

بررسی مقاومت دارویی سویه های E.coli جدا شده از عفونت های ادراری در شهر ایلام به روش دیسک دیفیوژن و پروفایل پلاسمیدی آن ها

رضا محبی^۱، ایرج پاکزاد^{۲*}، نورخدا صادقی فرد^۳، عباس ملکی^۴، حسین ملکی^۵، علی همتیان^۶، سبحان غفوریان^۳

(۱) گروه علوم پایه، دانشکده تحصیلات تکمیلی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

(۲) گروه میکروب شناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

(۳) دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۸۸/۴/۳۰

چکیده

مقدمه: بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیک و پروفایل پلاسمیدی صد نمونه ایزوله اشرشیاکلی جدا شده از عفونت های ادراری در شهر ایلام هدف این مطالعه است.

مواد و روش ها: ایزوله ها با روش های مرسوم تشخیص داده شد. تست حساسیت آنتی بیوتیک به وسیله روش دیسک- دیفیوژن (کربی بائر) براساس معیارهای CLSI انجام گرفت. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت انجام گرفت.

یافته های پژوهش: همه ایزوله ها به مروپنم حساس بودند. میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف به ترتیب ذیل بود: آموکسی سیلین ۸۱ درصد، تتراسایکلین ۶۴ درصد، سیپروفلوکساسین ۲۱ درصد سفپیوم و سفترایدیم ۱۶ درصد، سفتریاکسون، کوتریمکسازول و تورامایسین ۱۵ درصد، جنتامیسین ۱۲ درصد، نیتروفورانتوئین ۵ درصد و آمیکاسین ۱ درصد. مطالعات پروفایل پلاسمیدی نشان داد که ایزوله های E.coli حاوی پلاسمیدهایی با اندازه هایی از ۱/۵ تا ۲۱ کیلو دالتون حمل بودند. ۸۸ درصد ایزوله های E.coli دارای یک پلاسمید عمومی با وزن مولکولی ۲۱ کیلو دالتون بودند که عامل مقاومت به آموکسی سیلین و احتمالاً تتراسایکلین می باشند.

بحث و نتیجه گیری: مروپنم، آمیکاسین، نیتروفورانتوئین، جنتامیسین و سیپروفلوکساسین برای درمان اکثریت عفونت های مجاری ادراری مرتبط با E.coli مناسب هستند. پلاسمید ۲۱ کیلو دالتونی ممکن است در گسترش مقاومت به آموکسی سیلین و تتراسایکلین در این منطقه نقش داشته باشد.

واژه های کلیدی: عفونت ادراری، دیسک دیفیوژن، پروفایل پلاسمیدی، E.coli

*نویسنده مسئول: گروه میکروب شناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام



مقدمه

دست آمد و به وسیله نرم افزار spss15/5 با استفاده از آمار تحلیلی ضریب همبستگی پیرسون که در آن $\alpha = 5\%$ و $N=100$ می باشد رابطه پلاسمیدهای استخراج شده با مقاومت به آنتی بیوتیک ها بررسی شد، سپس با استفاده از آزمون مقایسه ای کای اسکور نتایج این تحقیق با سایر مطالعات انجام شده مقایسه شد.

