

بررسی مقایسه ای الگوی مقاومتی باکتری اشریشیا کلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری با نمونه
استاندارد ATCC25922

Comparative study of the resistance pattern of Escherichia coli bacteria isolated from
patients with urinary tract infection with standard samples ATCC25922

- الهوردی قنبری ۱، شیوا سادات حسینی ۲، بیتا بشیری اقدام ۳، فاطمه غلامی ۴، الهام ملک زاده
۱. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه علوم پایه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
۲. دانشجوی کارشناس میکروبیولوژی، گروه علوم پایه زیست شناسی، موسسه آموزشی آفاق، ارومیه
۳. دانشجوی کارشناس میکروبیولوژی، گروه علوم پایه زیست شناسی، دانشگاه آزاد واحد ارومیه
۴. دانشجوی کارشناس میکروبیولوژی، گروه علوم پایه زیست شناسی، دانشگاه آزاد واحد ارومیه
۵. کارشناس میکروبیولوژی، گروه علوم پایه زیست شناسی، موسسه آموزشی آفاق، ارومیه

خلاصه:

امروزه با توجه به مصرف بی رویه و بدون تجویز داروهای ضد باکتریایی پدیده ای به نام مقاومت آنتی بیوتیکی برای سازمان های مرتبط با درمان و سلامتی خیلی نگران کننده شده است. با توجه به اینکه باکتری اشریشیا کلی به عنوان یکی از عوامل مهم در ایجاد عفونت ادراری است لذا توجه به موضوع تعیین الگوی مقاومتی این باکتری خیلی ضروری به نظر میرسد. در مطالعه حاضر نیز به خاطر اهمیت موضوع، تعداد ۵۰ نمونه باکتری اشریشیا کلی جدا شده از افراد دارای عفونت ادراری از نظر هاله عدم رشد در برابر دیسک های آنتی بیوتیکی با اشریشیا کلی دارای شناسه استاندارد مورد مقایسه واقع شد.

کلمات کلیدی: الگوی مقاومتی، اشریشیا کلی، آنتی بیوتیک، عفونت ادراری

مقدمه

به منظور ارزیابی دقیق الگوی مقاومت دارویی و تفسیر نتایج آزمایشگاهی، استفاده از سویه های استاندارد کنترل کیفی اهمیت ویژه ای دارد. سویه E. coli ATCC 25922 یکی از شناخته شده ترین و معتبرترین سویه های مرجع در ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی است که به طور گسترده در آزمایشگاه های میکروبیولوژی پزشکی برای کنترل کیفی روش های دیسک دیفیوژن، MIC و سایر آزمون های مربوطه به کار می رود (۱). از این رو، انجام مطالعه ای مقایسه ای میان سویه های اشریشیا کلی جدا شده از بیماران و سویه استاندارد ATCC 25922، نه تنها در شناخت الگوی مقاومت رایج و تغییرات احتمالی آن مؤثر است، بلکه می تواند مبنایی برای انتخاب درمان های هدفمند، به کارگیری راهبردهای کنترل عفونت و برنامه ریزی در سیاست های مصرف آنتی بیوتیک باشد. این پژوهش با هدف بررسی و مقایسه دقیق الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی در این دو گروه انجام شده است. گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی در میان باکتری های پاتوژن، از مهم ترین چالش های نظام سلامت در دهه های اخیر است. اشریشیا کلی، به عنوان شایع ترین عامل UTI، به طور فزاینده ای نسبت به آنتی بیوتیک های رایج مانند سفالوسپورین ها، فلوروکینولون ها و آمینوگلیکوزیدها مقاومت نشان می دهد (۲). این روند علاوه بر ناکارآمدی روش های درمانی، هزینه های درمانی و مدت بستری بیماران را افزایش می دهد. شناسایی دقیق الگوی مقاومت در سویه های بالینی، تنها زمانی قابل اعتماد خواهد بود که با یک سویه مرجع معتبر مانند ATCC 25922 مقایسه شود. با وجود اهمیت این مقایسه، مطالعات جامع در این زمینه محدود بوده و خلأ پژوهشی قابل توجهی وجود دارد. بنابراین نیاز است الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های بالینی جدید مورد بررسی و با سویه استاندارد تطبیق داده شود تا تغییرات احتمالی در عملکرد آنتی بیوتیک ها به طور دقیق مشخص گردد. مطالعات انجام گرفته شده در

