

بررسی نقش کلبسیلا اکسی توکا در کولیت ناشی از مصرف آنتی بیوتیک و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های بالینی

سپیده خداپرست^۱، دکتر سید فضل‌اله موسوی^۲، دکتر فرشته شاهچراغی^۳، دکتر محمد یوسف علیخانی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر، کلبسیلا اکسی توکا به عنوان عامل کولیت هموراژیک وابسته به آنتی بیوتیک (Antibiotic-associated hemorrhagic colitis) شناخته شده است. این عارضه اغلب بعد از درمان آنتی بیوتیکی توسط داروهای بتالاکتام، کوینولون‌ها و سفالوسپورین‌ها که در درمان بیماری‌های عفونی و در تمام سنین مورد استفاده قرار می‌گیرند، مشاهده می‌شود. هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان شیوع کلبسیلا اکسی توکا در افراد مبتلا به کولیت و تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در سویه‌های ایزوله شده بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی توصیفی تحلیلی، بیماران بستری در بیمارستان که سابقه‌ی مصرف آنتی بیوتیک را به مدت ۱ هفته تا ۲ ماه قبل از شروع اسهال یا اسهال خونی داشتند، بررسی شدند. شناسایی سویه‌های کلبسیلا اکسی توکا با استفاده از تست‌های استاندارد میکروبی شناسی بر روی نمونه‌ی مدفوع صورت گرفت. باکتری‌های ایزوله‌شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت ردیابی ژن اختصاصی کلبسیلا اکسی توکا (Polygalacturonase pehX gene) و با روش PCR (Polymerase chain reaction) تأیید شدند. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده با روش استاندارد دیسک دیفیوژن آگار بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد و نتایج بر اساس توصیه‌های (Clinical and laboratory standards institute) CLSI ارزیابی شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، ۳۱۱ نمونه‌ی مدفوع از بیماران مبتلا به اسهال یا اسهال خونی در مدت ۱۸ ماه (خرداد ۱۳۹۰ لغایت دی ماه ۱۳۹۱) بررسی شد. تعداد ۴۰ سویه کلبسیلا اکسی توکا با روش‌های استاندارد میکروبی شناسی جدا و با روش PCR تأیید شدند. شیوع کلبسیلا اکسی توکا در بین کودکان ۵۲/۵ درصد، زنان ۲۲/۵ درصد و مردان ۲۵ درصد بود. ۳۰/۶ درصد سویه‌های کلبسیلا اکسی توکا از بیماران مبتلا به اسهال خونی و ۶۹/۴ درصد از بیماران مبتلا به اسهال با سابقه‌ی مصرف آنتی بیوتیک ایزوله گردید. حساسیت ایزوله‌های بالینی کلبسیلا اکسی توکا نسبت به آنتی بیوتیک‌های آمیکاسین، ارتاپنم، ایمپنم و مروپنم به ترتیب ۹۸، ۹۸، ۹۳ و ۹۰ درصد بود. باکتری‌های ایزوله‌شده به ترتیب دارای بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های آموکسی سیلین (۸۵ درصد)، آمپی سیلین (۸۰ درصد)، تیکارسیلین (۵۵ درصد)، و کوتریموکسازول (۳۰ درصد) بود.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که عفونت با کلبسیلا اکسی توکا در بیماران مبتلا به کولیت وابسته به آنتی بیوتیک همراه با اسهال و یا اسهال خونی باید مورد توجه بیشتر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: کولیت وابسته به آنتی بیوتیک، کولیت هموراژیک، کلبسیلا اکسی توکا، مقاومت آنتی بیوتیکی، ژن pehX

ارجاع: خداپرست سپیده، موسوی سید فضل‌اله، شاهچراغی فرشته، علیخانی محمد یوسف. بررسی نقش کلبسیلا اکسی توکا در کولیت ناشی

از مصرف آنتی بیوتیک و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های بالینی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۳۸): ۷۴۶-۷۳۷

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبی شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان. همدان، ایران

۲- استادیار، بخش میکروبی شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- استاد، بخش میکروبی شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه میکروبی شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان. همدان، ایران

