مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۳۸/هفته چهارم تیر ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۲۴

بررسی نقش کلبسیلا اکسی‌توکا در کولیت ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی 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 اکسی‌توکا به عنوان عامل کولیت هموراژیک وابسته به آنتی‌بیوتیک (Antibiotic-associated hemorrhagic colitis) شناخته شده است. این عارضه اغلب بعد از درمان آنتی‌بیوتیکی 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 اکسی‌توکا در افراد مبتلا به کولیت و تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های ایزوله شده بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی توصیفی تحلیلی، بیماران بستری در بیمارستان که سابقه‌ی مصرف آنتی‌بیوتیک را به مدت ۱ هفته تا ۲ ماه قبل از شروع اسهال یا اسهال خونی داشتند، بررسی شدند. شناسایی سویه‌های کلبسیلا اکسی‌توکا با استفاده از تست‌های استاندارد میکروب‌شناسی بر روی نمونه‌ی مدفوع صورت گرفت. باکتری‌های ایزوله‌شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت ردیابی ژن اختصاصی کلبسیلا اکسی‌توکا (Polygalacturonase pehX gene) و با روش PCR (Polymerase chain reaction) تأیید شدند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده با روش استاندارد دیسک دیفیوژن آگار بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد و نتایج بر اساس توصیه‌های CLSI (Clinical and laboratory standards institute) 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 اکسی‌توکا با روش‌های استاندارد میکروب‌شناسی جدا و با روش PCR تأیید شدند. شیوع کلبسیلا اکسی‌توکا در بین کودکان ۵۲/۵ درصد، زنان ۲۲/۵ درصد و مردان ۲۵ درصد بود. ۳۰/۶ درصد سویه‌های کلبسیلا اکسی‌توکا از بیماران مبتلا به اسهال خونی و ۶۹/۴ درصد از بیماران مبتلا به اسهال با سابقه‌ی مصرف آنتی‌بیوتیک ایزوله گردید. حساسیت ایزوله‌های بالینی کلبسیلا اکسی‌توکا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، ارتاپنم، ایمی‌پنم و مروپنم به ترتیب ۹۸، ۹۸، ۹۳ و ۹۰ درصد بود. باکتری‌های ایزوله‌شده به ترتیب دارای بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین (۸۵ درصد)، آمپی‌سیلین (۸۰ درصد)، تیکارسیلین (۵۵ درصد)، و کوتریموکسازول (۳۰ درصد) بود.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست‌آمده نشان داد که عفونت با کلبسیلا اکسی‌توکا در بیماران مبتلا به کولیت وابسته به آنتی‌بیوتیک همراه با اسهال و یا اسهال خونی باید مورد توجه بیشتر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: کولیت وابسته به آنتی‌بیوتیک، کولیت هموراژیک، کلبسیلا اکسی‌توکا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن pehX

ارجاع: خداپرست سپیده، موسوی سید فضل‌اله، شاهچراغی فرشته، علیخانی محمد یوسف. **بررسی نقش کلبسیلا اکسی‌توکا در کولیت ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های بالینی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۳۸): ۷۴۶-۷۳۷

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۲- استادیار، بخش میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- استاد، بخش میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمد یوسف علیخانی
Email: alikhani@umsha.ac.ir

مقدمه

کولیت عارضه‌ای است که با ظهور اسهال و تجمع سلول‌های پلی‌موفونوکلئر در قسمت لامینا پروپریای کولون مشخص می‌گردد (۱). از انواع کولیت با منشأ باکتریال می‌توان به کولیت وابسته به آنتی‌بیوتیک (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 آنتی‌بیوتیک 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 آنتی‌بیوتیک (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 آنتی‌بیوتیک، احتمال می‌رود کولیت هموراژیک ناشی از آنتی‌بیوتیک به طور خود به خود، بعد از قطع درمان آنتی‌بیوتیکی رفع گردد (۴). مکانیزم‌های متفاوتی مانند واکنش‌های آلرژیک (۴)، ایسکمی مخاطی (۵)، عفونت با کلبسیلا اکسی‌توکا (Klebsiella oxytoca) و یا عوامل ویروسی (۶-۵) به عنوان علت ایجاد این عارضه پیشنهاد می‌شود.

