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[1]، ایرج پاکزاد[2*]، نورخدا صادقی فرد[2]،عباس ملکی[1]،حسین ملکی[1]، علی همتیان[2]، سبحان غفوریان[3]

1) گروه علوم پایه، دانشکده تحصیلات تکمیلی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
2) گروه میکروب شناسی، دانشکده پیراپزشکی،دانشگاه علوم پزشکی ایلام
3) دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت:87/2/24 تاریخ پذیرش:88/4/30

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 81 درصد، تتراسایکلین 64 درصد، سیپروفلوکساسین 21 درصد سفپیم و سفتاریدیم 16 درصد، سفتریاکسون، کوتریمکسازول و توبرامایسین 15 درصد، جنتامیسین 12 درصد، نیتروفورانتوئین 5 درصد و آمیکاسین 1 درصد. مطالعات پروفایل پلاسمیدی نشان داد که ایزوله های E.coli حاوی پلاسمیدهایی با اندازه هایی از 1/5 تا21 کیلو دالتون حمل بودند. 88 درصد ایزوله های E.coli دارای یک پلاسمید عمومی با وزن مولکولی 21 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 21 کیلو دالتونی ممکن است در گسترش مقاومت به آموکسی سیلین و تتراسایکلین دراین 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

E-mail: pakzad_i۲۰۰٦@yahoo.com

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 17:26 IRST on Sunday November 29th 2020

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 17:26 IRST on Sunday November 29th 2020

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 17:26 IRST on Sunday November 29th 2020

مقدمه

عفونت های مجاری ادراری در همه گروه‌های سنی اتفاق می‌افتد،(1). و به وسیله تعداد زیادی از پاتوژن هایی که دارای الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی متفاوت می‌باشند، به وجود می آیند. در تمام دنیا هنوز E.coli میکروارگانیسم غالب در عفونت های ادراری است و 70-30درصد موارد عفونت های ادراری را ایجاد می کند،(2). اصولاً بعد از تشخیص عفونت ادراری و عامل ایجاد کننده آن و قبل از شروع درمان،انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی پیشنهاد می‌گردد،(5-3). ژن های مقاومت غالباً در پلاسمیدها یا عناصر خارج کروموزومی قرار دارند که مستقل از کروموزوم باکتری همانند سازی می کنند. با استخراج پلاسمید ها و بررسی الگوهای پلاسمیدی نیز می توان پلاسمیدهای مرتبط با مقاومت به آنتی بیوتیک ها را شناسایی کرد،(6). 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،(8-7). کشت ها خالصی که دارای بیش از 105 کلونی بود(و از نظر سیتولوژی بیش از WBC/hpf ۵) به عنوان کشت مثبت در نظر گرفته شد،(9). باکتری ها طبق جداول استاندارد تشخیصی به عنوان باکتری E.coli شناخته شدند.(11-10)

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: بررسی مقاومت دارویی سویه‌ها به روش دیسک دیفیوژن و با استفاده از روش کربی بائر بر روی محیط کشت مولر هینتون(مرک آلمان)انجام گرفت.(12)

استخراج پلاسمید: با استفاده از کیت استخراج پلاسمید(شرکت کیاژن) پلاسمیدهای صد نمونه E.coli استخراج شده و محصول استخراج در ژل آگاروز 1درصد الکتروفورز شد،(14). و به وسیله دستگاه gel document از ژل ها عکس برداری،(15). سپس با استفاده از آمارهای توصیفی فراوانی و درصد، درصد مقاومت صد نمونه E.coli به آنتی بیوتیک ها را به دست آمد و به وسیله نرم افزار spss۱۵/۵ با استفاده از آمار تحلیلی ضریب همبستگی پیرسون که در آن $\alpha = 5\%$ و N=۱۰۰ 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 81 درصد، تتراسایکلین 64 درصد، سیپروفلوکساسین 21درصد، سفتازیدیم 16درصد، سفپیم16درصد، توبرامایسین15درصد، سفتریاکسون15 درصد، کوتریموکسازول 15درصد، جنتامیسین12درصد، نیتروفورانتوئین5 درصد،آمیکاسین 1 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 36 نوع پلاسمید مختلف بودند. که پلاسمیدهای استخراج شده با توجه به وزن و وجود در سویه های مختلف در 11 گروه، تیپ بندی شدند. که تعداد این باندها در هر نمونه از یک تا هشت باند متفاوت بود،(تصویر-1). پلاسمید 21226جفت بازی در 88 درصد از نمونه ها وجود داشت. پلاسمید 21226 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، سفتازیدیم، 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 نتیجه‌گیری

