پراکندگی ژن qnrA در ایزوله های اشریشیا کلی مقاوم به فلوروکینولون جدا شده از ادرار بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی(ره) تهران

مژده حاکمی والا[1*]، شیما عبدی[2]، رضا رنجبر[3]، عذرا باقری بجستانی [4]، فاطمه باقری بجستانی [5]

۱. دکتری تخصصی باکتری شناسی پزشکی، استادیار دانشکده پزشکی شهید بهشتی تهران
۲. داروساز، واحد علوم داروئی آزاد اسلامی تهران
۳. دکتری تخصصی باکتری شناسی پزشکی، دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشکده پزشکی بقیه ا... تهران
۴. کارشناس ارشد سلولی مولکولی ، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشکده پزشکی بقیه ا... تهران
۵. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مربی واحد علوم داروئی آزاد اسلامی تهران

* **نشانی برای مکاتبه:** ولنجک، بلوار دانشجو، خ کودکیار، ط هفتم . تلفن تماس ۲۳۸۷۲۵۵۶، mojdeh_hakemi@yahoo.com
دریافت مقاله: شهریور نود و دو پذیرش برای چاپ: آذر نود و دو

چکیده

سابقه و هدف: *این مطالعه با هدف تعیین وضعیت مقاومت سویه های اشریشیا کلی جدا شده از عفونت ادراری بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی نسبت به دارو های رایج با تاکید بر کینولون ها و ارزیابی میزان پراکندگی ژن پلاسمیدی qnrA در این باکتری ها انجام شد.*

روش کار: *صد سویه اشریشیاکلی طی ۶ ماه از نمونه های مختلف بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی تهران بطور تصادفی جمع آوری شد و پس از تائید باکتریولوژیک، حساسیت آنها نسبت به آنتی بیوتیک های رایج طبق پروتکل CLSI2011تعیین گردید.در ادامه استخراج DNA انجام و فراوانی ژن qnrA بکمک روش PCR تعیین شد.*

یافته ها: *تمام سویه ها نسبت به پنی سیلین و آموکسی سیلین، ۷۷٪ به آموکسی -کلاو،۷۲٪ به سفتازیدیم ، ۶۹٪ به سفوتاکسیم، ۶۳٪ به نالیدیکسیک اسید، ۵۱٪ به سیپروفلوکساسین ، ۴۷٪ به سفکسیم، ۴۶٪ به سفتریاکسون ، ۴۳٪ به سفالکسین، به آزترونام ۲۷٪ و به ایمی پنم ۲٪ مقاوم بودند.در مرحله غربال گری با استفاده از PCR در ۳۹/۵ ٪ از نمونه ها باندی به وزن bp ۵۱۶ مربوط به ژن qnrA مشاهده شد.*

نتیجه گیری: *با در نظر گرفتن این نکته که بیش ترین بیماران بررسی شده در این مطالعه بانوان بوده و بیش ترین نمونه ها نیزاز بخش زنان جدا شد، از طرف دیگر مقاومت هم زمان نسبت به هر دو داروی نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین در مقایسه به مقاومت نسبت به هر یک به تنهائی در تقریبا نیمی از سویه ها دیده شد(۴۹٪)، انجام آزمایش ساده انتی بیوگرام قبل از تجویز هر گونه داروئی خصوصا کینولون ها پیشنهاد می گردد تا بتوان از روند رو به افزایش اکتساب مقاومت نسبت به دارو های فلوروکینولون مما نعت نمود.*

کلمات کلیدی: ***E.coli, Drug resistant, qnrA, PCR***

مقدمه

اشریشیا کلی یکی از گونه های خانواده انتروباکتریاسه است که در روده بزرگ انسان ها و برخی ازحیوانات به طور طبیعی یافت می شود و تنها گونه ای است که در بیماری زایی انسان اهمیت دارد. این باکتری شایع ترین علت عفونت های ادراری می باشد(۱).در سال های اخیر افزایش مقاومت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها در حال افزایش است که این امر مشکل اساسی را در درمان ایجاد کرده است. بطور مشابه در درمان عفونت های مجاری ادراری ناشی از این باکتری ها نیز که معمولا از دارو های گروه بتا لاکتام وسفالوسپورین ها استفاده می شود بدلیل بروز موارد شکست درمانی از دارو های وسیع الطیف گروه فلوروکینولون استفاده می گردد که در اکثر موارد در درمان موثر بوده اند(۲). اما در سال های اخیر حتی نسبت به این دارو ها نیز مقاومت رو به افزایشی ایجاد شده که ضمن ایجاد اختلال در روند درمان موجب افزایش طول مدت بستری و بالا رفتن هزینه های درمانی شده است. لذا بررسی مداوم و پیوسته میزان مقاومت این باکتری ها نسبت به دارو های رایج در درمان امری ضروری است(۳).

