



## بررسی فنوتایپی توانایی تولید آنزیم AmpC-beta-lactamase و تعیین پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا اکسی توکا

محبوبه نصاری<sup>۱</sup>، جلال مردانه<sup>۳\*</sup>، زهرا حسین زاده<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی، پردیس علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

<sup>۲</sup> گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

<sup>۳</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

<sup>۴</sup> گروه میکروبیولوژی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

(دریافت مقاله: ۹۳/۱۲/۱۷- پذیرش مقاله: ۹۴/۲/۳۰)

### چکیده

زمینه: کلبسیلا اکسی توکا پاتوژن فرصت طلبی است که در ایحاد بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی نقش دارد. شیوع مقاومت به کلاس‌های مختلف آنتی بیوتیکی در گونه‌های کلبسیلا در حال افزایش است. در برخی از ایزوله‌ها مقاومت به واسطه تولید آنزیم AmpC-beta-lactamase است. هدف از این مطالعه بررسی توانایی تولید AmpC-beta-lactamase و شناسایی پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا اکسی توکا در شیراز (ایران) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، ۳۵ سویه کلبسیلا اکسی توکا از بیماران بستری در بیمارستان‌های شیراز (ایران) جدا شدند و کشت مجدد بر روی محیط‌های میکروبیولوژی شامل مک کانکی آگار انجام شد. ایزوله‌ها با استفاده از تست‌های طراحی شده در سیستم API20E مورد تأیید نهایی قرار گرفتند. تست تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی بر اساس پروتکل استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI 2014) انجام شد. به منظور شناسایی فنوتیپی سویه‌های تولیدکننده AmpC-beta-lactamase از دیسک‌های سفوکسیتین و سفپیم استفاده شد.

یافته‌ها: به طور کلی ۳۵ ایزوله کلبسیلا اکسی توکا ایزوله و مورد بررسی قرار گرفتند که از این بین ۴ (۱۱/۴ درصد) ایزوله تولیدکننده AmpC-beta-lactamase بودند. در بین آنتی میکروبیال‌های مورد بررسی ایمپنم (۱۰۰ درصد) و کلیستین (۱۰۰ درصد) مؤثرترین داروها علیه ایزوله‌ها بودند. میزان مقاومت ایزوله‌ها به آمیکاسین، سفوکسیتین، سیپروفلوکساسین و سفپیم به ترتیب ۸۸/۶ درصد، ۸۸/۶ درصد، ۸۵/۷ درصد و ۸۵/۷ درصد بود. ایزوله‌ها بالاترین مقاومت را به سفنازیدیم (۲۰ درصد) نشان دادند. همه ایزوله‌های AmpC-beta-lactamase positive به آمیکاسین، ایمپنم و کلیستین حساس بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سفالوسپورین‌های نسل سوم علیه ۲۰ درصد از عفونت‌های ناشی از سویه‌های کلبسیلا اکسی توکا مورد مطالعه مؤثر نیستند. مقاومت به دو کلاس آنتی بیوتیکی بزرگ (آمینوگلیکوزیدها و سفالوسپورین‌ها) در بین سویه‌های مورد بررسی مشاهده شد و درمان عفونت‌های ناشی از این ایزوله‌ها در آینده مشکل بزرگی خواهد بود.

واژگان کلیدی: عفونت بیمارستانی، کلبسیلا اکسی توکا، مقاومت آنتی بیوتیکی، AmpC-بتالاکتاماز

\* گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

## مقدمه

کلبسیلا اکسی توکا (*Klebsiella oxytoca*) یک باکتری گرم منفی، متحرک، باسیلی شکل و کپسول دار است که به خانواده انتروباکتریاسه تعلق دارد و در طبیعت منحصر بفرد است اگرچه اغلب افراد عفونی شده با کلبسیلا اکسی توکا به صورت بدون علامت باقی می ماند اما به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب مطرح است و هم اکنون به عنوان یک پاتوژن با اهمیت از نظر بالینی مرتبط با عفونت های بیمارستانی در افراد بستری در بیمارستان شامل بچه ها و نوزادان است (۳-۱). این باکتری به عنوان عامل اتیولوژیک کولیت هموراژیک مرتبط با مصرف آنتی بیوتیک (AAHC) در بالغین و سالمندان مطرح است (۴). عمدتاً سبب ایجاد عفونت های اکتسابی از بیمارستان به ویژه در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی یا افرادی که نیاز به مراقبت های ویژه دارند، می شود. طغیان های گزارش شده اغلب مرتبط با منابع محیطی بوده است (۵-۸). این ارگانیزم همانند دیگر اعضای خانواده انتروباکتریاسه ممکن است ژن های کدکننده مقاومت از جمله بتالاکتامازهای وسیع الطیف و کاربامپنازها را کسب نماید. طغیان های عفونت های ناشی از کلبسیلا اکسی توکا مقاوم به چنددارو (MDR) یک خطر بالقوه برای بیماران بستری در بیمارستان محسوب می شود (۹). طغیان های عفونت مرتبط با مراقبت های ویژه ناشی از کلبسیلا اکسی توکا اغلب مرتبط با آلودگی مخازن محیطی از قبیل ضد عفونی کننده ها، ویال های multidose یا parenteral humidifiers fluid bags و ونتیلاتورها است. سینک های دستشویی در بیمارستان های شلوغ ممکن است به عنوان مخزن کلبسیلا اکسی توکا عمل نمایند و انتقال شخص به شخص از بیماری به بیمار دیگر از

طریق پرسنل به دیگر بیماران و بخش ها رخ می دهد. انتقال سویه های کلبسیلا اکسی توکا در بیمارستان به نظر می رسد که هم از طریق سینک ها و هم از طریق بیماران کلونیزه شده یا عفونی شده با این ارگانیزم رخ دهد. همچنین ظهور ارگانیزم های تولیدکننده کاربامپنم در بین انتروباکتریاسه توجه زیادی را به خود جلب کرده است. کلونیزاسیون با انتروباکتریاسه های تولیدکننده برای ماه ها یا سال ها می تواند ادامه داشته باشد (۹-۱۱). کلبسیلا اکسی توکا تولیدکننده توکسین به عنوان عامل ایجادکننده بیماری شناخته شده است همچنین پیشنهاد شده است که این باکتری مرتبط با اسهال مرتبط با آنتی بیوتیک غیر هموراژیک و کولیت شدید مرتبط با درمان آنتی بیوتیکی است (۱۲ و ۱۳).

کاربامپنم ها به عنوان اولین خط درمانی برای درمان عفونت های شدید ایجادشونده به وسیله باکتری های گرم منفی مقاوم به چنددارو (MDR) به ویژه سویه های تولیدکننده سطوح بالای از سفالوسپورینازهای AmpC یا بتالاکتامازهای وسیع الطیف می باشد. متأسفانه استفاده زیاد و گسترده از کاربامپنم ها منجر به ظهور سویه های انتروباکتریاسه مقاوم به چند دارو شده است (۱۴). ظهور و گسترش انتروباکتریاسه های تولیدکننده کاربامپنازها یک تهدید جدی در مدیریت عفونت های بیمارستانی است. در گزارشی سویه ای از کلبسیلا اکسی توکا تولیدکننده OXA-48 بتالاکتاماز (کلاس D) کاربامپناز شناسایی گردیده است (۱۵). این مقاومت تهدید بزرگی برای درمان عفونت ها است و تولید کاربامپنازها مهم ترین مکانیزم ملکولی برای اهداف اپیدمیولوژیک و بالینی است. گزارش هایی از کلبسیلا اکسی توکا تولیدکننده KPC وجود دارد (۱۶). با توجه به استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها در ایران و افزایش خطر

دست آوردن کد ارگانسیم و وارد نمودن کد در نرم افزار API مورد شناسایی نهایی قرار گرفتند.

**تعیین حساسیت ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها:** در این مطالعه به کمک روش استاندارد دیسک دیفیوژن و بر اساس پروتکل ارائه شده توسط سازمان استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI 2014) (۱۰) و استفاده از دیسک‌های ۸ آنتی‌بیوتیک (Rosco, Danish) شامل سفوکسیتین (FOX, 30µg)، آمیکاسین (AMI, 30µg)، سیپروفلوکساسین (CIP, 5µg)، سفتازیدیم (CAZ, 30µg)، سفپیم (CPM, 30µg)، جنتامایسین (GM, 10µg)، ایمی‌پنم (IMP, 10µg)، کلیستین (CO, 10µg) حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جداسازی شده مورد مطالعه قرار گرفت. در این روش با استفاده از نرمال سالین رقت ۰/۵ مک‌فارلند از باکتری تهیه گردید و کشت بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام و پس از انکوباسیون محیط‌ها در دمای  $2 \pm 35$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت، نتایج خوانده شدند (۱۷).

