رهیافت‌های نوین در علوم سلولی و مولکولی
JNACMS
دوره ۲ شماره ۳ پاییز ۱۴۰۳
Journal homepage: https://sanad.iau.ir/journal/nacms

بررسی الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های اشریشیا کلی جدا شده از موارد عفونت‌های ادراری کودکان شهرستان اصفهان در سال ۱۳۹۸

فاطمه خداوردی پور[۱]، پریسا کریمی[۲]، نازیلا ارباب سلیمانی[۳*]

۱. مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.

چکیده

عفونت‌های دستگاه ادراری (UTIs) یکی از رایج‌ترین عفونت‌های باکتریایی در کودکان هستند که بیشترین عامل آن‌ها باکتری اشریشیا کلی (Escherichia coli) است. با توجه به رشد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی درسویه‌های پاتوژن، بررسی و شناسایی ژن‌های مقاومت و ویرولانس اشریشیا کلی اهمیت ویژه‌ای دارد. این مطالعه با هدف تعیین خصوصیات مولکولی و الگوهای ژن‌های ویرولانس و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های اشریشیا کلی جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت ادراری در شهرستان اصفهان انجام شده است. در این پژوهش، از میان ۱۰۰ نمونه ادرار جمع‌آوری شده از کودکان مبتلا به عفونت ادراری و پس از کشت باکتری‌ها و تایید گونه اشریشیا کلی با استفاده از روش‌های کشت میکروبی وPCR ، بررسی ژن‌های ویرولانس شاملfimH ، hlyA، cnf1 و سایر ژن‌های حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش PCR چندگانه انجام شد. از مجموع ۵۶ ایزوله اشریشیا کلی جدا شده، ژن fimH در ۱۰۰درصد ایزوله‌ها شناسایی شد که نشان‌دهنده نقش کلیدی آن در فرآیند عفونت است. ژن‌های توکسین‌ساز hlyA وcnf1 نیز به ترتیب در ۸۵/۷ درصد نمونه‌ها مشاهده شدند. علاوه بر این، بررسی‌ها نشان داد که توزیع ژن‌های ویرولانس و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به طور معناداری با شدت عفونت و وضعیت بالینی کودکان مبتلا به عفونت ادراری ارتباط دارد. به‌ویژه، ایزوله‌هایی که ژن‌های توکسین‌ساز hlyAو cnf1 را حمل می‌کردند، عفونت‌های شدیدتر و طولانی‌تری را ایجاد کردند که نیازمند مراقبت‌های درمانی بیشتری بودند. همچنین، نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که این ایزوله‌ها در برابر داروهای بتالاکتام و برخی دیگر از آنتی‌بیوتیک‌های متداول، مقاومت بالایی دارند.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:
دریافت:۱۴۰۳/۱۰/۰۶
پذیرش:۱۴۰۳/۱۱/۲۲
چاپ:۱۴۰۳/۱۱/۲۳
DOI:

کلمات کلیدی: عفونت ادراری، مقاومت آنتی بیوتیکی، اشرشیا کلی

* نویسنده مسئول: *Email*
nazilaarbab@yahoo.co.uk

مقدمه

عفونت مجاری ادراری (UTI) یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی در انسان است که عمدتاً توسط باکتری اشریشیا کلی (E. coli) ایجاد می‌شود و در ۸۰ تا ۹۰ درصد از عفونت‌های ادراری اکتسابی از جامعه و ۳۰ تا ۵۰ درصد از عفونت‌های بیمارستانی نقش دارد (۱و۲). شیوع عفونت‌های ادراری به عوامل مختلفی از جمله سن و جنس وابسته است؛ به طوری که سه تا پنج درصد از دختران و یک درصد از پسران در دوران کودکی دچار عفونت ادراری می‌شوند (۱و۳). در سال اول زندگی، این عفونت در پسران شایع‌تر از دختران است، اما در مراحل بعدی، دختران بیشتر در معرض خطر ابتلا به این عفونت قرار دارند (۴). همچنین، شیوع عفونت ادراری در پسران ختنه نشده نسبت به ختنه شده‌ها بیشتر است (۵). اشریشیا کلی که معمولاً در روده انسان و حیوان به‌عنوان بخشی از فلور طبیعی یافت می‌شود، گاهی در آب، خاک و حتی گیاهان نیز یافت شده و در صورت انتقال به دستگاه ادراری، موجب بروز عفونت می‌شود (۶و۷). این باکتری که از خانواده انتروباکتریاسه و به شکل باسیل گرم منفی است، می‌تواند علاوه بر عفونت‌های ادراری، عفونت‌هایی همچون سپسیس، گاستروانتریت، مننژیت نوزادان، عفونت مجاری صفراوی و عفونت زخم ایجاد کند (۸). در کودکان، عفونت‌های ادراری ناشی از سویه

