

تعیین الگوی پلاسمیدی و مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های بالینی اشریشیا کولی جدا شده از بیماران مناطق مختلف شهر کرج

سیده مهسا میرمصطفی^۱ - اعظم حدادی^{۲*} - نور امیرمظفری ثابت^۳

^۱ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران
^۲ استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران
^۳ دانشیار میکروب شناسی، دانشکده علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: در سال های اخیر خطر اکتساب مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها به دلیل سوء مصرف آن ها در حال افزایش است. هدف از این مطالعه، بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و ارزیابی میزان شیوع مقاومت چند دارویی و آنالیز پروفایل پلاسمیدی در سویه های بالینی اشریشیا کولی بود.

مواد و روش ها: این مطالعه بر روی ۸۳ نمونه بالینی اشریشیا کولی جمع آوری شده از سطح شهر کرج انجام شد. نمونه ها، بر اساس آزمون های استاندارد بیوشیمیایی شناسایی شدند. نمونه های تعیین هویت شده، تحت آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی، توسط ۲۰ آنتی بیوتیک، با استفاده از روش انتشار دیسک کربی - بائر قرار گرفتند، همچنین پروفایل پلاسمیدی نمونه ها نیز ارزیابی شد.

یافته ها: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به شرح زیر مشاهده شد: نیتروفورانثونین ۸/۴٪، تتراسایکلین ۶۳/۸٪، آموکسی سیلین ۸۳٪، افلوکساسین ۳۰٪، لوفلوکساسین ۳۰٪، کوتریموکسازول ۵۹٪، آمیکاسین ۱۸٪، ایمپنم ۲۵/۳٪، کلرامفنیکل ۱۶/۹٪، سفالکسین ۶۱/۴٪، جنتامایسین ۲۸/۲٪، نورفلوکساسین ۳۳/۷٪، نالیدیکسیک اسید ۵۶/۶٪، سفالوتین ۴۸/۲٪، سیپروفلوکساسین ۳۲/۵٪، سفنازیدیم ۲۷/۷٪، سفتریاکسون ۳۷/۳٪، سفتری زوکسیم ۱۶/۹٪، سفوتاگسیم ۳۸/۵٪، آموکسی سیلین/کلاونیک اسید ۶۸/۷٪ از ۸۳ نمونه ۹۲/۷۷٪ (۷۷) نمونه به بیش از دو آنتی بیوتیک غیر هم خانواده مقاوم بودند. از ۸۳ نمونه، ۶۵ عدد، (۷۸/۳٪) دارای پلاسمید بودند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان دهنده مقاومت رو به رشد سویه ها، مخصوصا نسبت به آنتی بیوتیک های رده اول تجویزی علیه عفونت ادراری می باشد. همچنین حضور وسیع پلاسمید در سویه ها نقش مهمی در ایجاد مقاومت چند دارویی دارد.

کلمات کلیدی: مقاومت آنتی بیوتیکی، اشریشیا کولی، مقاومت چند دارویی، پلاسمید.

مقدمه

حال توسعه تا اندازه ای حائز اهمیت است که سازمان بهداشت جهانی، روز جهانی بهداشت سال ۲۰۱۱ را، روز مبارزه با مقاومت دارویی نام گذاری کرد (۲۱). امروزه مسئله مقاومت دارویی و عدم تاثیر آنتی بیوتیک ها با سرعت زیادی در حال پیشرفت است (۴). پلاسمید ها عناصر ژنتیکی خارج کروموزومی هستند که یکی از عوامل عمده القای مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها می باشند. مطالعات اپیدمیولوژیکی - مولکولی پلاسمیدهای مقاومت از زمانی که دانشمندان پی به نقش پلاسمیدها در ایجاد مقاومت دارویی برده اند بسیار شایان توجه شده است (۱۲). با گسترش روش های مولکولی و پیشرفت تکنیک خالص سازی پلاسمید از دهه هفتاد قرن گذشته، اهمیت بررسی محتوای

عفونت دستگاه ادراری یکی از شایع ترین بیماری ها، علی الخصوص در کودکان می باشد که نیاز به درمان آنتی بیوتیکی دارد (۲۰). بیشترین عامل عفونت دستگاه ادراری اشریشیا کولی می باشد (۲). دیده شده است که حساسیت آنتی بیوتیکی گونه های اشریشیا کلی متغیر است و در هر مکان جغرافیایی و زمان های مختلف الگوی متفاوتی دارد (۱۲). امروزه پرداختن به مسئله مقاومت دارویی به علت گسترش این مشکل مخصوصا در کشورهای در

