۲۶/۳٪) ۳۸ ایزوله به کمک این روش تولیدکننده ESBL شناسایی شد. همه ایزوله‌های تولیدکننده ESBL به ایمی‌پنم و مروپنم حساس و به آنتی‌بیوتیک آزترونام مقاوم بودند. با استفاده از دیسک‌های ترکیبی سفنازیدیم/کلاوولانیک اسید، سفوتاکسیم/کلاوولانیک اسید و سفودکسیم/کلاوولانیک اسید به ترتیب (۹۲/۱٪)، (۸۹/۴٪) و (۸۱/۵٪) ایزوله به عنوان ایزوله‌های مولد بتالاکتاماز شناسایی شدند. در جدول ۲ توزیع ایزوله‌های مولد ESBL در نمونه‌های مختلف آورده شد.

بحث

افزایش مصرف داروهای بتالاکتام وسیع‌الطیف و بستری شدن طولانی‌مدت بیماران سبب افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود که این مقاومت از راه‌های مختلفی حاصل می‌شود که از مهمترین آنها، وجود پمپ‌های افلاکس، کاهش نفوذ پذیری غشاء و تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف ESBL می‌باشد.^۶ ارگانسیم‌هایی که این ژن‌ها را در خود حمل می‌کنند باعث افزایش بیماری‌زایی و مرگ و میر در بین افراد می‌شوند و ادامه روند رو به رشد در ایجاد مقاومت‌هایی از این دسته جامعه را با خطر جدی مواجه خواهد کرد.^۷ ۱۷ ایزوله در مطالعه حاضر به همه آنتی‌بیوتیک‌های به کار برده شده مقاوم بودند که یک خطر جدی برای درمان افرادی که با این ایزوله‌ها

اردیبهشت ۱۳۹۲ تعداد ۱۴۴ ایزوله کلبسیلا پنومونیه از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های آموزشی شیراز جمع‌آوری شد. این ایزوله‌های کلینیکی از بخش‌های مختلف بیمارستان و از نمونه‌های مختلف مانند ادرار، خون، خلط، عفونت زخم، مایعات بدن جمع‌آوری شده بودند. نمونه‌های تکراری در مطالعه محاسبه نگردید. به منظور تشخیص باکتری کلبسیلا پنومونیه برای تمامی ایزوله‌ها تست‌های تشخیصی مانند بررسی مورفولوژی کلنی در محیط اتوزین متیلن بلو آگار (EMB)، واکنش‌های محیط TSI، سیمون سترات آگار، MR/VP، SIM و تست اوره آز انجام گرفت.

بررسی الگوی حساسیت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها (Mast Group, Merseyside, UK) به روش دیسک دیفیوژن در سطح محیط Himedia Mueller Hinton Agar (MHA) انجام گردید.^۴

پس از بررسی هاله عدم رشد، سویه‌های مقاوم به حداقل یکی از انواع آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به عنوان ESBL محسوب شده و در مرحله بعد تحت آزمون فنوتیپی تاییدی قرار گرفتند.

جهت انجام تست تاییدی از دیسک‌های ترکیبی (۳۰ µg سفالوسپورین با دیسک ۱۰ µg کلاوولانیک اسید) استفاده شد که این دیسک‌ها در محیط مولر هیتون آگار بر اساس روش دیسک دیفیوژن مانند آزمون غربالگری قرار داده شد.

اگر قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف دیسک ترکیبی حداقل ۵ mm بیشتر از قطر هاله عدم رشد دیسک منفرد همان آنتی‌بیوتیک باشد، به عنوان سویه مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف محسوب می‌گردد.

از سویه‌های استاندارد کلبسیلا پنومونیه ATCC 7881 جهت کنترل مثبت و از اشرشیاکلی ATCC 25922 جهت کنترل منفی استفاده گردید.^۵

تعیین فنوتیپی ESBL به روش E-test ESBL (سفنازیدیم) همانند دیسک ترکیبی می‌باشد با این تفاوت که آنتی‌بیوتیک منفرد و ترکیبی هر کدام در یک سمت نوار قرار دارد. روش کار نیز همانند روش دیسک دیفیوژن می‌باشد.