های یوروپاتوژنیک اشریشیا کلی (UPEC) به عنوان یکی از علل مهم بستری شدن و درمان‌های طولانی مدت شناخته می‌شود (۱و۲). همچنین، این عفونت‌ها در کودکان عوارضی همچون آسیب به پارانشیم کلیه و فیبروز کلیوی ایجاد می‌کنند و به‌عنوان دومین عفونت شایع کودکان مطرح‌اند (۹و۱۰). با افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، درمان عفونت‌های اشریشیا کلی به چالشی جدی بدل شده است. علاوه بر خطر شکست درمان، این مقاومت‌ها منجر به گسترش مقاومت میان سایر باکتری‌ها و ظهور سویه‌های مقاوم‌تر می‌شوند (۲). اعضای خانواده انتروباکتریاسه به‌طورمعمول نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم‌اند و این مقاومت از مکانیسم‌های متعدد ذاتی و اکتسابی ناشی می‌شود که باعث می‌شود برای درمان این عفونت‌ها، تست‌های حساسیت میکروبی ضرورت یابد (۹). به‌ویژه، افزایش سویه‌های تولید کننده بتالاکتاماز، اثر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را کاهش داده و محدود کرده است (۸). بنابراین، شناسایی پاتوژن‌ها و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها برای تجویز درمان صحیح ضروری است (۱۱و۱۲). سویه‌های یوروپاتوژنیک اشریشیا کلی (UPEC) به‌دلیل برخورداری از فاکتورهای ویرولانس متعدد، بیماری‌زایی بالایی دارند. از جمله این عوامل، فیمبریه‌های نوع P و S ، فیمبریه‌های چسبندگی، همولیزین (hlyA)، فاکتور نکروزان سایتوتوکسیک (cnf-1)، آئروباکتین(eae) و برخی دیگر از فاکتورهای بیماری‌زا همچون usp ، iroN، set-1 و astA هستند که در افزایش توان چسبندگی و تهاجم به سلول‌های میزبان نقش دارند (۱۳). حضور این ژن‌ها در UPEC باعث افزایش چسبندگی و نفوذپذیری آن‌ها به سلول‌های اپیتلیال دستگاه ادراری و تولید فاکتورهای التهابی می‌شود که در نهایت به فرار از فاگوسیتوز می‌انجامد (۱۴). بسیاری از این سویه‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم بر روی غشاهای مخاطی مثانه را دارند که منجر به بروز عفونت‌های مقاوم و غیرقابل درمان می‌شود و همچنین باعث افزایش مقاومت چندگانه دارویی و عفونت‌های مکرر می‌گردد (۱۵). با توجه به شیوع و پیامدهای این عفونت‌ها در جامعه، غربالگری، تشخیص و درمان سریع و صحیح این بیماران ضروری است. هدف اصلی این تحقیق، بررسی خصوصیات مولکولی ایزوله‌های اشریشیا کلی جداشده از موارد عفونت‌های ادراری کودکان شهرستان اصفهان در سال ۱۳۹۸ است.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

تعداد ۱۰۰ نمونه ادرار به حجم ۲۰ میلی‌لیتر در ظروف استریل مخصوص نمونه‌گیری از کودکان مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری در بیمارستان‌های سطح شهرستان اصفهان، از دی ماه ۹۸ تا تیر ۹۹ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شدند. کشت و جداسازی نمونه‌های ادرار ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل جهت کشت میکروبی در محیط TSB به‌منظور غنی‌سازی اولیه قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از این مرحله، رشد باکتری‌ها در محیط مک کانکی به شکل خطی کشت داده شد و سپس در محیط EMB کشت داده شد. پرگنه‌های صورتی‌رنگ لاکتوز مثبت برای تشخیص اشریشیاکلی انتخاب شدند. برای تأیید نهایی، پرگنه‌های سبز متالیک لاکتوز مثبت با انجام رنگ‌آمیزی گرم، تست IMViCو کشت در محیط سه قندی آهن‌دار(TSI) بررسی شدند. باکتری های منتخب به روش جوشاندن استخراج DNAشدند. در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت یک شبه باکتری در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. سپس، لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به‌عنوان منبع DNA جدا و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای ارزیابی کیفیت DNA استخراج‌شده، ۵ میکرولیتر از DNA بر روی ژل آگارز ۱درصد قرار داده شد و با روش الکتروفورز بررسی گردید. نتایج الکتروفورز به‌صورت باندهای واضح و یکنواخت نشان‌دهنده کیفیت مناسب DNA بودند. برای تعیین غلظت و کمیتDNA ، از دستگاه بایوفوتومتر در طول‌موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. نمونه‌هایی با کیفیت مناسب و غلظتی حداقل برابر با ۵۰ نانوگرم برای مرحله PCR انتخاب شدند.

