رهیافت‌های نوین در علوم سلولی و مولکولی
JNACMS
دوره ۳ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۴
Journal homepage: https://sanad.iau.ir/journal/nacms

تعیین الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های یوروپاتوژنیک *اشریشیا کلی* جدا شده از مواردکلینیکی در شهرستان شهرکرد

امین روزبهی[1*]
گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، ایران

چکیده

اشریشیا کلی یکی از مهم‌ترین علل میکروبی شایع در عفونت‌های ادراری است. مقاومت آنتی بیوتیکی به دلیل استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها، یکی از بزرگ‌ترین علل ناکامی در درمان آنتی بیوتیکی است. هدف از این تحقیق تعیین الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک جدا شده از موارد کلینیکی در شهرستان شهرکرد است. این تحقیق به صورت توصیفی- تحلیلی و مقطعی بر روی ۱۳۰ بیمار مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد صورت گرفت. با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و تکنیک مولکولی بر اساس ردیابی ژن *۱۶srRNA* همه ایزوله‌ها تایید و مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و روش مولکولی بر اساس ژن‌های (*qnr*،*tet A*، *tet B, aac (3)IIa* و *sul1*) بررسی شدند. از ۱۳۰ نمونه مورد بررسی در مطالعه‌ی الگوی مقاومت ضد میکروبی، بیشترین میزان مقاومت مربوط به آمپی‌سیلین (۶۷/۹۶ درصد) و کمترین میزان مقاومت مربوط به نیتروفورانتئین (۱/۵۳ درصد) برآورد گردید. ژن *aac (3)IIa* (کدکننده مقاومت به جنتامایسین) با فراوانی ۸۶/۹۵ درصد و ژن *qnr* (کد کننده مقاومت به سیپروفلوکساسین) با فراوانی ۱۴/۵۸ درصد بیشترین و کمترین ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی ردیابی شده در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* بودند. این نتایج بیانگر افزایش مقاومت *اشریشیا کلی* به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و تتراسایکلین در مقایسه با مطالعات پیشین است. تحقیقات بیشتر در این زمینه، سبب افزایش دانش ما و مواجهه موثرتر با مقاومت آنتی بیوتیکی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا خواهد شد.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:
دریافت:۱۴۰۴/۰۵/۲۴
پذیرش:۱۴۰۴/۰۶/۳۱
چاپ:تابستان ۱۴۰۴

DOI:
doi.org/10.82415/nacms.1404.1215565

کلمات کلیدی:
اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک، الگوی فنوتیپی، مقاومت آنتی بیوتیکی

* نویسنده مسئول: *Email*
amin.roozbehi.1370@gmail.com

مقدمه

خانواده انتروباکتریاسه به‌طور وسیعی در طبیعت وجود دارند. این ارگانیسم‌ها از جمله پاتوژن‌های مهم فرصت طلب انسان می‌باشند که باعث بیماری‌های عفونی به خصوص عفونت‌های دستگاه ادراری، سپتی سمی، پنومونی وابسته به بیمارستان و عفونت‌های دستگاه گوارش می‌باشند (۱). *اشریشیا کلی* مسئول انواع عفونت‌های روده‌ایی و خارج روده‌ایی در انسان می‌باشد (۲). در میان پاتوژن‌های ادراری، *اشریشیاکلی* عامل حدود ۸۰ درصد عفونت‌های ادراری اکتسابی از جامعه و نزدیک به ۵۰ درصد عفونت‌های ادراری مرتبط با مراقبت‌های بهداشتی‌درمانی گزارش شده است. این باکتری حدود ۹۰ درصد عفونت های دستگاه ادراری در خانم های جوان را به خود اختصاص می‌دهد. عفونت دستگاه ادراری دومین عفونت شایع در بیماران می‌باشد که منجر به حدود هفت میلیون ویزیت توسط پزشکان در هر سال می‌شود. افزایش در مقاومت آنتی بیوتیکی میان پاتوژن‌های ادراری یک مشکل جهانی است. هر سال حدود ۱۵۰ میلیون نفر به عفونت دستگاه ادراری دچار می‌شوند. اگر چه مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها از اوایل دهه ۱۹۴۰ به رسمیت شناخته شده است، اما استفاده غیر صحیح از آنتی بیوتیک ها در درمان بیماری های انسانی و حیوانی و در کشاورزی، به دلیل استفاده ناصحیح از آنتی بیوتیک‌ها به میزان زیادی افزایش پیدا کرده است. استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها خصوصا انواعی که مصرف مشترک انسانی دارند، زمینه ساز ایجاد مقاومت‌ها و ایجاد سویه‌های مقاوم باکتریایی شده و مشکلات زیادی به همراه می آورد. برای مثال موجب بروز بیماری‌هایی می‌شود که درمان آن‌ها بسیار مشکل و در بعضی موارد غیر ممکن است و در نهایت موجب گسترش بیماری و شیوع یک همه گیری بدون درمان در جامعه می‌گردد (۴،۳). مقاومت دارویی این *اشریشیا کلی* اهمیت زیادی به خصوص در بیماران بستری در بیمارستان‌ها دارد. این باکتری از مهم‌ترین علل میکروبی شایع در عفونت های ادراری است. عامل بسیاری از عفونت های بیمارستانی از قبیل سپسیس، عفونت های زخم، گاستروانتریت، و مننژیت نوزادی به شمار می‌رود. *اشریشیا کلی* یکی از پاتوژن‌های فرصت طلب بیمارستانی می‌باشد و به علت کسب پلاسمیدهایی که کد کننده‌ی بتالاکتامازهای وسیع الطیف هستند، به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم شده‌اند. به همین دلیل، درمان عفونت‌های ناشی از *اشریشیا کلی* با مشکل مواجه شده است مقاومت ضد میکروبی در *اشریشیا کلی* در سرتاسر جهان گزارش شده است و سرعت افزایش مقاومت در این باکتری، نگرانی‌های زیادی در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته ایجاد کرده است (۵،۶).