کلبسیلا اکسی‌توکا یک باسیل گرم منفی است که در مدفوع بیماران مبتلا به کولیت هموراژیک وابسته به آنتی‌بیوتیک یافت می‌شود، اگر چه این باکتری از مدفوع افراد سالم هم جداسازی می‌شود (۷). در مطالعات مختلف به نقش کلبسیلا اکسی‌توکا به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده‌ی کولیت هموراژیک ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک اشاره شده است (۸-۷). مشخص شده است که سویه‌های کلبسیلا اکسی‌توکای جدا شده از این بیماران و ۵۰ درصد سویه‌های جدا شده از افراد سالم سیتوتوکسینی (۱۰-۹) تولید می‌کنند که قادر به القای مرگ سلولی در کشت سلول‌های اپیتلیال می‌باشد (۴). تأیید تشخیص کولیت هموراژیک به وسیله‌ی کشت کلبسیلا اکسی‌توکا 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 کلبسیلایی داروی خط اول درمان سفالوسپورین‌ها هستند. در صورت بروز مقاومت به سفالوسپورین‌ها می‌توان از آمینوگلیکوزیدها (به طور معمول جنتامایسین)، فلوروکینولون‌ها (مثل سیپروفلوکساسین)، پیپراسیلین 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 (۱۳-۱۲) هستند، جامعه‌ی علمی را نسبت به راه کارهای درمانی بسیار محتاط نموده است. با توجه به این امر که مطالعه‌ی جامعی در مورد کلبسیلا اکسی‌توکا در ارتباط با کولیت ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک در کشور ما انجام نشده است، هدف از انجام این پژوهش بررسی شیوع کلبسیلا اکسی‌توکا در بیماران بستری مبتلا به کولیت و یا کولیت

هموراژیک ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک می‌باشد.

روش‌ها

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 آنتی‌بیوتیک در حدود ۱ هفته تا ۲ ماه قبل از شروع اسهال داشتند. سابقه‌ی مصرف آنتی‌بیوتیک توسط این بیماران شامل سابقه‌ی درمان با آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مانند پنی‌سیلین، کاربا‌پنم‌ها مانند ایمی‌پنم و مروپنم، سفالوسپورین‌ها شامل سفتریاکسون و سفتازیدیم 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 انجام‌شده در کشور اتریش (۳)، به ۴ گروه تقسیم‌بندی شدند: ۲۵۹ بیمار که درمان آنتی‌بیوتیکی داشتند و مبتلا به اسهال بودند (A^+D^+)، ۳۹ بیمار که درمان آنتی‌بیوتیکی داشتند و دچار اسهال نشده بودند (A^+D^-)، ۳۰ بیمار که درمان آنتی‌بیوتیکی نداشتند اما مبتلا به اسهال بودند (A^-D^+) و ۳ بیماری که درمان آنتی‌بیوتیکی نداشتند و مبتلا به اسهال نیز نبودند(A^-D^-).

برای جداسازی و تعیین هویت باکتری، نمونه‌ی مدفوع بیماران در ظرف نمونه‌گیری مدفوع جمع‌آوری شد و یک سواپ از نمونه به محیط کری بلر انتقال داده شد. مشخصات ظاهری نمونه، قوام، اطلاعات مربوط به سن و جنس بیمار، آنتی‌بیوتیک مصرف‌شده و مدت زمان مصرف آن در برگه‌ی پرسشنامه ثبت گردید. نمونه‌های مدفوع منتقل‌شده با کری بلر در بخش میکروب‌شناسی انستیتو پاستور ایران بر روی محیط مک کانکی آگار (Merck, Germany) کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد 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 ONPG [Beta (β)-GALACTOSIDASE] از نظر وجود کلبسیلا اکسی‌توکا 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 سانتی‌گراد 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.

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 اکسی‌توکا تعیین هویت گردیدند با استفاده از ردیابی ژن pehX (Polygalacturonase pehX gene) که اختصاصی گونه‌ی کلبسیلا اکسی‌توکا 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 میلی‌مولار MgCl2، ۲/۵ میکرولیتر بافر X ۱، ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۰/۲ پیکومول از هر پرایمر، یک واحد آنزیم Taq پلیمراز و ۳ میکرولیتر از DNA الگو در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید (۱۶).

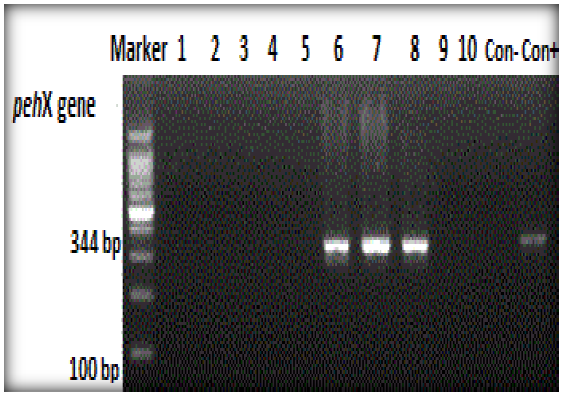
واکنش PCR در دستگاه ترموسایکر (Eppendrof AG 22331) بدین شرح انجام شد: دو دقیقه در ۹۵ درجه ی سانتی‌گراد، سپس ۳۵ سیکل شامل ۲۰ ثانیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه در ۵۹ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد و در نهایت یک سیکل ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گرفت (۱۶). سویه‌ی 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 تهیه شد. وجود محصول PCR با اندازه‌ی ۳۴۴ جفت باز توسط سایز مارکر DNA (Pars Toos Co, Iran) مثبت تلقی شد.