بروز مقاومت نسبت به گروه کینولون ها اکثرا به دلیل بروز موتاسیون در ژن های کروموزومی چون DNA gyrase بوده است اما متعاقبا با بروز مقاومت با واسطه ژن های پلاسمیدی چون qnrA ،qnrB در سویه های کلبسیلا علت بروز مقاومت نسبت به فلوروکینولون ها در سویه های اشریشیا کلی نیز تغییر کرده است(۴) .بر این اساس ، هدف از انجام این تحقیق تعیین وضعیت مقاومت سویه های اشریشیا کلی جدا شده از نمونه ادرار بستری شدگان در بیمارستان امام خمینی تهران نسبت به دارو های رایج با تاکید بر کینولون ها و ارزیابی میزان پراکندگی ژن پلاسمیدی qnrA در این باکتری ها بوده است.

روش کار

در این مطالعه توصیفی – مقطعی نمونه های ادرار بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان امام خمینی در در طی ۶ ماه (از اسفند ۱۳۸۹ تا شهریور ۱۳۹۰)جمع آوری و بر اساس روش های استاندارد باکتری شناسی مورد بررسی قرار گرفتند(۵). در ادامه ۱۰۰ سویه اشریشیاکلی بطور تصادفی جهت بررسی در این تحقیق انتخاب شد و حساسیت یا مقاومت آنها نسبت به آنتی بیوتیک های ایمی پنم، سفتریاکسون، پنی سیلین، آموکسی سیلین، سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید، آموکسی کلاو، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفکسیم، سفالکسین، آزترونام (Himedia co. India) بر اساس روش Kirby_Bauer و با استفاده از محیط مولر هینتون آگار طبق پروتکلCLSI ۲۰۱۱تعیین شد(۵). بطور هم زمان اطلاعات بیماران از نظر جنس ، سن و بخش بستری نیز ثبت گردید.

در مرحله بعدی استخراج DNA انجام شد و بدین منظور در ابتدا از نمونه های باکتری در محیط LBبراث برای مدت ۱۸ ساعت کشت شد و در ادامه استخراج DNAباکتری با استفاده از کیت (Gene JET^{tm}, Fermentase ≠ KO721) انجام و متعاقبا به کمک روش PCR فراوانی ژن qnrA در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر (از هر پرایمرµl 6، DNA µl 5 ، Ampliqon Master mix (2X) µl۲۵و مابقی آن حاوی آب مقطر بود) تعیین شد. توالی پرایمر های استفاده شده در این مطالعه هم راه با اندازه قطعه محصولPCR درجدول ۱ ذکر شده اند.

جدول ۱: توالی جفت پرایمرهایqnrA استفاده شده در این مطالعه و اندازه محصول PCR

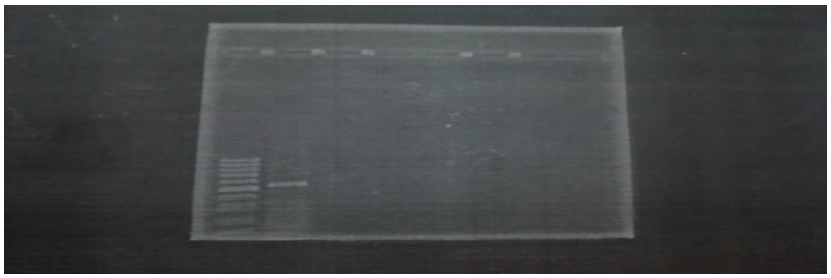
اسم پرایمر	توالی الیگونوکلئوتید	اندازه محصول (bp)
qnrA(F)	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516
qnrA(R)	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	