تأیید شناسایی اشریشیاکلی

برای تأیید شناسایی اشریشیا کلی، از روش PCR و ردیابی ژن SrRNA ۱۶ استفاده شد. ابتدا DNA از ایزوله‌های باکتریایی رشد یافته در محیط TSB استخراج گردید. سپس، با استفاده از دو پرایمر اختصاصی AGAGTTTGATCMTGGCTCAGو CCGTCAATTCATTTGAGTTT ناحیه‌ای از ژن ۱۶SrRNA که به طور خاص به اشریشیا کلی مربوط است، تکثیر شد. در نهایت، وجود این قطعه ژنی، به عنوان تأییدی برای حضور اشریشیا کلی در نمونه‌ها محسوب شد.

ردیابی ژن‌های حدت

جهت ردیابی ژن‌های حدت اصلی داشریشیاکلی، واکنش PCRبا استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. مشخصات و توالی پرایمرهای مورداستفاده به‌صورت چندگانه در سه واکنش جداگانه تنظیم شد تا بیشترین بازده در ردیابی ژن‌ها حاصل شود.

الکتروفورز و تجزیه و تحلیل محصول PCR

برای بررسی و تأیید محصولات آگارز ۲ درصد انجام شد. به‌منظور تهیه ژل، ۰,۴ گرم پودر آگارز در ۲۰ میلی‌لیتر بافر TBE X1حل شد و در قالب مخصوص ریخته شد. پس از قرار دادن محصول PCR و مارکر DNA ، ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه اعمال شد. نتایج با استفاده از دستگاه Gel Documentationتجزیه و تحلیل و تصویربرداری شدند.

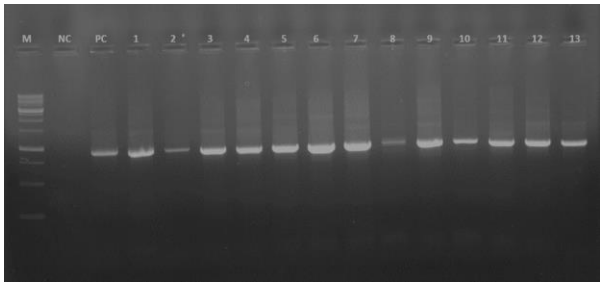
تحلیل آماری

جهت آنالیز داده‌های آماری از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۸ استفاده شد و برای سنجش ار ژن‌های حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، از مدل‌های آماری کای مربع و آزمون دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید.

نتایج

آزمون های میکروبی

مطالعه حاضر با هدف بررسی خصوصیات مولکولی ایزوله‌های ایشرشیا کلی جدا شده از موارد عفونت‌های ادراری کودکان در شهرستان اصفهان در سال ۹۸ انجام شد که برای این منظور تعداد۱۰۰ نمونه عفونی مورد مطالعه تعداد ۵۶ نمونه (۵۶درصد) آلوده به اشریشیا کلی بودند ایزوله‌های جداشده در کشت میکروبی با ردیابی ژن 16srRNA در آن ها به روش PCR تائید شدند که ژل حاصل از ردیابی این ژن در شکل (۱) نشان داده شده است:



شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن 16srRNA در ایزوله‌های اشریشیاکلی (ستون M=مارکر ۱ کیلو بازی DNA، ستون NP= نمونه کنترل منفی، ستون PC= نمونه کنترل مثبت، ستون‌های 1-13= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۹۱۹ جفت بازی DNA مربوط به ژن 16srRNA).