نحوه تعیین ایزوله‌های مولد ESBL به این طریق بود که نخست باید MIC سفنازیدیم آنها بیشتر یا مساوی ۱ µg باشد و سپس نسبت Minimal inhibitory concentration (MIC) سفنازیدیم نهایی به سفنازیدیم+کلاوولانیک اسید باید بیشتر یا مساوی ۸ µg شود (نوارهای E-test از Liofilchem srl., Italy تهیه شده بود).

جدول ۱: میزان فراوانی سویه‌های مقاوم، حساسیت متوسط و حساس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی

مقاوم No. (%)	نیمه حساس No. (%)	حساس No. (%)	الگوی مقاومت	آنتی بیوتیک
۵۹(۴۱)	۱۳(۹)	۷۲(۵۰)		سفتوناکسیم
۵۲(۳۶/۱)	۱۱(۷/۶)	۸۱(۵۶/۳)		سفتازیدیم
۶۱(۴۲/۴)	۰(۰)	۸۳(۵۷/۶)		سفتریاکسون
۵۶(۳۹)	۲(۱/۳)	۸۶(۵۹/۷)		سفتیزوکسیم
۵۱(۳۵/۴)	۱(۰/۷)	۹۲(۶۳/۹)		سفییم
۵۸(۴۰/۳)	۸(۵/۶)	۷۸(۵۴/۱)		سفیودوکسیم
۲۸(۱۹/۵)	۳(۲/۱)	۱۱۳(۷۸/۴)		لوفلوکسازین
۱۴(۹/۷)	۳(۲/۱)	۱۲۷(۸۸/۲)		مروپنم
۱۶(۱۱/۱)	۷(۴/۹)	۱۲۱(۸۴)		ایمی پنم
۱۵(۱۰/۴)	۸(۵/۶)	۱۲۱(۸۴)		آمیکاسین
۲۴(۱۶/۷)	۴(۲/۸)	۱۱۶(۸۰/۵)		جتتامایسین
۵۰(۳۴/۷)	۴(۲/۸)	۹۰(۶۲/۵)		آزترونام
۶۱(۴۲/۳)	۲(۱/۴)	۸۱(۵۶/۳)		کوتریموکسازول
۱۴۲(۹۸/۶)	۲(۱/۴)	۰(۰)		آموکسی سیلین

جدول ۲: توزیع ایزوله‌های مولد ESBL در نمونه‌های مختلف

نوع نمونه	کل نمونه No.	ESBL ^a (+) No. (%)
ادرار	۱۰۸	۲۹(۲۶/۸)
خلط	۹	۱(۱۱/۱)
زخم	۷	۲(۲۸/۵)
خون	۵	۲(۴۰)
گلو	۵	۱(۲۰)
مایعات بدن	۶	۲(۳۳/۳)
دیگر نمونه‌ها	۴	۱(۲۵)

^a Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) enzymes

ایمی پنم برای درمان ایزوله‌هایی که به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز از جمله سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم مقاوم بودند، استفاده می‌شود. اما با توجه به نتایج مطالعات دیگر انجام شده در سایر نقاط دنیا و نیز مطالعه حاضر که بیانگر مقاومت ۱۶ درصدی نسبت به ایمی پنم است، افزایش مقاومت به این آنتی‌بیوتیک نشان‌دهنده کاهش کارایی این دارو در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌باشد.^۳ در این مطالعه میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزید (آمیکاسین و جتتامایسین) به ترتیب ۱۶ و ۱۹/۴٪ بود که نزدیک به آنتی‌بیوتیک ایمی پنم می‌باشد و در مطالعاتی که صورت گرفته می‌توان از درمان ترکیبی (ایمی پنم+آمیکاسین) برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مولد ESBL استفاده کرد. علت این امر این است که فعالیت باکتری‌سیدالی ایمی پنم در ترکیب با آمیکاسین بیشتر از ایمی پنم تنهاست.^۸

در این مطالعه برای تشخیص فنوتیپی ESBL از دیسک‌های ترکیبی سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید، سفتوناکسیم/کلاوولانیک اسید

