بررسی فراوانی ژن‌های *sul* در سویه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد

مهناز شماعی[۱]، مریم رئیسی[۲]، حسین خدابنده شهرکی[۳]*

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسئول: Hossein.khodabandeh.sh@gmail.com

چکیده

عفونت‌های ادراری یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی محسوب می‌گردد و *اشریشیاکلی* به‌عنوان مهم‌ترین عامل عفونت‌های ادراری مطرح می‌باشد. این تحقیق باهدف بررسی فراوانی ژن‌های *sul* در باکتری *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد عفونت‌های دستگاه ادراری در شهرکرد به‌صورت مقطعی - توصیفی در سال ۱۳۹۲ صورت گرفت. نمونه‌ها به‌صورت استریل تهیه شد و از لحاظ آزمایش‌های کامل ادرار، کشت و مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی حساسیت میکروبی با روش دیسک دیفیوژن انجام گرفت. همچنین به‌منظور ردیابی ژن‌های *sul* واکنش PCR در حضور پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت و نتایج به‌دست‌آمده مورد تجزیه‌وتحلیل واقع شد. در این تحقیق از ۱۳۰ ایزوله *اشریشیاکلی* مورد بررسی در ۶۷ ایزوله (۵۱/۵۳درصد) مقاومت به کوتریموکسازول مشاهده گردید. فراوانی ژن‌های *sul1*, *sul2* و *sul3* به ترتیب ۲۰/۸۹درصد، ۵۵/۲۲درصد و ۴/۴۷درصد گزارش گردید. در تجزیه‌وتحلیل آماری با آزمون کای اسکوار بین مقاومت به سولفونامید و ژن‌های *sul* رابطه معنی‌دار آماری مشاهده گردید. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ایزوله‌های *اشریشیاکلی* نسبت به سولفونامیدها مقاومت بالایی دارند که علت آن می‌تواند مصرف بی‌رویه این آنتی‌بیوتیک‌ها باشد.

واژگان کلیدی: *اشریشیا کلی*، سولفونامیدها، عفونت‌های دستگاه ادراری، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

عفونت دستگاه ادراری اگر چه یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی است که به‌راحتی قابل‌درمان است ولی یکی از شایع‌ترین عفونت‌های بیمارستانی است که عمدتاً زنان، کودکان و افراد مسن را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (۴-۱). مطالعات انجام شده در جوامع مختلف نشان می‌دهد که باسیل‌های گرم منفی به‌عنوان شایع‌ترین عوامل اتیولوژیک عفونت‌های مجاری ادراری بوده و در بین آن‌ها *اشریشیاکلی* عامل اولیه ۹۰-۷۵ درصد موارد عفونت دستگاه ادراری است (۶،۵،۲). عفونت‌های دستگاه ادراری ایجاد شده توسط *اشریشیاکلی* شامل طیف وسیعی از اختلالات از جمله التهاب مثانه، التهاب و عفونت میزنای و عفونت کلیه هستند (۸،۷). کسب ژن‌های مقاومت توسط انتقال افقی، در حال حاضر نقش عمده‌ای را در گسترش سویه‌های مقاوم چندداروییی بازی می‌کند چون بخش قابل‌توجهی از ژن‌های مقاومت در پلاسمیدهای کونژوگاتیو، ترانسپوزون ها، توالی الحاقی و اینتگرون ها واقع شده‌اند. برای درمان عفونت دستگاه ادراری از تری متوپریم و سولفامتوکسازول به‌صورت ترکیبی استفاده می‌شود (۱۱-۹). سولفونامیدها به‌عنوان یک عامل بسیار مهم ضدمیکروبی برای درمان عفونت به *اشریشیاکلی* طبقه‌بندی‌شده‌اند و وجود مقاومت به سولفانامیدها می‌تواند منجر به شکست در درمان عفونت دستگاه ادراری شود. در *اشریشیاکلی* مقاومت در برابر سولفانامیدها اغلب مربوط به ژن *دی هیدروپتروآت سنتتاز* (*DHPS*)[1] در اینتگرون است (۱۲-۱۴). در حال حاضر سه نوع مختلف از ژن *DHPS*(*sul1*، *sul2* و *sul3*) مسئول مقاومت در برابر سولفانامیدها شناخته شده است. ژن *sul1* به طور انحصاری در پلاسمیدهای بزرگ کونژوگاتیو و انتهای ´۳ اینتگرون کلاس ۱ واقع شده است (۱۶،۱۵) درحالی‌که ژن *sul2* معمولاً در پلاسمیدهای متعلق به خانواده IncQ و یا در پلاسمیدهایی به نام پلاسمیدهای pBP1 واقع شده‌اند (۱۷). ساختمان پلاسمید حامل *sul3* هنوز به‌خوبی شناخته نشده است (۱۸). ژن‌های *sul1* و *sul2* شیوع بیشتری نسبت به ژن *sul3* دارند (۲۰،۱۹،۱۶). باتوجه‌به این که بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به‌صورت روزافزون در میان باکتری‌های مختلف، به یک معضل بزرگ درارتباط‌با سلامت همگانی تبدیل شده بنابراین بررسی فراوانی ژن‌های *sul* در باکتری *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد عفونت‌های دستگاه ادراری در شهرستان شهرکرد حائز اهمیت است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی *اشریشیاکلی*