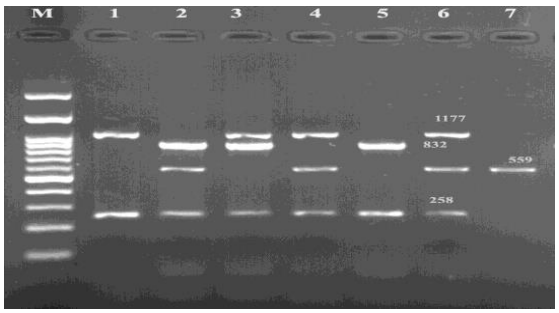
در ایزوله‌های جداشده حضور شایع ترین ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت ارزیابی شد که نتایج در جدول (۱)، آورده شده است:

جدول ۱- شایع ترین ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادرار

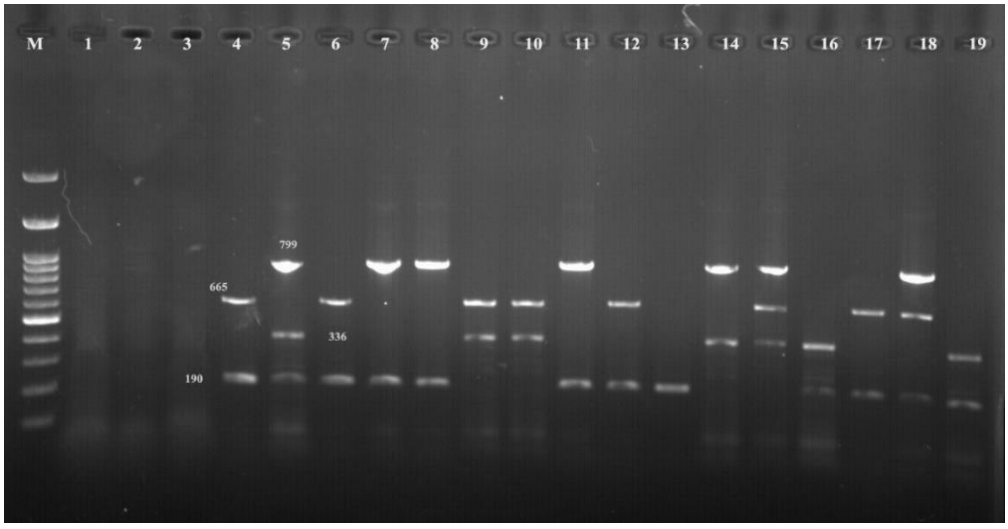
ردیف	نام ژن	تعداد و درصد	ردیف	نام ژن	تعداد و درصد
۱	set-1	(۸۷/۵۰)۴۹	۱۴	papGI	(۱۶/۵۷)۱۶
۲	sen	(۲۵)۱۴	۱۵	papGII	(۳۲/۱۸)۱۴
۳	astA	(۲۵)۱۴	۱۶	papGIII	(۷۸/۵۷)۴۴
۴	sigA	(۲۵)۱۴	۱۷	kpsMT	(۸/۹۲)۵
۵	sap	(۳۳/۹۲)۱۹	۱۸	iha	(۳۲/۱۴)۱۸
۶	Pic	(۱۷/۸۵)۱۰	۱۹	iron	(۶۴/۲۸)۳۶
۷	pap	(۸۳/۹۲)۴۷	۲۰	ompT	(۷/۱۴)۴
۸	cnf 1	(۸۵/۷۱)۴۸	۲۱	usp	(۱/۷۸)۱
۹	hlyA	(۸۵/۷۱)۴۸	۲۲	iss	(۱۲/۵۰)۷
۱۰	sfa	(۶۹/۶۴)۳۹	۲۳	irp2	(۵۱/۷۸)۲۹
۱۱	afa	(۱۴/۲۸)۸	۲۴	tsh	(۱۲/۵۰)۷
۱۲	iuc	(۱۲/۵۰)۷	۲۵	vat	(۱۴/۲۸)۸
۱۳	fim	(۱۰۰)۵۶	۲۶	Cva	(۷/۱۴)۴

همان گونه که در جدول فوق مشهود است۵۶ ایزوله اشریشیاکلی مورد مطالعه واجد اکثر عوامل حدت بوده و در این میان ژن‌های fimH، set 1، cnf 1 وhlyA با فراوانی۱۰۰و۸۱/۷۵ درصد شایع ترین و ژنusp با فراوانی ۱/۷۸ درصد نادرترین ژن‌های حدت ردیابی شده در ایزوله‌های مورد مطالعه بودند. در تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از جدول فوق، اختلاف آماری معنی داری بین حضور ژن‌های kpsMT /usp /ompT /Cva با ژن‌های fimH، cnf 1 و pap،hlyA در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p= 0. 038) مشاهده شد.