**شناسایی سویه‌های تولیدکننده AmpC-beta-lactamase با استفاده از تست فنوتیپی:** در این روش از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین (FOX, 30µg) و سفپیم (CPM, 30µg) استفاده شد. ایزوله‌هایی که مقاوم به سفوکسیتین و حساس به سفپیم بودند به‌عنوان AmpC-beta-lactamase positive در نظر گرفته شدند.

#### آنالیز آماری

نتایج حاصل از مطالعه به کمک نرم‌افزار SPSS (USA, Il.Chicago, SPSS Inc) ویرایش ۱۹ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

مقاومت دارویی، و اینکه در ایران کمتر مطالعه‌ای بر روی باکتری کلبسیلا اکسی‌توکا انجام شده است، اهداف این مطالعه شامل (۱) تعیین پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا اکسی‌توکا، (۲) بررسی توانایی تولید آنزیم AmpC-beta-lactamase، (۳) و مشخص نمودن Cross-resistance در بین ایزوله‌ها، بود.

#### مواد و روش‌ها

**جامعه مورد مطالعه و نمونه‌گیری:** در این مطالعه مقطعی که در طی یک سال از فروردین تا اسفند سال ۱۳۹۳ انجام شد، نمونه‌های مختلف بیماران بستری در بیمارستان‌های فقیهی، قطب‌الدین و نمازی شیراز جمع‌آوری گشت و برای هر یک پرسشنامه تنظیم‌شده و کدگذاری گردید. نمونه‌گیری از افراد پس از مشخص نمودن هدف مطالعه برای آن‌ها و کسب رضایت کتبی آگاهانه از هر یک از افراد تحت مطالعه صورت پذیرفت.

**جداسازی و شناسایی باکتری:** نمونه‌ها بر روی محیط‌های معمول میکروب‌شناسی شامل محیط‌های بلاد آگار، شکلات آگار و مک‌کانکی آگار (Merck Co. Germany) کشت داده شدند و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز، از نظر رشد باکتری و تشکیل کلونی بر روی محیط‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. باکتری‌های گرم منفی ایزوله‌شده از نمونه‌های ارسالی به کمک تست‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی اولیه شامل رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز و حرکت (Merck Co. Germany) و به دنبال آن با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی تعبیه شده در سیستم API 20E اختصاصی انتروباکتریاسه‌ها و به

## یافته‌ها

در این مطالعه مقطعی به‌طور کلی ۳۵ ایزوله کلبسیلا اکسی‌توکا از نمونه‌های مختلف بالینی ایزوله گشتند. ۶۸/۵ درصد (۲۴ مورد) سویه‌ها از خون، ۱۴/۵ درصد (۵ مورد) از ادرار، ۸/۵ درصد (۳ مورد) از مایع ابدومینال، ۵/۷ درصد (۲ مورد) از نازال و ۲/۸ درصد (۱ مورد) از گلو ایزوله شدند. ۶۰ درصد ایزوله‌ها به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه حساس بودند. نتایج بررسی توانایی تولید AmpC-beta-lactamase نشان داد که ۴ (۱۱/۴ درصد) ایزوله تولیدکننده این آنزیم هستند. در بین آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی ایمی‌پنم (۱۰۰ درصد) و کلیستین (۱۰۰ درصد) مؤثرترین داروها علیه ایزوله‌ها بودند. ایزوله‌ها بالاترین مقاومت را به سفنازیدیم (سفالوسپورین‌های نسل سوم) نشان دادند به‌طوری که ۲۰ درصد آن‌ها به این دارو پاسخ ندادند (جدول ۱).

جدول ۱) پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های کلبسیلا اکسی‌توکا (N=35)

آنتی‌بیوتیک	حساس (%)	مقاوم (%)
جتنامایسین	۸۲/۹	۱۷/۱
آمیکاسین	۸۸/۶	۱۱/۴
سفپیم	۸۵/۷	۱۴/۳
سفنازیدیم	۸۰	۲۰
سفوکسیتین	۸۸/۶	۱۱/۴
سیپروفلوکساسین	۸۵/۷	۱۴/۳
ایمی‌پنم	۱۰۰	-
کلیستین	۱۰۰	-

مقاومت متقاطع آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های مورد بررسی مشاهده شد که نتایج آن در جدول ۲ آمده است. آنالیز داده‌ها نشان داد که همه ایزوله‌های AmpC-beta-lactamase positive به آمیکاسین، ایمی‌پنم و کلیستین حساس هستند (جدول ۲).