۵ تا ۱۰ سی سی نمونه توسط بیمار و از طریق تکنیک ادرار وسط درظروف استریل جمع آوری گردیده و بلافاصله پس از نمونه گیری، نمونه‌های ادرار جهت انجام کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص نوع باکتری مورد بررسی قرار گرفتند.

نمونه ادرار میانی گرفته شده در بطری‌های استریل به‌محض رسیدن به آزمایشگاه کشت می‌شد. کشت کمی بوده و با استفاده از لوپ کالیبره ۰/۰۱ میلی لیتر، ازنمونه ادرارسانتریفوژ نشده درشرایط استریل برروی محیط مکانکی آگار کشت داده شد. پس از انجام کشت به روش خطی، محیط‌های کشت داده شده به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماخانه گذاری شدند. چنان چه در مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون رشدی در پلیت‌ها دیده نمی‌شد، ۲۴ساعت دیگر گرماخانه گذاری و درصورت عدم رشد، به عنوان کشت منفی ثبت می‌شد. بعد از مدت انکوباسیون تعداد کل باکتری‌های رشد کرده در میلی لیتر ادرار را از ضرب کردن تعداد کلنی‌های ظاهر شده در محیط بلاد آگار در ۱۰۰ به دست آورده و باسیل‌های گرم منفی از نظر مورفولوژی در محیط EMB (مرک، آلمان) مورد بررسی قرار گرفتند (۲۱).

پس از مشخص‌شدن نمونه‌های UTI مثبت، تعیین هویت باکتری *اشریشیاکلی* توسط آزمون‌های بیوشیمیایی (نظیر تست IMVIC،اوره، لیزین دکربوکسیلاز) و آزمون PCR جهت تشخیص مولکولی صورت پذیرفت (۲۲).

[1] . dihydropteroate synthase(DHPS)

آزمایشات مولکولی

استخراج DNA

به‌منظور تشخیص قطعی و بررسی فراوانی ژن‌های *sul* مراحل استخراج DNA با روش جوشاندن بر روی کلنی‌های رشد کرده، صورت گرفت. برای این منظور کشت یک شبه باکتری در محیط پپتون واتر (مرک، آلمان)، به‌عنوان منبع برای استخراج DNA، مورداستفاده قرار گرفت. برای این کار ۱۲۰ ماکرولیتر از محیط پپتون واتر که حاوی باکتری رشدیافته در محیط‌های کشت مورد بررسی بود (هر نمونه به شکل جداگانه)، را با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در بشر حاوی آب جوش، جوشانده شد. جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های موردمطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز استفاده شد. بدین منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده روی ژل ۱درصد آگاروز الکتروفورز گردید. به‌منظور کمیت‌سنجی DNA تخلیص شده از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه‌گیری میزان DNA در نمونه در طول‌موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید. نمونه DNAهایی که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بودند جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش PCR انتخاب گردیدند.

تأیید ایزوله‌ها با استفاده از آزمون PCR

بعد از استخراج DNA با استفاده از زوج پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* که در جدول ۱ نشان‌داده‌شده است، آزمایش PCR به‌منظور تشخیص قطعی *اشریشیاکلی* با استفاده از کیت Accupower PCR PreMix (ساخت بیونیر) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۱ میکرولیتر از پرایمرهای F و R و ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۴ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت Accupower PCR PreMix انجام گرفت. ترکیبات موجود در کیت در جدول ۲ نشان داده شده است (۲۳).

جدول ۱.توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله‌های*اشریشیا کلی*

ژن	توالی پرایمر (۳ـ۵)	اندازه محصول (bp)
16srRNA	16S-F, GCGGACGGGTGAGTAATGT 16S-B, TCATCCTCTCAGACCAGCTA	200

تکثیر ژن *16srRNA* با برنامه حرارتی ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه انجام گرفت و مشاهده باند ۲۰۰ جفت بازی نشان‌دهنده مثبت بودن این تست است (۲۳).