آزمون PCR با استفاده ازدستگاه ترموسایکلر Eppendorf در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه ،دمای ۹۴ درجه سانتی گراد ۶۰ ثانیه ، حرارت ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و دمای۷۲ درجه ۵ دقیقه (extensionانتهایی)انجام گردید.در نهایت ۴ میکرولیتر از محصول هم راه با بافر لودینگ به ژل آگاروز ۱٪ منتقل نموده و با ولتاژ ۱۰۰ توسط دستگاه Uvitec الکتروفورز شد . وجود محصول نهائی و اندازه آن پس رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و زیر نور UV و در حضور مارکر(Gene ruler 100-1000bp, Fermentase) تعیین شد. در این مطالعه از سویه E.coli ATCC 25922 به عنوان کنترل استفاده شد.

یافته ها

در این مطالعه نمونه های ادرار بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان امام خمینی در طی ۶ ماه از اسفند ۱۳۸۹ تا شهریور ۱۳۹۰ جمع آوری شد و ۱۰۰ سویه E.coli بطور تصادفی انتخاب شدند.۷۷ بیمار بزرگ سال (۲۱ مرد و ۵۶ زن) و ۲۳ بیمار کودک (۹ پسر و ۱۴ دختر) بودند. ۳۳، ۲۱، ۱۵، ۱۴ و ۲۲ نمونه به ترتیب از بخش زنان، کودکان، ارولوژی، اعاب و سرپایی و ۱۶ نمونه از سایر بحش ها جمع آوری شد.

تمام سویه ها نسبت به پنی سیلین و آموکسی سیلین، ۷۷٪ به آموکسی - کلاو،۷۲٪ به سفتازیدیم، ۶۹٪ به سفوتاکسیم، ۶۳٪ به نالیدیکسیک اسید، ۵۱٪ به سیپروفلوکساسین ، ۴۷٪ به سفکسیم، ۴۶٪ به سفتریاکسون ، ۴۳٪ به سفالکسین، به آزترونام ۲۷٪ و به ایمی پنم ۲٪ مقاوم بودند.در مرحله غربال گری با استفاده از PCR در ۳۹/۵ ٪ از نمونه ها باندی به وزنbp ۵۱۶ مربوط به ژن qnrA مشاهده شد(شکل۱).



شکل ۱: مربوط به PCR ژن qnrA : ladder (100-1000) ، ۲ یک نمونه حاوی ژنqnrA با باند به وزن (516bp)،۳-کنترل منفی(*E.coli* ATCC 25922) ۴- شاهد منفی فاقد DNA

بحث

در این مطالعه بطور تصادفی ۱۰۰ سویه اشریشیا کلی جدا شده از ادرار بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان امام خمینی انتخاب شدند . همان طور که انتظار می رفت بیش ترین گروه درگیرمربوط به گروه بانوان و متعاقبا بخش زنان بوده است .به علاوه مقاومت این باکتری ها نسبت به آمپی سیلین وپنی سیلین ۱۰۰٪ بوده است .هم چنین مقاومت هم زمان نسبت به هردو داروی نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین در تقریبا نیمی از باکتری های مورد بررسی(۴۹٪) دیده شده و این امر همانند زنگ خطری است تا به میزان مصرف و تجویز این دارو ها توجه بیش تری گردد. در بین سال های ۲۰۰۲-۲۰۰۴در شهر Minnesotaآمریکا روی ۹۳۱ نمونه اشریشیا کلی جدا شده از ادرار در دو گروه بیماران و کنترل بررسی انجام و مقاومت آنها نسبت به فلوروکینولون ها تعیین شد . هم چنین با روش PCRمقاومت مولکولی نسبت به فلوروکینولون ها ، تری متو پریم سولفومتوکسازول و سفالوسپورین های ارزیابی شد. بر اساس نتایج بدست آمده مشخص شد که میزان مقاومت نسبت به دارو ها ی فلوروکینولون به ویژه در افراد بستری در بیمارستان بیش تر از افراد کنترل بوده است(۷). از بین نمونه های بررسی شده ۸۴٪ بیماران مربوط به بیماران بستری در بخش های مختلف و ۱۶٪ مربوط به بیماران سرپائی مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی تهران بوده است. بعلاوه مقاومت این باکتری ها نسبت به پنی سیلین و آموکسی سیلین ۱۰۰٪، سفتریاکسون ۴۶٪ ونسبت به سیپروفلوکساسین ۵۱٪ بوده است. لذا نتایج هر دو تحقیق بطور مشابه مقاومت بالای این باکتری ها را نسبت به دارو های رایج در درمان عفونت های ادراری نشان می دهد.