مقدمه

کولیت عارضه‌ای است که با ظهور اسهال و تجمع سلول‌های پلی موفونوکلئر در قسمت لامینا پروپریای کولون مشخص می‌گردد (۱). از انواع کولیت با منشأ باکتریال می‌توان به کولیت وابسته به آنتی بیوتیک (Antibiotic-associated colitis) اشاره کرد. عامل این نوع کولیت، سویه‌های تولیدکننده‌ی توکسین کلستریدیوم دیفیسیل است که موجب کولیت با غشای کاذب (Pseudomembranous colitis) در کولون می‌گردد (۲). کولیت هموراژیک وابسته به آنتی بیوتیک فرم مشخصی از کولیت است که عامل ایجادکننده‌ی آن کلستریدیوم دیفیسیل نیست. این بیماری با اسهال خونی ناگهانی شروع می‌گردد و با دردهای شدید شکمی همراه است (۳). کولیت هموراژیک ناشی از آنتی بیوتیک (Antibiotic-associated hemorrhagic colitis) برای اولین بار در سال ۱۹۷۸ گزارش شد (۴). مشخص شده است که این نوع کولیت به طور معمول هم‌زمان و یا بعد از درمان با داروهای بتالاکتام، کوئینولون‌ها و سفالوسپورین‌ها اتفاق می‌افتد. برعکس کولیت وابسته به آنتی بیوتیک، احتمال می‌رود کولیت هموراژیک ناشی از آنتی بیوتیک به طور خود به خود، بعد از قطع درمان آنتی بیوتیکی رفع گردد (۴). مکانیزم‌های متفاوتی مانند واکنش‌های آلرژیک (۴)، ایسکمی مخاطی (۵)، عفونت با کلبسیلا اکسی توکا (*Klebsiella oxytoca*) و یا عوامل ویروسی (۶-۵) به عنوان علت ایجاد این عارضه پیشنهاد می‌شود.

کلبسیلا اکسی توکا یک باسیل گرم منفی است که در مدفوع بیماران مبتلا به کولیت هموراژیک وابسته به آنتی بیوتیک یافت می‌شود، اگر چه این باکتری از

مدفوع افراد سالم هم جداسازی می‌شود (۷). در مطالعات مختلف به نقش کلبسیلا اکسی توکا به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده‌ی کولیت هموراژیک ناشی از مصرف آنتی بیوتیک اشاره شده است (۷-۸). مشخص شده است که سویه‌های کلبسیلا اکسی توکای جدا شده از این بیماران و ۵۰ درصد سویه‌های جدا شده از افراد سالم سیتوتوکسینی (۹-۱۰) تولید می‌کنند که قادر به القای مرگ سلولی در کشت سلول‌های اپیتلیال می‌باشد (۴). تأیید تشخیص کولیت هموراژیک به وسیله‌ی کشت کلبسیلا اکسی توکا و اثبات وجود کولیت ناحیه‌ی راست کولون می‌تواند مانع از انجام معاینات تهاجمی به خصوص در کودکان دچار اسهال خونی گردد (۳).

در درمان عفونت‌های کلبسیلابی داروی خط اول درمان سفالوسپورین‌ها هستند. در صورت بروز مقاومت به سفالوسپورین‌ها می‌توان از آمینوگلیکوزیدها (به طور معمول جنتامایسین)، فلوروکینولون‌ها (مثل سیپروفلوکساسین)، پپراسیلین و یا کرباپنم‌ها استفاده کرد (۱۱). امروزه بروز مقاومت باکتریایی نه تنها در مورد کلبسیلا بلکه در مورد تمامی باکتری‌ها بسیار مورد بحث می‌باشد. به خصوص که با ظهور کلبسیلاهایی که قادر به هیدرولیز سفالوسپورین‌ها (۱۲) و حتی کرباپنم‌ها (۱۲-۱۳) هستند، جامعه‌ی علمی را نسبت به راه کارهای درمانی بسیار محتاط نموده است. با توجه به این امر که مطالعه‌ی جامعی در مورد کلبسیلا اکسی توکا در ارتباط با کولیت ناشی از مصرف آنتی بیوتیک در کشور ما انجام نشده است، هدف از انجام این پژوهش بررسی شیوع کلبسیلا اکسی توکا در بیماران بستری مبتلا به کولیت و یا کولیت

هموراژیک ناشی از مصرف آنتی بیوتیک می باشد.

روش ها

در این مطالعه‌ی توصیفی تحلیلی، جمعیت مورد مطالعه، بیماران بستری در بیمارستان مبتلا به اسهال یا اسهال خونی بودند. این مطالعه در طی مدت ۱۸ ماه (خرداد ۱۳۹۰ لغایت دی ماه ۱۳۹۱) با نمونه‌گیری از بیماران بستری در مراکز درمانی بیمارستان میلاد، مرکز تحقیقات کبد و گوارش بیمارستان طالقانی، مرکز طبی کودکان و بیماران بستری در بیمارستان شریعتی شهر تهران که نمونه‌ی مدفوع آن‌ها برای انجام تست تشخیصی کلستریدیوم دیفیسیل به درمانگاه تخصصی داخلی مسعود ارسال شده بود و یا بیماران بستری در دیگر مراکز درمانی تهران که نمونه‌ی مدفوع آن‌ها برای تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل به دانشکده‌ی بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران ارسال گردیده بود، انجام گرفت.

