دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال نوزدهم، شماره ۲، صفحه ۲۰۲– ۱۹۴ (خرداد و تیر ۱۳۹۵)

ISMJ 2016;19(2): 194-202

بررسی فنوتایپی توانایی تولید آنزیم AmpC-beta-lactamase و تعیین پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا اکسی‌توکا

محبوبه نصاری [۱و۲]، جلال مردانه [۳*]، زهرا حسین‌زاده [۴]

[۱] گروه میکروبیولوژی، پردیس علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
[۲] گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
[۳] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
[۴] گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

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

چکیده

زمینه: کلبسیلا اکسی‌توکا پاتوژن فرصت‌طلبی است که در ایجاد بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی نقش دارد. شیوع مقاومت به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی 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 آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا اکسی‌توکا در شیراز (ایران) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، ۳۵ سویه کلبسیلا اکسی‌توکا از بیماران بستری در بیمارستان‌های شیراز (ایران) جدا شدند و کشت مجدد بر روی محیط‌های میکروب‌شناسی شامل مک‌کانکی آگار انجام شد. ایزوله‌ها با استفاده از تست‌های طراحی شده در سیستم **API20E** مورد تأیید نهایی قرار گرفتند. تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی 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: به‌طور کلی ۳۵ ایزوله کلبسیلا اکسی‌توکا ایزوله و مورد بررسی قرار گرفتند که از این بین ۴ (۱۱/۴ درصد) ایزوله تولیدکننده **AmpC-beta-lactamase** بودند. در بین آنتی‌میکروبیال‌های مورد بررسی ایمی‌پنم (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 سفتازیدیم (۲۰ درصد) نشان دادند. همه ایزوله‌های **AmpC-beta-lactamase positive** به آمیکاسین، ایمی‌پنم و کلیستین حساس بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سفالوسپورین‌های نسل سوم علیه ۲۰ درصد از عفونت‌های ناشی از سویه‌های کلبسیلا اکسی‌توکا مورد مطالعه مؤثر نیستند. مقاومت به دو کلاس آنتی‌بیوتیکی 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 اکسی‌توکا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، **AmpC**-بتالاکتاماز

* گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

Email:Jalalmardaneh@yahoo.com

مقدمه

کلبسیلا اکسی‌توکا (*Klebsiella oxytoca*) یک باکتری گرم منفی، متحرک، باسیلی شکل و کپسول‌دار است که به خانواده انتروباکتریاسه تعلق دارد و در طبیعت منحصربفرد است اگرچه اغلب افراد عفونی‌شده با کلبسیلا اکسی‌توکا به‌صورت بدون علامت باقی می‌مانند اما به عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب مطرح است و هم اکنون به عنوان یک پاتوژن با اهمیت از نظر بالینی مرتبط با عفونت‌های بیمارستانی در افراد بستری در بیمارستان شامل بچه‌ها و نوزادان است (۳-۱). این باکتری به عنوان عامل اتیولوژیک کولیت هموراژیک مرتبط با مصرف آنتی‌بیوتیک (AAHC) در بالغین و سالمندان مطرح است (۴). عمدتاً سبب ایجاد عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان به ویژه در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی یا افرادی که نیاز به مراقبت‌های ویژه دارند، می‌شود. طغیان‌های گزارش‌شده اغلب مرتبط با منابع محیطی بوده است (۸-۵). این ارگانیسم همانند دیگر اعضاء خانواده انتروباکتریاسه ممکن است ژن‌های کدکننده مقاومت از جمله بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و کارباپنمازها را کسب نماید. طغیان‌های عفونت‌های ناشی از کلبسیلا اکسی‌توکا مقاوم به چنددارو (MDR) یک خطر بالقوه برای بیماران بستری در بیمارستان محسوب می‌شود (۹). طغیان‌های عفونت مرتبط با مراقبت‌های ویژه ناشی از کلبسیلا اکسی‌توکا اغلب مرتبط با آلودگی مخازن محیطی از قبیل ضدعفونی‌کننده‌ها، ویال‌های multidose یا parenteral fluid bags، humidifiers و ونتیلاتورها است. سینک‌های دستشویی در بیمارستان‌های شلوغ ممکن است به عنوان مخزن کلبسیلا اکسی‌توکا عمل نمایند و انتقال شخص به شخص از بیماری به بیمار دیگر از طریق پرسنل به دیگر بیماران و بخش‌ها رخ می‌دهد. انتقال سویه‌های کلبسیلا اکسی‌توکا در بیمارستان به نظر می‌رسد که هم از طریق سینک‌ها و هم از طریق بیماران کلونیزه شده یا عفونی‌شده با این ارگانیسم رخ دهد. همچنین ظهور ارگانیسم‌های تولیدکننده کاربابنم در بین انتروباکتریاسه توجه زیادی را به خود جلب کرده است. کلونیزاسیون با انتروباکتریاسه‌های تولیدکننده برای ماه‌ها یا سال‌ها می‌تواند ادامه داشته باشد (۱۱-۹). کلبسیلا اکسی‌توکا تولیدکننده توکسین به عنوان عامل ایجادکننده بیماری شناخته شده است همچنین پیشنهاد شده است که این باکتری مرتبط با اسهال مرتبط با آنتی‌بیوتیک غیرهموراژیک و کولیت شدید مرتبط با درمان آنتی‌بیوتیکی است (۱۲ و ۱۳).