در مطالعه Warburg و هم کاران(۱۹۹۱-۲۰۰۵) بررسی مقاومت سویه های اشریشیا کلی نسبت به فلوروکینولون ها و غربال گری ژن های qnrA ، qnrB و aac-Ib-cr با استفاده از روش PCR انجام شد و مشخص شد که نه تنها مقاومت این باکتری ها نسبت به سیپروفلوکساسین رو به تزاید است بلکه بسیاری از این سویه ها مولد بتا لاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) نیز بوده اند و لذا جابه جائی ژن های پلاسمیدی نقش مهمی را در این بین ایفا می نمایند. هم چنین، با توجه به نتایج مطالعه مذکور این فرضیه ایجاد شد که نوعی مقاومت هم زمان نسبت به فلوروکینولون ها و توانایی تولیدESBL به دلیل ارتباط بین دو پلاسمید وجود دارد(۸). در مطالعه حاضر نیز در بین سویه های اشریشیا کلی بررسی شده ضمن مشاهده مقاومت صد در صدی نسبت به پنی سیلین و آموکسی سیلین در ۴۹٪ سویه های مقاومت هم زمان نسبت به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید دیده شد.

درمطالعه ۵ ساله ای که در شهر هیستون آمریکا انجام شد ، ارتباط بین فاکتور های زمان ، مکان ، سن و جنس در ایجاد مقاومت نسبت به فلوروکینولون ها بررسی و مشخص شد در افراد مذکر با افزایش سن و افزایش طول مدت بستری در بیمارستان میزان بروز مقاومت نسبت به فلوروکینولون ها نیز افزایش می یابد(۹).

بطور مشابه افزایش مقاومت نسبت به سیپرو فلوکساسین در سویه های اشریشیا کلی جدا شده از نمونه های ادرار بیماران مبتلا به عفونت های ادراری در سوئیس به استفاده بی رویه از فلوروکینولون ها نسبت داده شده است(۱۰). در مطالعه Joseph و هم کاران که در کانادا انجام شد، تغییرات میزان مقاومت نسبت به لوفلوکساسین(از دیگر دارو های گروه فلوروکینولون ها) بررسی و مشخص گردید که میزان مقاومت نسبت به این دارو طی ۵ سال از ۱٪ به ۹٪ افزایش داشته و عواملی چون طول مدت بستری و استفاده بی رویه از این دارو ها در افزایش مقاومت دخالت داشته است(۱۱). در مطالعه دیگری که در نروژ انجام شد، تغییرات مقاومت سویه های اشریشیا کلی جدا شده از عفونت های ادراری نسبت به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید با روش دیسک دیفیوژن در طی ۴ سال،۱/۲٪ افزایش نشان داد. در این مطالعه نیز بیش ترین نمونه از بانوان جمع آوری شده بود.در ادامه مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین ، تری متوپریم ، آمپی سیلین ، سولفونامید ، نیتروفورانتوئین، نالیدیکسیک اسید ، کلرامفنیکل ، تتراسایکلین ، جنتامایسین تعیین شد و در نهایت با استفاده از وضعیت ژنهای دخیل در بروز مقاومت توسطPCRو Pulse-field تایید گردید(۱۲). اگرچه در مطالعه حاضر از متد Pulse-field استفاده نشده اما بطور مشابه بیش ترین بیماران بررسی شده مربوط به گروه جنسی بانوان بوده است و گرچه تغییر میزان مقاومت نسبت به فلوروکینولون ها در طی چند سال بررسی نشده است ولی با انجام دیسک دیفیوژن میزان مقاومت نسبت به دو داروی رایج فلوروکینولون نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین به ترتیب ۶۳٪ و ۵۱٪و مقاومت هم زمان به دو دارو در ۴۹٪ سویه ها تائید گردید. به علاوه با استفاده از روش PCR فراوانی ژن qnrA در۳۹/۵٪ سویه ها شناسایی گردید.