نمونه‌گیری از مدفوع بیمارانی انجام شد که سابقه‌ی مصرف آنتی بیوتیک در حدود ۱ هفته تا ۲ ماه قبل از شروع اسهال داشتند. سابقه‌ی مصرف آنتی بیوتیک توسط این بیماران شامل سابقه‌ی درمان با آنتی بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مانند پنی سیلین، کاربامپن‌ها مانند ایمپنم و مروپنم، سفالوسپورین‌ها شامل سفتریاکسون و سفنازیدیم و آمینوگلیکوزیدها مانند جنتامایسین و آمیکاسین بود.

تعداد ۳۳۱ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند، که بر اساس وجود و یا عدم وجود اسهال و سابقه‌ی مصرف آنتی بیوتیک توسط بیمار مطابق با مطالعه‌ی انجام شده در کشور اتریش (۳)، به ۴ گروه تقسیم بندی شدند: ۲۵۹ بیمار که درمان آنتی بیوتیکی داشتند و مبتلا

به اسهال بودند (A^+D^+)، ۳۹ بیمار که درمان آنتی بیوتیکی داشتند و دچار اسهال نشده بودند (A^+D^-)، ۳۰ بیمار که درمان آنتی بیوتیکی نداشتند اما مبتلا به اسهال بودند (AD^+) و ۳ بیماری که درمان آنتی بیوتیکی نداشتند و مبتلا به اسهال نیز نبودند (AD^-).

برای جداسازی و تعیین هویت باکتری، نمونه‌ی مدفوع بیماران در ظرف نمونه‌گیری مدفوع جمع‌آوری شد و یک سوپ از نمونه به محیط کری بلر انتقال داده شد. مشخصات ظاهری نمونه، قوام، اطلاعات مربوط به سن و جنس بیمار، آنتی بیوتیک مصرف شده و مدت زمان مصرف آن در برگه‌ی پرسشنامه ثبت گردید. نمونه‌های مدفوع منتقل شده با کری بلر در بخش میکروبی شناسی انستیتو پاستور ایران بر روی محیط مک کانکی آگار (Merck, Germany) کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه گردید. کلنی‌های لاکتوز مثبت با تست‌های بیوشیمیایی اندول، سیمون سیترات، لیزین دکربوکسیلاز، TSI (Triple Sugar Iron)، تست مصرف مالونات و [Beta (β)-GALACTOSIDASE] ONPG از نظر وجود کلبسیلا اکسی توکا بررسی شدند (۱۴).

استخراج DNA با روش جوشاندن (Boiling) انجام شد. برای این کار ابتدا ۳ تا ۵ کلنی از هر نمونه داخل ویال اپندورف حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد و سپس ورتکس گردید. ویال‌ها مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی گراد فریزر قرار گرفتند و سپس لوله‌ها را به مدت ۲۰ دقیقه در داخل بن ماری جوش (۱۰۰ درجه سانتی گراد) قرار دادند و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند.

تهیه شد. وجود محصول PCR با اندازه‌ی ۳۴۴ جفت باز توسط سائز مارکر DNA (Pars Toos Co, Iran) مثبت تلقی شد.

جهت تعیین حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک‌های آمیکایسین، آمپی سیلین، آمپی سیلین/سولباکتام، آزترونام (Aztreonam)، سفوتاکسیم، سفپیم (Cefepime)، ارتاپنم (Ertapenem)، سیپروفلوکسازین، سفتازیدیم، سفتریاکسون، جتتامایسین، آموکسی سیلین، کوتریموکسازول، ایمپنم، مروپنم (Meropenem)، مینوسیکلین، نتیل میسین (Netilmicin)، ریفامپیسین، تیکارسیلین، توبرامایسین (Mast Co, England) از دیسک دیفیوژن آگار به روش Kirby-Bauer بر روی پلیت مولر هیتون آگار (Merck, Germany) استفاده شد (۱۷). حساسیت و مقاومت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک‌های استفاده شده مطابق با دستورالعمل استاندارد CLSI تفسیر گردید (۱۸).

داده‌های جمع‌آوری شده به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون χ^2 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. سطح معنی داری آماری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از تعداد ۳۳۱ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از بیماران پس از انجام تست‌های میکروبی و افتراقی بیوشیمیایی، تعداد ۵۷ مورد کلبسیلا اکسی توکا جداسازی شدند. از ۵۷ سویه کلبسیلا اکسی توکا ایزوله شده با آزمون‌های بیوشیمیایی، تعداد ۴۰ سویه (۱۲/۱ درصد) از نظر دارا بودن ژن اختصاصی *pehX* با روش PCR مورد تأیید قرار گرفتند (شکل ۱).

محلول رویی (سوپرناتانت) ویال‌ها، برای انجام واکنش PCR (Polymerase chain reaction) مورد استفاده قرار گرفت (۱۵).