یکی از معمولی ترین تشخیص های پزشکی عفونت های مجرای ادراری می باشد،(16). با توجه به مطالعاتی که دکتر امامی و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان،(17). دکتر مقدم نیا و همکاران در

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 17:26 IRST on Sunday November 29th 2020

دانشگاه علوم پزشکی بابل در سال 1378 شمسی،(18). در مطالعه ای در palma یونان سال 1992 میلادی،(19). و احمد و همکاران در بیمارستان شاه فهد عربستان در سال 1995 میلادی،(20). انجام دادند باکتری E.coli به ترتیب 65/81 درصد، 58/4 درصد، 68 درصد و 50/2 درصد مهمترین عامل عفونت های ادراری را تشکیل می دهد،(18). در مطالعات دیگر که توسط دکتر مقدم نیا و همکاران،(18). و الشهابی و همکاران،(6). انجام شد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک کوتریموکسازول در بابل، اصفهان، تهران و اردن به ترتیب 77/6 ، 63/2 و 62/77درصد می باشد که با توجه به درصد مقاومت به این آنتی بیوتیک در شهر ایلام که 15 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،(21). و الشهابی و همکاران،(6). در تهران و اردن انجام شد میزان مقاومت به تتراسایکلین 53/3 و 74 درصد بوده است که این درصد در شهر ایلام برابر با 64 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،(21). مقاومت به سیپروفلوکساسین 20 درصد و در شهر ایلام برابر با 21 درصد و می باشد که بین این دو نتیجه اختلافی وجود ندارد. در مطالعه دکتر مقدم نیا و همکاران در شهر بابل،(18). مقاومت باکتری E.coli جدا شده از عفونت ادراری نسبت به آنتی بیوتیک توبرامایسین 20/1 درصد و در این تحقیق 15 درصد می باشد که اختلافی بین این نتایج وجود ندارد. مقاومت ایجاد شده علیه آنتی بیوتیک جنتامیسین در بابل،(18). تهران،(21). و اردن،(6). به ترتیب 9/6، 19/9، 13/3 و 48 درصد می باشد که با توجه به درصد مقاومت به این آنتی بیوتیک در شهر ایلام که 12 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،(17). بابل،(18). و اردن،(6). انجام شد میزان مقاومت به ترتیب 7/۸، 89/۱۵ و24درصد می باشد که با توجه به نتیجه این تحقیق که 5 درصد می باشد، متفاوت می باشند. مقاومت به آنتی بیوتیک آمیکاسین در شهر بابل 10/2 درصد بوده است،(18). که در مقایسه با نتیجه مقاومت به آنتی بیوتیک در شهر ایلام متفاوت می باشد.

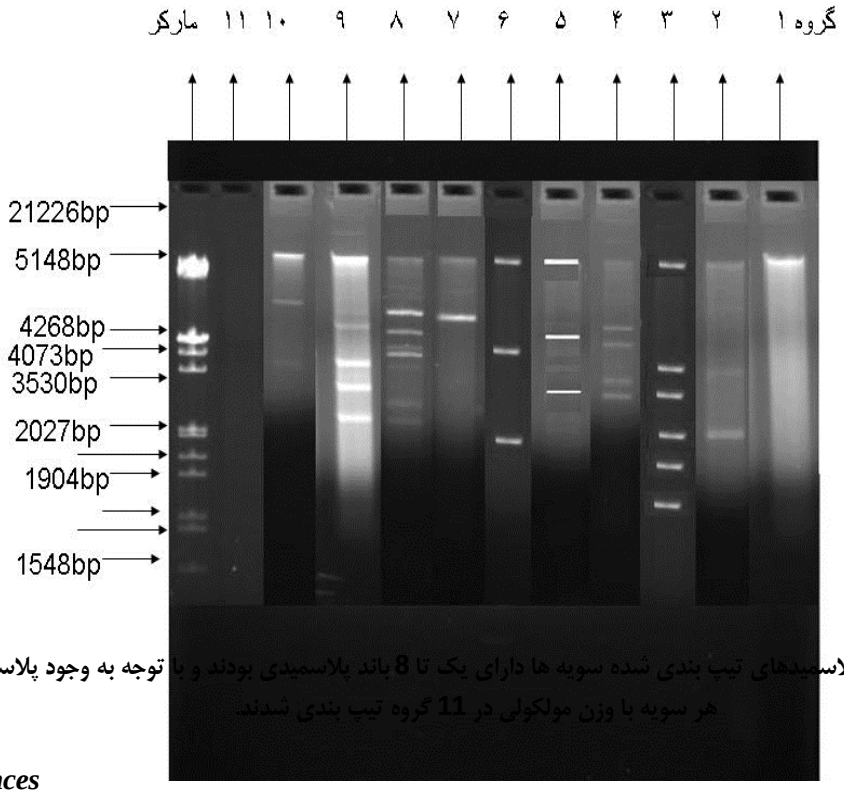
نتیجه مقاومت به آنتی بیوتیک آموکسی سیلین در کشور اردن 77 درصد بوده است،(6). اما در شهر ایلام این درصد برابر 81 می باشد که با توجه به آزمون مقایسه ای کای اسکور این دو نتیجه مشابه می باشد. ثابت شده است در اکثر موارد به واسطه استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها، شاهد موارد زیادی از مقاومت داروئی در پاتوژن 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 داروئی 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(17).در مطالعه کشور اردن،(6). پلاسمید28000 جفت بازی در 67 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 2126 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 21226 جفت بازی می باشند با توجه به این که از 16 سویه که تنها مقاومت به آموکسی سیلین را دارند، 11 سویه از آن ها فقط دارای پلاسمید 21226 جفت بازی و 3 سویه نیز دارای این پلاسمید در بین پلاسمیدهای خود می باشند می توان گفت که پلاسمید 21226 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