آدرس نویسنده مسئول: کرج - انتهای رجائی شهر، تقاطع بلوار شهید
مؤذن و استقلال - دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

Email: haddadi@kiaou.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۸/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۳۰

نتایج

از ۱۰۰ ایزوله جمع آوری شده ۸۳ نمونه، پس از انجام تست های بیوشیمیایی و افتراقی و اختصاصی بعنوان اشریشیا کلی تایید شد. مابقی سویه ها (۳ عدد)، مربوط به جنس کلبسیلا و (۶ عدد)، مربوط به جنس سیتروباکتر بود و مابقی نمونه ها بدلیل عدم کیفیت در بررسی لحاظ نشد. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های جمع آوری شده به صورت زیر بود (جدول ۱)

جدول ۱ - الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های جمع آوری شده

نام آنتی بیوتیک	تعداد سویه های حساس	تعداد سویه های مقاوم	درصد مقاومت	نام آنتی بیوتیک	تعداد سویه های مقاوم	تعداد سویه های مقاوم
نیتروفورانئونین	۷۶	۷	۸/۴٪	تتراسایکلین	۳۰	۵۳
آموکسی سیلین	۱۴	۶۹	۸۳٪	افلوکساسین	۵۸	۲۵
لوفلوکساسین	۵۸	۲۵	۳۰٪	کوتریمو کسازول	۳۴	۴۹
امیکاسین	۶۸	۱۵	۱۸٪	ایمی پنم	۶۲	۲۱
کلرامفنیکل	۶۹	۱۴	۱۶/۹٪	سفالکسین	۳۲	۵۱
جنتامایسین	۶۰	۲۳	۲۸/۲٪	نورفلو کساسین	۵۵	۲۸
نالیدیسیک اسید	۳۶	۴۷	۵۶/۶٪	سفالوتین	۴۳	۴۰
سیپروفلو کساسین	۵۶	۲۷	۳۲/۵٪	سفتازیدیم	۶۰	۲۳
سفتریاکسون	۵۲	۳۱	۳۷/۳٪	سفتی زوکسیم	۶۹	۱۴
سفتواکسیم	۵۱	۳۲	۳۸/۵٪	آموکسی سیلین / کلاونیک اسید	۲۶	۵۷

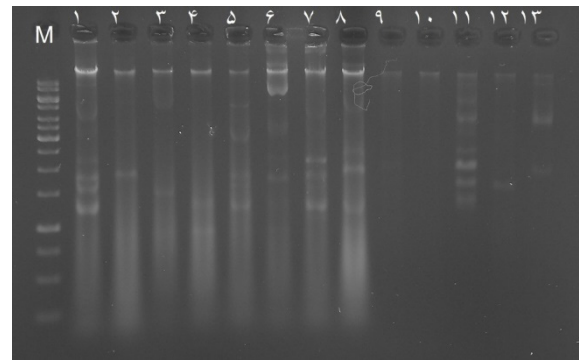
از ۸۳ سویه جمع آوری شده، ۷۷ سویه (۷۷/۹۳٪) به بیشتر از دو آنتی بیوتیک مقاوم بودند Multi-Drug Resistance. از ۸۳ نمونه جمع آوری شده ۶۵ نمونه (۷۸/۳٪)، حاوی پلاسمید بودند. در این مطالعه تنها پلاسمیدهای کوچکی که عمدتاً بصورت باند درخشانی زیر نوار مربوط به DNA کروموزومی بودند مطالعه گردید زیرا احتمال از بین رفتن و شکستن پلاسمیدهای بزرگ در خلال مراحل استخراج پلاسمید و کشت های متوالی و همچنین استوک کردن نمونه ها بسیار بالاست (۱۹). تعداد پلاسمید در سویه ها از ۰ تا ۸ پلاسمید متغیر بود و سویه ها به صورت میانگین حاوی ۲/۸ پلاسمید بودند. ساین بیشتر پلاسمید

پلاسمیدی سویه ها به عنوان ابزاری برای معرفی یک کلون منحصر بفرد افزایش یافته است. اندازه گیری تعداد و اندازه پلاسمید های موجود در هر ایزوله باکتریایی، بررسی پروفایل پلاسمیدی آن ایزوله نام دارد (۹،۱۵،۲۱). هدف از این مطالعه بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های بالینی اشریشیا کلی در بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری در شهر کرج و همچنین بررسی محتوای پلاسمیدی این ایزوله ها می باشد و نظر به این که تا زمان انجام این مطالعه، اطلاعاتی در این باب در شهر کرج به ثبت نرسیده بود نتایج این مطالعه دید خوبی از لحاظ اپیدمیولوژیکی در اختیار پژوهشگران برای مطالعات تکمیلی بعدی می گذارد.