باسیل‌های گرم منفی و لاکتوز مثبت که با آزمایش‌های بیوشیمیایی به عنوان کلبسیلا اکسی توکا تعیین هویت گردیدند با استفاده از ردیابی ژن *pehX* (Polygalacturonase *pehX* gene) که اختصاصی گونه‌ی کلبسیلا اکسی توکا می‌باشد، با روش PCR تأیید شدند (۱۶). بعد از استخراج DNA، آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شامل PEH-C:5'-GATACGGAGTATGCCTTTACGGTG-3' PEH-D:5'-TAGCCTTTATCAAGCGGATACTGG-3' انجام گرفت (۱۶). جهت انجام آزمایش مخلوط واکنش (Pars Toos Co, Iran) شامل ۱/۵ میلی مولار MgCl₂، ۲/۵ میکرولیتر بافر X ۱، ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۰/۲ پیکومول از هر پرایمر، یک واحد آنزیم Taq پلیمرز و ۳ میکرولیتر از DNA الگو در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید (۱۶).

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکر (Eppendorf AG 22331) بدین شرح انجام شد: دو دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سانتی گراد، سپس ۳۵ سیکل شامل ۲۰ ثانیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی گراد، ۲۰ ثانیه در ۵۹ درجه‌ی سانتی گراد، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد و در نهایت یک سیکل ۱۰ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد انجام گرفت (۱۶). سویه‌ی *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182 از بخش کلکسیون میکروبی انستیتو پاستور ایران به عنوان شاهد مثبت و یک لوله محتوی تمام اجزای مخلوط واکنش و فاقد DNA الگو به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. محصول PCR الکتروفورز گردید و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید از آن عکس

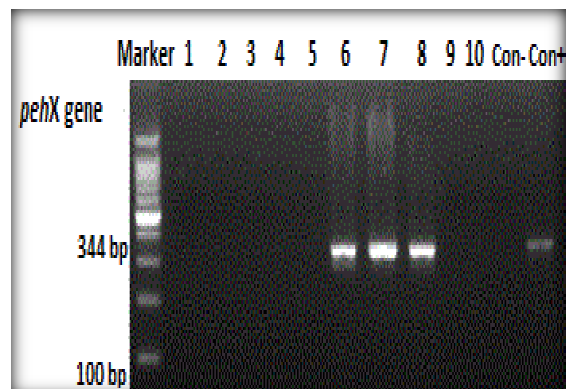
جدول ۱. توزیع فراوانی کلبسیلا اکسی توکا در بیماران بر حسب

سن و جنس

جنس	فراوانی (درصد) تعداد
کودکان (زیر ۱۵ سال)	۲۱ (۵۲/۵)
زنان (۱۵ تا ۷۵ سال)	۹ (۲۲/۵)
مردان (۱۵ تا ۷۵ سال)	۱۰ (۲۵)

از ۳۶ بیمار مربوط به گروه اول (A^+D^+) که سابقه‌ی مصرف آنتی بیوتیک داشتند و مبتلا به اسهال بودند، ۱۱ سویه (۳۰/۶ درصد) کلبسیلا اکسی توکا از بیماران مبتلا به اسهال خونی و در مقایسه ۲۵ سویه (۶۹/۴ درصد) از بیماران مبتلا به اسهال آبکی با سابقه‌ی مصرف آنتی بیوتیک ایزوله گردید. میزان شیوع کلبسیلا اکسی توکا در گروه‌های مختلف بیماران ارتباط معنی دار آماری نشان نداده است.

نتایج الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی مشخص کرد، که حساسیت ایزوله‌های بالینی کلبسیلا اکسی توکا نسبت به آنتی بیوتیک‌های آمیکاسین، ارتاپنم، ایمپنم و مروپنم به ترتیب ۹۷/۵، ۹۷/۵، ۹۷/۵ و ۹۲/۵ درصد بود. باکتری‌های جدا شده به ترتیب دارای بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک‌های آموکسی سیلین (۸۵ درصد)، آمپی سیلین (۸۰ درصد)، تیکارسیلین (۵۵ درصد) و کوتریموکسازول (۳۰ درصد) بودند (جدول ۳).



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن *pehX* ردیف‌های ۱ تا ۵ و ۹ و ۱۰ باکتری‌های دیگر غیر از کلبسیلا اکسی توکا، ردیف‌های ۶ تا ۸ سویه‌های کلبسیلا اکسی توکا، Con^- شاهد منفی و Con^+ سویه استاندارد *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182 به عنوان شاهد مثبت همراه با مارکر ۱۰۰ جفت باز

شیوع ایزوله‌های بالینی کلبسیلا اکسی توکا در کودکان (محدوده‌ی سنی کمتر از ۱۵ سال) بیشتر از بزرگسالان بوده است. همچنین، شیوع عفونت در مردان نسبت به زنان به میزان بالاتری مشاهده شده است (جدول ۱).