آنالیز نتایج Cross-resistance نشان داد که ۳ سویه (۸/۶ درصد) از ۳۵ ایزوله کلبسیلا اکسی‌توکا الگوی مقاومتی مشابه داشته به‌طوری که همزمان به چهار داروی جنتامایسین، آمیکاسین، سفپیم، سفنازیدیم مقاوم بودند و در واقع به کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی آمینوگلیکوزیدی، سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم مقاومت نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۲) الگوهای Cross-resistance در ایزوله‌های بالینی

الگو	آنتی‌بیوتیک‌ها	تعداد
۱	جتنامایسین، آمیکاسین، سفپیم، سفنازیدیم	۳
۲	جتنامایسین، سفوکسیتین، سفنازیدیم	۱
۳	سیپروفلوکساسین، سفپیم، سفنازیدیم	۱
۴	سیپروفلوکساسین، سفوکسیتین	۱

بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های AmpC-beta-lactamase positive کلبسیلا اکسی‌توکا بیان کننده آن بود که ۲ سویه از ۴ سویه الگوی حساسیتی کاملاً مشابه داشته و به سیپروفلوکساسین، ایمی‌پنم، کلیستین، جنتامایسین، آمیکاسین، سفنازیدیم حساس هستند (جدول ۳).

جدول ۳) پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های AmpC-beta-lactamase positive کلبسیلا اکسی‌توکا

شماره سویه	الگوی حساسیت	الگوی مقاومت
۱	ایمی‌پنم، کلیستین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین	سفنازیدیم، جنتامایسین
۲	ایمی‌پنم، کلیستین، جنتامایسین، آمیکاسین، سفنازیدیم	سیپروفلوکساسین
۳	سیپروفلوکساسین، ایمی‌پنم، کلیستین، جنتامایسین، آمیکاسین، سفنازیدیم	-
۴	سیپروفلوکساسین، ایمی‌پنم، کلیستین، جنتامایسین، آمیکاسین، سفنازیدیم	-

## بحث

کلبسیلا اکسی توکا یک ارگانسم گرم منفی از میکروبیوتا انسان است که در مجرای روده‌ای ۲ تا ۱۰ درصد افراد سالم وجود دارد و به عنوان یک عضو کومانسال میکروفلور روده‌ای مطرح است. کلبسیلا اکسی توکا مقاومت طبیعی به پنی سیلین‌ها نشان می‌دهد (۱۸). مشخص شده است که این باکتری می‌تواند سایتوتوکسین‌هایی تولید نماید. در سال‌های اخیر سویه‌های مقاوم به چنددارو کلبسیلا اکسی توکا به عنوان یک مشکل مهم در سیستم مراقبت‌های بهداشتی مطرح است (۱۹ و ۲۰). الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی که به نظر می‌رسد به‌طور قابل ملاحظه‌ای بین سویه‌های مختلف کلبسیلا اکسی توکا متفاوت باشد. سویه‌های کلبسیلا اکسی توکا به واسطه تولید بتالاکتامازها به آمینوپنی سیلین‌ها و کربوکسی پنی سیلین‌ها مقاوم هستند. تست حساسیت آنتی بیوتیکی نشان می‌دهد که همه سویه‌های مورد بررسی به آمپی سیلین مقاوم هستند. مقاومت به آموکسی سیلین کلاولانات در برخی سویه‌ها مشاهده شده است. الگوی مقاومت در سویه‌های کلبسیلا اکسی توکا که از منابع غیر انسانی ایزوله شده‌اند نشان می‌دهد که نه تنها به آمپی سیلین، سفالوتین، آموکسی کلاولانات بلکه به تری متوپریم سولفامتوکسازول، انروفلوکسازین و جنتامایسین مقاوم هستند. درصد بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های جدا شده از پریمات‌های غیر انسانی ممکن است نشان دهنده استفاده وسیع از آنتی بیوتیک‌ها در حیوانات باشد (۴ و ۲۱). این مقاومت می‌تواند از مسیرهای مختلف به انسان‌ها منتقل گردند.