مواد و روش ها

نمونه گیری و جداسازی اشریشیا کلی

تحقیق حاضر یک مطالعه توصیفی- مقطعی می‌باشد که در یک فاصله زمانی یک ساله در سال ۱۳۹۲ در شهرستان

شهرکرد صورت گرفت. تعداد ۱۳۰ سویه *اشریشیا کلی* جدا شده از بیماران مبتلا به علائم عفونت ادراری مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد مورد مطالعه قرار گرفتند. این سویه‌ها با روش بیوشیمیایی به عنوان *اشریشیا کلی* مورد تایید قرارگرفته بودند و جهت بررسی‌های مولکولی به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شدند. کلنی‌های مشکوک به *اشریشیا کلی* در محیط EMB آگار ساخت شرکت مرک آلمان، انکوبه گذاری شدند. کلنی‌های سبز متالیک با جلای فلزی رشد کرده در این محیط به عنوان باکتری *اشریشیا کلی* موردپذیرش قرار گرفتند و به منظور تایید تشخیص به منظور شناسایی از تست‌هایی نظیر IMViC، اوره و لیزین دکربوکسیلاز استفاده گردید. تست‌های بیوشیمیایی مورد استفاده برای شناسایی *اشریشیا کلی* در جدول ۱ نشان داده شده است (۷).

جدول ۱: تست‌های بیوشیمیایی مورد استفاده برای شناسایی باکتری *اشریشیا کلی*

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

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها از روش کربی- بایر[1] بر طبق دستورالعمل CLSI استفاده شد. در این تحقیق از سویه استاندارد *اشریشیا کلی* ATCC 25922 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

آزمایش آنتی بیوگرام

به‌منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* از روش کربی بائر طبق دستورالعمل NCCLS و سویه استاندارد *اشریشیا کلی* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای این منظور باکتری‌های جدا شده به مدت ۲۴ ساعت در محیط جامد مولر هینتون آگار (های مدیا، هند) در حضور دیسک های آنتی‌بیوتیکی کوتریموکسازول (تری‌متوپریم+سولفامتوکسازول) (SXT)، آمیکاسین (AM30)، سفتریاکسون (CRO30)،

[1] Kirby Bauer

نیتروفورانتئین (FM300)، سفالوتین (CF30)، نالیدیکسیک اسید (NA30)، نورفلوکساسین (NOR)، تتراسایکلین (TE30)، ایمی پنم (IPM10) و جنتامایسین (GM10) (شرکت پادتن طب، ایران) در دمای ۳۷ درجه کشت داده شدند. سپس با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه تعیین و ثبت گردید (۶).

داده‌های حاصل از مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ver 19 و مدل‌های آماری کای اسکوار و دقیق فیشر مورد ارزیابی قرار گرفت. در این راستا وجود ($P<0.05$) به عنوان وجود رابطه آماری معنی دار بین دو فاکتور مورد مطالعه در نظر گرفته شد.