جدول ۲.اجزای کیت Accupower PCR PreMix

Component	20 µl Reaction
Taq DNA Polymerase	1 U
Each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTp)	250 µM
Tris-HCl (pH=9)	mM10
KCl	30 mM
MgCl2	1.5 mM
Stabilizer and tracking	

شناسایی ژن‌های *sul1*، *sul2* و *sul3* در ایزوله‌های *اشریشیاکلی*

آزمایش PCR به‌منظور ردیابی ژن‌های *sul1*، *sul2* و *sul3* با استفاده از کیت Accupower PCR PreMix

در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۳ میکرولیتر از پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۳ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت انجام گرفت. این آزمون بر روی ایزوله‌هایی که نسبت به آنتی بیوتیک کوتریماکسازول مقاوم بودند صورت گرفت. تکثیر ژن‌های *sul1*، *sul2* و *sul3* با برنامه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۶۵ درجه ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۷ دقیقه انجام گرفت و مشاهده باند ۴۳۳ جفت بازی نشان دهنده وجود ژن *sul1*، باند ۲۹۳ جفت بازی نشان دهنده وجود ژن *sul2* و باند ۷۵۰ جفت بازی نشان دهنده وجود ژن *sul3* می‌باشد (۲۴،۲۳).

جدول ۳. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص ژن‌های *sul* 1، *sul* 2 و *sul* 3

ژن	توالی پرایمر (۳ـَ۵)	Annealing temp (0C)	اندازهٔ محصول (bp)	منبع
Sul 1	F: CGGCGTGGGCTACCTGAACG R: GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	۶۵	۴۳۳	(۲۴)
Sul 2	F: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT R: GCGTTTGATACCGGCACCCGT	۶۵	۲۹۳	(۲۴)
Sul 3	F: GCCTATGCATCTACACAATC R: TGAGAAATGGACAATGTCCG	۶۵	۷۵۰	(۲۳)

بعد از انجام آزمایشات PCR، به‌منظور تأیید وجود قطعه تکثیر شده، محصول PCR روی ژل ۲درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز، آلمان) الکتروفورز و نتیجه با دستگاه تصویربردار از ژل (انگلستان، یووی تک) مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش آنتی بیوگرام

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش کربی - بائر برطبق دستورالعمل CLSI(شرکت پادتن طب) استفاده شد. در این تحقیق از سویه استاندارد *اشریشیاکلی* *ATCC* 25922 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در این آزمایش شامل: کوتریموکسازول(تری متوپریم-سولفامتوکسازول)(SXT)، آمیکاسین(AM30)، سفتریاکسون(CRO30)، نیتروفورانتوئین(FM300)، سفالوتین(CF30)، نالیدیکسیک اسید(NA30)، نورفلوکساسین(NOR)، تتراسایکلین(TE30)، ایمی‌پنم(IPM10)، جنتامایسین(GM10) (پادتن طب، ایران) مورداستفاده قرار گرفتند. برای انجام آنتی بیوگرام طبق دستورالعمل CLSI 3 ۳ تا ۴ کلنی از باکتری موردنظر را برداشته و به محیط TSB انتقال داده و به مدت ۱ تا ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده تا کدورتی معادل نیم مک فارلند حاصل شود سپس با استفاده از سوآپ استریل از باکتری برداشته و به‌صورت فشرده بر روی محیط مولر هینتون کشت انجام شد و دیسک‌های موردنظر با حفظ فاصله روی آن قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بر اساس اندازه هاله‌ی ممانعت از رشد، بر اساس جدول شرکت پادتن طب نتایج ثبت شد (۲۵).

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از ارزیابی ژن‌های *sul1*، *sul2* و *sul3* با استفاده از آزمون مربع کای اسکوار و دقیق فیشر و با نرم‌افزار SPSS شماره ۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

به‌منظور شناسایی *اشریشیاکلی* از تست‌هایی بیوشیمیایی استفاده گردید که نتایج آن در جدول ۴ نشان‌داده‌شده است.

جدول ۴. نتایج تست‌های بیوشیمیایی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرکرد

نوع باکتری	نوع تست						
	تولید اندول	متیل رد	ووژس پروسکوئر	سیترات	H_2S	اوره	لیزین دکربوکسیلاز
اشریشیا کلی	+	+	–	–	–	–	–

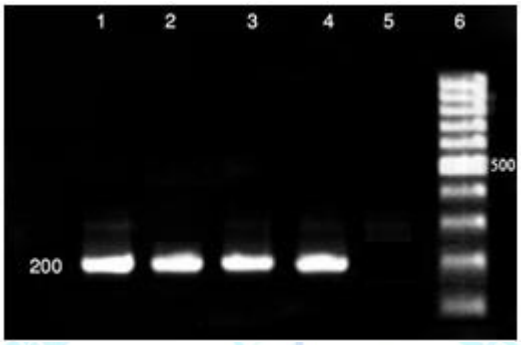
در آزمایش آنتی بیوگرام جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* از آنتی‌بیوتیک‌های معمول در درمان عفونت‌های ادراری در انسان استفاده شد که همان‌گونه که در جدول ۵ نشان‌داده‌شده است در هر دو جنس مرد و زن به ترتیب بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین با فراوانی ۷۵درصد و ۶۶/۳۳درصد و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوئین با فراوانی ۶/۸۹درصد در جنس مرد و کاملاً حساس در جنس زن مشاهده شد.