مواد و روش ها

این پژوهش از ابتدای مرداد لغایت دی ماه ۱۳۹۰ صورت گرفت. از بیماران سرپایی و بستری مراجعه کننده به ۴ بیمارستان اصلی و ۲ مرکز خصوصی تشخیص طبی شهر کرج ۱۰۰ ایزوله اشریشیا کلی جمع آوری شد. برای حصول اطمینان از خلوص نمونه ها ابتدا از هر نمونه کشت ایزوله خطی بر روی محیط های EMB و Nutrient agar داده شد، سپس از کلنی های تک ایزوله شده به محیط های افتراقی و اختصاصی انتروباکتریاسه از جمله MR/VP, TSI, SIM, Simmons Citrate تلقیح و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون شد. از کلنی های تک ایزوله شده لام تهیه شد و رنگ آمیزی گرم برای تایید نهایی سویه های اشریشیا کلی انجام شد. تعیین حساسیت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک توسط ۲۰ دیسک (شرکت پادتن طب- ایران) از روش Kirby & Bauer بر اساس رهنمودهای CLSI انجام شد (۱۶). برای کنترل کیفیت دیسک ها از سوش استاندارد اشریشیا کولی ATCC ۲۵۹۲۲ استفاده شد. سویه های خالص و ایزوله شده اشریشیا کولی در محیط BHI Broth حاوی ۱۲٪ گلیسرول در فریزر نگهداری شدند تا مراحل مولکولی روی آن ها انجام شود (۱۶). برای استخراج پلاسمید از سویه ها مراحل استاندارد کشت و آماده سازی انجام شد (۵،۶،۷،۱۹). پلاسمیدها به روش لیز قلیایی توسط کیت (شرکت سیناژن) استخراج شدند و توسط ژل آگارز ۰/۰۸٪ با جریان ۲۰ میلی آمپر به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شدند. DNA Ladder استفاده شده در این پژوهش ۱kb DNA Ladder (شرکت Fermentase) بود.

های استخراج شده به صورت مقایسه با مارکر DNA از ۵/۲ kb تا ۱۰ kb متغیر بود (تصویر ۱). از ۷۷ نمونه مقاوم به چند دارو، ۶۰ نمونه (۷۷/۹٪)، حاوی پلاسمید بودند.



شکل ۱. پروفایل پلاسمیدی ایزوله های *E. Coli* در ژل آگارز ۸/۰٪، چاهک M، مارکر DNA ۱ kb، چاهک های ۱ تا ۱۳، نمونه های *E. coli*

بحث

مکانیسم های مختلفی هستند که به کمک آن ها میکروارگانیسم های مختلف نسبت به دارو مقاوم می شوند. به عنوان مثال: میکروارگانیسم ها آنزیم هایی تولید می کنند که داروی فعال را تخریب می کنند، نفوذ پذیری خود را به دارو تغییر می دهند، یک هدف ساختمانی تغییر یافته برای دارو ایجاد می کنند، با تغییر مسیر متابولیسم، واکنشی که توسط دارو مهار می شود را دور می زنند، آنزیم های تغییر یافته ای می سازند که عمل متابولیسمی خود را انجام می دهد ولی کمتر تحت تأثیر دارو قرار می گیرد (۳). مقاومت کروموزومی در نتیجه یک جهش خود به خودی در یک لوکوس (جایگاه ژنی) که حساسیت یک داروی ضد میکروبی را در بر دارد، رخ می دهد و یک علت ناشایع مقاومت بالینی به دارو در یک بیمار است (۳). بیشترین عامل مقاومت های آنتی بیوتیکی پلاسمیدها هستند که ژن های ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک ها مخصوصا بتالاکتامازها را کد می کنند (۱۳). در این مطالعه، درصد بالایی از سویه ها (۷۷/۹۲٪)، دارای مقاومت چندگانه بودند. چنین مقاومت های دارویی، مشکلات پیچیده ای را برای درمان های تجربی عفونت های ایجاد شده توسط اشریشیاکولی ایجاد می کنند. سطح مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری از کشوری به کشور دیگر متغیر است. به طوریکه در ایالات متحده در سال ۲۰۰۰ و در اسلوانی در سال ۲۰۰۶