آزمایشات مولکولی

به منظور تائید قطعی وجود *اشریشیا کلی* در نمونه های کشت داده شده و ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌ها، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد.

در این راستا ابتدا DNA ژنومی باکتری‌ها با استفاده از روش بویلینگ، استخراج و آزمایش PCR روی DNA تخلیص شده انجام گرفت. در مرحله اول حضور قطعی *اشریشیا کلی* در ایزوله‌ها با ردیابی ژن کد کننده ۱۶S rRNA باکتری با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۲ انجام گرفت. در این مرحله واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر واجد ۳۰ میلی مول KCl، ۱۰ میلی مول Tris-HCl، ۲۵۰ میکرومول dNTP (سیناژن، ایران)، ۱/۵ میلی مول $Mgcl_2$، ۱ میکرولیتر از زوج پرایمرهای R و F، ۱ واحد آنزیم DNATaq پلیمراز (سیناژن، ایران) و ۵ میکرولیتر از DNA هر نمونه تنظیم و با برنامه حرارتی ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه یک سیکل، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مستر سایکلر گرادیانت (اپندرف، آلمان) انجام گرفت.

جدول ۲: توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله‌های *اشریشیا کلی*

ژن	توالی پرایمر (´۳-´۵)	اندازه محصول جفت باز
۱۶SrRNA	۱۶S-F, GCGGACGGGTGAGTAATGT ۱۶S-R, TCATCCTCTCAGACCAGCTA	۲۰۰

در مرحله دوم ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی شامل ژن‌های *tetA* و *tetB* (مقاومت به تتراسیکلین)، *qnr* (مقاومت به فلوروکینولون‌ها)، *aac (3)IIa* (مقاومت به جنتامایسین) و ژن *sul1* (مقاومت به سولفونامیدها)به روش

PCR چندگانه ای با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۲ به شرح زیر انجام گرفت.

جدول ۲: پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *اشریشیا کلی*

آنتی بیوتیک	ژن مقاومت	توالی	اندازه (جفت باز)
Tetracycline	*tetA*	GTGAAACCCAACATACCCC GAAGGCAAGCAGGATGTAG	۸۸۸
Tetracycline	*tetB*	CCTTATCATGCCAGTCTTGC ACTGCCGTTTTTTCGCC	۷۷۴
Fluoroquinolone	*qnr*	ATTTCTCACGCCAGGATTTG GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	۵۱۶
Gentamicin	*aac (3)IIa*	CGGAAGGCAATAACGGAG TCGAACAGGTAGCACTGAG	۷۴۰
Sulfonamide	*Sul1*	CGGCGTGGGCTACCTGAACG GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	۴۳۳

واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر برای ژن‌های *tetA* و *aac(3)IIa* شامل۲ میکرولیتر از پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۳ میکرولیتر آب مقطر، برای ژن-های *tetB* و*qnr* درحجم ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۱ میکرولیتر از پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۱۳ میکرولیتر آب مقطر و ژن *sul1* در حجم ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۱ میکرولیتر از پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۱۴ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت Accupower PCR PreMix (BioNEER) انجام گرفت. برنامه ی دمایی برای انجام واکنش PCR برای ژن‌های مختلف در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳: برنامه دمایی برای انجام واکنش PCR برای ژن‌های مورد بررسی

برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی مراز	نام ژن
۱ سیکل	***tetA* و *aac (3)IIa***
۵ دقیقه -------- ۹۴	

۳۰ سیکل	
۱۵ ثانیه -------- ۹۴	
۶۰ ثانیه -------- ۵۵	
۶۰ ثانیه -------- ۷۲	
۱ سیکل	
۵ دقیقه -------- ۷۲	
۱ سیکل	***tetB, qnr***
۵ دقیقه -------- ۹۴	
۳۰ سیکل	
۱۵ ثانیه -------- ۹۴	
۵۰ ثانیه -------- ۵۶	
۶۰ ثانیه -------- ۷۲	
۱ سیکل	
۵ دقیقه -------- ۷۲	
۱ سیکل	***Sul1***
۵ دقیقه -------- ۹۴	
۳۰ سیکل	
۲۰ ثانیه -------- ۹۴	
۶۰ ثانیه -------- ۵۹	
۶۰ ثانیه -------- ۷۲	
۱ سیکل	
۶ دقیقه -------- ۷۲	

بعد از انجام آزمایشات PCR، محصول PCR روی ژل ۱درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز، آلمان) الکتروفورز و نتیجه با دستگاه تصویر بردار از ژل (انگلستان، Uviteck) مورد بررسی قرار گرفت (۵).