نتایج به دست آمده نشان داد که از ۴۰ بیمار که دارای کلبسیلا اکسی توکا بودند، تعداد ۳۶ بیمار (A^+D^+ درصد) در گروه A^+D^+ ، ۲ بیمار در گروه A^+D^- ، ۲ بیمار در گروه A^-D^+ قرار داشتند. باکتری از بیماران گروه A^-D^- ایزوله نشد (جدول ۲).

جدول ۲. توزیع فراوانی عوامل باکتریال جدا شده از نمونه مدفوع بیماران مورد مطالعه

تعداد کل تعداد (درصد)	تقسیم‌بندی گروه‌های بیماران				باکتری جدا شده
	A^+D^+ تعداد (درصد)	A^+D^- تعداد (درصد)	A^-D^+ تعداد (درصد)	A^-D^- تعداد (درصد)	
۴۰ (۱۲/۱)	۳۶ (۱۳/۹)	۲ (۵/۲)	۲ (۶/۷)	۰ (۰)	کلبسیلا اکسی توکا
۴۶ (۱۳/۸)	۳۹ (۱۵/۱)	۲ (۵/۲)	۵ (۱۶/۷)	۱ (۳۳/۳)	کلبسیلا به غیر از گونه‌ی اکسی توکا
۲۴۵ (۷۴/۱)	۱۸۴ (۷۱/۰)	۳۵ (۱۹/۶)	۲۳ (۷۶/۶)	۲ (۶۶/۶)	سایر باکتری‌ها
۳۳۱	۲۵۹	۳۹	۳۰	۳	تعداد کل

جدول ۳. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های بالینی کلپسیلا اکسی توکا

آنتی بیوتیک (میکروگرم)	مقاوم (درصد) تعداد	حدوسط (درصد) تعداد	حساس (درصد) تعداد
آمیکاسین (۳۰)	۰ (۰)	۱ (۲/۵)	۳۹ (۹۷/۵)
آمپی سیلین (۱۰)	۳۲ (۸۰/۰)	۴ (۱۰/۰)	۴ (۱۰/۰)
آمپی سیلین / سولباکتام (۲۰)	۱۰ (۲۵/۰)	۳ (۷/۵)	۲۷ (۶۷/۵)
آز ترو نام (۳۰)	۷ (۱۷/۵)	۲ (۵/۰)	۳۱ (۷۷/۵)
آموکسی سیلین (۲۵)	۳۴ (۸۵/۰)	۱ (۲/۵)	۵ (۱۲/۵)
سفیم (۳۰)	۷ (۱۷/۵)	۲ (۵/۰)	۳۱ (۷۷/۵)
سفوتا کسیم (۳۰)	۱۱ (۲۷/۵)	۳ (۷/۵)	۲۶ (۶۵/۰)
سفتازیدیم (۳۰)	۹ (۲۲/۵)	۴ (۱۰/۰)	۲۷ (۶۷/۵)
سفتریکسون (۳۰)	۹ (۲۲/۵)	۳ (۷/۵)	۲۸ (۷۰/۰)
سیپروفلوکساسین (۵)	۶ (۱۵/۰)	۲ (۵/۰)	۲۸ (۸۰/۰)
کو تریمو کسازول (۲۵)	۱۲ (۳۰/۰)	۱ (۲/۵)	۲۷ (۶۷/۵)
ارتاپنم (۱۰)	۱ (۲/۵)	۰ (۰)	۳۹ (۹۷/۵)
جتتامایسین (۱۰)	۵ (۱۲/۵)	۰ (۰)	۳۵ (۸۷/۵)
ایمی پنم (۱۰)	۰ (۰)	۳ (۷/۵)	۳۷ (۹۲/۵)
مروپنم (۱۰)	۱ (۲/۵)	۳ (۷/۵)	۳۶ (۹۰/۰)
مینومایسین (۳۰)	۶ (۱۵/۰)	۱۸ (۴۵/۰)	۱۶ (۴۰/۰)
نیمایسین (۳۰)	۲ (۵/۰)	۵ (۱۲/۵)	۳۳ (۸۲/۵)
تیکارسیلین (۷۵)	۲۲ (۵۵/۰)	۱۰ (۲۵/۰)	۸ (۲۰/۰)
تایجی سایکلین (۱۵)	۰ (۰)	۱۰ (۲۵/۰)	۳۰ (۷۵/۰)
توبرامایسین (۱۰)	۱۰ (۲۵/۰)	۱۴ (۳۵/۰)	۱۶ (۴۰/۰)