ژل حاصل از ردیابی تعدادی از ژن‌های حدت مورد مطالعه در شکل های (۲) و (۳) آورده شده است:



شکل ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی تعدادی از ژن‌های حدت در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری کودکان(ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، قطعه ۲۵۸جفت بازی مربوط به ژنpapGIII قطعه ۵۵۹ جفت بازی DNA مربوط به ژنfim قطعه ۸۳۲ جفت بازی DNA مربوط به ژنsap قطعه ۱۱۷۷ جفت بازی DNA مربوط به ژنhlyA



شکل ۳- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی تعدادی از ژن‌های حدت در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری کودکان(ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، قطعه ۱۹۰جفت بازی مربوط به ژن papGII قطعه ۳۳۶جفت بازی DNA مربوط به ژنpap قطعه ۶۶۵ جفت بازی DNA مربوط به ژنiron قطعه ۷۹۹ جفت بازی DNA مربوط به ژنsen

این مطالعه نشان داد که ژن‌های ویرولانس fimH، hlyA، و cnf1 نقش کلیدی در شدت عفونت‌های ادراری کودکان دارند و حضور ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان می‌دهد که بسیاری از ایزوله‌ها در برابر داروهای رایج مقاوم هستند. این یافته‌ها نیاز به رویکردهای درمانی هدفمند و استفاده بهینه از آنتی‌بیوتیک‌ها را برجسته می‌کنند.

بحث

عفونت دستگاه ادراری از شایع‌ترین عفونت‌ها درزنان و کودکان است و در این میان باکتری‌های مختلف، اشریشیاکلی عامل اصلی عفونت به‌شمار می رود اشریشیاکلی به‌عنوان یکی از مهم ترین عوامل ایجاد عفونت های ادراری در انسان محسوب می گردد. این باکتری قادر به ایجاد عفونت‌های ادراری وسیعی از سیستیت تا پیلونفریت می باشد عفونت بستگی به حدت سویه و مقاومت میزبان دارد. شناسایی فاکتورهای ویرولانس این باکتری در پیشگویی وضعیت عفونت موثر می‌باشد. بسیاری از این عوامل حدت محصول ژن های مختلفی می باشند که قابل شناسایی هستند .از این رو مطالعات مولکولی متعددی در جهت شناسایی این عوامل حدت صورت گرفته است در بین عوامل حدت در سویه‌های بیماریزایی اشریشیاکلی از موارد عفونت های ادراری فیمبریه ها نظیر فیمبریه P و fimH از اهمیت ویژه ای برخوردارند. علاوه بر عوامل فیمبریه ای کپسول و عامل تهاجم نیز نقش مهمی در گسترش عفونت دارند .از این رو در مطالعات مختلف فاکتورهای ویرولانس باکتری اشریشیاکلی در جدایه های مربوط به عفونت های ادراری، در ایران و نقاط مختلف جهان مورد بررسی قرار گرفته اند. در مطالعه ناظمی و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام دادند، شیوع ژن های fim و pap در نمونه های اشریشیاکلی یوروپاتوژن را مورد بررسی قرار دادند که میزان شیوع این ۲ ژن به ترتیب ۹۴درصد و ۳۵/۵د گزارش شد(۱۶). در سال ۲۰۱۲ عربی و همکاران به بررسی حضور تعدادی از ژن‌های فیمبریه ای در ۳۴۳ نمونه اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت های ادراری جمع آوری شده از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی پرداختند .نتایج در این مطالعه میزان حاکی از شیوع ژن هایfimH و pap به میزان ۸۷/۷ درصد و ۳۰ درصد بود(۱۷). در سال ۲۰۱۲ کریمیان و همکاران به بررسی حضور ژن های ویرولانس در ۱۲۳ نمونه اشریشیاکلی جداسازی شده ازعفونت های ادراری پرداختند .در این مطالعه، فراوانی ژن fimH ، ۶۹/۶ درصد و فراوانی ژنpap ، ۵۰/۴ درصد بود (۱۸). در مطالعه‌ای که بهالو و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام دادند، از ۱۰۰ جدایه اشریشیاکلی یوروپاتوژن، فراوانی ژن های fimH و pap به ترتیب ۳۰ درصد و ۴۰ درصد گزارش کردند (۱۹). در مطالعه‌ای که جلالی و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام دادند، ۱۰۰ نمونه اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت های ادراری رااز لحاظ وجود تعدادی از ژن‌های حدت مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه میزان شیوع ژن های fimH و pap به ترتیب برابر ۷۳ درصد و ۴۶ درصد بود (۲۰). مطالعه‌ای که حجتی و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام دادند، میزان شیوع ژن fimH، ۹۲/۸ % بود وpapEF در بین سویه های یوروپاتوژن ۱۰درصد بود (۲۱). ممتاز و همکاران به بررسی حضور ژن های ویرولانس و مقاومت دارویی در سویه های اشریشیاکلی در سال ۲۰۱۳ پرداختند. ۸۶/۶ درصد سویه ها واجد ژن fim ، ۴ درصد نمونه ها دارای ژن kpsMT بودند (۲۲). درخشنده و همکاران در سال ۲۰۱۵، میزان فراوانی ژن ibeA را در جدایه های اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت های ادراری ۹/۴ درصد بدست آوردند (۲۳). هم‌چنین اسدی و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی حضور تعدادی از ژن های ویرولانس در جدایه های اشریشیاکلی یوروپاتوژن و سنجش میزان حساسیت آنتی بیوتیکی این جدایه ها پرداخته و گزارش نمودند که ۵۶/۷ درصد جدایه-های دارای ژن fimH ۲۰ درصد واجد ژن ibeA می باشند (۲۴). Johnson و همکاران در سال ۲۰۰۰ به بررسی حضور 29ژن ویرولانس در 75 سویه اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت های ادراری پرداختند در این مطالعه فراوانی ژن fimH۱۰۰درصد، papAH ،۷۹ درصد papEF، ۷۷درصد، kpsMT ۱درصد، ibeA ۵ درصد بود(۲۵). در مطالعه Robino و همکاران سال ۲۰۱۴ میزان فراوانی ژن