یافته‌های پژوهش

بعد از انجام آنتی بیوگرام نتایج به دست آمده از مقاومت صد نمونه باکتری E.coli به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه به قرار زیر بوده است: آموکسی سیلین ۸۱ درصد، تتراسایکلین ۶۴ درصد، سیپروفلوکساسین ۲۱ درصد، سفنازیدیم ۱۶ درصد، سفپیم ۱۶ درصد، تورامایسین ۱۵ درصد، سفتریاکسون ۱۵ درصد، کوتریموکسازول ۱۵ درصد، جنتامیسین ۱۲ درصد، نیتروفورانتوئین ۵ درصد، آمیکاسین ۱ درصد و آنتی بیوتیک مروپنم که همه صد نمونه به آن حساس بودند. مقاومت سویه ها به آنتی بیوتیک های مختلف در ده گروه، گروه بندی شد. صد نمونه E.coli دارای ۳۶ نوع پلاسمید مختلف بودند. که پلاسمیدهای استخراج شده با توجه به وزن و وجود در سویه های مختلف در ۱۱ گروه، تیپ بندی شدند. که تعداد این باندها در هر نمونه از یک تا هشت باند متفاوت بود، (تصویر-۱). پلاسمید ۲۱۲۲۶ جفت بازی در ۸۸ درصد از نمونه ها وجود داشت. پلاسمید ۲۱۲۲۶ جفت بازی به عنوان مقاومت به آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین و تتراسایکلین شناخته شد. و با استفاده از آمار استنباطی ضریب همبستگی پیرسون رابطه پلاسمیدهای دیگر با مقاومت به آنتی بیوتیک ها سفپیم، سفنازیدیم، کوتریموکسازول، جنتامیسین، سیپروفلوکساسین به دست آمد. پلاسمید های استخراج شده هیچ ارتباطی با مقاومت به آنتی بیوتیک های سفتریاکسون، آمیکاسین و نیتروفورانتوئین ندارند.

بحث و نتیجه گیری

یکی از معمولی ترین تشخیص های پزشکی عفونت های مجرای ادراری می باشد، (۱۶). با توجه به مطالعاتی که دکتر امامی و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، (۱۷). دکتر مقدم نیا و همکاران در

عفونت های مجاری ادراری در همه گروه های سنی اتفاق می افتد، (۱). و به وسیله تعداد زیادی از پاتوژن هایی که دارای الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی متفاوت می باشند، به وجود می آیند. در تمام دنیا هنوز E.coli میکروارگانیزم غالب در عفونت های ادراری است و ۷۰-۳۰ درصد موارد عفونت های ادراری را ایجاد می کند، (۲). اصولاً بعد از تشخیص عفونت ادراری و عامل ایجاد کننده آن و قبل از شروع درمان، انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی پیشنهاد می گردد، (۳-۵). ژن های مقاومت غالباً در پلاسمیدها یا عناصر خارج کروموزومی قرار دارند که مستقل از کروموزوم باکتری همانند سازی می کنند. با استخراج پلاسمیدها و بررسی الگوهای پلاسمیدی نیز می توان پلاسمیدهای مرتبط با مقاومت به آنتی بیوتیک ها را شناسایی کرد، (۶). هدف ما از این مطالعه بررسی الگوی مقاومت دارویی و الگوی پروفایل پلاسمیدی ایزوله های ادراری E.coli جمع آوری شده از آزمایشگاه های شهر ایلام می باشد.

مواد و روش ها

کشت نمونه های ادرار میانه ارجاع شده به آزمایشگاه های شهر ایلام انجام گردید، (۷-۸). کشت ها خالصی که دارای بیش از ۱۰۵ کلونی بود (و از نظر سیتولوژی بیش از 5 WBC/hpf) به عنوان کشت مثبت در نظر گرفته شد، (۹). باکتری ها طبق جداول استاندارد تشخیصی به عنوان باکتری E.coli شناخته شدند. (۱۰-۱۱)

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: بررسی مقاومت دارویی سویه ها به روش دیسک دیفیوژن و با استفاده از روش کربی بائر بر روی محیط کشت مولر هینتون (مرک آلمان) انجام گرفت، (۱۲)

استخراج پلاسمید: با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (شرکت کیاژن) پلاسمیدهای صد نمونه E.coli استخراج شده و محصول استخراج در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد، (۱۴). و به وسیله دستگاه gel document از ژل ها عکس برداری، (۱۵). سپس با استفاده از آمارهای توصیفی فراوانی و درصد، درصد مقاومت صد نمونه E.coli به آنتی بیوتیک ها را به



آنتی بیوتیک آمیکاسین در شهر بابل ۱۰/۲ درصد بوده است، (۱۸). که در مقایسه با نتیجه مقاومت به آنتی بیوتیک در شهر ایلام متفاوت می باشد.