جوامع مختلف نشان میدهد که باسیل های گرم منفی، به عنوان شایعترین عامل اتیولوژیک عفونت دستگاه ادراری بوده و در بین آنها باکتری اشرشیا کلای بیش از ۸۰ درصد موارد عفونت های حاد دستگاه ادراری را تشکیل میدهد. افزایش خطر عفونت دستگاه ادراری در نوزادان، زنان باردار، افراد سالخورده، بیماران با اشکال در عصب دهی مثانه که در آسیب به نخاع و متعاقب استفاده از سوند ادراری، مولتیپل اسکلروزیس، دیابت و بیماران دچار نقص سیستم ایمنی بیشتر گزارش میشود. اساس درمان مناسب در عفونت های ادراری، انتخاب یک آنتی بیوتیک مناسب با کارایی و اثر بخشی بالا میباشد. (۳)

امروزه اشرشیاکلی شایع ترین اوروپاتوژن می باشد که به دلیل مقاومت روزافزون به آنتی بیوتیک ها، درمان آن دشوارتر شده است.

اشرشیا کُلی یا به اختصار E.coli نوعی باسیل گرم منفی بی هوازی اختیاری و میله ای شکل کلی فرم از سرده اشرشیا و خانواده انتروباکتریاسه است. رشد بهینه این باکتری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس است. سویه های اشرشیا کلای دارای تاژک و متحرک هستند. تاژک ها متعدد و از نوع پیرامونی هستند. در واقع این باکتری جزء فلور طبیعی روده جانوران گرم است اما تحت تأثیر عواملی مثل شرایط محیطی، ضعف سیستم ایمنی میزبان و تغییرات در ژن باکتری می تواند باعث بیماری زایی شود. گونه های بیماری زا اشرشیاکلی می توانند باعث بروز عفونت های مختلفی مانند اسهال، عفونت مجاری ادراری، سپسیس، و حتی مننژیت در نوزادان شوند. (۴) اشرشیا کلای با استفاده از مکانیسم هایی مانند ترانسفورماسیون، هم یوگی (کانژوگاسیون) و ترانسسانی، ماده ژنتیکی خود را از راه انتقال افقی ژن ها به سایر باکتری های مشابه خود منتقل می کنند. علائم بالینی اشرشیاکلی به صورت تکرر ادراری، سوزش ادراری، خون در ادرار و چرک در ادرار است. نخستین بار در سال ۱۸۸۵ Theodor Escherich، این باکتری را در مدفوع افراد سالم پیدا کرد و آن را Bacterium coli commune نامید. در صورتی که UTI به موقع و به درستی درمان شود، به ندرت عوارض جانبی ایجاد می کند. اما اگر درمان نشود، ممکن است عواقب جدی به همراه داشته باشد به عنوان مثال سپسیس به خصوص زمانی اتفاق می افتد که عفونت از مجرای ادراری به کلیه ها گسترش پیدا کند. عفونت مثانه (سیستیت) اغلب توسط باکتری اشرشیا کُلی (E. coli) ایجاد می شود. اشرشیا کُلی (E. coli) قادر به تشکیل بیوفیلم هست ساختاری محافظتی که باکتری ها در آن به صورت گروهی زندگی کرده و در برابر آنتی بیوتیک ها مقاومت بیشتری پیدا می کنند. آنتی بیوتیک هایی که E. coli معمولاً به آن ها مقاومت دارد شامل پنی سیلین، سفالوسپورین های نسل اول، تتراسایکلین ها و فلوروکینولون ها هستند. (۵)

مواد و روش مطالعه:

در مطالعه حاضر که بصورت توصیفی - مقطعی می باشد، تعداد ۱۵۰ نمونه ادرار صبحگاهی از نظر کشت میکروبی مورد آزمایش واقع شدند. کشت اولیه نمونه ها بر روی محیط کشت ها بلاد آگار و آئوزین متیلن بلو صورت گرفت. کشت های اولیه بعد ۲۴ ساعت نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد مورد بررسی واقع شدند. از تعداد ۱۵۰ نمونه اولیه، ۵۰ کشت مثبت میکروبی از نظر جدایه اشرشیاکلی انتخاب و وارد مطالعه شد. برای تشخیص نهایی جدایه، تست های بیوشیمیایی (اکسیداز، کاتالاز و کوآگولاز) و همچنین از محیط کشت های افتراقی ۵ گانه شامل (سیمون سیترا، اوره آگار، MR-VP، TSI، SIM) برای بررسی IMVIC استفاده شد. بعد از تشخیص نهایی جدایه مورد نظر، بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار تست آنتی بیوگرام به روش دیفیوژن بر اساس CLSI صورت گرفت. همچنین برای مطالعه مقایسه ای جدایه های بالینی با نمونه اشرشیا کُلی دارای شناسه ملی بصورت تجاری خریداری گردید.