یافته‌ها:

از مجموع ۱۳۰ بیمار مورد مطالعه ، ۱۰۱ نفر زن (۷۷/۶۹ درصد) و ۲۹ نفر (۲۲/۳۰ درصد) مرد بودند. در آزمایش آنتی بیوگرام جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* از آنتی بیوتیک‌های معمول در درمان عفونت‌های ادراری در انسان استفاده شد که این نتایج برحسب جنسیت در جدول‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است. در این آزمایش ۶۶/۲ درصد از ایزوله‌ها نسبت به آمپی سیلین و تنها ۲/۳ درصد از آن ها نسبت به آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین مقاوم بودند.در تجزیه و تحلیل آماری بین جنسیت و آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، تتراسایکلین، نالیدیکسیک اسید، کوتریموکسازول، سفالوتین، سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین رابطه آماری معنی داری مشاهده نگردید (P-value> 0/05). اما بین جنسیت و آنتی بیوتیک‌های نورفلوکساسین، ایمی پنم و 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 FM رابطه آماری معنی داری مشاهده گردید (P-value< 0/05).

جدول ۴: مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرکرد در دو جنس زن و مرد

آنتی بیوتیک	جنسیت				p-value
	مرد	درصد	زن	درصد	
آمپی سیلین	۲۱	۷۲/۴۱	۶۵	۶۴/۳۵	۰/۳۸۴
تتراسایکلین	۲۰	۶۸/۹۶	۵۳	۵۲/۴۷	۰/۱۱۵
نالیدیکسیک اسید	۱۷	۵۸/۶۲	۵۱	۵۰/۴۹	۰/۴۴
کوتریموکسازول	۱۹	۶۵/۵۱	۴۸	۴۷/۵۲	۰/۰۸۷
سیپروفلوکساسین	۱۳	۴۴/۸۲	۳۶	۳۵/۶۴	۰/۰۵۷۳
سفالوتین	۱۵	۵۱/۷	۳۵	۳۳/۳	۰/۰۷
نورفلوکساسین	۲۲	۷۵/۸۶	۲۵	۲۴/۷۵	۰/۰۰۱
سفتریکسون	۱۱	۳۷/۹۳	۲۵	۲۴/۷۵	۰/۱۶۲
آمیکایسین	۸	۲۷/۵۸	۲۳	۲۲/۷۷	۰/۸۷۸
ایمی پنم	۱۱	۳۷/۹۳	۱۹	۱۸/۸۱	۰/۰۳۱

جنتامایسین	۹	۳۱/۰۳	۱۴	۱۳/۸۶	۰/۰۳۳
نیتروفورانتئین	۲	۶/۸۶	۰	۰	۰/۰۴۸

جدول ۵: نتایج مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *اشریشیا کلی*

ردی ف	آنتی بیوتیک	مقاوم		نیمه حساس		حساس		جم ع کل
		تعدا د	در صد	تعدا د	در صد	تعدا د	درصد	
۱	ایمی پنم	۳۰	۲/۱۳	۵	۳/۸	۹۵	۷۳/۱	۱۳۰
۲	کوتریموکسازول	۶۷	۵/۵۱	۸	۶/۲	۵۵	۴۲/۳	۱۳۰
۳	سفتریاکسون	۳۶	۲/۷۷	۸	۶/۲	۸۶	۶۶/۲	۱۳۰
۴	نوروفلوکسازین	۴۷	۳۶/۲	۸	۶/۲	۷۵	۵۷/۷	۱۳۰
۵	تتراسایکلین	۷۳	۵۶/۲	۱۲	۹/۲	۴۵	۳۴/۶	۱۳۰
۶	سفالوتین	۴۹	۳/۷۷	۱۴	۱/۸۰	۶۷	۵۱/۵	۱۳۰
۷	سپروفلوکساسین	۴۹	۳/۷۷	۷	۵/۴	۷۴	۵۶/۹	۱۳۰
۸	نالیدیک سیک اسید	۶۸	۵/۳۲	۱۱	۵/۸	۵۱	۳۹/۲	۱۳۰
۹	آمپی سیلین	۸۶	۶۶/۲	۲۳	۱/۷۷	۲۱	۱۶/۲	۱۳۰
۱۰	آمیکاسین	۳۱	۲/۸۳	۲۸	۲/۵۱	۷۱	۵۴/۶	۱۳۰

