مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره دوازدهم، پاییز ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

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، دانشگاه 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 - باثر قرار گرفتند ، همچنین پروفایل پلاسمیدی نمونه ها نیز ارزیابی شد.

یافته ها: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به شرح زیر مشاهده شد : نیتروفورانتوئین۸/۴٪، تتراسایکلین۶۳/۸٪، آموکسی سیلین ۸۳٪، افلوکساسین ۳۰٪، لووفلوکساسین ۳۰٪ ،کوتریموکسازول ۵۹٪، آمیکاسین۱۸٪، ایمیپنم ۲۵/۳٪، کلرامفنیکل ۱۶/۹٪، سفالکسین ۶۱/۴٪، جنتامایسین ۲۸/۲٪، نورفلوکساسین۳۳/۷٪، نالیدیکسیک اسید۵۶/۶٪، سفالوتین ۴۸/۲٪، سیپروفلوکساسین ۳۲/۵٪، سفتازیدیم ۲۷/۷٪، سفتریاکسون۳۷/۳٪، سفتی زوکسیم ۱۶/۹٪، سفوتاکسیم۳۸/۵٪، آموکسی سیلین/کلاونیک اسید۶۸/۷٪ 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

عفونت دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها، علی‌الخصوص در کودکان می‌باشد که نیاز به درمان آنتی بیوتیکی دارد (۲۰). بیشترین عامل عفونت دستگاه ادراری اشریشیا کولی می‌باشد(۲). دیده شده است که حساسیت آنتی بیوتیکی گونه های اشریشیا کلی متغیر است و در هر مکان جغرافیایی و زمان های مختلف الگوی متفاتی دارد(۱۲). امروزه پرداختن به مسئله مقاومت دارویی به علت گسترش این مشکل مخصوصا در کشورهای در 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 درایجاد 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

آدرس نویسنده مسئول : کرج - انتهای رجائی شهر ، تقاطع بلوار شهید مودن و استقلال- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
Email : haddadi@kiau.ac.ir
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۸/۲۳
تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۳۰

Archive of SID
www.SID.ir

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 شهرکرج ۱۰۰ ایزوله اشریشیا کلی جمع آوری شد. برای حصول اطمینان از خلوص نمونه ها ابتدا از هر نمونه کشت ایزوله خطی برروی 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 ۲۰دیسک(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 ۰/۸٪ با جریان ۲۰ میلی آمپر به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شدند. DNA Ladder استفاده شده در این پژوهش DNA Ladder ۱kb)شرکت Fermentase (بود.

نتایج

از ۱۰۰ ایزوله جمع آوری شده ۸۳ نمونه، پس از انجام تست های بیوشیمیایی و افتراقی و اختصاصی بعنوان اشریشیا کـلی 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)

جدول۱ - الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های جمع آوری شده

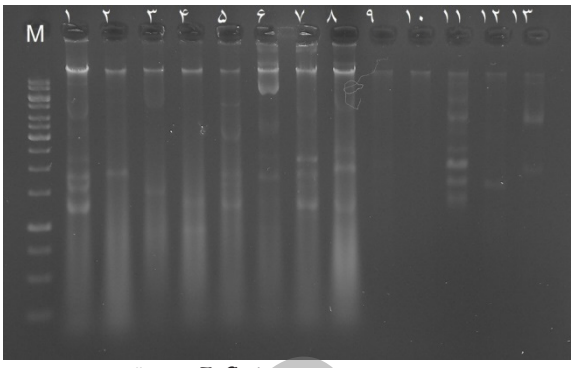
نام آنتی بیوتیک	تعداد سویه های حساس	تعداد سویه های مقاوم	درصد مقاومت	نام آنتی بیوتیک	تعداد سویه های	تعداد سویه های مقاوم
نیتروفورانتوئین	۷۶	۷	٪۸/۴	تتراسایکلین	۳۰	۵۳
آموکسی سیلین	۱۴	۶۹	٪۸۳	افلوکساسین	۵۸	۲۵
لووفلوکساسین	۵۸	۲۵	٪۳۰	کوتریمو کسازول	۳۴	۴۹
آمیکاسین	۶۸	۱۵	٪۱۸	ایمی پنم	۶۲	۲۱
کلرامفنیکل	۶۹	۱۴	٪۱۶/۹	سفالکسین	۳۲	۵۱
جنتامایسین	۶۰	۲۳	٪۲۸/۲	نورفلو کساسین	۵۵	۲۸
نالیدیکسیک 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
سفوتاکسیم	۵۱	۳۲	٪۳۸/۵	آموکسی سیلین/ کلاونیک اسید	۲۶	۵۷

از ۸۳ سویه جمع آوری شده، ۷۷ سویه (٪۷۷/۹۲) 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 عمدتا 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. سایز بیشتر پلاسمید

Archive of SID

www.SID.ir

های استخراج شده به صورت مقایسه با مارکر DNA از kb۵/۲ تا kb۱۰متغیر بود(تصویر۱). 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، مارکرkb DNA۱ ، 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: میکرو ارگانیسم 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 متابولیکی 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 دربین سویه های ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری ازکشوری به کشور دیگر متغیر است. به طوریکه در ایالات متحده در سال ۲۰۰۰ و در اسلوونی درسال 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 احتمالا 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 یوروپاتوژنیک اشریشیاکلی انجام شد و ۷۶ سویه حاوی پلاسمید بودند با میانگین ۵/۵ پلاسمید (۱-۱۰ پلاسمیددرهرسویه)، میزان کمتری از پلاسمید را نشان می دهد(۱۰).

در مطالعه ای که درسال 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 احتمالا 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 درحال توسعه با سرعت فزاینده ای رو به افزایش است و همچنین این آمار و ارقام نشان دهنده این است که شهر کرج بعلت 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 درسویه 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

Archive of SID
www.SID.ir

جلوگیری از انتشار مقاومت باید در صدر امور قرار گیرد همچنین تعیین دقیق ژنوتیپی عوامل مقاومت برای مواجهه بهتر با این عوامل باید در دستور کار تحقیقات آینده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مدیریت و پرسنل قسمت میکروبیولوژی آزمایشگاه های بیمارستان البرز، قائم، امام خمینی، کسری و همچنین آزمایشگاه های رازی و کاوش کرج اعلام میداریم.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

(1) اسلامی گ، سید جوادی 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 تولیدآنزیم های بتالاکتاماز طیف گسترده درگونه های کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلی جداشده ازنمونه های ادرار در بیمارستان میلاد تهران. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، ۱۳۸۹؛ سال۴، شماره های ۱و۲: ۴۱-۳۶.

(3) واکر ا، ژنتیک باکتریایی ، بهادر ع، علیخانی م، پیری دوگاهه ه، طاهری کلان م، منصوری ش، میکروبشناسی واکر ترجمه فارسی، تهران، نشر دیباج، ۱۳۸۷، ۹۱-۸۷.

(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. pj m, 2008; 57: 193-198.
(11) Gudarzi M, Japoni A, Farshad S, Basiri E, Ziaeyan M, Assay for Integrons 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, Raviglionea 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. CurrMicrobiol, 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.

Archive of SID

www.SID.ir