نتیجه مقاومت به آنتی بیوتیک آموکسی سیلین در کشور اردن ۷۷ درصد بوده است، (۶). اما در شهر ایلام این درصد برابر ۸۱ می باشد که با توجه به آزمون مقایسه ای کای اسکور این دو نتیجه مشابه می باشد. ثابت شده است در اکثر موارد به واسطه استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها، شاهد موارد زیادی از مقاومت دارویی در پاتوژن ها باشیم که این خود سبب عدم موفقیت در درمان و پیدایش بسیاری از عوارض علی رغم صرف هزینه های هنگفت درمانی می گردد. مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک ها در مناطق مختلف ایران و جهان به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه های ایجاد کننده و تفاوت در میزان مصرف آنتی بیوتیک ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و جدید متفاوت می باشند (۱۷). در مطالعه کشور اردن، (۶). پلاسمید ۲۸۰۰۰ جفت بازی در ۶۷ درصد نمونه وجود داشت که با مقاومت ایجاد شده نسبت به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، تتراسایکلین و کوتریموکسازول ارتباط داشت و در این تحقیق با توجه به مقایسه و بررسی گروه اول، دوم و سوم مقاومت به آنتی بیوتیک ها با گروه اول تیپ بندی پلاسمیدها، پلاسمید ۲۱۲۶ جفت بازی عامل مقاومت به تتراسایکلین و آموکسی سیلین می باشد. در بررسی و مقایسه گروه اول الگوهای مقاومت به آنتی بیوتیک ها که شامل مقاومت به آموکسی سیلین می باشد، با گروه اول الگوی پلاسمیدی که شامل سویه هایی است که تنها دارای پلاسمید ۲۱۲۶ جفت بازی می باشند با توجه به این که از ۱۶ سویه که تنها مقاومت به آموکسی سیلین را دارند، ۱۱ سویه از آن ها فقط دارای پلاسمید ۲۱۲۶ جفت بازی و ۳ سویه نیز دارای این پلاسمید در بین پلاسمیدهای خود می باشند می توان گفت که پلاسمید ۲۱۲۶ جفت بازی عامل مقاومت به آموکسی سیلین در سویه های مذکور می باشد.

در بررسی و مقایسه گروه سوم الگوهای مقاومت به آنتی بیوتیک ها که شامل مقاومت به تتراسایکلین می باشد با گروه اول الگوهای پلاسمیدی نشان داد از

دانشگاه علوم پزشکی بابل در سال ۱۳۷۸ شمسی، (۱۸). در مطالعه ای در palma یونان سال ۱۹۹۲ میلادی، (۱۹). و احمد و همکاران در بیمارستان شاه فهد عربستان در سال ۱۹۹۵ میلادی، (۲۰). انجام دادند باکتری E.coli به ترتیب ۶۵/۸۱ درصد، ۵۸/۴ درصد، ۶۸ درصد و ۵۰/۲ درصد مهمترین عامل عفونت های ادراری را تشکیل می دهد، (۱۸). در مطالعات دیگر که توسط دکتر مقدم نیا و همکاران، (۱۸). و الشهبابی و همکاران، (۶). انجام شد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک کوتریموکسازول در بابل، اصفهان، تهران و اردن به ترتیب ۷۷/۶، ۶۳/۲ و ۶۲/۷۷ درصد می باشد که با توجه به درصد مقاومت به این آنتی بیوتیک در شهر ایلام که ۱۵ درصد می باشد بین نتایج آن تحقیقات و این مطالعه با توجه به آزمون مقایسه ای کای اسکور اختلاف وجود دارد. در تحقیقاتی که توسط دکتر کرباسی زاده و همکاران، (۲۱). و الشهبابی و همکاران، (۶). در تهران و اردن انجام شد میزان مقاومت به تتراسایکلین ۵۳/۳ و ۷۴ درصد بوده است که این درصد در شهر ایلام برابر با ۶۴ می باشد که با توجه به آزمون کای اسکور بین این نتایج اختلافی وجود ندارد. در مطالعه دکتر کرباسی زاده و همکاران در شهر تهران، (۲۱). مقاومت به سیپروفلوکساسین ۲۰ درصد و در شهر ایلام برابر با ۲۱ درصد و می باشد که بین این دو نتیجه اختلافی وجود ندارد. در مطالعه دکتر مقدم نیا و همکاران در شهر بابل، (۱۸). مقاومت باکتری E.coli جدا شده از عفونت ادراری نسبت به آنتی بیوتیک توبرامایسین ۲۰/۱ درصد و در این تحقیق ۱۵ درصد می باشد که اختلافی بین این نتایج وجود ندارد. مقاومت ایجاد شده علیه آنتی بیوتیک جنتامیسین در بابل، (۱۸). تهران، (۲۱). و اردن، (۶). به ترتیب ۹/۶، ۱۹/۹، ۱۳/۳ و ۴۸ درصد می باشد که با توجه به درصد مقاومت به این آنتی بیوتیک در شهر ایلام که ۱۲ درصد می باشد نتایج اصفهان، بابل و تهران با ایلام مشابه با اردن متفاوت است.