در مطالعه ما بیشترین مقاومت به سفنازیدیم مشاهده شد به طوری که ۲۰ درصد ایزوله‌ها به این دارو مقاوم بودند. تمام سویه‌های مورد مطالعه به کارباپنم‌ها (ایمی پنم) حساس بودند. در بررسی‌های صورت گرفته توسط

پیتوت (Pitout) و همکاران در سال ۲۰۰۹ در کشور کانادا همه سویه‌های مورد بررسی به ایمی پنم، سفپیم، سیپروفلوکسازین و جنتامایسین حساس بوده‌اند (۲۲) که در مقایسه با مطالعه ما نتایج آنتی بیوتیک ایمی پنم مشابه است اما در مقابل ۸۵/۷ درصد ایزوله‌های ما به سفپیم، ۸۵/۷ درصد به سیپروفلوکسازین و ۸۲/۹ درصد به جنتامایسین حساس بودند که میزان حساسیت پایین‌تر از مطالعه ذکر شده است و نشان دهنده آن است که مقاومت دارویی در بین سویه‌های کلبسیلا اکسی توکا به سرعت در حال افزایش است. استفاده بی‌رویه از داروها در جامعه و محیط‌های بیمارستانی می‌تواند یکی از دلایل عمده بالاتر بودن میزان مقاومت باشد از سوی دیگر به دلیل بالا بودن مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری‌های شایع در بیمارستان احتمال انتقال ژن‌های مقاومت به این باکتری در محیط‌های بیمارستانی وجود دارد. همچنین در برخی مواقع استفاده از داروها در خارج از جامعه انسانی مانند استفاده در حیوانات، ماکیان یا مواد غذایی می‌تواند سبب افزایش مقاومت در نتیجه مجاورت باکتری با این داروها گردد.

در مطالعه ما ۱۱/۴ درصد سویه‌ها به سفوکسیتین مقاوم بودند در مقایسه در مطالعه توکرال (Thukral) بر روی سویه‌های کلبسیلا اکسی توکا ۲۱/۵ درصد آن‌ها مقاوم به سفوکسیتین و احتمالاً تولیدکننده AmpC بوده‌اند (۲۳) و در نتیجه سویه‌های ما حساسیت بهتری نشان دادند. اگر چه مطالعه ما بر روی تعداد کمتری ایزوله انجام شده و لازم است برای رسیدن به نتایج بهتر بررسی در طی یک دوره چندین ساله و در مناطق جغرافیایی مختلف کشور ایران انجام شود. در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۱۴ توسط رولاند (Reuland) و همکاران بر روی ۲۴ ایزوله کلبسیلا اکسی توکا انجام شده ۲/۹ درصد آن‌ها pAmpC

مثبت بوده‌اند (۲۴). در مطالعه ما نتایج تست‌های فنوتیپی نشان داد که ۱۱/۴ درصد ایزوله‌ها تولید کننده AmpC beta-lactamase هستند که در مقایسه با مطالعه رولاند بالاتر است اما از مطالعه هلمی (Helmy) و همکاران که میزان تولیدکننده‌های این آنزیم را ۲۰ درصد احتمال می‌دهند پایین‌تر است (۲۵). این متفاوت بودن میزان سویه‌های تولید کننده AmpC بتالاکتاماز نشان دهنده آن است که در نواحی مختلف الگوی حساسیت ایزوله‌ها بسته به آن منطقه جغرافیایی و میزان استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها در آن منطقه متفاوت است. از دیدگاهی دیگر در برخی از نقاط جغرافیایی استفاده از برخی آنتی‌بیوتیک‌ها در بالین متداول نیست یا بنا به برنامه سلامت و بهداشت ملی آن کشور اجازه مصرف ندارد و در نتیجه احتمال بروز مقاومت نسبت به آن در بین سویه‌ها کمتر خواهد بود (۲۶ و ۲۷).

نگرانی عمده دیگری که در تمام جهان وجود دارد افزایش مقاومت به کاربائیم‌ها در بین باکتری‌های گرم منفی بیمارستانی از جمله ائروباکتریاسه است (۲۷) که خوشبختانه هیچ گونه مقاومتی به نسبت به ایمی‌پنم مشاهده نشد و همچنان درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های کلبسیلا اکسی‌توکا مقاوم به آمینوگلیکوزیدها یا سفالوسپورین‌ها با کاربائیم‌ها امکان‌پذیر است اما باید توجه داشت که کاربائیم‌ها جزء آخرین خط‌های درمانی هستند که جهت درمان عفونت‌های ناشی از ائروباکتریاسه استفاده می‌شوند و اگر مقاومت به آن‌ها ایجاد شود شاهد افزایش مرگ و میر و مشکلات درمان بیماری‌های ایجادشونده به وسیله این سویه‌های مقاوم به چند دارو خواهیم بود. خوشبختانه اگر چه در مطالعه ما مقاومت به دو کلاس آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌ها دیده شد اما هیچ یک از آن‌ها MDR

