

بررسی فنوتیپی و مولکولی تولید ESBL در بین سویه های اشریشیاکلی جدا شده از زخم های ارتوپدیک بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های اختر و فیروزگر تهران، 90-1389

حسین کیوانی¹، مژده حاکمی والا^{2*}، زهرا طالب نیا چلنبری³، فروزان میرباقری⁴، فاطمه باقری بجستانی⁵

1. ویروس شناس، دانشیار گروه ویروس شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
2. میکروب شناس، استادیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
3. دانشجوی داروسازی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی
4. کارشناس ارشد آزمایشگاه بیمارستان اختر، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
5. کارشناس ارشد میکروب شناسی و عضو هیات علمی گروه میکروبیولوژی واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی

* نشانی برای مکاتبه: تهران، ولنجک، خ کودکیار، دانشکده پزشکی ط 7، تلفن: 23487255، mhakemi@sbm.u.ac.ir

پذیرش برای چاپ: شهریور نود و یک

دریافت مقاله: مرداد نود و یک

چکیده

مقدمه: اشریشیاکلی یکی از اعضا خانواده انتروباکتریاسه است که به وفور از زخم های ارتوپدیک جدا می شود. در حال حاضر مقاومت این باکتری های گرم منفی نسبت به آنتی بیوتیک های رایج و خصوصا سفالوسپورین نسل سوم به دلیل تولید آنزیم بتالاکتامازوسیع الطیف (ESBL) رو به افزایش است و متعاقبا مشکلات درمانی بسیاری را در جهان ایجاد کرده است. بر این اساس در مطالعه حاضر سویه های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های زخم ارتوپدیک از نظر توانایی تولید ESBL در سطح فنوتیپی و مولکولی بررسی شدند. **مواد و روش ها:** در این مطالعه 60 نمونه از زخم بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های اختر و فیروزگر تهران در سالهای 1389 و 1390 در شرایط استریل جمع آوری شد. در ادامه و طبق روش های استاندارد کشت و تعیین جنس و گونه انجام گرفت. مقاومت آنها نسبت به آنتی بیوتیک های رایج با روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید. سویه های مولد ESBL در سطح فنوتیپی با روش DDST/DDT غربالگری شده و در ادامه استخراج DNA در سویه های کاندید با استفاده از کیت انجام شد. فراوانی ژن های *PER-1*، *SHV*، *TEM*، *PER* با روش PCR تعیین شد.

یافته ها: در طی این مطالعه از 60 نمونه زخم بررسی شده 29 مورد اشریشیاکلی (48/3%) جدا شد. مقاومت این باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیکهایی بررسی شده به ترتیب: سفیدوکسیم 41/7%، ازترونام 34/5%، سفالکسین 48/3%، سفنازیدم 51/7%، سفوتاکسیم 68/9%، سفتریاکسون 41/4%، ایمینم 44/8%، سفپیم 44/8%، سفوکسیتین 44/8%، کلرامفنیکل 44/8%، جنتامایسین 48/3%، سیپروفلوکساسین 44/8% بود. 20/6% از سویه ها با روش DDST/DDT مولد ESBL بوده و فراوانی ژن های *PER-1*، *SHV*، *TEM* به ترتیب 33/3%، 33/3% و 50% محاسبه شد.

نتیجه گیری: با توجه به جستجو های انجام شده در اکثر سویه های اشریشیاکلی بررسی شده علت تولید ESBL به دلیل وجود ژنهای *SHV*، *TEM* و *CTX* بود. ژن *PER-1* نیز اکثرا در سودوموناس، اسینتوباکتر و پروتئوس علت تولید ESBL می باشد. در ایران نیز حضور هم زمان این ژن در کنار سایر ژن ها در 7/5% از سویه های کلپسیلا گزارش شده است. با توجه به اطلاعات موجود در مطالعه حاضر وجود ژن *per-1* در سویه های اشریشیاکلی برای اولین بار گزارش شده است. گرچه که تایید نتایج بدست آمده به بکارگیری نمونه های بیشتر، سکانسینگ و مقایسه نتایج با اطلاعات موجود در *data bank* نیازمند است.