بحث

به تازگی کلپسیلا اکسی توکا به عنوان عامل کولیت هموراژیک وابسته به آنتی بیوتیک شناسایی شده است. این فرم از اسهال وابسته به مصرف آنتی بیوتیک در غیاب کلستریدیوم دیفیسیل به وجود می آید. اما اهمیت نقش این باکتری در ایجاد کولیت غیر هموراژیک وابسته به آنتی بیوتیک مورد مطالعه قرار نگرفته است. کولیت هموراژیک ناشی از آنتی بیوتیک بیشتر در کودکان و افرادی که درمان آنتی بیوتیکی به خصوص آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام داشته‌اند، دیده می‌شود؛ در صورتی که کولیت ناشی از کلستریدیوم

دیفیسیل بیشتر در بزرگسالان و بیماران بستری در بیمارستان مشاهده می‌شود (۵، ۳). در مطالعه‌ای در اتریش که بر روی ۳۸۵ فرد سالم انجام شد، ۶ مورد کلپسیلا اکسی توکا گزارش گردید (۳). این مطالعه با مقایسه‌ی نتایج با نتایج یک مطالعه در فرانسه که شیوع ۹ درصدی این باکتری را نشان داده بود، پیشنهاد داد که شیوع این باکتری می‌تواند وابسته به ناحیه‌ی زیستی باشد (۳). در مطالعه‌ای در چین موردی از اسهال خونی دیده شد که در آن بیمار بعد از درمان با آموکسی سیلین دچار کولیت هموراژیک شده بود (۱۹).

روبرو کرده است. با توجه به افزایش سوبه‌های مقاوم از یک سو و بالا رفتن میزان مرگ و میر ناشی از بیماری‌های عفونی از سوی دیگر، پزشکان و محققین مراکز تحقیقاتی کلیه‌ی کشورها ملزم به شناخت مکانیسم‌های مقاومت در باکتری‌ها هستند (۲۰). در مطالعه‌ی ما میزان حساسیت به آمیکاسین، آزترونام، سفپیم، سفنازیدیم، سفتریاکسون، سپروفلوکساسین، کوتریموکسازول، جتتامایسین، نیتمایسین و تایچی‌سایکلین در مقایسه با مطالعات انجام‌شده در اتریش، ژاپن، هلند، چین و هند شباهت داشت (۲۲-۲۱، ۱۸، ۷، ۳).

در مطالعه‌ای در ترکیه حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های دسته‌ی کارباپنم مانند ایمپنم، مروپنم و ارتاپنم به ترتیب ۹۹/۳، ۹۸/۶ و ۱۰۰ درصد بود (۲۳). در مطالعه‌ی ما نتایج حساسیت به ایمپنم، مروپنم و ارتاپنم درصد کمی از مقاومت به کارباپنم‌ها را نشان داد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست‌آمده لازم است به نقش کلبسیلا اکسی توکا در ایجاد کولیت‌های ناشی از آنتی‌بیوتیک توجه بیشتری شود و همچنین به عنوان یکی از عوامل باکتریایی دیگر به غیر از کلاستریدیوم دیفیسیل در ایجاد اسهال ناشی از آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته شود. نقش این باکتری در ایجاد اسهال ناگهانی و یا اسهال خونی متعاقب درمان آنتی‌بیوتیکی در بیماران بستری و یا حتی در افرادی که درمان آنتی‌بیوتیکی نداشتند، قابل توجه و ردیابی است. اثبات نحوه‌ی پاتوژنز این باکتری با ردیابی سیتوتوکسین باکتری با روش کشت سلولی و استفاده

در مطالعه‌ی ما از تعداد ۳۳۱ بیمار مورد مطالعه در مجموع تعداد ۴۰ سوبه (۱۲/۱ درصد) کلبسیلا اکسی توکا با استفاده از روش‌های میکروبیولوژی و مولکولی مورد تأیید قرار گرفتند. این تعداد در مقایسه با مطالعات دیگر در سایر کشورها درصد بالاتری را، هر چند به طور ناچیز، نشان می‌دهد. طبق مطالعات انجام‌شده در سایر کشورها میزان شیوع کلبسیلا اکسی توکا در حدود ۷-۱۰ درصد گزارش شده است (۶).

در این مطالعه، توزیع فراوانی کلبسیلا اکسی توکا در میان گروه‌های سنی و از نظر جنس مورد بررسی قرار گرفت. به علاوه شیوع کلبسیلا اکسی توکا در کودکان (میانگین سنی زیر ۱۵ سال) بیشتر بود. همچنین فراوانی باکتری در مردان بالاتر بود. نتایج مطالعه‌ای در یک مرکز کودکان در اتریش بر اهمیت ابتلا به کلبسیلا اکسی توکا در میان کودکان، تشخیص و پیگیری کولیت خونی در آن‌ها و نیز اهمیت نتایج کشت مدفوع را مورد تأکید قرار داد (۳).