آلوده می‌شوند به حساب می‌آید. همچنین در این مطالعه نشان داده شد که ۶۱ ایزوله (۴۲/۳٪) از ۱۴۴ ایزوله نسبت به سه یا بیشتر از سه آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند (Multi-drug resistance). در حال حاضر از

test ESBL تعداد ۳۵ ایزوله‌ای که به روش دیسک ترکیبی شناسایی شده بودند را نیز تایید کرد. این نتیجه با آنچه که توسط Mohanty و همکارانش انجام گرفت همخوانی دارد.^{۱۰} شیوع ۲۶/۳ درصدی ESBL در مطالعه حاضر با شیوعی که از مناطق دیگر ایران گزارش شده است همخوانی دارد.^{۱۱} البته باید این نکته را یادآور شد که این طیف وسیعی از شیوع به علت متفاوت بودن نوع مطالعات در مناطق مختلف، نمونه‌های مختلف و همچنین بخش‌های مختلف بیمارستان می‌باشد.

با توجه به نتایج مطالعات اخیر، مقاومت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها از آمار بالایی برخوردار است که این معضل می‌تواند باعث طولانی‌شدن دوره درمان، مدت بستری و افزایش هزینه‌های درمانی گردد. بنابراین برای درمان عفونت‌های مشکوک به ارگانسیم‌های تولیدکننده بتالاکتاماز باید آنتی‌بیوتیک مناسب به دقت انتخاب شود.

همچنین سوش‌هایی که حساسیت آن‌ها در برابر سفنازیدیم و سفوتاکسیم کاهش پیدا کرده است باید از نظر داشتن توانایی تولید آنزیم‌های ESBL (با یکی از روش‌های E-test ESBL یا Combined Disk Method) مورد بررسی قرار بگیرند.

سپاسگزاری: این مقاله بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف SHV، PER، TEM و CTX-M در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه بیمارستان‌های آموزشی شیراز- ایران در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۱ و کد ۶۵۸۹۶-۹۱ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی فارس اجرا شده است.

وسفیودکسیم/کلانولانیک اسید استفاده شد که میزان حساسیت و اختصاصیت دیسک ترکیبی سفنازیدیم بیشتر از دو آنتی‌بیوتیک دیگر بود این در حالی است که در پژوهش Jain و همکاران صورت گرفت حساسیت و اختصاصیت سه آنتی‌بیوتیک سفیودکسیم، سفوتاکسیم و سفنازیدیم در غربال کردن ایزوله‌های ESBL مثبت مقایسه شده بود که در این بین آنتی‌بیوتیک سفیودکسیم بیشترین حساسیت و اختصاصیت را از خود نشان داده بود.^۹

همچنین در بین ۳۸ ایزوله ESBL مثبت ۳۷ ایزوله به آزمون مقاوم بودند که نشان‌دهنده حساسیت بالای این آنتی‌بیوتیک در جداسازی ایزوله‌های ESBL می‌باشد، به طوری که همه‌ی ایزوله‌های ESBL مثبت حداقل به یک یا دو سفالوسپورین مقاوم بودند این در حالی است که اکثر این ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک آزترونام مقاومت داشتند، پس در حالت کلی می‌توان این نتیجه را گرفت که در تشخیص فنوتیپی ESBL می‌توان به مقاومت حداقل یک آنتی‌بیوتیک سفالوسپورین و آنتی‌بیوتیک آزترونام بسنده کرده و در تجویز آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان این عفونت‌ها اقدام کرد، زیرا تشخیص ESBL به روش مولکولی نیاز به هزینه زیاد و زمان دارد و همچنین بیشتر آزمایشگاه‌ها این امکانات را در اختیار ندارند.