واژگان کلیدی: *E. coli*, *PER-1*, *ESBL*

مقدمه

باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها در حال افزایش است که این امر مشکل اساسی را در درمان که معمولا با استفاده از داروهای بتالاکتام و سفالوسپورین ها انجام میگیرد، ایجاد کرده است (2).

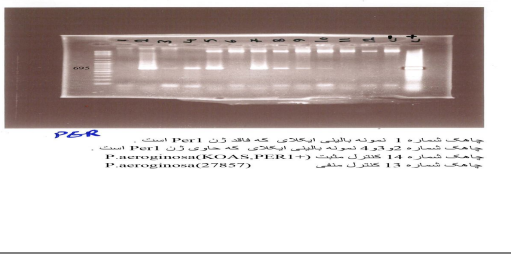
اشریشیاکلی یکی از اعضا خانواده انتروباکتریاسه است که در روده بزرگ انسانها و برخی حیوانات به طور طبیعی یافت می شود. این باکتری یکی از علت های عفونت ارتوپدیک است (1). در سالهای اخیر افزایش مقاومت

یافته ها

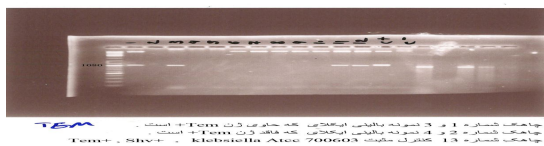
در این مطالعه توصیفی، 60 نمونه زخم از بیماران بستری در بخش ارتوپدی بیمارستان های اختر و فیروزگر انتخاب شد و از آنها 29 مورد (48%) اشریشیا کلی بدست آمد. میزان مقاومت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک هایی بررسی شده به ترتیب:

سفپودوکسیم 41/7%، از ترونام 34/5%، سفالکسین 48/3%، سفنازیدم 51/7%، سفوتا کسیم 68/9%، سفتریاکسون 41/4%، ایمپینم 44/8%، سفیپم 44/8%، سفوکسیتین 18/44% کلرامفنیکل 44/8%، جنتامایسین 48/3%، سیپروفلوکساسین 44/8% بود. 20/7% سویه ها با روش DDST/DDT مولد ESBL بوده و فراوانی ژن های TEM, SHV, PER-1 به ترتیب 33/3%، 33/3% و 50% بودند. نتایج PCR پس از انجام الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید و مشاهده در زیر نور UV تعیین شد. اندازه محصول PCR برای ژنهای PER-1, SHV و TEM به ترتیب 695 bp، 928 bp و 1080 bp بود (شکل 1 تا 3).

شکل شماره 1: مربوط به نتیجه PCR برای ژن Tem



شکل شماره 2: مربوط به PCR ژن SHV



شکل شماره 3: مربوط به PCR ژن Per-1



بحث

در مطالعه میرصالحیان و همکاران که روی 170 نمونه سودوموناس اثرروزینوزاجدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی انجام شد، 67% از سویه های بررسی شده مولد ESBL و 33% دارای ژن PER-1 بودند (8). در مطالعه حاضر فراوانی ژن PER-1 در 50% از سویه های اشریشیا کلی جدا شده و برای اولین بار گزارش گردید. در مطالعه رهبر و همکاران نیز که در بیمارستان میلاد تهران انجام گرفت، 89 نمونه از 44 سرباز عراقی تهیه و کشت داده شد. از این تعداد 32 مورد از نظر کشت منفی و 57 مورد کشت مثبت بودند. فراوان ترین باکتری های گرم منفی جدا شده مربوط به اشریشیا کلی و کلیسیلا (17/5%) هر کدام 10 مورد) بودند. همگی سویه های اشریشیا کلی نسبت به سفالکسین، سفنازیدیم، سفتریاکسون و سفوتاکسیم مقاومت داشتند (9).