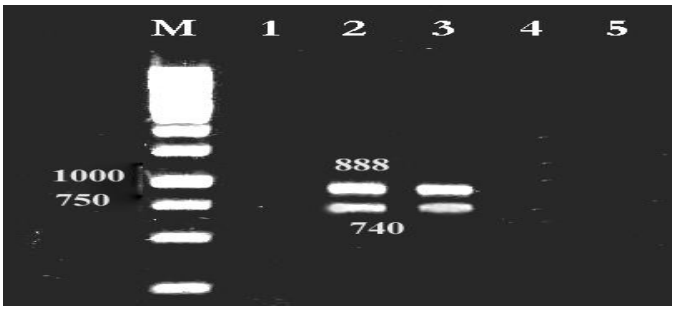
۱۱	جنتامایسین	۲۳	۱/۷	۹	۶/۹	۹۸	۷۵/۴	۱۳۰
۱۲	نیتروفورانتیئن	۳	۲/۳	۱۲	۹/۲	۱۱۵	۸۸/۵	۱۳۰

توزیع انواع ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های *اشریشیا کلی* مورد بررسی قرار گرفتند. از ۷۳ ایزوله مقاوم به تتراسایکلین ژن *tet A* در ۵۹ ایزوله با فراوانی ۸۰/۸۲ درصد و ژن *tet B* در ۵۵ ایزوله با فراوانی ۷۵/۳۴ درصد مشاهده گردید. از ۶۸ ایزوله مقاوم به نالیدیکسیک اسید در ۸ ایزوله (۱۱/۷۶ درصد)، از ۵۴ ایزوله مقاوم به نورفلوکساسین در ۸ ایزوله (۱۴/۸۱ درصد) و از ۴۸ ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین در ۷ ایزوله (۱۴/۵۸درصد) ژن *qnr* گزارش گردید. از ۶۷ ایزوله مقاوم به کوتریموکسازول در ۱۴ ایزوله (۲۰/۸۹ درصد) ژن *sul 1* و از ۲۳ ایزوله مقاوم به جنتامایسین در ۲۰ ایزوله (۸۶/۹۵ درصد) ژن *aac (3)IIa* گزارش گردید.

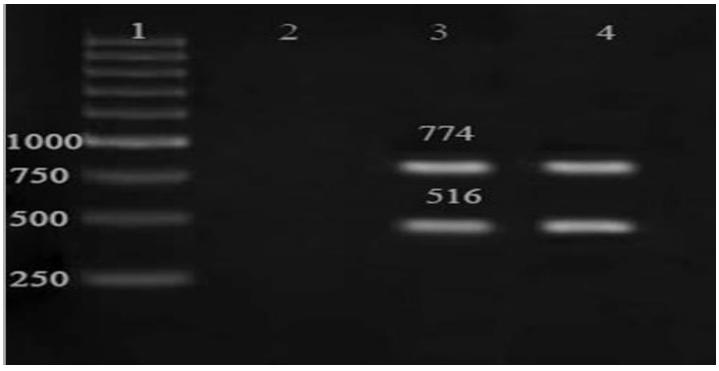
جدول ۶: فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *اشریشیا کلی*

نوع ژن	آنتی بیوتیک	مقاومت به روش PCR	مقاومت با دیسک	P-value
tet A	تتراسایکلین	۵۹ ٪ ۸۰/۸۲	۷۳ ٪ ۵۶/۲۰	۰/۰۰۰
tet B	تتراسایکلین	۵۵ ٪ ۷۵/۳۴	۷۳ ٪ ۵۶/۲۰	۰/۰۰۰
Qnr	نالیدیکسیک اسید	۸ ٪ ۱۱/۷۶	۶۸ ٪ ۵۲/۲۰	۰/۰۰۰
Qnr	نورفلوکساسین	۸ ٪ ۱۴/۸۱	۵۴ ٪ ۴۱/۵۳	۰/۰۰۰
qnr	سیپروفلوکساسین	۷ ٪ ۱۴/۵۸	۴۹ ٪ ۳۷/۷	۰/۰۰۰
sul 1	سولفونامیدها	۱۴	۶۷	۰/۰۰۰