هایfimH ، kpsMT وpapEF به ترتیب ۸۹ و ۸۸ درصد بوده است(۲۶). در مطالعه Tiba و همکاران که سال ۲۰۰۸ انجام دادند، میزان شیوع ژن های fimH ، ۹۷/۵ درصد kpsMT ، ۵۳/۱ درصد، papEF ۳۲/۷ درصد بود(۲۷). Tramutaو همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی شیوع ژن های فیمبریه ای در سویه های اشریشیاکلی یوروپاتوژن جداسازی شده از سگ و گربه در کشور ایتالیا پرداختند. در این مطالعه ژن fim دارای بالاترین فراوانی (۸۳ درصد در سگ ها و۹۰ درصد در گربه ها) در بین این سویه ها بود(۲۸).

در مطالعه حاضر اکثر عوامل حدت در ایزوله های مورد مطالعه ردیابی شد که در این میان fimH،set 1 cnf 1 و hlyA با فراوانی۱۰۰و۸۱/۷۵ درصد شایع ترین و ژنusp با فراوانی ۱/۷۸ درصد نادرترین ژن‌های حدت ردیابی شده در ایزوله‌های مورد مطالعه بودند. مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات نشان می دهد که فراوانی ژن fimH در مقایسه با سایر ژن های فیمبریه ای دخیل در ایجاد عفونت های ادراری به مراتب بیشتر بوده و سایر ژن های فیمبریه ای در مرتبه های بعدی قرار می گیرند که این امر نشان دهنده اهمیت بالای این ژن فیمبریه در بروز بیماری و بیماری زایی این باکتری متناسب با علائم بالینی در نمونه های جمع آوری شده این تحقیق می باشد که این امر می تواند با میزان شیوع ژن ها و باکتری اشریشیاکلی عامل عفونت ادراری ارتباط داشته باشد .در مطالعه حاضر میزان شیوع ژن های کپسولی یعنی ژن هایKspMT (۸/۹۲)، iuc (۱۲/۵)،iron (۳۲/۱۴)،iha (۶۴/۲۸ درصد) بود که در ایجاد بیماری دخیل می باشند. در مطالعات مختلف درصدهای متفاوتی از شیوع میزان این ژن به دست آمد که علت این تفاوت می‌تواند تفاوت در منبع سویه‌ها یا تفاوت در منطقه جغرافیایی باشد .همان طور که از نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات به دست آمد، میزان فراوانی ژن usp کمتر از سایر ژن‌هاست و در مطالعه حاضر نیز در هیچ یک ازجدایه ها این ژن شناسایی نشد .از مزایای مطالعه حاضر، استفاده از روش Multiplex-PCR بود که امکان شناسایی همزمان چند ژن ویرولانس را به طور هم‌زمان و در مدت زمان کوتاه تر امکان پذیر می سازد.