در سالهای اخیر بروز مقاومت رو به افزایش نسبت به این داروها ضمن ایجاد اختلال در روند درمان موجب افزایش مدت بستری شدن و بالا رفتن هزینه های درمانی نیز شده است. لذا بررسی مداوم و پیوسته وضعیت مقاومت این باکتری ها نسبت به داروهای رایج امری ضروری می باشد (3 و 4). بر این اساس، در این تحقیق سویه های اشریشیاکلی جدا شده از زخم های ارتوپدیک از نظر توانایی تولید ESBL در سطح فنوتیپی و مولکولی بررسی شدند.

روش کار

در این مطالعه دریک سال (90-1389) 60 نمونه زخم از بیماران بستری در بخش ارتوپدی بیمارستان های اختر و فیروزگر جمع آوری و براساس روش های استاندارد باکتری شناسی (5) مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه نمونه های حاوی اشریشیا کلی براساس روش های استاندارد شناسایی شده و حساسیت یا مقاومت آن ها نسبت به آنتی بیوتیک های سفپودوکسیم، از ترونام، سفالکسین، سفنازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، ایمپینم، سفیپم، سفوکسیتین، کلرامفنیکل، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین (شرکت ROSCO) و با استفاده از روش دیسک دیفیوژن Kirby_Bauer تعیین شد (5). (سویه های مولد ESBL در سطح فنوتیپی با synergistic test; DDST, double disk test; DDT) غربالگری شده و در ادامه استخراج DNA در سویه های کاندید با استفاده از کیت ساخت QIAGEN کشور آلمان انجام شد. فراوانی ژن های SHV, TEM, PER-1 با روش PCR که در ادامه به سکانس پرایمر ها برنامه ها (جدول 1 و 2) اشاره شده است، تعیین شد (6، 7). محصولات تولید شده با روش اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با استفاده از ترانسلومیناتور و در کنار مارکر بررسی شدند. در این مطالعه از باکتری های (700003) K.pneumonia و P.aeruginosa (koasper1+) به عنوان کنترل ESBL منفی و P.aeruginosa (27853) به عنوان کنترل ESBL مثبت استفاده شد.

جدول 1: توالی پرایمر های بکار رفته و اندازه محصولات آن

Gene	Sequence	PCR product (bp)
SHV	F5' ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC R5' TTTATGGCGTTACCTTTGACC	928
TEM	F 5' CCGTGTCCGCCCTTATTCC R5' AGGCACCTATCTCAGCGA(2)	1080
PER1	F5' GCCTGACGATCTGGAACCTT R5' GCCGTCCATCAGCAACA(3)	695

جدول 2: برنامه های PCR استفاده شده

Target gene	PCR program
SHV	Denaturation 95°C 5min Annealing 54.7°C 45s Elongation 72°C 1min 35cycle
TEM	Denaturation 95°C 5min Annealing 57.4°C 45s Elongation 72°C 50s 35cycle
PER	Denaturation 95°C 5min Annealing 57°C 45s Elongation 72°C 1min 35cycle

ژن در کنار سایر ژن ها در 7/5% از سویه های سودوموناس، اسینتوباکتر و پروتئوس گزارش شده است (11). با توجه به اطلاعات موجود در مطالعه حاضر وجود ژن PER-1 در سویه های اشیریشیاکلی برای اولین بار گزارش شده است . گرچه که تایید نتایج بدست آمده به بررسی تعداد نمونه های بیشتر، تعیین توالی و مقایسه نتایج با اطلاعات موجود در databank نیازمند است.

سپاس گزاری

تحقیق فوق به عنوان پایان نامه دانشجویی بوده که با حمایت واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی انجام شده و بدین وسیله از مسئولین ذیربط تشکر می گردد.