کاربابنم‌ها به عنوان اولین خط درمانی برای درمان عفونت‌های شدید ایجادشونده به وسیله باکتری‌های گرم منفی مقاوم به چنددارو (MDR) به ویژه سویه‌های تولیدکننده سطوح بالایی از سفالوسپورینازهای AmpC یا بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌باشند. متأسفانه استفاده زیاد و گسترده از کاربابنم‌ها منجر به ظهور سویه‌های انتروباکتریاسه مقاوم به چند دارو شده است (۱۴). ظهور و گسترش انتروباکتریاسه‌های تولیدکننده کاربابنمازها یک تهدید جدی در مدیریت عفونت‌های بیمارستانی است. در گزارشی سویه‌ای از کلبسیلا اکسی‌توکا تولیدکننده OXA-48 بتالاکتاماز (کلاس D) کاربابنماز شناسایی گردیده است (۱۵). این مقاومت تهدید بزرگی برای درمان عفونت‌ها است و تولید کاربابنمازها مهم‌ترین مکانیسم ملکولی برای اهداف اپیدمیولوژیک و بالینی است. گزارش‌هایی از کلبسیلا اکسی‌توکا تولیدکننده KPC وجود دارد (۱۶). با توجه به استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در ایران و افزایش خطر

مقاومت دارویی، و اینکه در ایران کمتر مطالعه‌ای بر روی باکتری کلبسیلا اکسی‌توکا انجام شده است، اهدف 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 دست آوردن کد ارگانیسم 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 ارائه‌شده 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 جداشده 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 مولرهینتون آگار انجام و پس از انکوباسیون محیط‌ها در دمای ۲ ± ۳۵ 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 به‌عنوانAmpC-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.

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 سفتازیدیم (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 (٪)
جنتامایسین	۸۲/۹	۱۷/۱
آمیکاسین	۸۸/۶	۱۱/۴
سفپیم	۸۵/۷	۱۴/۳
سفتازیدیم	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، سفتازیدیم 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 کلبسیلا اکسی‌توکا

الگو	آنتی‌بیوتیک‌ها	تعداد
۱	جنتامایسین، آمیکاسین، سفپیم، سفتازیدیم	۳
۲	جنتامایسین، سفوکسیتین، سفتازیدیم	۱
۳	سیپروفلوکساسین، سفپیم، سفتازیدیم	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، سفتازیدیم 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	سفتازیدیم، جنتامایسین
۲	ایمی‌پنم، کلیستین، جنتامایسین، آمیکاسین، سفتازیدیم	سیپروفلوکساسین
۳	سیپروفلوکساسین، ایمی‌پنم، کلیستین، جنتامایسین، آمیکاسین، سفتازیدیم	-
۴	سیپروفلوکساسین، ایمی‌پنم، کلیستین، جنتامایسین، آمیکاسین، سفتازیدیم	-