جدول شماره (۱) تجهیزات مورد استفاده در تحقیق

جدول (۱) مواد و تجهیزات مورد استفاده

نام دستگاه/مواد	شرکت سازنده	تعداد/عدد، ویال
هود میکروبی	لا بترون	۱

۱	کاوش مگا	انکوباتور
۱۵۰	فرازبین کیمیا	ظرف کشت ادرار
۱	انستیتو پاستور	سوش استاندارد اشرشیا کلی
۱	الیمپوس	میکروسکوپ
۴۰۰	زیست رویش	محیط های کشت
۱	بهار افشان	کیت رنگ آمیزی گرم
۳۰۰	پادتن طب	دیسک آنتی بیوتیک

جدول (۱) نشان دهنده مواد مصرفی در این مطالعه می باشد که اکثریت آنها به جزء تجهیزات استفاده شده، به صورت تجاری خریداری شدند.

نتایج تحقیق:

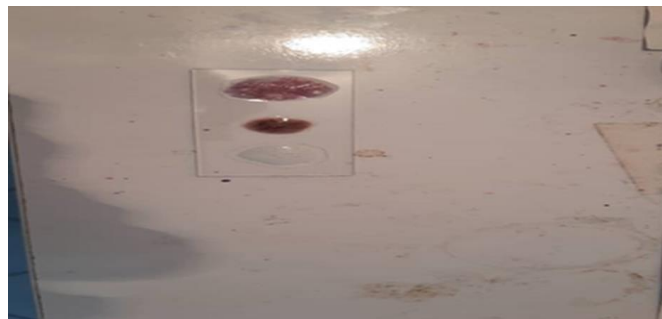
بعد از انجام تست آنتی بیوگرام بر روی محیط مولر هینتون آگار، قطر هاله های عدم رشد باکتری ها در مقابل دیسک های آنتی بیوتیکی بوسیله خط کش مخصوص اندازه گیری شد و در مقابل هاله عدم رشد اشرشیا کلی با شناسه استاندارد مورد مقایسه واقع گردید.

شکل شماره (۱) محیط کشت EMB



شکل شماره ۱ رشد باکتری اشرشیا کلی بر روی محیط کشت انتخابی اتوزین متیلن بلو و ایجاد جلای سبز نشان داده می شود.

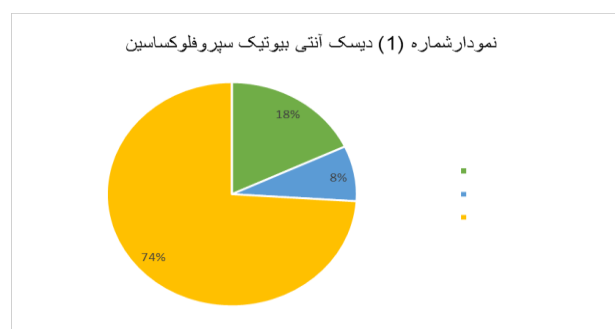
شکل شماره (۲) تست کاتالاز



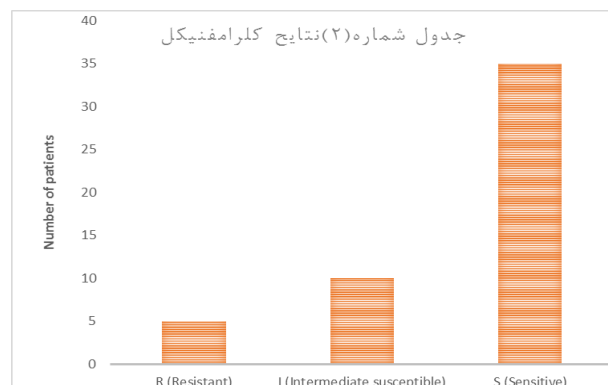
در شکل شماره ۲ تست کاتالاز یکی از مهمترین تست های بیوشیمیایی در باکتری های گرم منفی به خصوص انتروباکتریاسه ها می باشد. اشریشیا کلی نیز عضو انتروباکتریاسه و کاتالاز مثبت می باشد.