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 17:26 IRST on Sunday November 29th 2020

5 سویه که تنها به تتراسایکلین مقاوم بودند 3 سویه فقط دارای پلاسمید 21226 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 30 سویه که دارای مقاومت به آموکسی سیلین و تتراسایکلین می باشند 12 سویه فقط دارای پلاسمید 21226 جفت بازی می باشند و 11 سویه نیز دارای این پلاسمید در بین پلاسمیدهای خود می باشند پس می توان گفت پلاسمید 21226 جفت بازی عامل مقاومت به 2 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 پلاسمید ها با مقاومت به آنتی بیوتیک ها مشخص گردید که احتمالاً عامل یا عاملین مقاومت به آنتی بیوتیک های سفپیم پلاسمیدهای2300 جفت بازی،20000جفت بازی، سفتازیدیم پلاسمیدهای 2300جفت بازی،20000جفت بازی،کوتریموکسازول پلاسمید 1650جفت بازی، جنتامیسین پلاسمید831جفت بازی و سیپروفلوکساسین پلاسمید 947 جفت بازیمی باشند که در این میان پلاسمیدها2300 و جفت بازی 20000عامل مقاومت به دو آنتی بیوتیک، سفپیم و سفتازیدیم می باشند.

در این مطالعه به نظر می رسد آنتی بیوتیک مروپنم که تمامی صد نمونه به آن حساس بودند. آمیکاسین (1درصدمقاوم)، نیتروفورانتوئین(5درصد مقاوم)و جنتامیسین(12درصد مقاوم) بهترین آنتی بیوتیک ها برای درمان این عفونت در این منطقه می باشند.



تصویر 1. ژل آگارز پلاسمیدهای تیپ بندی شده سویه ها دارای یک تا 8 باند پلاسمیدی بودند و با توجه به وجود پلاسمیدها در هر سویه با وزن مولکولی در 11 گروه تیپ بندی شدند.

References

۱-Andriole VT, Patterson TF. Epidemiology, natural history, and management of urinary tract infections in pregnancy. Med Clin N Am ۱۹۹۱ Mar; ۷۵(۲):۳۵۹-۷۳.

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

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 17:26 IRST on Sunday November 29th 2020

urinary tract infection. J Infect ۲۰۰۳ Feb;٤٦(۲):۹٤-۱۰۰.

۳-Ang JY, Ezike E, Asmar BI. Antibacterial resistance. Indian J Pediatr ۲۰۰٤ Mar;۷۱(۳):۲۲۹-۳۹. (Review)

٤-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 ۲۰۰۵ Aug; ۵(۸): ٤۸۱-۹۳. (Review)

۵-Rashmi S, Lal Sc, Bhuvneshwar K. Antimicrobial resistance current problems and possible solution. Indian J Med Sci ۲۰۰۵ Mar;۵۹(۳):۱۲۰-۹. (Review)

٦-Shehabi A, Mahafazah AM, Alkhalili KZ. Antimicrobial resistance and plasmid profile of urinary Escherichia coli isolates from Jordanian patients. East Mediterr Health J ۲۰۰٤ May;۱۰(۳): ۳۲۲-۸.