جدول ۵: مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرکرد در دو جنس زن و مرد

آنتی‌بیوتیک	جنسیت				p-value
	مرد۲۹=N	درصد	زن۱۰۱=N	درصد	
آمیکاسین(AM)	۲۱	۷۵درصد	۶۷	۶۶/۳۳درصد	۰/۳۸۴
تتراسایکلین(TE)	۲۰	۶۸/۹۶درصد	۵۳	۵۲/۴۷درصد	۰/۱۱۵
نالیدیکسیک اسید(NA)	۱۷	٪۵۸/۶۲	۵۱	٪۵۰/۴۹	۰/۴۴
کوتریموکسازول(SXT)	۱۹	٪۶۵/۵۱	۴۸	٪۴۷/۵۲	۰/۰۸۷
سیپروفلوکساسین(CP)	۱۲	٪۴۱/۳۷	۳۶	٪۳۵/۶۴	۰/۵۷۳
سفالوتین(CF)	۱۵	٪۵۱/۷	۳۵	۳۳/۳درصد	۰/۰۷
نورفلوکساسین(NOR)	۲۰	۶۸/۹۶درصد	۳۴	۳۳/۶۶درصد	۰/۰۰۱
سفتریاکسون(CRO)	۱۱	۳۷/۹۳درصد	۲۵	۲۴/۷۵درصد	۰/۱۶۲
AN	۷	۲۴/۱۳درصد	۲۳	۲۲/۷۷درصد	۰/۸۷۸
ایمی‌پنم(IMP)	۱۱	۳۷/۹۳درصد	۱۹	۱۸/۸۱درصد	۰/۰۳۱
جنتامایسین(GM)	۹	۳۱/۰۳درصد	۱۴	۱۳/۸۶درصد	۰/۰۳۳
نیتروفورانتوئین(FM)	۲	۶/۸۹درصد	۰	۰درصد	*۰/۰۴۸

* آزمون دقیق فیشر

در این تحقیق پس از انجام آزمون PCR به‌منظور تشخیص قطعی باکتری *اشریشیاکلی* و حضور توالی ژن *16SrRNA*، تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۲۰۰ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. نتایج در شکل ۱ نشان‌داده‌شده است.



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن *16srRNA*: ستون ۶: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۵: کنترل منفی، ستون ۴: کنترل مثبت، ستون‌های ۱، ۲ و ۳ باند ۲۰۰ جفت بازی مربوط به نمونه‌های مثبت

همان‌طور که در جدول ۶ و شکل ۲ نشان داده شده است پس از انجام آزمون PCR در حضور پرایمرهای اختصاصی از ۶۷ ایزوله مقاوم به سولفونامید ژن‌های *sul1* در (۲۰/۸۹درصد)۱۴ ایزوله، *sul2* در (۵۵/۲۲درصد)۳۷ ایزوله و *sul3* در (۴/۴۷درصد)۳ ایزوله مشاهده گردید.

جدول ۶: فراوانی ژن‌های *sul1*،*sul2* و *sul3* در *اشریشیا کلی* مقاوم به سولفونامیدها

Strain Charachteristic	No. of isolates with genes					
	Sul 1	*Sul 2*	*Sul 3*	*Sul 1* *Sul 2*	*Sul 1* *Sul 3*	*Sul 1* *sul 2* *Sul 3*
Sulfonamide Resistance	14	37	3	8	2	3
N=67	20.89%	55.22 %	4.47%	11.94%	2.98%	4.47%

در تجزیه‌وتحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS شماره ۱۹ استفاده از آزمون کای مربع بین جنسیت و آنتی بیوتیک‌های آمیکاسین، تتراسایکلین، نالیدیکسیک اسید، کوتریماکسازول، سیپروفلوکساسین، سفالوتین، سفتریاکسون، آمیکاسین رابطه آماری معنی داری مشاهده نگردید (P-value> 0/05). اما بین جنسیت و آنتی بیوتیک‌های نورفلوکساسین، ایمی پنم، جنتامایسین رابطه آماری معنی دار مشاهده گردید (P-value < 0/05). هم چنین با استفاده از آزمون دقیق فیشر نیز بین جنسیت و آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین رابطه آماری معنی داری مشاهده گردید (P-value < 0/05). در این تحقیق در تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون کای مربع بین مقاومت به سولفونامیدها و ژن‌های *sul* رابطه معنی دار مشاهده گردید (P-value < 0/05).