نتیجه گیری

به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که بر طبق مطالعات انجام شده و مقایسه آن با دستاوردهای این پژوهش میزان ژن fimH در همه جدایه ها بیشترین درصد را به خود اختصاص داده و ژن های فیمبریه papGIII ، pap, papGII در رتبه های بعدی قرار گرفته اند پس این 3 ژن جزیی از فاکتورهای حدت اشریشیاکلی بوده که قادر به ایجاد عفونت ادراری می باشند، در نقاط مختلف دنیا مطالعات زیادی راجع به پاتوتیپ های اشریشیاکلی و ژن های مربوط صورت گرفته است .حال با کمک روش Multiplex-PCR می‌توان در کوتاه ترین مدت زمان با ویژگی و حساسیت بالا به حضور ژن های بیماری زا پی برد و درمان مناسب و به موقع را انجام داد .بدون شک با مطالعات بیشتر اهمیت هر یک از ژن های حدت در پاتوژنز اشریشیاکلی در عفونت‌های ادراری مشخص خواهد شد که این یافته‌ها جهت طراحی معیارهای پیشگیری کننده نیاز است.

مراجع

1. Griebling TL.2005. Urologic diseases in America project: trends in resource use for urinary tract infections in women. Urology J.173(4):1281-7.
2. Ejrnæs K.2011. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by Escherichia coli. Dan Med Bull. 58(4):B4187.
3. Bader MS, Hawboldt J, Brooks A.2010. Management of complicated urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. Postgraduate medicine.122(6):7-15
4. Mittal S, Sharma M, Chaudhary U.2010. Study of virulence factors of uropathogenic Escherichia coli and its antibiotic susceptibility pattern. Indian Journal of Pathology and Microbiology. 57(1):61.
5. Marhova M, Kostadinova S, Stoitsova S.2009. Antimicrobial resistance profiles of urinary Escherichia coli isolates. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 23(sup1):616-20.
6. Wagenlehner FM, Naber KG, Weidner W.2008. Rational antibiotic therapy of urinary tract infections. Med Monatsschr Pharm. 31(10):385-390.
7. Sanchez U M, Bello T H, Dominguez Y M, Mella M S, Zemelman Z R, Gonzalez RG.2006. Transference of extendedspectrum beta-lactamases from nosocomial strains of Klebsiella pneumoniae to other species of Enterobacteriaceae. Rev Med Chil. 134(4):415-420.
8. Hickerson AD, Carson CC. The treatment of urinary tract infections and use of ciprofloxacin extended release. Expert opinion on investigational drugs. 2006 May 1;15(5):519-32.
9. Johnson JR, Russo TA.2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) Escherichia coli. International journal of medical microbiology. 295(6-7):383-404
10. Haghgoo SM, Varshochi M, Sabour S, Askari E, et al. 2014.The Prevalence and Antibiotic Susceptibility Pattern of Isolated Microorganisms from Hospitalized Patients with Heart Diseases. J Isfahan Med Sch . 260-68. [Persian]
11. Zhanel GG, Karlowsky JA, Harding GKM. 2010. A Canadian national surveillance study of urinary tract isolates from outpatients: comparison of the activities of trimethoprim sulfamethoxazole, ampicillin, mecillinam, nitrofurantoin, and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(4): 1089-92.
12. Croxen MA, Finlay BB. 2010. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. Nature Reviews Microbiology. (8): 26-38.
13. Akhi MT, Toloue Ostadgavahi A, Ghotaslou R, Asgharzadeh M, Pirzadeh T. 2015.

isolated from urinary tract infection isolated of children in Shahrekord Iran by multiplex PCR. Middle East J Sci Res.14(1): 29-32.

20. Jalali HR, Pourbakhsh A, Fallah F, Eslami G.2015. Genotyping of Virulence Factors of Uropathogenic Escherichia coli by PCR. Novel Biomed. 3(4): 177-81.
21. Hojati Z, Zamanzad B, Hashemzadeh M, Molaie R, Gholipour A. 2015. The FimH gene in uropathogenic Escherichia coli strains isolated from patients with urinary tract infection. Jundishapur J Microbiol.8(2): e17520
22. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpoor Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, et al.2013. Uropathogenic Escherichia coli in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Ann Clin Microbiol Antimicrob.12: 8.
23. Derakhshandeh A, Firouzi R, Motamedifar M, Motamedi Boroojeni A, Bahadori M, Arabshahi S, et al.2015. Distribution of virulence genes and multiple drug-resistant patterns amongst different phylogenetic groups of uropathogenic Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection. Lett Appl Microbiol.60(2): 148-54.
24. Asadi S, Kargar M, Solhjoo K, Najafi A, Ghorbani-Dalini S.2014. The association of virulence determinants of uropathogenic

Virulence Gene Assessment and Antibiotic Resistance Pattern of O157 Enterohemorrhagic Escherichia coli in Tabriz, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology.8(11): e25317.