بحث

کلبسیلا اکسی‌توکا یک ارگانیسم گرم منفی از میکروبیاتا 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 اکسی‌توکا مقاومت طبیعی به پنی‌سیلین‌ها نشان می‌دهد (۱۸). مشخص شده است که این باکتری می‌تواند سایتوتوکسین‌هایی تولید نماید. در سال‌های اخیر سویه‌های مقاوم به چنددارو کلبسیلا اکسی‌توکا به عنوان یک مشکل مهم در سیستم مراقبت‌های بهداشتی مطرح است (۱۹ و ۲۰). الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی که به نظر می‌رسد به‌طور قابل ملاحظه‌ای بین سویه‌های مختلف کلبسیلا اکسی‌توکا متفاوت باشد. سویه‌های کلبسیلا اکسی‌توکا به واسطه تولید بتالاکتامازها به آمینوپنی‌سیلین‌ها و کربوکسی‌پنی‌سیلین‌ها مقاوم هستند. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان می‌دهد که همه سویه‌های مورد بررسی به آمپی‌سیلین مقاوم هستند. مقاومت به آموکسی‌سیلین کلاولانات در برخی سویه‌ها مشاهده شده است. الگوی مقاومت در سویه‌های کلبسیلا اکسی‌توکا که از منابع غیر انسانی ایزوله شده‌اند نشان می‌دهد که نه تنها به آمپی‌سیلین، سفالوتین، آموکسی‌کلاوولانات بلکه به تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، انروفلوکساسین و جنتامایسین مقاوم هستند. درصد بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های جداشده از پریمات‌های غیرانسانی ممکن است نشان دهنده استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌ها در حیوانات باشد (۴ و ۲۱). این مقاومت می‌تواند از مسیرهای مختلف به انسان‌ها منتقل گردند.

در مطالعه ما بیشترین مقاومت به سفتازیدیم مشاهده شد به‌طوری که ۲۰ درصد ایزوله‌ها به این دارو مقاوم بودند. تمام سویه‌های مورد مطالعه به کاربانم‌ها (ایمی‌پنم) حساس بودند. در بررسی‌های صورت گرفته توسط پیتوت (Pitout) و همکاران در سال ۲۰۰۹ در کشور کانادا همه سویه‌های مورد بررسی به ایمی‌پنم، سفپیم، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین حساس بوده‌اند (۲۲) که در مقایسه با مطالعه ما نتایج آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم مشابه است اما در مقابل ۸۵/۷ درصد ایزوله‌های ما به سفپیم، ۸۵/۷ درصد به سیپروفلوکساسین 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 اکسی‌توکا 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 آنتی‌بیوتیکی 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 اکسی‌توکا 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 اکسی‌توکا 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 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 کاربانپم‌ها در بین باکتری‌های گرم منفی بیمارستانی از جمله اعضاء انتروباکتریاسه 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 کاربانپم‌ها امکان‌پذیر است اما باید توجه داشت که کاربانپم‌ها جزء آخرین خط‌های درمانی هستند که جهت درمان عفونت‌های ناشی از انتروباکتریاسه استفاده می‌شوند و اگر مقاومت به آن‌ها ایجاد شود شاهد افزایش مرگ ومیر 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 سالخوردگان، 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

بهتر 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

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 مواجه با بیماران، همه آزمایشگاه‌های میکرروب شناسی بالینی باید توجه داشته باشند که ایزوله‌های کلبسیلا تحت عنوان کلی .Klebsiella spp 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.

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 Microbial 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 β-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 β-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 β-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.Abbaspour 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.

ISMJ 2016;19(2): 194-202

Original Article

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

M. Nassari [1,2*], J. Mardaneh [3*], Z. Hosseinzadeh [4]

[1] Department of Microbiology, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
[2] Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
[3] Department of Microbiology, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran
[4] 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 β-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-lactamasec was performed by cefepime and cefoxitin 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, cefoxitin, 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-gerneration cephalosprins 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