بحث

مطالعه حاضر باهدف بررسی فراوانی ژن‌های *sul* در باکتری *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد عفونت‌های دستگاه ادراری در شهرستان شهرکرد با دو روش آنتی بیوگرام و مولکولی (PCR) انجام گرفت. باتوجه‌به نقش ژن‌های *sul* در ایجاد مقاومت به سولفونامیدها مطالعه حاضر برای

اولین‌بار در شهرستان شهرکرد انجام گرفت. از ۱۳۰ بیمار مبتلا به عفونت ادراری در ۶۷ ایزوله (۵۱/۵۳ درصد) مقاومت به کوتریموکسازول مشاهده گردید. از ۲۹ نفر مرد مورد بررسی در ۱۹ نفر (۶۵/۵۱درصد) و از ۱۰۱ نفر زن مورد بررسی در ۴۸ نفر (۴۷/۵۲درصد) مقاومت به کوتریموکسازول مشاهده گردید. به‌این‌ترتیب مشخص می‌گردد که نقش زنان در ایجاد عفونت‌های ادراری بیشتر از مردان می‌باشد.

در مطالعه محمدی و همکاران در خرم‌آباد، میزان مقاومت به آمپی‌سیلین ۹۸/۴درصد گزارش شد(۲۶). در مطالعه انجام شده توسط صفار و همکاران در ساری، این میزان ۸۰-۱۰۰درصد گزارش شده است(۲۷). در این مطالعه حساسیت *اشریشیاکلی* نسبت به آنتی بیوتیک های کوتریماکسازول، جنتامایسین، نیتروفورانتوئین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب ۴۸/۴۷درصد، ۸۲/۳۱درصد، ۹۸/۴۷درصد و ۴۷/۷۰درصد بود ولی در مطالعه‌ای که توسط براتی و همکاران انجام شد، حساسیت نسبت به کوتریماکسازول، جنتامایسین، آمپی سیلین، نیتروفورانتوئین و نالیدکسیک اسید را به ترتیب ۴۸/۱درصد، ۴۰/۳درصد، ۸/۹درصد، ۷۲/۵درصد و ۵۵/۳درصد گزارش نمودند(۲۸). در این مطالعه مقاومت *اشریشیاکلی* نسبت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین ۳۶/۹۲درصد در حالی که در بررسی که محمدی مهر و همکاران در تهران انجام دادند، مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و نیتروفورانتوئین در باکتری *اشریشیاکلی* به ترتیب ۵۸/۳۳درصد، ۲۷/۷۷درصد و ۱۳/۸۸ گزارش شد(۲۹). در مطالعه‌ای که توسط شریفی یزدی و همکاران در شهر خوی صورت گرفت، میزان مقاومت به کوتریماکسازول را ۵۹/۶۲درصد گزارش کردند(۳۰). در مطالعه حاضر میزان مقاومت *اشریشیاکلی* نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین، تتراسایکلین، ایمی پنم، سفالوتین و سفتریاکسون به ترتیب ۶۷درصد، ۵۶درصد، ۲۳/۰۷درصد، ۳۸/۴۶درصد و ۲۷/۶۹درصد برآورد گردید در حالی که میزان مقاومت *اشریشیاکلی* نسبت به آنتی بیوتیک های سفتریاکسون در مطالعه مهاجری و همکاران ۷۱درصد، آمیکاسین ۶۶/۴درصد، تتراسایکلین ۹/۷درصد گزارش شده است (۳۱). در مطالعه انجام گرفته توسط مدنی و همکاران میزان مقاومت *اشریشیاکلی* نسبت به آنتی بیوتیک ایمی پنم ۸۸/۲درصد برآورد گردید(۳۲).

در این تحقیق فراوانی ژن‌های *sul1*، *sul2* و *sul3* در ایزوله‌های مقاوم به کوتریموکسازول به ترتیب ۲۰/۸۹درصد ۵۵/۲۲درصد و ۴/۴۷درصد گزارش گردید. ژن‌های *sul1* و *sul2* به طور هم زمان در ۸ ایزوله (۱۱/۹۴درصد)، ژن‌های *sul1* و *sul3* هم زمان در ۲ ایزوله (۲/۹۸درصد) و ژن‌های *sul1*، *sul2* و *sul3* هم زمان در ۳ ایزوله (۴/۴۷درصد) گزارش گردیدند.

در مطالعه مشابهی Kerrn و همکاران در سال ۲۰۰۲ فراوانی ژن *sul1* را در ۱۰۷ ایزوله *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد عفونت‌های ادراری در دانمارک ۲۸/۳۰ درصد و فراوانی ژن *sul2* را ۵۰/۴۶درصد برآورد کردند(۲۳). در این تحقیق فراوانی ژن‌های *sul1* و *sul2* هم زمان در ۱۸/۶۹درصد برآورد کردند که با تحقیق حاضر هم خوانی دارد.