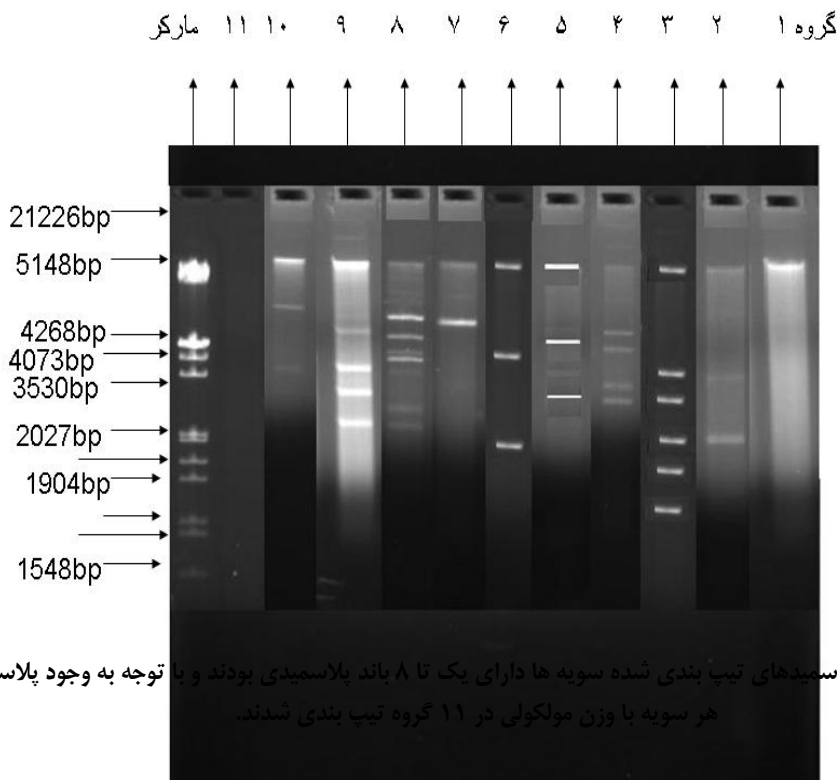
در مورد مقاومت به آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین در مطالعاتی که در اصفهان، (۱۷). بابل، (۱۸). و اردن، (۶). انجام شد میزان مقاومت به ترتیب ۸۹/۱۵، ۸/۷ و ۲۴ درصد می باشد که با توجه به نتیجه این تحقیق که ۵ درصد می باشد، متفاوت می باشند. مقاومت به



مقاومت به آنتی بیوتیک ها مشخص گردید که احتمالاً عامل یا عاملین مقاومت به آنتی بیوتیک های سفپیم پلاسمیدهای ۲۳۰۰ جفت بازی، ۲۰۰۰۰ جفت بازی، سفنازیدیم پلاسمیدهای ۲۳۰۰ جفت بازی، ۲۰۰۰۰ جفت بازی، کوتریموکسازول پلاسمید ۱۶۵۰ جفت بازی، جنتامیسین پلاسمید ۸۳۱ جفت بازی و سیپروفلوکساسین پلاسمید ۹۴۷ جفت بازی می باشند که در این میان پلاسمیدها ۲۳۰۰ و جفت بازی ۲۰۰۰۰ عامل مقاومت به دو آنتی بیوتیک، سفپیم و سفنازیدیم می باشند.