جهت تعیین حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، آمپی‌سیلین، آمپی‌سیلین/سولباکتام، آزترونام (Aztrenam)، سفوتاکسیم، سفپیم (Cefepime)، ارتاپنم (Ertapenem)، سیپروفلوکسازین، سفتازیدیم، سفتریاکسون، جنتامایسین، آموکسی‌سیلین، کوتریموکسازول، ایمی‌پنم، مروپنم (Meropenem)، مینوسیکلین،نتیل میسین (Netilmicin)، ریفامپیسین، تیکارسیلین، توبرامایسین (Mast Co, England) از دیسک دیفیوژن آگار به روش Kirby-Bauer بر روی پلیت مولر هینتون آگار (Merck, Germany) استفاده شد (۱۷). حساسیت و مقاومت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استفاده‌شده مطابق با دستورالعمل استاندارد CLSI تفسیر گردید (۱۸).

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

یافته‌ها

از تعداد ۳۳۱ نمونه مدفوع جمع‌آوری‌شده از بیماران پس از انجام تست‌های میکروبی و افتراقی بیوشیمیایی، تعداد ۵۷ مورد کلبسیلا اکسی‌توکا جداسازی شدند. از ۵۷ سویه کلبسیلا اکسی‌توکا ایزوله‌شده 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).



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

شیوع ایزوله‌های بالینی کلبسیلا اکسی‌توکا 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 دست‌آمده نشان داد که از ۴۰ بیمار که دارای کلبسیلا اکسی‌توکا بودند، تعداد ۳۶ بیمار (۱۳/۹ 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 ۱. توزیع فراوانی کلبسیلا اکسی‌توکا 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 آنتی‌بیوتیک داشتند و مبتلا به اسهال بودند، ۱۱ سویه (۳۰/۶ درصد) کلبسیلا اکسی‌توکا از بیماران مبتلا به اسهال خونی و در مقایسه ۲۵ سویه (۶۹/۴ درصد) از بیماران مبتلا به اسهال آبکی با سابقه‌ی مصرف آنتی‌بیوتیک ایزوله گردید. میزان شیوع کلبسیلااکسی‌توکا در گروه‌های مختلف بیماران ارتباط معنی‌دار آماری نشان نداده است.

نتایج الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی مشخص کرد، که حساسیت ایزوله‌های بالینی کلبسیلا اکسی‌توکا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، ارتاپنم، ایمی‌پنم و مروپنم به ترتیب ۹۷/۵، ۹۷/۵، ۹۲/۵ و ۹۰ درصد بود. باکتری‌های جداشده به ترتیب دارای بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی سیلین (۸۵ درصد)، آمپی‌سیلین (۸۰ درصد)، تیکارسیلین (۵۵ درصد) و کوتریموکسازول (۳۰ درصد) بودند (جدول ۳).

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

باکتری جداشده	تقسیم‌بندی گروه‌های بیماران				تعداد کل (درصد) تعداد
	A^-D^- (درصد) تعداد	A^-D^+ (درصد) تعداد	A^+D^- (درصد) تعداد	A^+D^+ (درصد) تعداد	
کلبسیلا اکسی توکا	۰ (۰)	۲ (۶/۷)	۲ (۵/۲)	۳۶ (۱۳/۹)	۴۰ (۱۲/۱)
کلبسیلا به غیر از گونه‌ی اکسی توکا	۱ (۳۳/۳)	۵ (۱۶/۷)	۲ (۵/۲)	۳۹ (۱۵/۱)	۴۶ (۱۳/۸)
سایر باکتری‌ها	۲ (۶۶/۶)	۲۳ (۷۶/۶)	۳۵ (۸۹/۶)	۱۸۴ (۷۱/۰)	۲۴۵ (۷۴/۱)
تعداد کل	۳	۳۰	۳۹	۲۵۹	۳۳۱

جدول ۳. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های بالینی کلبسیلا اکسی‌توکا