هم چنین Bean و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه ایی که بر روی ۳۹۱ ایزوله *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد عفونت‌های ادراری در بیمارستان رویال لندن انجام دادند، مقاومت به سولفونامیدها را ۴۵/۵ درصد و فراوانی ژن *sul2* در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* مقاوم ۸۱درصد گزارش کردندکه نسبت به تحقیق ما از فراوانی بالاتری برخوردار می‌باشد (۳۳).

در تحقیق انجام شده توسط نوروزی و همکاران که به‌منظور ردیابی ژن *sul2* در باکتری‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد عفونت ادراری مراجعه‌کننده به مراکز کلینیکی شهر خوی بر روی ۳۰۰ بیمار انجام گرفت، مقاومت به کوتریموکسازول ۷۱درصد و فراوانی ژن *sul2*، ۸۰درصد گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما از فراوانی بالاتری برخوردار می‌باشد (۳۴).

در مطالعه انجام شده توسط Hammerum و همکاران که بر روی ۱۹۹ ایزوله *اشریشیاکلی* مقاوم به سولفونامیدها انجام شد، فراوانی ژن *sul2* ۸۱درصد گزارش گردید(۳۵). Koljalg به بررسی ۷۸ ایزوله *اشریشیاکلی* جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری پرداختند که میزان مقاومت به کوتریموکسازول را ۴۰درصد گزارش کردند. در این تحقیق فراوانی ژن *sul2* در ایزوله‌های مقاوم به کوتریموکسازول ۴۰درصد گزارش گردید (۳۶).

Al-Agamyمیزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول را در ۱۰۰ ایزوله *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد عفونت ادراری را ۶۲درصد گزارش کرد و فراوانی ژن *sul2* در ایزوله‌های مقاوم به کوتریماکسازول ۸۶/۳۶درصد گزارش گردید(۳۷). به این ترتیب مشخص می‌گردد که در تمامی تحقیقات انجام شده توسط محققین مختلف ژن *sul2* نسبت به ژن‌های *sul1* و *sul3* از فراوانی بالاتری برخوردار می‌باشد.

در تحقیق انجام شده توسط Hoa و همکاران به‌منظور بررسی مقاومت باکتری‌های جدا شده از استخرهای مزارع کشاورزی نسبت به سولفونامیدها و بررسی فراوانی ژن‌های *sul1*،*sul2* و *sul3* مقاومت به سولفامتازین ۸۶،۵درصد گزارش گردید (۳۸). در این تحقیق در این تحقیق فراوانی ژن‌های *sul1*،*sul2* و *sul3* به ترتیب ۵۰درصد، ۲۱/۱۷درصد و ۴/۱۷درصد گزارش گردید.

استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول و انتقال افقی آن در بین باکتری‌ها باعث افزایش مقاومت نسبت به سولفونامیدها در نمونه‌های محیطی گشته به‌طوری‌که نتایج حاصل از تحقیق Hoa و همکاران که به‌منظور بررسی فراوانی ژن‌های *sul1*،*sul2* و *sul3* در استخرهای پرورش ماهی و میگو صورت گرفت، فراوانی ژن *sul1* در استخرهای پرورش ماهی و میگو به ترتیب ۵۷درصد و ۳۳درصد گزارش گردید. فراوانی *sul2* در استخرهای پرورش ماهی و میگو به ترتیب ۵۱ درصد و ۱۹ درصد و فراوانی ژن *sul3* در استخرهای پرورش ماهی و میگو به ترتیب ۱۴درصد و ۶درصد گزارش گردید (۳۹).Byrne-Bailey و همکاران مقاومت به سولفاکلروپیرادازین و فراوانی ژن‌های *sul1*،*sul2* و *sul3* در خاک مزارع کشاورزی انگلستان را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق مشخص گردید که فراوانی این ژن‌ها به ترتیب ۲۳درصد، ۱۸درصد و ۹درصد می‌باشد (۴۰).

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مقایسه آن با سایر تحقیقات انجام شده در ایران و جهان نشان می‌دهد که اکثر ایزوله‌های *اشرشیاکلی* جدا شده از عفونت‌های ادراری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های معمول در درمان عفونت‌های ادراری مقاوم هستند و چون بخش قابل‌توجهی از ژن‌های مقاومت در پلاسمیدهای کونژوگاتیو، ترانسپوزون ها، توالی الحاقی و اینتگرون ها واقع شده‌اند لذا استفاده از روش مولکولی نظیر PCR جهت ردیابی سریع ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها ضروری به نظر رسیده و نتایج حاصل از این کار می‌تواند در انتخاب دقیق آنتی‌بیوتیک مناسب در درمان و جلوگیری از گسترش بیشتر مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها کمک شایانی نماید.

منابع

1.Foxman B, Brown P. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. Infect Dis Clin North Am. 2003;17: 227–248.

2.Gupta K, Hooton TM, Stamm WE. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. Ann Intern Med. 2001;135:41–50.