نتایج مطالعه‌ی ما مانند برخی مطالعات پیشین، فرضیه‌ی بیماری‌زا بودن کلبسیلا اکسی توکا را حتی در افرادی که آنتی‌بیوتیک دریافت نکرده بودند تأیید کرد (۴).

طبق نتایج به دست‌آمده، میزان شیوع کلبسیلا اکسی توکا در اسهال خونی و اسهال معمولی متعاقب مصرف آنتی‌بیوتیک قابل توجه بود. همچنین مواردی از حضور کلبسیلا اکسی توکا در کولیت بدون مصرف آنتی‌بیوتیک نیز دیده شد که این مسأله اهمیت کلبسیلا اکسی توکا را در ایجاد اسهال جدی‌تر می‌نماید.

امروزه مقاومت باکتری‌های گرم منفی، درمان بیماری‌های عفونی را در سطح جهانی با مشکل

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پایان نامه‌ی دانشجویی کارشناسی ارشد بود. محققین از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به دلیل تأمین هزینه‌های طرح و کارکنان بیمارستان‌ها، بخش میکروب‌شناسی انستیتو پاستور ایران، بخش میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان و مرکز تحقیقات کبد و گوارش بیمارستان طالقانی شهر تهران به دلیل همکاری در انجام این تحقیق، کمال تشکر را دارند.

از مدل حیوانی فرصت بحث‌های بیشتری را فراهم می‌نماید. انجام روش‌های تشخیصی کشت میکروبیولوژی و تأیید ژن داخلی باکتری به روش PCR از ملزومات تشخیص کلبسیلا اکسی توکا می‌باشد. به علاوه توزیع فراوانی کلبسیلا اکسی توکا در بیماران بستری به خصوص در کودکان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. همچنین یافتن راه حل مناسبی برای درمان و تعیین فراوانی سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها و در نظر گرفتن الگوی درمانی مناسب در بهبود درمان مؤثر خواهد بود.

References

1. Carpenter HA, Talley NJ. The importance of clinicopathological correlation in the diagnosis of inflammatory conditions of the colon: histological patterns with clinical implications. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(4): 878-96.
2. Song HJ, Shim KN, Jung SA, Choi HJ, Lee MA, Ryu KH, et al. Antibiotic-associated diarrhea: candidate organisms other than *Clostridium difficile*. *Korean J Intern Med* 2008; 23(1): 9-15.
3. Zollner-Schwetz I, Hogenauer C, Joainig M, Weberhofer P, Gorkiewicz G, Valentin T, et al. Role of *Klebsiella oxytoca* in antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 2008; 47(9): e74-e78.
4. Beaugerie L, Metz M, Barbut F, Bellaiche G, Bouhnik Y, Raskine L, et al. *Klebsiella oxytoca* as an agent of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1(5): 370-6.
5. Gorkiewicz G. Nosocomial and antibiotic-associated diarrhoea caused by organisms other than *Clostridium difficile*. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33(Suppl 1): S37-S41.
6. Hogenauer C, Langner C, Beubler E, Lippe IT, Schicho R, Gorkiewicz G, et al. *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *N Engl J Med* 2006; 355(23): 2418-26.
7. Shinjoh M, Iwata S, Takahashi T. *Klebsiella oxytoca*-positive, penicillin-associated hemorrhagic enterocolitis in children. *Pediatr Int* 2010; 52(1): 132-3.
8. Hogenauer C, Hammer HF, Krejs GJ, Reisinger EC. Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1998; 27(4): 702-10.
9. Higaki M, Chida T, Takano H, Nakaya R. Cytotoxic component(s) of *Klebsiella oxytoca* on HEp-2 cells. *Microbiol Immunol* 1990; 34(2): 147-51.
10. Minami J, Saito S, Yoshida T, Uemura T, Okabe A. Biological activities and chemical composition of a cytotoxin of *Klebsiella oxytoca*. *J Gen Microbiol* 1992; 138(9): 1921-7.
11. Babouee B, Widmer AF, Dubuis O, Ciardo D, Droz S, Betsch BY, et al. Emergence of four cases of KPC-2 and KPC-3-carrying *Klebsiella pneumoniae* introduced to Switzerland, 2009-10. *Euro Surveill* 2011; 16(11).
12. Gaibani P, Ambretti S, Berlingeri A, Gelsomino F, Bielli A, Landini MP, et al. Rapid increase of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a large Italian hospital: surveillance period 1 March - 30 September 2010. *Euro Surveill* 2011; 16(8).
13. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, et al. Distribution of bla(TEM), bla(SHV), bla(CTX-M) genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. *Microb Drug Resist* 2010; 16(1): 49-53.
14. Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. 12th ed. Philadelphia, PA. Mosby Elsevier; 2007.
15. Shojapour M, Shariati L, Karimi A, Zamanzad B. Prevalence of TEM-1 type beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains