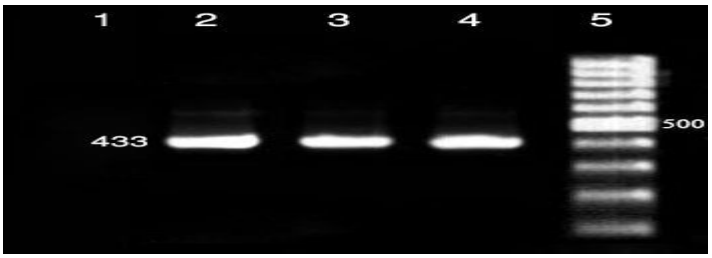
		٪ ۲۰/۸۹	٪ ۵۱/۵۳	
aac (3)IIa	جنتامایسین	۲۰	۲۳	۰/۶۱۷
		٪ ۸۶/۹۵	٪ ۱۷/۷۰	



تصویر ۱. الکتروفورز محصولات PCR. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز. ستون ۱: کنترل منفی ستون های ۲ و ۳ باند ۸۸۸ جفت بازی مربوط به ژن *tetA* و باند ۷۴۰ جفت بازی مربوط به ژن *aac (3)IIa*. ستون های ۴ و ۵: نمونه های منفی



تصویر ۲. الکتروفورز محصولات PCR. ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۲: کنترل منفی، ستون های ۳ و ۴ باند ۷۷۴ جفت بازی مربوط به ژن *tetB*. و باند ۵۱۶ جفت بازی مربوط به ژن *qnr*



تصویر ۳. الکتروفورز محصولات PCR. ستون ۵: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز. ستون های ۲-۴ باند ۴۳۳ جفت بازی مربوط به ژن *sul1* ستون ۱: کنترل منفی

بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک جدا شده از موارد کلینیکی در شهرستان شهرکرد با دو روش معمول آنتی بیوگرام و مولکولی انجام گرفت. مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف بر اساس الگوهای درمانی که در مناطق مختلف صورت می‌گیرد، متفاوت است. به عنوان مثال در مطالعه ی ما بیشترین مقاومت نسبت به آمپی سیلین (۶۷/۹۶ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتئین (۱/۵۳ درصد) گزارش شد.

در تحقیق انجام شده توسط نخعی مقدم و همکاران که بر روی ۱۰۹ ایزوله *اشریشیا کلی* عفونت ادراری انجام شد، مقاومت ایزوله‌ها نسبت به کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، پلی میکسین و نیتروفورانتوئین به ترتیب ۵۵/۰۵ درصد، ۳۴/۸۶ درصد، ۲۱/۱۰ درصد، ۱۲/۸۴ درصد، ۴/۷۵ درصد و ۱/۸۳ درصد گزارش گردید. در این تحقیق بیشترین مقاومت نسبت به کوتریموکسازول و کمترین مقاومت نسبت به ایمی پنم گزارش گردید. در حالی که نخجوانی و همکاران در ۲۰۰۷ میزان مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین را به ترتیب ۴۹/۳ درصد و ۴۰/۲ درصد گزارش کردند. که نسبت به تحقیق ما از مقاومت پایین‌تری برخوردار می‌باشد (۸).

با توجه به مقایسه‌ی درصدهای مختلف نتایج آنتی بیوگرام با آزمایش‌های مشابه، باید توجه داشت که تفاوت منطقه‌ای در نقاط مختلف دنیا یا حتی یک کشور، پاسخ‌های درمانی متفاوتی را نسبت به داروهای ضد میکروبی ایجاد می‌کند. منشا این تفاوت‌ها در نقاط مختلف را می‌توان تفاوت‌های ژنتیکی افراد، تفاوت‌های ژنتیکی سویه‌ها و تفاوت در زمینه‌های دیگر دانست که با توجه به این امر، الگوهای درمانی مورد استفاده در نقاط مختلف، متفاوت و براساس ویژگی‌های خاص هر منطقه تعریف می‌شود. بنابراین بایستی تحقیقات منظم و دنباله داری در نقاط مختلف جهان انجام شود. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گیری کرد که حساسیت به این آنتی بیوتیک‌ها به دلیل عواملی از جمله تجویز مکرر و غیر منطقی آنتی بیوتیک‌ها، جهش‌های آنزیماتیک و هم چنین انتقال مقاومت از طریق پلاسمیدها کاهش یافته است. با توجه به بررسی نتایج این مطالعه و دیگر تحقیقات و با توجه به افزایش روز افزون مقاوم تنها به انواع مواد ضد میکروبی از جمله سیپروفلوکساسین و ایمی پنم که از جمله شاخص‌های درمانی برای عفونت‌های *اشریشیا کلی* هستند، لزوم مطالعات بیشتر در این زمینه و هم چنین

کاهش مصرف آنتی بیوتیک و تجویز منطقی آن‌ها توسط پزشکان ضروری به نظر می‌رسد.