و در ایران در سال ۲۰۰۸ درصد سویه های دارای مقاومت چندگانه به ترتیب ۱/۷٪، ۴۲٪ و ۲/۸۲٪ بود (۱۱، ۱۷، ۱۸). براساس مطالعات اسلامی و همکارانش در تهران که بر روی ۱۷۴ نمونه اشریشیاکلی انجام شد، ۵/۸۵٪ از نمونه ها دارای مقاومت چندگانه بودند که کمتر از مطالعه ما (۷۷/۹۲٪) بود (۱). در مطالعات انجام شده توسط گودرزی و همکارانش که بر روی ۲۰۰ نمونه اشریشیاکلی انجام شد، ۱۶۵ نمونه، (۵/۸۲٪) مقاوم به چند دارو بودند و فرکانس مقاومت به ۳، ۴، ۵ و ۶ آنتی بیوتیک و بیشتر به ترتیب ۳۷ (۴/۲۲٪)، ۳۴ (۷/۲۰٪)، ۱۲ (۳/۷٪) و ۴۰ (۲/۲۴٪) بود که نتایج فوق کمتر از نتایج مطالعه ما بود و احتمالاً بدلیل این است که با گذشت زمان فرکانس مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های رایج بیشتر شده (۱۱).

در مطالعه ما (۳/۷۸٪) سویه ها حاوی پلاسمید بودند و در مقایسه با مطالعه ای که توسط فرشاد و همکارانش بر روی ۹۶ سویه یورپاتوژنیک اشریشیاکلی انجام شد و ۷۶ سویه حاوی پلاسمید بودند با میانگین ۵/۵ پلاسمید (۱-۱۰ پلاسمید در هر سویه)، میزان کمتری از پلاسمید را نشان می دهد (۱۰).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹، در هند بر روی سویه های اشریشیاکلی مقاوم به دارو انجام شد ۵۰٪ سویه ها مقاوم به چند دارو بودند و از ۷۶ نمونه بررسی شده از لحاظ پروفایل پلاسمیدی، ۴۰ نمونه (۶/۵۲٪) حاوی پلاسمید بودند که سایز پلاسمیدها بین ۳/۲ تا ۲۶ kb متغیر بود و نتایج حاصل از پژوهش ما کمتر بود و احتمالاً نشانگر میزان بیشتر سوء مصرف آنتی بیوتیک در کشور ما می باشد (۱۲).

با توجه به میزان زیاد مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه ها، نسبت به نتایج به دست آمده از تحقیقات مشابه در سال های اخیر، به نظر می رسد پدیده مقاومت دارویی در کشورهای در حال توسعه با سرعت فزاینده ای رو به افزایش است و همچنین این آمار و ارقام نشان دهنده این است که شهر کرج بعزت نزدیکی به پایتخت و مهاجرپذیری از شهرها و حتی کشورهای مجاور به میزان بسیار زیاد و غیرقابل چشم پوشی با این پدیده مواجه است. تعداد پلاسمیدها ی یافت شده در سویه ها و تعداد زیاد سویه ها ی بتالاکتاماز بیان کننده انتقال این عوامل مقاومت با سرعت بالا یی مابین سویه هاست. تدابیر دقیق دست اندر کار ان بالینی برای تجویز آنتی بیوتیک مناسب و کنترل عفونت و

جلوگيرى از انتشار مقاومت بايد در صدر امور قرار گيرد همچنين تعيين دقيق ژنوتىپى عوامل مقاومت براى مواجهه بهتر با اين عوامل بايد در دستور كار تحقيقات آينده قرار گيرد.

تشكر و قدردانى

بدين وسيله مراتب تقدير و تشكر خود را از مديريت و پرسنل قسمت ميكروبيولوژى آزمايشگاه هاى بيمارستان البرز، قائم، امام خمينى، كسرى و همچنين آزمايشگاه هاى رازى و كاوش كرج اعلام ميداريم.