- isolated from burn infections using Duplex PCR in Shahrekord, 2008. *J Arak Univ Med Sci* 2011; 14(54): 55-61. [In Persian].
16. Kovtunovych G, Lytvynenko T, Negrutska V, Lar O, Brisse S, Kozyrovska N. Identification of *Klebsiella oxytoca* using a specific PCR assay targeting the polygalacturonase *pehX* gene. *Res Microbiol* 2003; 154(8): 587-92.
17. Zhang Y, Zhou H, Shen XQ, Shen P, Yu YS, Li LJ. Plasmid-borne *armA* methylase gene, together with *blaCTX-M-15* and *blaTEM-1*, in a *Klebsiella oxytoca* isolate from China. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt 10): 1273-6.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute USA (CLSI); 2013.
19. Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De MR, et al. Emergence of *ArmA* and *RmtB* aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(3): 459-64.
20. Joainig MM, Gorkiewicz G, Leitner E, Weberhofer P, Zollner-Schwetz I, Lippe I, et al. Cytotoxic effects of *Klebsiella oxytoca* strains isolated from patients with antibiotic-associated hemorrhagic colitis or other diseases caused by infections and from healthy subjects. *J Clin Microbiol* 2010; 48(3): 817-24.
21. Van KE, Westerdaal NA, Willers JM. New, simple medium for selective recovery of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* from human feces. *J Clin Microbiol* 1984; 20(5): 936-41.
22. Lal P, Kapil A, Das BK, Sood S. Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* sp. isolated from a tertiary care hospital. *Indian J Med Res* 2007; 125(2): 173-8.
23. Kuzucu C, Yetkin F, Gorgec S, Ersoy Y. Investigation of the susceptibilities of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. strains to ertapenem and other carbapenems. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(1): 28-35. [In Turkish].

The Role of *Klebsiella Oxytoca* in Antibiotic-Associated Colitis and Determination of Antibiotic-Sensitivity Pattern in Clinical Isolates

Sepideh Khodaparast MSc¹, Sayed Fazlollah Mousavi PhD², Fereshteh Shahcheraghi PhD³,
Mohammad-Yousef Alikhani PhD⁴

Original Article

Abstract

Background: *Klebsiella oxytoca* is recently described as the causative organism for antibiotic-associated hemorrhagic colitis. The condition occurs mainly after treating with beta-lactamase antibiotics, cephalosporins, quinolone which is frequently used in the treatment of infectious diseases of all ages. The patients with hemorrhagic colitis typically have abdominal pain and almost always, bloody diarrhea. The aim of this study was to determine the prevalence of *Klebsiella oxytoca* in patient with colitis and the of antibiotic-sensitivity pattern in clinical isolates.

Methods: In this cross-sectional study, population consisted of hospitalized patients with the history of diarrhea or dysentery and taking antibiotics for 1 week to 2 months. Fecal samples were collected, inoculated into Cary-Blair transport medium and transferred to the microbiology laboratory of Pasteur Institute (Iran). *Klebsiella oxytoca* strains were identified by standard microbiology tests. Isolated bacteria using specific primers for polygalacturonase (*pehX*) gene were confirmed by polymerase chain reaction (PCR). The antibiotic resistance patterns of isolates were investigated using Kirby-Bauer disk diffusion method on Muller-Hinton agar and the results were evaluated according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) recommendations.

Findings: 311 stool specimens from patients with diarrhea or bloody diarrhea during 18 months (June 2011 to January 2013) were studied. Forty strains of *Klebsiella oxytoca* isolated by microbiology standard methods and were confirmed by PCR. The prevalence of *Klebsiella oxytoca* was 52.5% among children, 22.5% among women and 25% among men. Out of 40 isolates, 30.6% was isolated from the patients with dysentery compared to 69.4% from the patients with diarrhea and history of taking antibiotics. The results of antibiotic susceptibility pattern revealed that clinical isolates of *Klebsiella oxytoca* shown high sensitivity to amikacin (98%), ertapenem (98%), imipenem (93%) and meropenem (93%). The most resistance were to amoxicillin (85%), ampicillin (80%), ticarcillin (55%), and cotrimoxazole (30%).

Conclusion: The results indicated that infection with *Klebsiella oxytoca* in patients with antibiotic-associated colitis or hemorrhagic colitis should be considered further.

Keywords: Antibiotic-associated colitis, Hemorrhagic colitis, Antibiotic resistance, *pehX* gene

Citation: Khodaparast S, Mosavi SF, Shahcheraghi F Alikhani MY. **The Role of *Klebsiella Oxytoca* in Antibiotic-Associated Colitis and Determination of Antibiotic-Sensitivity Pattern in Clinical Isolates.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(238): 737-46

1- Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Corresponding Author: Mohammad-Yousef Alikhani PhD, Email: alikhani@umsha.ac.ir