نبودند چون بر اساس تعریف سویه‌های MDR محسوب می‌شوند که حداقل به ۳ کلاس بزرگ آنتی‌بیوتیکی مقاوم باشند. از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به محدودیت زمان، محدود بودن تحقیق به فقط یک منطقه جغرافیایی و تعداد کم ایزوله‌ها به دلیل شیوع پایین کلبسیلا اکسی‌توکا، اشاره نمود.

بخشی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها به دلیل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنایع دیگر از جمله صنایع پرورش دام، پرندگان و پرورش ماهی و نیز کشاورزی است. در این صنایع به منظور افزایش تولید، باردهی و در نتیجه رسیدن به سود اقتصادی بیشتر از برخی آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود. با توجه به افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در بیمارستان‌ها و نیز بین افراد جامعه الگوی مقاومت دارویی باکتری‌ها در حال تغییر است در نتیجه نیاز به بررسی‌های دوره‌ای و منظم پروفایل مقاومت دارویی جهت استفاده از رژیم درمانی کارآمد جهت درمان بیماران است. افراد دارای نقص و ضعف سیستم ایمنی (از جمله دریافت‌کنندگان پیوند عضو، نوزادان، و سالخورده‌گان، افراد دیالیزشونده، افراد HIV مثبت، مبتلایان به سرطان و دریافت‌کنندگان داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی از گروه‌های در خطر بالای عفونت ناشی از باکتری‌های بالقوه پاتوژن و فرصت‌طلب ساکن در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها و نیز موجود در مواد غذایی مورد استفاده، هستند (۳۶-۲۸).

### نتیجه‌گیری

بهرتر است که مطالعات آینده بر روی کلبسیلا اکسی‌توکا در طی یک دوره چندین ساله و بر روی سویه‌هایی که در مناطق جغرافیایی مختلف کشور از بیماران ایزوله می‌شوند صورت گیرد. در مطالعه حاضر نتایج حساسیت

گزارش نگردند زیرا مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه نسبت به سایر گونه‌ها بسیار بالاتر بوده و در نتیجه درصد‌های مقاومت ارائه شونده میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی هیچ یک از گونه‌ها را به‌طور واقعی بیان نمی‌کنند به همین دلیل ضروری است که ایزوله‌های کلبسیلا در سطح گونه شناسایی شده و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی هر گونه به‌صورت مجزا گزارش گردد.

آنتی‌بیوتیکی نشان داد که ۴۰ درصد ایزوله‌های کلبسیلا اکسی‌توکا حداقل به یک مورد از آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت نشان داده‌اند و میزان مقاومت در گونه کلبسیلا اکسی‌توکا نیز در حال افزایش است. از سوی دیگر در بالین در مواجهه با بیماران، همه آزمایشگاه‌های میکروروب شناسی بالینی باید توجه داشته باشند که ایزوله‌های کلبسیلا تحت عنوان کلی *Klebsiella spp.*