3.Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. Microbes Infect. 2003;5:449–456.

4.Tartof SY, Solberg OD, Riley LW. Genotypic analyses of uropathogenic *Escherichia coli* based on fimH single nucleotide polymorphisms (SNPs). J Med Microbiol. 2007;56:1363–1369.

5.Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004;2:123–140.

6.Nicolle LE. Epidemiology of urinary tract infection. Clin Microbiol Newsl. 2002;24: 135–140.

7.Schalger TA. Urinary tract infections in children younger than 5 years of age. Pediatric Drugs. 2001;3(3):219-27.

8.Riccabona M. Urinary tract infections in children. Current Opinions in Urology. Jan 2003;13(1):59-62.

9.Chang CY, Lu PL, Lin CC, Lee TM, Tsai MY, Chang LL. Integron types, gene cassettes, antimicrobial resistance genes and plasmids of Shigella *sonnei* isolates from outbreaks and sporadic cases in Taiwan. J Med Microbiol. 2011;60: 197–204.

10.Fierer J, Guiney D. Extended-spectrum b-lactamases: a plague of plasmids. JAMA. 1999;281: 563–564.

11.Moritz EM, Hergenrother PJ. The prevalence of plasmids and other mobile genetic elements in clinically important drug-resistant bacteria. p 35–64. In: Amabile-Cuevas, C. F., and Wymondham, UK. (ed.) , In Antimicrobial Resistance in Bacteria. Horizon Bioscience, 25-54.

12.Grape M, Sundstro, mL, Kronvall G. Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. J Antimicrob Chemother. 2003; 52:1022–1024.

13.Huovinen P, Sundstro ML, Swedberg G, Skold O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39:279–289.

14. Skold O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. Drug Resist Updat. 2000; 3: 155–160.

15.Hall RM, Collis CM. Antibiotic resistance in gramnegative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. Drug Resist Updat. 1998; 1:109–119.

16.Trobos M, Christensen H, Sunde M, Nordentoft S, Agerso Y, Simonsen GS, Hammerum AM, Olsen JE. Characterization of sulphonamide-resistant *Escherichia coli* using comparison of *sul2* gene sequences and multilocus sequence typing. Microbiology. 2009; 155:831–836.

17.van Treeck U, Schmidt F, Wiedemann B. Molecular nature of a streptomycin and sulfonamide resistance plasmid (*pBP1*)

prevalent in clinical *Escherichia coli* strains and integration of an ampicillin resistance transposon (TnA). Antimicrob Agents Chemother. 1981;19: 371–380.

18.Wu S, Dalsgaard A, Hammerum AM, Porsbo LJ, Jensen LB. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. Acta Vet Scand. 2010; 52:47.

19.Blahna MT, Zalewski CA, Reuer J, Kahlmeter G, Foxman B, Marrs CF. The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. J Antimicrob Chemother. 2006; 57: 666–672.

20.Ho PL, Wong RC, Chow KH, Que TL. Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among Escherichia coli from humans and food-producing animals. Lett Appl Microbiol. 2009; 49:627–634.

21.Schaeffer AJ. Potential role of phase variation of type I pilli in urinary tract infection and bacterial prostitutes. Infection Disease. 2005; 3 (2): 144-149.

۲۲. ادیب فر پ. میکروب شناسی پزشکی. چاپ هفتم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۸۳: ۸۰-۶۰.

23.Kerrn MB, Klemmensen T, Frimodt-Møller N, Espersen F. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. J Antimicrob Chemother. 2002; 50 (3): 513–516.

24.Gundogdu A, Long YB, Vollmerhausen TL, Katouli M. Antimicrobial resistance and distribution of *sul* genes and integron associated *intI* genes among uropathogenic *Escherichia coli* in Queensland, Australia. J Med Microbiol. 2011; 60 (5):1633–1642.

25.National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Methods for disk antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. Wayne, Pa: 2003.

26.Mohammadi M, Ghasemi E, Mokhayeri H, Pournia Y, Boroun H. Antimicrobial resistance patterns of *E.coli* detected from hospitalized urine culture samples. Asian J Biol Sci. 2010; 3(4): 195-201.

27.Saffar MJ, Enayti AA, Abdolla IA, Razai MS, Saffar H. Antibacterial susceptibility of uropathogens in 3 hospitals, Sari, Islamic Republic of Iran, 2002-2003. East Mediterr Health J. 2008; 14(3): 556-563.

۲۸.براتی ل، قزلسفلی ف، آذرهوش ر، حیدری ف، نورا م. تعیین حساسیت باکتری *اشریشیاکلی* جدا شده از ادرار زنان باردار نسبت به آنتی بیوتیک ها در شهرستان کلاله. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان، ۱۳۸۷؛ دوره ۱۳، شماره ۳، صفحات ۱۰۱-۱۰۷.