نتایج تحقیق:

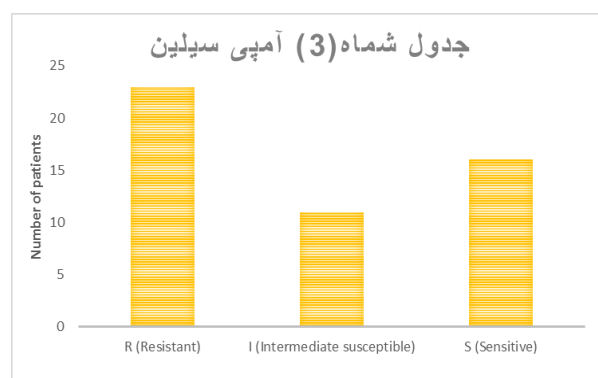
در بررسی آنتی بیوگرام قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک مروپنم تعداد ۱۲ نفر (۲۴٪) از بیماران مقاوم، تعداد ۹ بیمار (۱۸٪) نیمه حساس و تعداد ۲۹ نفر (۵۸٪) مقاوم بوده اند. نتایج تست آنتی بیوگرام باکتری اشریشیا کلی در مقابل آنتی بیوتیک سفازولین ۲۹ نفر (۵۸٪) از بیماران مقاوم، تعداد ۷ نفر (۱۴٪) نیمه حساس و تعداد ۱۴ نفر (۲۸٪) حساس بوده اند.



در جدول شماره ۱ نتایج اندازه گیری قطر هاله عدم رشد باکتری اشریشیا کلی در برابر دیسک آنتی بیوتیک سفروفلوکساسین نشان داده میشود که بر این اساس تعداد ۹ (۱۸٪) حساس، تعداد ۳۷ (۷۴٪) مقاوم و تعداد ۴ (۸٪) نیمه حساس بود.



در جدول شماره ۱ نتایج اندازه گیری قطر هاله عدم رشد باکتری اشرشیا کلی در برابر دیسک آنتی بیوتیک کلرامفنیکل نشان داده میشود که بر این اساس تعداد ۳۵ (٪۷۰) نمونه حساس، تعداد ۵ (٪۱۰) مقاوم و تعداد ۱۰ (٪۲۰) نیمه حساس می باشد.



در جدول شماره ۱ نتایج اندازه گیری قطر هاله عدم رشد باکتری اشرشیا کلی در برابر دیسک آنتی بیوتیک آمپی سیلین نشان داده میشود که بر این اساس تعداد ۱۶ (٪۳۲) نمونه حساس، تعداد ۲۳ (٪۴۵) مقاوم و تعداد ۱۱ (٪۲۲) نیمه حساس می باشد.

جدول (۲) نتایج اشرشیاکلی با شناسه استاندارد

مروپنیم	آمپی سیلین	کلرامفنیکل	سپروفلوکساسین	سفازولین	دیسک آنتی بیوتیک
۲۵	۲۰	۲۳	۳۰	۲۹	اندازه قطر هاله / میلی متر
Sensitive	Sensitive	Sensitive	Sensitive	Sensitive	

در جدول شماره ۲ نتایج تست آنتی بیوگرام باکتری اشرشیاکلی با کد استاندارد ATCC25922 نشان داده می شود که بر این اساس همه آنتی بیوتیک بر اساس CLSI کنترل و همه در محدوده حساس می باشد.