در تحقیق انجام شده توسط سلیمانی اصل و همکاران که بر روی ۱۴۰ ایزوله اشریشیا کلی عامل عفونت ادراری در سال ۱۳۹۱ انجام گرفت مقاومت به آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین به ترتیب ۸۲/۸ درصد و ۴۳ درصد گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما از مقاومت بالاتری برخوردار می‌باشند. در این تحقیق مشخص گردید ۱۲/۱درصد از ایزوله‌های مقاوم به نالیدیکسیک اسید و ۱۴/۳ درصد از ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای ژن *qnrA* می‌باشند (۹).

از جمله آنتی بیوتیک‌های کینولونی مورد استفاده در این تحقیق نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین بودند که میزان مقاومت به آن‌ها به ترتیب ۵۲/۳۰ درصد، ۳۶/۹۲ درصد و ۴۱/۵۳ درصد برآورد گردید. در این تحقیق از ۶۸ ایزوله مقاوم به نالیدیکسیک اسید در ۸ ایزوله (۱۱/۷۶درصد)، از ۵۴ ایزوله مقاوم به نورفلوکساسین در ۸ ایزوله (۱۴/۸۱ درصد) و از ۴۸ ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین در ۷ ایزوله (۱۴/۵۸درصد) ژن *qnr* گزارش گردید نتایج حاصل از فراوانی ژن *qnr* در تحقیق ما با نتایج سلیمانی اصل و همکاران تقریبا تطابق دارد.

در مطالعه انجام شده در پاکستان در سال ۲۰۱۱ مقاومت در ایزوله‌های ادراری *اشریشیا کلی* نسبت به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب ۳۶/۴۵ درصد و ۸۴/۱۶ درصد گزارش گردید. مقاومت بالا نسبت به آنتی بیوتیک‌های کینولونی می‌تواند می‌تواند ناشی از مصرف بی رویه و بدون نظارت داروهای فوق باشد. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۰۶ در آمریکا مقاومت نسبت به کینولون‌ها ۲۱ درصد و مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها ۱۲ درصد گزارش شده است. اختلاف نتایج مطالعه انجام شده در آمریکا با مطالعه حاضر از نظر میزان مقاومت مشاهده شده میتواند به دلیل وجود برنامه‌های نظارتی دقیق تر در آن کشور و در دسترس نبودن داروهای با در جدایه‌های اهمیت فوق باشد. مطالعات حاکی از آن است که یک ارتباط مستقیم بین میزان مصرف کینولون‌ها و درصد مقاومت به این آنتی بیوتیک‌ها وجود دارد (۱۱).

در مورد دیگر آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه نیز نتایج مشابه یا متفاوتی با دیگر محققان از ایران یافت شد که این اختلافات می تواند ناشی از اختصاصات بومی هرمنطقه، روش به کار رفته جهت تعیین میزان حساسیت و عوامل دخیل در ایجاد مقاومت دارویی از جمله پلاسمیدهای قابل انتقال و .. .باشد اما در مجموع تمام ایزوله های *اشریشیا کلی* مورد بررسی در مطالعه حاضر دارای مقاومت چندگانه به آنتی بیوتیک مختلف هستند که این خود خطر استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها را در سطح جامعه دو چندان می کند.

در قسمت دیگر از این تحقیق، ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در *اشریشیا کلی* مورد بررسی قرار گرفتند و از روش PCR چندگانه جهت ردیابی ژن های مورد مطالعه

استفاده شد که نتایج نشان داد ژن *aac (3)IIa* (کد کننده مقاومت به جنتامایسین) با فراوانی ۸۶/۹۵ درصد و ژن *qnr* (کد کننده مقاومت به سیپروفلوکساسین) با فراوانی ۱۴/۵۸ درصد از ایزوله های *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت های ادراری وجود دارد.