۲۹.محمدیم، فیض آبادیم، بهادریم م، متشکرآرانی ع، خسرویم. بررسی فراوانی و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های گرم منفی مسئول عفونت بیمارستانی بخش مراقبت ویژه بیمارستان بعثت تهران در سال ۱۳۸۶. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، ۱۳۸۸؛ سال سوم، شماره‌های ۲ و ۳، صفحات ۵۴-۴۷.

۳۰.شریفی یزدیم ک، آذرسا م، شیرازیم ح، رستگار لاری ع، اولیاء پ، فلاح مهرآبادی ج، ملأ آقا میرزایی ه، صباغی آ، شامکانی ف، مبصری گ، بختیاری ر، سلطان دلالم م. فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف و گروه CTX-M-I در سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از عفونت‌های ادراری

بهدو روش فنوتیپی و PCR در خوی، ایران.مجله دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ۱۳۹۰؛ دوره ۱۹، شماره ۷۷، صفحات ۵۳-۶۱.

۳۱.مهاجری پ، ایزدی ب، نقاشی ن. حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از عفونت‌های ادراری مراجعه کنندگان به آزمایشگاه مرکزی کرمانشاه. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ۱۳۹۰؛ دوره ۱۵، شماره ۱، صفحات ۵۱-۵۶.

۳۲.مدنی ح، خزاعی ص، کنانی م، شاهیم. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشرشیاکلی* در نمونه‌های کشت ادرار بیمارستان امام رضا، کرمانشاه ۱۳۸۵. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ۱۳۸۷؛ دوره ۱۲، شماره ۳، صفحات ۲۸۷-۲۹۵.

33.Bean DC, Livemore D, Hall LM. *E.coli*: implications for Plasmids imparting sulfonamide resistance in persistence. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 1088-1093.

۳۴.نوروزی ج، اخوان سپهی ع، بزاززاده ن. ردیابی ژن *sul2* در *اشریشیاکلی* جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری مراجعه کننده به مراکز کلینیکی شهر خوی. محله دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ۱۳۹۲؛ دوره ۲۱، شماره ۸۸، صفحات ۷۶-۸۳.

35.Hammerum A, Sandvaye D, Andersen SR. Detection of *sul1*, *sul2*, *sul3*, in sulfonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans pork and pigs in Denmark. Int J Food Microbiol. 2006; 106: 235-239.

36.Koljalg S, Trusaluk K, Vainumae I, Stsepetova J, Mikelsaar M. Presistance of *Escherichia coli* colones and phenotype and genotypic antibiotic resistance in recurrent urinary tract infections in childhood. J Clin microbial. 2009; 47: 99-105.

37.Al-Agamy M. Molecular resistance mechanisms to older antimicrobial agents in *Escherichia coli* isolates. J African Microbiol. 2012; 6: 106-111.

38.Hoa PT, Managaki S, Norihide N, Takada Hong D, Hung Viet P, Hien PT, Suzuki S. Abundance of sulfonamide-resistant bacteria and their resistance genes in integrated quaculture-agriculture ponds, north vietnam. Total Environ Sci. 2010; 15-22.

39.Hoa PT, Nonaka L, Hung Viet P, Suzuki S. Detection of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north vietnam. Sci Total Environ. 2008; 405(1-3): 377-84.

40.Byrne-Bailey KG, Gaze WH, Kay P Boxall AB, Hawkey PM, We llington E.M. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the united kingdom. Antimicrob agents and Chemother. 2009; 53(2): 696-702.

Prevalence of *sul* genes in *E.coli* isolated from urinary tract infectious in Shahrekord

Mahnaz Shamaei [1] ,Maryam Reisi [2] ,Hossein Khodabandeh Shahraki [3*]

1. M.Sc. Student of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. PhD Student in Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author: Hossein.khodabandeh.sh@gmail.com

Abstract

Urinary tract infections is one of the most common infectious diseases and *E. coli* is one of urinary tract infection the most important factor. The purpose of this investigation is prevalence of *sul* genes in *E.coli* isolated from urinary tract infectious in Shahrekord to form cross-sectional in 2013. Samples was prepared as sterile and in terms of urine tests, cultures and was studied. Investigation antimicrobial susceptibility was performed by disk diffusion method. As well as, for tracing *Sul* gene PCR reaction was performed in the presence of specific primers and the results was analyzed. In this study of 130 *E. coli* isolates studied 67 isolates (53/51%) resistance to co-trimoxazol was observed. The frequency of genes *sul1*, *sul2* and *sul3* was respectively 20/89%, 55/22% and 4/47%. In statistical analysis with chi-square test between to resistance sulfonamides and *sul* genes significant correlation was observed. The results showed that *E. coli* isolates are high resistant to sulfonamides that may be the indiscriminate use of these antibiotics.

Keywords: Antibiotic resistance, *E. coli*, Sulfonamides, Urinary tract infection