در مطالعه حاضر برای مقایسه حساسیت و اختصاصیت تست تاییدی فنوتیپی از نوارهای E-test ESBL سفنازیدیم نیز استفاده شد که تعداد سه ایزوله به جمع ESBL مثبت‌ها اضافه شد (در تست تاییدی فنوتیپی به روش دیسک ترکیبی تعداد ۳۵ ایزوله ESBL مثبت شدند که در انجام این تست با استفاده از نوارهای E-test این تعداد به ۳۸ ایزوله افزایش پیدا کرد) این در حالی بود که نوارهای E-

References

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58(10):256-60.
- Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001;32(7):1085-9.
- Dhillon RH-P, Clark J. ESBLs: A clear and present danger? *Crit Care Res Prac* 2011;2012:1-11.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Seventeenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S17. Wayne, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin VS, Nematzadeh S. PER, CTX-M, TEM and SHV beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Tehran, Iran. *Iran J Basic Med Sci* 2010;13(3):111-8.
- Agnihotri N, Gupta V, Joshi RM. Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms: a five-year study. *Burns* 2004;30(3):241-3.
- Turner PJ. Extended-spectrum β -lactamases. *Clin Infect Dis* 2005;41 Suppl 4:S273-5.

8. Rudresh SM, Nagarathnamma T. Extended spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae and antibiotic co-resistance. *Indian J Med Res* 2011;133(1):116-8.
9. Jain A, Mondal R. Detection of extended spectrum beta-lactamase production in clinical isolates of *Klebsiella* spp. *Indian J Med Res* 2008;127(4):344-6.
10. Mohanty S, Gaiind R, Ranjan R, Deb M. Use of the cefepime-clavulanate ESBL Etest for detection of extended-spectrum beta-lactamases in AmpC co-producing bacteria. *J Infect Dev Ctries* 2009;4(1):24-9.
11. Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 2007;60(5):1018-29.

Comparison of phenotypic detection of extended spectrum beta-lactamases using the E-test ESBL and combined disk method clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: *brief report*

Mohammad Motamedifar
Ph.D.^{1,2}

Davood Mansury Ph.D.
student^{3,4*}

Hadi Sedigh Ebrahim-Saraie
Ph.D. student¹

Jamal Sarvari Ph.D.¹

1- Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

2- HIV/AIDS Research Center, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran.

3- Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

4- Department of Laboratory Medicine, Varastegan Medical Higher Education Center, Mashhad, Iran.

* Corresponding author: Department of Bacteriology and Virology, Ghaem Hospital, Shariati Sq., Mashhad, Iran.
Tel: +98- 51- 38022562
E-mail: mansury154@yahoo.com

Abstract

Received: 26 Oct. 2014 Accepted: 28 Feb. 2015 Available online: 10 Jun. 2015

Background: Antimicrobial resistance is a growing problem in many bacterial pathogens and is of particular concern for hospital-acquired nosocomial infections. *Klebsiella pneumoniae* is an important cause of nosocomial infections has rapidly become the most common extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing organism. ESBL are defined as the enzymes capable of hydrolyzing oxyimino-cephalosporins. The aim of this study was to compare phenotypic detection of ESBL using two phenotypically method among the clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*.

Methods: In this cross-sectional study a total of 144 isolates from clinical samples Urine, sputum, wound, blood, throat and body fluids isolated and identified as *K. pneumoniae* in a teaching hospitals in Shiraz within a six months period from December 2012 to May 2013. Antibacterial susceptibility test performed to 14 antibiotics by the disk diffusion method according to CLSI guideline and then isolates that were resistant to at least one of the beta-lactam antibiotics evaluated for the production of beta-lactamase enzymes by using E-test ESBL and combined disk method.

Results: Totally 38 (26.3%) isolates produced ESBLs. All ESBL producing isolates were susceptible to imipenem and meropenem and resistant to aztreonam. The highest antibiotic resistance was observed for amoxicillin (100%) and the lowest antibiotic resistance was observed for meropenem (9.7%). The number of 38 (100%) isolates were identified as ESBL producer by using E-test ESBL ceftazidime. It was while using the combined disks; ceftazidime/clavulanic acid, cefotaxime/clavulanic acid and cefpodoxime/clavulanic acid, respectively 35 (92.1%), 34 (89.4%) and 31 (81.5%) of isolates identified as beta-lactamase producing isolates.

Conclusion: Considering the high prevalence of bacteria producing ESBL, screening for infections caused by ESBL-producing isolates may be lead to the most effective antibiotics therapies.

Keywords: beta-lactamases, cross-sectional studies, infections, *klebsiella pneumoniae*.