سیپروفلوکساسین در مقایسه به مقاومت نسبت به هر یک به تنهائی در تقریبا نیمی از سویه ها دیده شد(۴۹٪)، انجام آزمایش ساده انتی بیوگرام قبل از تجویز هر گونه داروئی خصوصا کینولون ها پیشنهاد می گردد تا بتوان از روند رو به افزایش اکتساب مقاومت نسبت به دارو های فلوروکینولون مما نعت نمود.

نتیجه گیری

با در نظر گرفتن این نکته که بیش ترین بیماران بررسی شده در این مطالعه بانوان بوده و بیش ترین نمونه ها نیزاز بخش زنان جدا شد، از طرف دیگر مقاومت هم زمان نسبت به هر دو داروی نالیدیکسیک اسید و

REFERENCES

1- Rahimi MK, Hakemi Vala M, Eslami G, Fallah F, Godarzi H(2009). Translated Medical microbiology Jawets, 24th edition, Aiij publisher .

2- Gallini A, Degris E, Desplas M, Bourrel R, Archambaud M, Montastruc JL, Lapeyre-Mestre M, Sommet A (2010). Influence of fluoroquinolone consumption in inpatients and outpatients on ciprofloxacin-resistant Escherichia coli in a university hospital J Antimicob chemother;65(12):2650-7.

3- Lee K, Lee MA, Lee CH, Lee J, Roh KH, Kim S, Kim JJ, Koh E, Yong D, Chong Y; the KONSAR group (2010) . Increase of Ceftazidime- and Fluoroquinolone-Resistant Klebsiella pneumoniae and Imipenem-Resistant Acinetobacter spp. in Korea: Analysis of KONSAR Study Data from 2005 and 2007.Yonsei Med J, 51(6):901-911.

4-Hong Bin Kim, Chi Hye Park, Chung Jong Kim, Eui-Chong Kim, George A. Jacoby, and David C. Hooper (2009). Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants over a 9-Year Period. Antimicrob Agents Chemother,53(2): 639–645.

5- Murray PR, Jorgenson JH, Yolken RH, Baron EJ, Pfaller MA (2003). Manual of clinical microbiology,8th edi, Vol1,Mosby.

6- Robicsek, A., J. Strahilevitz, D. F. Sahm, G. A. Jacoby, and D. C. Hoope(2006). qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. Antimicrob. Agents Chemother: 50; 2872–2874.

7- James R. Johnson, Mark R. Sannes ,Cynthia Croy, Brian Johnston, Connie Clabots, Michael A. Kuskowski, Jeff Bender, Kirk E. Smith, Patricia L. Winokur, and Edward A. Belongia (2007). Antimicrobial Drug–Resistant Escherichia coli from Humans and Poultry Products, Minnesota and Wisconsin. EID Journals, 13(6): 838–846.

8- Gabriela Warburg, Maya Korem, Ari Robicsek, Dalia Engelstein, Allon E. Moses, Colin Block and Jacob Strahilevitz (2009).Changes in aac(6′)-Ib-cr Prevalence and Fluoroquinolone Resistance in Nosocomial Isolates of Escherichia coli Collected from 1991 through 2005.Antimicrobiol Agents Chemother, 53(3); 1268–1270.

9- Lauren Becnel Boyd, Robert L Atmar, Graham L Randall , Richard J Hamill, David Steffen and Lynn Zechiedrich(2008) . Increased fluoroquinolone resistance with time in Escherichia coli from >17,000 patients at a large county hospital as a function of culture site, age, sex, and location BMC Infect Dis,15(8):1-7.

10- Grude, N., Strand, L., Mykland, H., Nowrouzian, F. L., Nyhus, J., Jenkins, A. and Kristiansen, B.-E (2008). Fluoroquinolone-resistant uropathogenic Escherichia coli in Norway. Clin Microbiol Infect,14(5): 498–500.

11- Johnson L, Sabel A, Burman WJ, Everhart RM, Rome M, MacKenzie TD, Rozwadowski J, Mehler PS, Price CS (2008). Emergence of Fluoroquinolone Resistance in Outpatient Urinary Escherichia coli Isolates. Am J Med, 121(10): 876-884.

12- Nicoletti J, Kuster SP, Sulser T, Zbinden R, Ruef C, Ledergerber B, Weber R (2010). Risk factors for urinary tract infections due to ciprofloxacin-resistant Escherichia coli in a tertiary care urology department in Switzerland.Swiss Med WKLY, 140:w13059.