## References:

1. Savino F, Cordisco L, Tarasco V, et al. Molecular identification of coliform bacteria from colicky breastfed infants. *Acta Paediatr* 2009; 98: 1582-8.
2. Hoffmann KM, Deutschmann A, Weitzer C, et al. Antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca*. *Pediatrics* 2010; 125: e960-3.
3. Savino F, Cordisco L, Tarasco V, et al. Antagonistic effect of *Lactobacillus* strains against gas-producing coliforms isolated from colicky infants. *BMC Microbiol* 2011; 11: 157.
4. Darby A, Lertpiriyapong K, Sarkar U, et al. Cytotoxic and pathogenic properties of *Klebsiella oxytoca* isolated from laboratory animals. *PLoS One* 2014; 9: e100542.
5. Decré D, Burghoffer B, Gautier V, et al. Outbreak of multi-resistant *Klebsiella oxytoca* involving strains with extended-spectrum beta-lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 881-8.
6. Jeong SH, Kim WM, Chang CL, et al. Neonatal intensive care unit outbreak caused by a strain of *Klebsiella oxytoca* resistant to aztreonam due to overproduction of chromosomal beta-lactamase. *J Hosp Infect* 2001; 48: 281-8.
7. Schulz-Stübner S, Kniehl E. Transmission of extended-spectrum beta-lactamase *Klebsiella oxytoca* via the breathing circuit of a transport ventilator: root cause analysis and infection control recommendations. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011; 32: 828-9.
8. Zárate MS, Gales AC, Picão RC, et al. Outbreak of OXY-2-Producing *Klebsiella oxytoca* in a renal transplant unit. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2099-101.
9. Lowe C, Willey B, O'Shaughnessy A, et al. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* infections associated with contaminated handwashing sinks (1). *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1242-7.
10. Kola A, Holst M, Chaberny IF, et al. Surveillance of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria and routine use of contact isolation: experience from a three-year period. *J Hosp Infect* 2007; 66: 46-51.
11. O'Fallon E, Gautam S, D'Agata EM. Colonization with multidrug-resistant gram-negative bacteria: prolonged duration and frequent cocolonization. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1375-81.
12. Chen J, Cachay ER, Hunt GC. *Klebsiella oxytoca*: a rare cause of severe infectious colitis: first North American case report. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 142-5.
13. Soussi F, Tchirikhtchian K, Ramaholimihaso F, et al. Diclofenac-induced colitis complicated by *Klebsiella oxytoca* infection. *Gastroenterol Clin Biol* 2001; 25: 814-6.
14. Poorabbas B, Mardaneh J, Rezaei Z, et al. Nosocomial infections: multicenter surveillance of antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* and Gram negative rods isolated from blood and other sterile body fluids in Iran. *Iranian J Microbiol* 2015; 7: 127-35.
15. Nazik H, Aydin S, Albayrak R, et al. Detection and spread of oxa-48-producing *Klebsiella oxytoca* isolates in Istanbul, Turkey. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2014; 45: 123-9.
16. Hoenigl M, Valentin T, Zarfel G, et al. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella oxytoca* in Austria. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2158-61.
17. Anvarinejad M, Pouladfar Gh, Japoni A, et al. Isolation and Antibiotic Susceptibility of the Microorganisms Isolated from Diabetic Foot

- Infections in Nemazee Hospital, Southern Iran. *J Pathogens* 2015; 2015: 328796.
18. Herzog KA, Schneditz G, Leitner E, et al. Genotypes of *Klebsiella oxytoca* isolates from patients with nosocomial pneumonia are distinct from those of isolates from patients with antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 1607-16.
  19. Sbrana F, Malacarne P, Viaggi B, et al. Carbapenem-sparing antibiotic regimens for infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2013; 56: 697-700.
  20. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013; 34: 1-14.
  21. Fox JG, Handt L, Xu S, et al. Novel *Helicobacter* species isolated from rhesus monkeys with chronic idiopathic colitis. *J Med Microbiol* 2001; 50: 421-9.
  22. Pitout JD, Le PG, Moore KL, et al. Detection of AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 165-70.
  23. Thukral SS. Detection and Characterization of AmpC B-Lactamases in Indian Clinical Isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *Universal J Microbiol Res* 2013; 1: 15-21.
  24. Reuland EA, Hays JP, de Jongh DM, et al. Detection and occurrence of plasmid-mediated AmpC in highly resistant gram-negative rods. *PLoS One* 2014; 9: e91396.
  25. Helmy MM, Wasfi R. Phenotypic and molecular characterization of plasmid mediated AmpC  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infections in Egyptian hospitals. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 171548.
  26. Mardaneh J, Anvarinejad M, Abbasian A, et al. Emergence of Multi-drug Resistant ESBL Producing Strains among Enterobacteriaceae Members Isolated from Patients Blood Samples in South of Iran. *ISMJ* 2015; 18: 970-81.
  27. Abbaspoor S, Mardaneh J, Dehbashi S, et al. Profile of antimicrobial susceptibility isolated microorganisms from hospitalized patients in PICU ward and detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and ESBL-producing bacteria by phenotypic methods. *ISMJ* 2014; 17: 647-57.
  28. Mardaneh J, Soltan-Dallal MM. Isolation and Identification of *E. cowanii* from Powdered Infant Formula in NICU and Determination of Antimicrobial Susceptibility of Isolates. *Iran J Pediatr* 2014; 24: 261-6.
  29. Abbasi P, Kargar M, Doosti A, et al. Characterization of Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) using multiplex Real-Time PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*. *Iran J Microbiol* 2014; 6: 169-74.
  30. Mardaneh J, Soltan Dallal MM, Taheripoor M, et al. Isolation, Identification and Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Tatumella ptyseos* Strains Isolated from Powdered Infant Formula Milk Consumed in Neonatal Intensive Care Unit: First Report from Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2014; 7: e10608.
  31. Hassanzadeh P, Hassanzadeh Y, Mardaneh J, et al. Isolation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from HIV Patients Referring to HIV Referral Center, Shiraz, Iran, 2011-2012. *Iran J Med Sci* 2015; 40: 526-30.
  32. Mardaneh J, Soltan Dallal MM. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Pantoea* (Enterobacter) agglomerans isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward: First report from Iran. *Iran J Microbiol* 2013; 5: 263-7.
  33. Shaghaghian S, Pourabbas B, Alborzi A, et al. Vancomycin-Resistant Entrococci colonization in chronic hemodialysis patients and its risk factors in southern Iran (2005-2006). *Iran Red Crescent Med J* 2012; 14: 686-91.
  34. Mardaneh J, Soltan Dallal MM. Isolation and Identification Enterobacter *asburiae* from Consumed Powdered Infant Formula Milk (PIF) in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU). *Acta Medica Iranica* 2016; 54: 39-43.
  35. Abbaspoor Sh, Mardaneh J, Ahmadi Kh. The survey of shigellosis frequency and determination of antibiotic resistance profile of isolated strains from infected children in Tehran. *ISMJ* 2014; 17: 42-8.
  36. Mardaneh J, Soltan Dallal MM, Taheri Poor M. Isolation and determination antimicrobial susceptibility pattern of Enterobacter *cloacae* strains isolated from consumed powdered infant formula milk in NICU ward. *ISMJ* 2014; 17: 907-15.