منابع

- (1) اسلامی گ، سید جواد س، گودرزی ح، فلاح ف، گودرزی م. بررسی شیوع اینتگرون در اشریشیا کلی و کلبسیلا در کودکان مبتلا به عفونت ادراری مقاوم به چند دارو. پژوهش در پزشکی، ۱۳۸۹؛ دوره ۳۴، شماره ۱: ۶۵-۶۱.
- (2) بهروزی آ، رهبر م، وند یوسفی ج. شیوع تولید آنزیم های بتالاکتاماز طیف گسترده در گونه های کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلی جدا شده از نمونه های ادرار در بیمارستان میلاد تهران. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، ۱۳۸۹؛ سال ۴، شماره های ۲ و ۱: ۴۱-۳۶.
- (3) واکر ا، ژنتیک باکتریایی، بهادر ع، علیخانی م، پیری دوگاه ه، طاهری کلان م، منصوری ش، میکروشناسی واکر ترجمه فارسی، تهران، نشر دیباج، ۱۳۸۷، ۸۷-۹۱.
- (4) Alexander J, Mc Adam. Antibiotic Resistance, How Serious is the Problem and what can be done. Clinical Chem, 2012; 58: 1182-1186.
- (5) Ausubel F.M. Current Protocols in Molecular Biology, new York, John Wiley and Sons, 1999.
- (6) Bennett PM. Plasmid Encoded Antibiotic Resistance, Acquisition and Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Bacteria. Br J Pharmacol., 2008 Mar; 153: 347-357
- (7) Bimboim H.C, Doly J. A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. Nucl. Acids. Res, 1979; 7: 1513-1523.
- (8) Bimboim H.C, Doly J. A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. Methods Enzymol, 1983; 100: 243-253.
- (9) Farrar WE Jr. Molecular Analysis of Plasmids in Epidemiologic Investigation. J Infect Dis, 1983; 148:1-6.
- (10) Farshad S, Japoni A, Hosseini M, Low Distribution of Integrin Among Multi Drug Resistance E.coli Strain Isolated From Children With Community-Acquired Urinary Tract Infection in Shiraz, Iran. p j m, 2008; 57: 193-198.
- (11) Gudarzi M, Japoni A, Farshad S, Basiri E, Ziaeyan M, Assay for Integrins and Pattern of Antibiotic Resistance in Clinical Escherichia coli Strains by PCR-RFLP in Southern Iran. Jpn. J. Infect. Dis., 2008; 61 : 85-88.
- (12) Jan N, Meshram S, Kulkarni A, Plasmid Profile Analysis of Multidrug Resistance E.coli Isolated from UTI Patients of Nagpur City, India, Room. Biotechnol. Lett., 2009; 14: 4635-4640.
- (13) Leung E, Weil D, Raviglione M, Nakatania H. The WHO Policy Package to Combat Antimicrobial Resistance. Bull World Health Organ, 2011; 89:390-392.
- (14) Mil A. Evaluation of Isolated Cases of Salmonellosis by Plasmid Profile Analysis, Introduction and Transmission of a Bacterial Clone by Precooked Roastbeef. J Infect Dis, 1983; 148:7-12.
- (15) Orskov F, Orskov I. Summary of a Workshop on the Clone Concept in the Epidemiology, Taxonomy, and Evolution of the Enterobacteriaceae and Otherbacteria. J Infect Dis, 1983; 148:346-57.
- (16) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test, Nccls, 2003; 23: No 1.
- (17) Rijavec M, Starcic Erjavec M, Ambrozic Avgustin J, Reissbrodt R, Fruth A, Krizan-Hergouth V, Zgur-Bertok D. High Prevalence of Multidrug Resistance and Random Distribution of Mobile Genetic Elements Among Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) of the Four Major Phylogenetic Groups. Curr Microbiol, 2006 Aug; 53(2): 158-162.
- (18) Sahm DF, Thornsberry C, Mayfield DC, Jones ME, Karlowsky JA. Multidrug-resistant Urinary Tract Isolates of Escherichia coli, Prevalence and Patient Demographics in the United States in 2000. Antimicrob Agents Chemother, 2001 May; 45(5): 1402-1406.
- (19) Sambrook J, Russell D, Molecular Cloning, A laboratory Manual, 3rd ed, New York, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001, 121-143.
- (20) Sefton A, The Impact of Resistance on the Management of Urinary Tract Infections. Int J Antimicrob Agents, 2001; 16: 489-491.
- (21) Wachsmuth K. Molecular Epidemiology of Bacterial Infections: Examples of Methodology and of Investigations of Outbreaks. Rev Infect Dis, 1986; 8: 682-692.