آنتی بیوتیک (میکروگرم)	مقاوم (درصد) تعداد	حدوسط (درصد) تعداد	حساس (درصد) تعداد
آمیکاسین (۳۰)	۰ (۰)	۱ (۲/۵)	۳۹ (۹۷/۵)
آمپی‌سیلین (۱۰)	۳۲(۸۰/۰)	۴ (۱۰/۰)	۴ (۱۰/۰)
آمپی‌سیلین/سولباکتام (۲۰)	۱۰ (۲۵/۰)	۳ (۷/۵)	۲۷ (۶۷/۵)
آزترونام (۳۰)	۷(۱۷/۵)	۲ (۵/۰)	۳۱ (۷۷/۵)
آموکسی‌سیلین (۲۵)	۳۴ (۸۵/۰)	۱(۲/۵)	۵ (۱۲/۵)
سفپیم (۳۰)	۷(۱۷/۵)	۲ (۵/۰)	۳۱ (۷۷/۵)
سفوتاکسیم (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)
کوتریموکسازول (۲۵)	۱۲ (۳۰/۰)	۱ (۲/۵)	۲۷ (۶۷/۵)
ارتاپنم (۱۰)	۱ (۲/۵)	۰ (۰)	۳۹ (۹۷/۵)
جنتامایسین (۱۰)	۵ (۱۲/۵)	۰ (۰)	۳۵ (۸۷/۵)
ایمی‌پنم (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)
نتیمایسین (۳۰)	۲ (۵/۰)	۵ (۱۲/۵)	۳۳ (۸۲/۵)
تیکارسیلین (۷۵)	۲۲ (۵۵/۰)	۱۰ (۲۵/۰)	۸ (۲۰/۰)
تایجی‌سایکلین (۱۵)	۰ (۰)	۱۰ (۲۵/۰)	۳۰ (۷۵/۰)
توبرامایسین (۱۰)	۱۰ (۲۵/۰)	۱۴ (۳۵/۰)	۱۶ (۴۰/۰)

بحث

به تازگی کلبسیلا اکسی‌توکا به عنوان عامل کولیت هموراژیک وابسته به آنتی‌بیوتیک شناسایی شده است. این فرم از اسهال وابسته به مصرف آنتی‌بیوتیک در غیاب کلستریدیوم دیفیسیل به وجود می‌آید. اما اهمیت نقش این باکتری در ایجاد کولیت غیر هموراژیک وابسته به آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه قرار نگرفته است. کولیت هموراژیک ناشی از آنتی‌بیوتیک بیشتر در کودکان و افرادی که درمان آنتی‌بیوتیکی به خصوص آنتی‌بیوتیک‌های 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 کلبسیلااکسی‌توکا 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 آموکسی‌سیلین دچار کولیت هموراژیک شده بود (۱۹).

در مطالعه‌ی ما از تعداد ۳۳۱ بیمار مورد مطالعه در مجموع تعداد ۴۰ سویه (۱۲/۱ درصد) کلبسیلا اکسی‌توکا 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 اکسی‌توکا در حدود ۱۰-۷ درصد گزارش شده است (۶).

در این مطالعه، توزیع فراوانی کلبسیلا اکسی‌توکا در میان گروه‌های سنی و از نظر جنس مورد بررسی قرار گرفت. به علاوه شیوع کلبسیلا اکسی‌توکا 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 اکسی‌توکا 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 اکسی‌توکا را حتی در افرادی که آنتی‌بیوتیک دریافت نکرده بودند تأیید کرد (۴).

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

امروزه مقاومت باکتری‌های گرم منفی، درمان بیماری‌های عفونی را در سطح جهانی با مشکل روبرو کرده است. با توجه به افزایش سویه‌های 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، سفتازیدیم، سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین، کوتریموکسازول، جنتامایسین، نتیمایسین و تایجی‌سایکلین 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 ایمی‌پنم، مروپنم و ارتاپنم به ترتیب ۹۹/۳، ۹۸/۶ و ۱۰۰ درصد بود (۲۳). در مطالعه‌ی ما نتایج حساسیت به ایمی‌پنم، مروپنم و ارتاپنم درصد کمی از مقاومت به کارباپنم‌ها را نشان داد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست‌آمده لازم است به نقش کلبسیلا اکسی‌توکا در ایجاد کولیت‌های ناشی از آنتی‌بیوتیک توجه بیشتری شود و همچنین به عنوان یکی از عوامل باکتریایی دیگر به غیر از کلستریدیوم 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

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 اکسی‌توکا می‌باشد. به علاوه توزیع فراوانی کلبسیلا اکسی‌توکا 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 آنتی‌بیوتیک‌ها و در نظر گرفتن الگوی درمانی مناسب در بهبود درمان مؤثر خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پایان‌نامه‌ی 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.

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, Sahm 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-lactmase 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].

Journal of Isfahan Medical School Received: 14.04.2013

Vol. 31, No. 238, 4th Week, July 2013 Accepted: 14.06.2013

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

Sepideh Khodaparast MSc[1], Sayed Fazlollah Mousavi PhD[2], Fereshteh Shahcheraghi PhD[3], Mohammad-Yousef Alikhani PhD[4]

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, *peh*X 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