در این مطالعه به نظر می رسد آنتی بیوتیک مروپنم که تمامی صد نمونه به آن حساس بودند. آمیکاسین (۱ درصد مقاوم)، نیتروفوران (۵ درصد مقاوم) و جنتامیسین (۱۲ درصد مقاوم) بهترین آنتی بیوتیک ها برای درمان این عفونت در این منطقه می باشند.

۵ سویه که تنها به تتراسایکلین مقاوم بودند ۳ سویه فقط دارای پلاسمید ۲۱۲۲۶ جفت بازی بودند پس می توان گفت که این پلاسمید با مقاومت به تتراسایکلین نیز می تواند ارتباط داشته باشد. در مقایسه گروه دوم الگوهای مقاومت به آنتی بیوتیک ها که شامل مقاومت آموکسی سیلین و تتراسایکلین می باشد با گروه اول الگوهای پلاسمیدی نشان داد، از ۳۰ سویه که دارای مقاومت به آموکسی سیلین و تتراسایکلین می باشند ۱۲ سویه فقط دارای پلاسمید ۲۱۲۲۶ جفت بازی می باشند و ۱۱ سویه نیز دارای این پلاسمید در بین پلاسمیدهای خود می باشند پس می توان گفت پلاسمید ۲۱۲۲۶ جفت بازی عامل مقاومت به ۲ آنتی بیوتیک آموکسی سیلین و تتراسایکلین می باشد. بعد از بررسی رابطه پلاسمیدها با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون با مقاومت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه و در نظر گرفتن بیشترین ضریب همبستگی و معنی دار بودن رابطه پلاسمیدها با



تصویر ۱. ژل آگارز پلاسمیدهای تیب بندی شده سویه ها دارای یک تا ۸ باند پلاسمیدی بودند و با توجه به وجود پلاسمیدها در هر سویه با وزن مولکولی در ۱۱ گروه تیب بندی شدند.

References

1-Andriole VT, Patterson TF. Epidemiology, natural history, and management of urinary tract infections in pregnancy. *Med Clin N Am* 1991 Mar; 75(2):359-73.

۴۷

2-Farrel DJ, Morrissey I, De Rubeis D, Robbins M, Felmingham D. A UK multi-center study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing



- urinary tract infection. *J Infect* 2003 Feb;46(2):94-100.
- 3-Ang JY, Ezike E, Asmar BI. Antibacterial resistance. *Indian J Pediatr* 2004 Mar;71(3):229-39. (Review)
- 4-Okeke IN, Laxminaragan R, Bhutta ZA, Duse A, Jenkins P, O'Briens TF, Mendez AP, Klugman KP. Antimicrobial resistance in developing countries part I: recent trends and current states. *Lancet Infect Dis* 2005 Aug; 5(8): 481-93. (Review)
- 5-Rashmi S, Lal Sc, Bhuvneshwar K. Antimicrobial resistance current problems and possible solution. *Indian J Med Sci* 2005 Mar;59(3):120-9. (Review)
- 6-Shehabi A, Mahafazah AM, Alkhalili KZ. Antimicrobial resistance and plasmid profile of urinary Escherichia coli isolates from Jordanian patients. *East Mediterr Health J* 2004 May;10(3): 322-8.
- 7-Mandell LG, Bennett EJ, Dolin R. Principles and practice of infectious disease. Churchill Livingstone 2000; 773-805.
- 8- Raji MA, Mina U, Machangu R. Current epidemiological status of enterohaemorrhagic Escherichia coli 0157:H7 in Africa. *Chin Med J* 2006 Feb;119(3):217-22.
- 9-Monzon OT, Ory EM, Dobson HL. A comparison of bacterial counts of the urine obtained by needle aspiration of the bladder, catheterization and midstream-voided methods. *N Engl J Med* 1958 Oct; 259(16):764-7.
- 10-Roberts JA. Management of pyelonephritis and upper urinary tract infections. *Urol Clin North Am* 1999 Nov; 26(4):753-63. (Review)
- 11-Miller JL, Krieger JN. Urinary tract infections. Cranberry juice, underwear, and probiotics in the 21st century. *Urol Clin North Am* 2002 Aug; 29(3):695-9.
- 12-Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Bailey & Scotts. Diagnostic microbiology. Philadelphia 2000; 262-85.
- 13-Bernard HJ. Clinical diagnosis and management by laboratory methods: basic examination of urine. Mosby 1996.p. 411-56.
- 14-Okoli CI, Chah KF, Ozoh PTE, Udedibie ABI. Antimicrobial resistance profile of E-coli isolates from ropical Free range chickens[Online]. *J Health Allied Scs.*[cited 2006 Jan-Mar; 5 (1)];Available from: <http://www.ojhas.org/issue15/2005-3-3.htm>.
- 15-Sherly M, Gordon DM, Collignon PJ. Evolution of multi resistance plasmids in Australian clinical isolates of Escherichia coli. *Microbiology* 2004 Jun;150:1539-46.
- 16-Foxman B, Frerichs RR. Epidemiology of urinary tract infection. *Am J public health* 1985 Nov; 75(11):1308-13.
- 17-Emami S.[Assessment of urine cultures in Esfahan clinical laboratory]. *Journal of Esfahan University of Medical Sciences*. 2000; 2:47-53.(Persian)
- 18- Moghadamnia A, Ghadimi R, Fatemi A.[Antibiotic resistance pattern of uropathogenic bacterial isolated from children]. *J of Babol University of Medical Sciences* 1999; 2: 47-53.(Persian)
- 19-Rodriguez Moreno C, Muro Pascual V, Daviu Pastor A, Bestard Serra M, Llobera Canaves J, Campoamor Landin F. Use of antibiotics in primary care: treatment of urinary infection. *Aten Primaria* 1996 Nov; 17:309-16.
- 21-Ahmad S, Ahmad F. Urinary tract infection at a specialist hospital in Saudi Arabia. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 1995 Dec; 21(3): 95-8.
- 22-Karbasizad V, Badami N, Emtiazi G. [Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coli form isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran]. *Afr J Biotechnol* 2003 Oct ; 2:379-83.(Persian)



in Ilam(western Iran)

Mohebi R¹, Pakzad I^{2*}, Sadeghifard N², Maleki A¹, Maleki H¹, Hematian A², Ghafoorian S³

(Received: 14 May, 2008

Accepted: 20 Jun, 2009)

Abstract

Introduction: Assessment of antimicrobial resistance patterns and plasmid profile of 100 uropathogenic E. coli isolated from outpatient with UTI in Ilam(western Iran) was designed as the goal of our research .

Materials & Methods: Urinary samples isolated from symptomatic UTI cases were identified by routine methods. Antimicrobial susceptibility testing was performed by Kirby Bauer disc diffusion method according to CLSI guidelines. Plasmid extraction kit was used for plasmid extraction.

Findings: All the isolated samples proved sensitive to meropenem. The resistance rates of E.coli were as follows: 81% for amoxycillin, 64% for tetracycline, 21% for ciprofloxacin, 16% for cefepime and ceftazidime, 15% for ceftriaxone, cotrimoxazole and tubramycin, 12% for gentamicin, 5% for nitrofurantoin, and 1% for amikacin. Plasmid profile investigations

showed the isolated E.coli carried plasmid ranging from 21KD to 1/5KD in size. The number of plasmid in each of these isolates ranged from one to eight of different sizes. The E.coli isolates contained a common plasmid with a molecular weight of 21 KD which proved to enjoy resistance to, amoxicillin and possibly tetracycline.

Discussion & Conclusion: There are doubts as to the role of tetracycline and amoxicillin for empiric therapy of UTI. Meropenem amikacin, nitrofurantoin, gentamicin and ciprofloxacin are active against the great majority of UTI associated E.coli. 1KD R-plasmid reservoir may contribute to the spread of amoxicillin and probably tetracycline resistance in our region.

Keywords: disc diffusion, UTI, Plasmid profile and E.coli.

1.Dept of Basic Sciences, Post Graduate School, Islamic Azad University of Zanjan, Zanjan, Iran

2.Dept of Microbiology, School of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam Iran

3.School of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam Iran

*(corresponding author)