۷-Mandell LG, Bennett EJ, Dolin R. Principles and practice of infectious disease. Churchill Livingstone ۲۰۰۰; ۷۷۳-۸۰۵.

۸- Raji MA, Mina U, Machangu R. Current epidemiological status of entrohaemorhagic Escherichia coli ۰۱۵۷:H۷ in Africa. Chin Med J ۲۰۰٦ Feb;۱۱۹(۳):۲۱۷-۲۲.

۹-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 ۱۹۵۸ Oct; ۲۵۹(۱٦):۷٦٤-۷.

۱۰-Roberts JA. Management of pyelonephritis and upper urinary tract infections. Urol Clin North Am ۱۹۹۹ Nov; ۲٦(٤):۷۵۳-٦۳. (Review)

۱۱-Miller JL, Krieger JN. Urinary tract infections. Cranberry juice, underwear, and probiotics in the ۲۱st century. Urol Clin North Am ۲۰۰۲ Aug; ۲۹(۳):٦۹۵-۹.

۱۲-Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Bailey & Scotts.Diagnostic microbiology. Mosby ۲۰۰۰.p. ۳٦۳-۸۵.

۱۳-Bernard HJ. Clinical diagnosis and management by laboratory methods: basic examination of urine. Mosby ۱۹۹٦.p. ٤۱۱-۵٦.

۱٤-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 ۲۰۰٦ Jan-Mar; ۵ (۱)];Available from: *http://www.ojhas.org/issue۱۵/۲۰۰۵-۳-۳.htm.*

۱۵-Sherly M, Gordon DM, Collignon PJ. Evolution of multi resistance plasmids in Australian clinical isolates of Escherichia coli. Microbiology ۲۰۰٤ Jun;۱۵۰:۱۵۳۹-٤٦.

۱٦-Foxman B, Frerichs RR. Epidemiology of urinary tract infection. Am J public health ۱۹۸۵ Nov; ۷۵(۱۱):۱۳۰۸-۱۳.

۱۷-Emami S.[Assessment of urine cultures in Esfahan clinical laboratory]. Journal of Esfahan University of Medical Sciences. ۲۰۰۰; ۲:٤۷-۵۳.(Persian)

۱۸- Moghadamnia A, Ghadimi R, Fatemi A.[Antibiotic resistance pattern of uropathogenic bacterial isolated from children]. J of Babol University of Medical Sciences ۱۹۹۹; ۲: ٤۷-۵۳.(Persian)

۱۹-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 ۱۹۹٦ Nov; ۱۷:۳۰۹-۱٦.

۲۱-Ahmad S, Ahmad F. Urinary tract infection at a specialist hospital in Saudi Arabia. Bangladesh Med Res Counc Bull ۱۹۹۵ Dec; ۲۱(۳): ۹۵-۸.

۲۲-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 ۲۰۰۳ Oct ; ۲:۳۷۹-۸۳.(Persian)

A Study of Antibiotic Resistance Pattern and Plasmid Profile of Uropathogenic Escherichia coli Isolated

in Ilam(western Iran)

Mohebi R [1], Pakzad I [2], Sadeghifard N[2], Maleki A[1], Maleki H[1], Hematian A[2],Ghafoorian S[3]*

(Received: 14 May, 2008 Accepted: 20 Jun, 2009)

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 17:26 IRST on Sunday November 29th 2020

Abstract

Introduction: Assessment of antimicrobial resistance patterns and plasmid profile of ۱۰۰ uropathogeic 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: ۸۱٪ for amoxycillin, ٦٤% for tetracycline,۲۱٪ for ciprofloxacin, ۱٦٪ for cefepime and ceftazidime, ۱۵٪ for ceftriaxone, cotrimoxazole and tubramycin, ۱۲٪ for gentamicin, ۵٪ for nitrofurantoin, and ۱٪ for amikacin. Plasmid profile investigations showed the isolated E.coli carried plasmid ranging from ۲۱KD to ۱/۵KD 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 ۲۱ KD which proved to enjoy resistance to, amoxicillin and possibilly tetracycline.

Discussion & Conclusion: There are doubts as to the role of tetracycline and amoxicillin for empiric therapy of UTI. Meropenem amikacin, nitrofurantoin, gentamicyn and ciprofloxacin are active against the great majority of UTI associated E.coli. ۱KD R-plasmid reservoir may contribute to the spread of amoxicillin and probablly tetracycline resistance in our region.

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

1.*Dept of Basic Sciences, Post Graduate School, Islamic Azad Uuiversity 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)*