در مطالعه حاضر از 60 نمونه زخم بررسی شده 48/3% اشیریشیا کلی جدا شد و بر خلاف مطالعه مذکور میزان مقاومت سویه ها نسبت به سفترایدیم، سفالکسین ، سفتریاکسون، سفو تاکسیم به ترتیب 51/7%، 48/3%، 41/4% و 68/9% بوده است . از دلایل تفاوت در میزان مقاومت سویه های اشیریشیا کلی می توان به تفاوت در وضعیت بیماران بررسی شده ، زمان جنگ و تفاوت جغرافیایی اشاره نمود.

در مطالعه حاضر وضعیت سویه های اشیریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به زخم های ارتوپدی از نظر تولید ESBL بررسی شده و فراوانی ژن PER-1 در این گروه از باکتری ها گزارش شده است. با توجه به جستجوهای انجام شده توانائی تولید ESBL در اکثر سویه های اشیریشیاکلی، به دلیل وجود ژنهای TEM,SHV,CTX بوده است (10 و 6 و 8) در ایران نیز حضور هم زمان این

REFERENCES

1. Benu Dhawan, Srujana Mohanty, B.K. Das , Arti Kapil (2005) Bacteriology of orthopedic wound infections in an Indian Tertiary Care Hospital. Indian J Med Res, 121;784-785
2. Gallini A, Degris E, Desplas M, Bourrel R, Archambaud M, Montastruc JL, Lapeyre_Mestre M, Sommet A (2010). Influence of fluorquinolone consumption in inpatients and outpatients on ciprofloxacin-resistance *Esherichia coli* university hospital. J Antimicrob chemothe, 65(12);2650-7
3. Leek, Lee M A, Lee CH, Lee J, Roh KH, Kim JJ, Koh E, Yong D, Chong Y; the KONSAR group (2010). Increase of ceftazidime Z- and fluorquinolone-Resistance *Klebsiella pneumoniae* and *Imipenem-Resistance Acinetobacter spp.* in Korea: Analysis of KONSAR study Data from 2005 and 2007 Yonsei Medical J, 51(6):901_911
4. Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC (2009). Prevalence of plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants over a 9-Year period; J of Antimicrobi. Chemother 53(2), 639-645.
5. Murray PR ,Jorgenson JH, Tenover FC, Tenover FC, Baron EJ, Pfaller MA (2003). Manual of clinical microbiology, 8th edi, vol I, Mosby.
6. Fen Yao, Yuanshu Qian, Shuzhen Chen, Peifen Wang, and Yuanchun HUANG (2007). Incidence of Extended-Spectrum β -Lactamases and Characterization of Integrons in Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated in Shantou, China . Biochim, Biophys, in(shanghai), 39:527-532
7. Libisch B, Poirel L, Lepsanovic Z, Mirovic V, Balogh B, Pászti J, Hunyadi Z, Dobák A, Füzi M, Nordmann P (2008). Identification of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. FEMS Immunol Med Microbiol, 54(2008)330-338
8. Rahbar M. ,Blackwell N., Yadegarnia D., Mohammadzadeh M (2010). Etiology and drug resistant pattern of osteomyelitis associated with combat -related injuries in Iraqi patients pattern. Shiraz E Medical J, 11(2), 73-78
9. Zhao DN, Xiao YH, Zhang SL, Wang XX (2009). Bacterial composition and resistance from urinary tract infections in females. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 44(1);32-7. { Article in Chinese }.
10. Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, Gouriou S, Picard B, Denamur E (2005). Genetic background of *E. coli* and ESBL type. Emerg Infect Dis, 11(1):54-61 .
11. Nasehi L., Shahcheraghi F, Nikbin V.A.S, Nematizadeh Sh (2010). PER, CTX-M, TEM AND SHV Beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Tehran/ Iran. Iranian Journal of basic Medical science, 13 (14);111-118