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

حسین کیوانی [1]، مژده حاکمی والا[2*]، زهرا طالب نیا چلنبری[3]، فروزان میرباقری[4]، فاطمه باقری بجستانی [5]

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 داروئی دانشگاه آزاد اسلامی
4. کارشناس ارشد آزمایشگاه بیمارستان اختر، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
5. کارشناس ارشد میکروب شناسی وعضو هیات علمی گروه میکروبیولوژی واحد علوم داروئی دانشگاه آزاد اسلامی

*** نشانی برای مکاتبه :** تهران، ولنجک ، خ کودکیار، دانشکده پزشکی ط7 ، تلفن: 23487255، mhakemi@sbmu.ir.com
دریافت مقاله: مرداد نود و یک پذیرش برای چاپ: شهریور 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 جداشده 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 سالهای1389 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 ESBLدر سطح فنوتیپی با روش DDST/DDTغربالگری شده و در ادامه استخراجDNA در سویه های کاندید با استفاده از کیت انجام شد. فراوانی ژن های SHV,TEM ,PER -1 , با روش PCRتعیین 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: سفپودوکسیم41/7%، ازترونام34/5%، سفالکسین48/3%، سفتازیدم51/7%، سفوتاکسیم68/9%، سفتریاکسون41/4%، ایمیپنم44/8%، سفپیم44/8%، سفوکسیتین44/8%، کلرامفنیکل44/8%، جنتامایسین48/3%، سیپروفلوکساسین 44/8%بود.20/6%ازسویه ها با روشDDST/DDT مولد ESBLبوده و فراوانی ژن های bla PER-1 ، bla SHV،bla TEMبه ترتیب33/3%و33/3%و50% محاسبه شد.*

نتیجه گیری: *با توجه به جستجو های انجام شده در اکثر سویه های اشریشیاکلی بررسی شده علت تولید ESBLبه دلیل وجود ژنهایSHV,TEMوCTX بود . ژن bla Per-1 نیز اکثرا در سودوموناس،اسینتوباکتر و پروتئوس علت تولید ESBLمی باشد.در ایران نیز حضور هم زمان این ژن در کنار سایر ژن ها در 7/5% از سویه های کلبسیلا 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 databankنیازمند است.*

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

مقدمه

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 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).

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 نیزشده است.لذا بررسی مداوم و پیوسته وضعیت مقاومت این باکتری ها نسبت به داروهای رایج امری ضروری می باشد(3و4). 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 ازبیماران بستری در بخش ارتوپدی بیمارستان های اختر و فیروزگر جمع آوری و براساس روش های استاندار باکتری شناسی(5) مورد بررسی قرارگرفت. در ادامه نمونه های حاوی اشریشیا کلی براساس روش های استاندارد شناسائی شده و حساسیت یا مقاومت آن ها نسبت به آنتی بیوتیک های سفپودوکسیم، ازترونام،سفالکسین، سفتازیدم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، ایمی پنم،سفپیم، سفوکسیتین، کلرامفنیکل، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین (شرکت ROSCO) و با استفاده از روش دیسک دیفیوژن Kirby_Bauer تعیین شد(5).) سویه های مولدESBLدر سطح فنوتیپی با (double disk synergistic test; DDST, double disk test;DDT) غربالگری شده و در ادامه استخراج DNAدر سویه های کاندید با استفاده از کیت QIAGENساخت کشور آلمان انجام شد. فراوانی ژن های SHV,TEM,PER-1با روش PCR که در ادامه به سکانس پرایمر هاو برنامه ها(جدول1و2) اشاره شده است، تعیین شد(۶،۷). 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(koasوper1+) P.aerugionosa به عنوان کنترل ESBLمثبت واز(27853) P.aeruginosaبه عنوان کنترل ESBLمنفی استفاده شد.

جدول 1: توالی پرایمر های بکار رفته واندازه محصولات آن

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

جدول 2: برنامه های PCR استفاده شده

Target gene	PCR program
SHV	Denaturation 95° C 5min Annealing 54.7 ° C 45s Elongation72 ° C 1min 35cycle
TEM	Denaturation95°C 5min Annealing 57.4 °C 45s Elongation72°C 50s 35cycle
PER	Denaturation 95 °C 5min Annealing57°C 45s Elongation72°C 1min 35cycle

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: سفپودوکسیم41/7%،ازترونام34/5%،سفالکسین48/3%،سفتازیدم51/7%،سفوتا کسیم68/9%،سفتریاکسون41/4%،ایمیپنم44/8%،سفپیم44/8%،سفوکسیتین8/ 44%،کلرامفنیکل44/8%،جنتامایسین48/3%،سیپروفلوکساسین44/8%بود.20/7 % سویه ها با روشDDST/DDT مولد ESBLبوده و فراوانی ژن های PER-1,SHV ,TEM به ترتیب33/3%و33/3%و50% بود.نتایجPCRپس ازانجام الکتروفورز ورنگ امیزی ژل با اتیدیوم بروماید و مشاهده درزیر نور UV تعیین شد.اندازه محصولPCRبرای ژنهای PER-1 ، SHVوTEM به ترتیبbp 695، bp 928 و bp 1080بود(شکل 1تا 3).

شکل شماره1: 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 ائروزینوزاجدا 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 کلبسیلا(17/5%، هر کدام 10 مورد) بودند. همگی سویه های اشریشیا کلی نسبت به سفالکسین، سفتازیدیم ، سفتریاکسون و سفوتاکسیم مقاومت داشتند(9).

در مطالعه حاضر از 60 نمونه زخم بررسی شده 48/3% اشریشیا کلی جدا شد و بر خلاف مطالعه مذکور میزان مقاومت سویه ها نسبت به سفتازیدیم، 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 اشریشیا کلی می توان به تفاوت در وضعیت بیماران بررسی شده ، زمان جنگ و تفاوت جغرافیائی اشاره نمود.

در مطالعه حاضر وضعیت سویه های اشریشیاکلی جداشده از بیماران مبتلا به زخم های ارتوپدی از نظر تولید ESBLبررسی 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 اشریشیاکلی، به دلیل وجود ژنهای TEM,SHV.CTXبوده است(10و8و6).در ایران نیز حضور هم زمان این 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 ژنPER-1 در سویه های اشریشیاکلی 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 databankنیازمند 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.

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 ceftazidimeZ-and fluorquinolone-Resistance Klebsiella pneumoniae and Imipenem-Resistance Acinetobacter spp.in Korea: Analysis of KONSAR study Data from2005 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, Yolken RH, 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, Biophy,s in(shanghay),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).Ethiology 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 ESBLtype. 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 pneumoia isolated from Tehran/ Iran. Iranian Journal of basic Medical science,13 (14);111-118