Original Article

# The Survey for AmpC beta-lactamase Production and Characterization of Antibiotic Resistance Profile in Clinical Isolates of *Klebsiella oxytoca*

M. Nassari<sup>1,2\*</sup>, J. Mardaneh<sup>3\*</sup>, Z. Hosseinzadeh<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

<sup>2</sup> Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

<sup>3</sup> Department of Microbiology, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

<sup>4</sup> Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

(Received 6 Mar, 2015 Accepted 20 May, 2015)

## Abstract

**Background:** *Klebsiella oxytoca* is opportunistic pathogen that incriminated in many nosocomial infections. There is an increase in the prevalence of resistance to different classes of antibiotics in *Klebsiella* species. In some isolates resistance is mediated by the production of AmpC beta-lactamases. The goal of this study was the survey for AmpC beta-lactamase production and characterization of antibiotic resistance profile in Iranian (Shiraz) clinical isolates of *Klebsiella oxytoca*.

**Materials & Methods:** In this cross-sectional study, thirty-five *Klebsiella oxytoca* strains were isolated from patients hospitalized in Shiraz (Iran) hospitals, and subculture was performed on microbiological media including MacConkey agar. The isolates were identified based on biochemical tests embedded in the API-20E system. Standard susceptibility testing (disc diffusion) was performed according clinical and laboratory standards institute (CLSI, 2014) guidelines. Phenotypic detection of AmpC beta-lactamase was performed by cefepime and ceftazidime disk test.

**Results:** Total 35 *Klebsiella oxytoca* isolates were examined that among them 4 (11.4%) isolates were AmpC beta-lactamase producing. Among examined antimicrobials, imipenem (100%) and colistin (100%) were most effective drugs against isolates. Respectively, 88.6%, 88.6%, 85.7% and 85.7% isolates were resistant to amikacin, ceftazidime, ciprofloxacin and cefepime. Strains showed the most frequent resistance to ceftazidime (20%). All AmpC beta-lactamase positive isolates were sensitive to amikacin, imipenem and colistin.

**Conclusion:** Results of current study showed third-generation cephalosporins are not effective against 20% of infections caused by *Klebsiella oxytoca*. Resistance to two major classes of antibiotics (aminoglycosides and beta-lactams) was seen among studied strains and treatment of infections causing by this isolates are major problem in future.

**Key words:** Hospital infection, *Klebsiella oxytoca*, Antibiotic resistance, AmpC beta-lactamase

\* Address for correspondence: Department of Microbiology, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran. Email: Jalalmardaneh@yahoo.com