14. Pan H, Zhang J, Kuang D, Yang X, Ju W, Huang Z, et al.2015. Molecular analysis and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic Escherichia coli from diarrheal patients. Diagnostic microbiology and infectious disease.81(2):126-31.
15. Brandon AN, Hill DR.1983. Selected list of Books and Journals for the small medical library. Bulletin of the Medical Library Association. 71(2):147.
16. Nazemi A, Naderi M, Jafarpour M, Mirinargesi M, Sharifi S.2014. The Detection of Fimbrial Pathogenic Genes in E. coli Strains Isolated from Patients with Urinary Tract Infection. Med Lab J.4(2): 31.
17. Arabi SH,Tohidi F, Naderi S, Nazemi A, Jafarpour M, Naghshbandi R.2012. The common fimbaria genotypeing inuropathogenic Escherichia coli:Annals Biologi Res.3(10): 4951-54.
18. Karimian A, Momtaz H, Madani M.2012. Detection of uropathogenic Escherichia coli virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. Afr J Microbiol Res.6(39): 6811-6.
19. Bahalo S, Tajbakhsh E, Tajbakhsh S, Momeni M, Tajbakhsh F.2013. Detection of some virulence factors of Escherichia coli

Escherichia coli with antibiotic resistance. Jundishapur J Microbiol. 7(5): e9936.

25. Johnson JR, Stell AL.2000. Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis.181(1): 261-72.
26. Robino L, Scavone P, Araujo L, Algorta G, Zunino P, Pirez MC, et al.2014. Intracellular bacteria in the pathogenesis of Escherichia coli urinary tract infection in children. Clin Infect Dis.59(11): e158-64.
27. Tiba MR, Yano T, Leite Dda S.2008. Genotypic characterization of virulence factors in Escherichia coli strains from patients with cystitis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo.50(5): 255-60.
28. Tramuta C, Nucera D, Robino P, Salvarani S, Nebbia P.2011. Virulence factors and genetic variability of uropathogenic Escherichia coli isolated from dogs and cats in Italy. J Vet Sci. 12(1): 49-55.

Investigation of antibiotic resistance patterns of Escherichia coli isolates isolated from cases of urinary tract infections in children in Isfahan city in 2018

Fatemeh Khodaverdipour[1],Parisa Karimi[2], Nazila Arbab soleimani[3*]

1- Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Islamic Azad University, Shahrekord Branch,Shahrekord ,Iran.
2- Master's degree in microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
3- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan,Iran.

***Corresponding author**: *Nazilaarbab@yahoo.co.uk*

Abstract

Urinary tract infections (UTIs) are one of the most common bacterial infections in children, the most common cause of which is Escherichia coli. Considering the growth of antibiotic resistance in pathogen strains, investigation and identification of resistance and virulence genes of Escherichia coli is of particular importance. This study was conducted with the aim of determining the molecular characteristics and patterns of virulence and antibiotic resistance genes in Escherichia coli isolates isolated from children with urinary tract infections in Isfahan city. In this research, among 100 urine samples collected from children with urinary tract infection and after bacterial culture and confirmation of Escherichia coli species using microbial culture and PCR methods, virulence genes including fimH, hlyA, cnf1 and other virulence and resistance genes were examined. Antibiotic was done by multiple PCR method. From a total of 56 Escherichia coli isolates, the fimH gene was detected in 100% of the isolates, which indicates its key role in the infection process. The toxin-producing genes hlyA and cnf1 were observed in 85.7% of the samples, respectively. In addition, the studies showed that the distribution of virulence genes and the pattern of antibiotic resistance are significantly related to the severity of infection and the clinical condition of children with urinary tract infection. In particular, isolates carrying the hlyA and cnf1 toxin-producing genes caused more severe and prolonged infections that required more therapeutic care. Also, the antibiotic resistance results showed that these isolates are highly resistant to beta-lactam drugs and some other common antibiotics.

Keywords: Urinary tract infection, antibiotic resistance, Escherichia coli.