بحث و نتیجه گیری:

داروهای آنتی بیوتیک دسته دارویی مهمی هستند که علیه عفونت های باکتریایی در بدن مبارزه می کنند و یا باکتری ها را از بین می برند و یا از رشد و تکثیرشان در بدن جلوگیری می کنند. هر زمان که یک داروی آنتی بیوتیک را با تشخیص خودمان یا افراد غیرپزشک مصرف کنیم، یک قدم به سمت عوارض جانبی و مقاومت آنتی بیوتیکی پیش می رویم. مقاومت آنتی بیوتیکی به این معنا است که در صورت ابتلا به عفونت باکتریایی حتی با مصرف دارو، باکتری ها همچنان به رشد و فعالیت ادامه می دهند و دارو قادر نیست باکتری را از بین ببرد و از فعالیت بیماری زایی اش جلوگیری کند. مصرف بیش از حد و غیراصولی آنتی بیوتیک ها، به باکتری ها فرصت می دهد مکانیسم های دفاعیشان را برای مقاومت در برابر دارو ها فعال تر کنند. مقاومت باکتری در برابر آنتی بیوتیک ها یک تهدید جدی برای سلامت جهانی محسوب می شود. بر اساس آمارهای اراده شده توسط مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری های ایالات متحده (CDC)، سالانه ۲ میلیون نفر در ایالات متحده به عفونت های مقاوم به آنتی بیوتیک مبتلا می شوند و دست کم حدود ۲۳۰۰۰ نفر در اثر این عفونت ها می میرند. این آمار و مرگومیر در اثر عفونت، یکی از جوانب نگران کننده ی مقاومت دارویی باکتری ها محسوب می شود.

در سال ۲۰۱۳، مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری های ایالات متحده ۱۸ باکتری مقاوم در برابر دارو را معرفی کرد میزان خطری که این باکتری ها برای جان افراد دارند به سه گروه خطرناک (Urgent)، جدی (serious) و نگران کننده (concerning) طبقه بندی می شود. عفونت های اشریشیا کلی (E. coli) و کلبسیلا مقاوم در برابر کارباپنم در مراکز درمانی در حال افزایش هستند. عفونت ناشی از این باکتری ها به طور سالانه سبب مرگ و میر ۶۰۰ نفر در ایالات متحده می شوند و هرساله ۹۰۰۰ عفونت مقاوم در برابر آنتی بیوتیک از این نوع باکتری ها ایجاد می شود. همانطور که گفته شد مقاومت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک موضوعی نگران کننده در حوزه ی پزشکی است و اغلب به دلیل تجویز غیرضروری یا نادرست آنتی بیوتیک رخ می دهد. به همین دلیل لازم است تا اقداماتی برای کاهش روند مقاوم شدن باکتری ها نسبت به دارو صورت گیرد. ضرورت رعایت این اقدامات هم شامل کادر درمان و هم خود بیمار می شود. اقدامات زیر می تواند در کاهش سرعت مقاومت به آنتی بیوتیک در باکتری ها موثر باشد.

Reference:

1. Rnuka KA, Kapil A, Kabra SK, Wig N, Prasad SP, Chaudhry R. Reduced susceptibility to ciprofloxacin and gyrA gene mutation in north Indian strains of Salmonella enteric serotype typhi and serotype paratyphi A. Microb Resist; 2004; 10(8),58-63
2. Stamm WE, Norrby SR. Urinary tract infections. J Infect Dis; 2001; 18(3), 51-54.
3. Astal Z. Increasing Ciprofloxacin resistance among prevalent urinary tract bacterial isolates in Gaza Strip Palestine. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Singapore Med J; 2015; 46: (4), 57-65.
4. Haghightapanah M, Mozaffari Nejad AS, Mojtahedi A, Amirmozafari N, Zeighami H. Detection of ESBL and plasmid borne blaCTX-M and blaTEM genes among clinical strains of E. coli isolated from patients in the north of Iran. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2016; 7 (2): 110-113.
۵. نشاط غلامی، ن (۱۳۹۶). "بررسی تأثیر نانو ذرات نقره بر روی باسیل های گرم منفی مسبب عفونت های ادراری مقاوم به چند آنتی بیوتیک (MDR)"، فصلنامه علمی - پژوهشی بیولوژی کاربردی، شماره ۳، ص ۴۱ تا ص ۴۸.
۶. نادر نظامی، ن (۱۳۹۲). "سنتز نانوذرات نقره با ساختار مثلثی شکل و بررسی خواص ضد باکتریایی آنها بر روی باکتری های گرم منفی و گرم مثبت"، مجله مواد و فناوری های پیشرفته، شماره ۴ ص ۶۱ تا ۶۶.
۷. خداشناس، ن (۱۳۹۴). "بیوسنتز نانو ذرات نقره با استفاده از باکتری اشریشیاکولای"، مجله علوم پزشکی رازی، شماره ۱۳۶، ص ۲۲ تا ص ۲۴.