Bean و همکاران در مطالعه ایی که بر روی ۳۹۱ ایزوله *اشریشیا کلی* جدا شده از موارد عفونت‌های ادراری در بیمارستان رویال لندن انجام دادند، مقاومت به سولفونامیدها را ۴۵/۵ درصد گزارش کردند و فراوانی ژن *sul* 2 در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* مقاوم ۸۱ درصد گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما از فراوانی بالاتری برخوردار می‌باشد (۱۲).

در تحقیق انجام شده توسط Norouzi و همکاران که به منظور ردیابی ژن *sul* 2 در باکتری‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از موارد عفونت ادراری مراجعه کننده به مراکز کلینیکی شهر خوی بر روی ۳۰۰ بیمار انجام گرفت، مقاومت به کوتریموکسازول ۷۱ درصد و فراوانی ژن *sul* 2 ۸۰ درصد گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما از فراوانی بالاتری برخوردار می‌باشد (۱۳).

در مطالعه انجام شده توسط Hammerum و همکاران که بر روی ۱۹۹ ایزوله *اشریشیا کلی* مقاوم به سولفونامیدها انجام شد، فراوانی ژن *sul* 2 ۸۱ درصد گزارش گردید (۱۴). Koljalg و همکارانش به بررسی ۷۸ ایزوله *اشریشیا کلی* جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری پرداختند که میزان مقاومت به کوتریموکسازول را ۴۰ درصد گزارش کردند.

در این تحقیق فراوانی ژن *sul* 2 در ایزوله‌های مقاوم به کوتریموکسازول ۴۰ درصد گزارش گردید (۱۵).

Al-Agamy میزان مقاومت به آنتی بیوتیک کوتریماکسازول را در ۱۰۰ ایزوله *اشریشیا کلی* جدا شده از موارد عفونت ادراری را ۶۲٪ گزارش کرد و فراوانی ژن *sul* 2 در ایزوله‌های مقاوم به کوتریماکسازول ۸۶/۳۶ درصد گزارش گردید (۱۶). به این ترتیب مشخص می‌گردد که در تمامی تحقیقات انجام شده توسط محققین مختلف ژن *sul* 2 نسبت به ژن‌های *sul* 1 و *sul* 3 از فراوانی بالاتری برخوردار می‌باشد

نتیجه گیری:

درمجموع نتایج حاصل از مطالعه ی حاضر جلوگیری از انتشار مقاومت‌های دارویی یکی از مسائل مهم درمان عفونت‌ها در جامعه محسوب می‌شود. با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، تشخیص سریع و به موقع سویه‌های مقاوم به منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت، امری ضروری به نظر می‌رسد. هم‌چنین پیشنهاد می‌شود، درمان عفونت‌های ادراری که از اهمیت خاصی برخوردار است، با توجه به الگوی حساسیت و مقاومت منطقه صورت گیرد تا از ایجاد پدیده ی مقاومت دارویی و شکست‌های درمانی که منجر به عارضه دار شدن عفونت می‌گردد، جلوگیری شود.

مراجع

علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار. ۱۳۸۸؛ ۱۶(۴): ۲۲۸-۲۲۳.

۸. Akbari-Nakhjavani F, Mirsalehi A, HamidianM, Kazemi B, Mirafshar M, Jabal Ameli F. Antimicrobial susceptibility testing of *Escherichiacoli* strains isolated from urinary tract infections tofluoroquinolones and detection of *gyrA* mutationsin resistant strains. Daru. 2007; 15(2): 94-99.

۹. Soleimani-Asl Y, Zibaei M, Firoozeh F. Detection of *qnrA* gene among quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Khorram Abad during. 2011-2012; Feyz. 17(5): 488-495.

10. Muhammad I, Uzma M, Yasmin B, Mehmood Q, Habib B. Prevalence of antimicrobial resistance and integrons in *Escherichia coli* from Punjab, Pakistan. Braz J Microbiol. 2011; 42(3): 462-466.

۱۱. Moreno E, Prats G, Sabate M, Perez T, Johnson JR, Andreu A. Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 57(2): 204-211.

۱۲. Bean DC, Livemore D, Hall LM. *E .coli* implications for Plasmids imparting sulfonamide resistance in persistence. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53 (4): 1088-1093.

۱Servais P, Passerat J. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). Science of The Total Environment. 2009; 408 (2): 356-372.

۲. Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A. Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? Drug Resist Updates. 2013; 16 (1-2): 22-45.

۳. Ahmed KS, Feroz F, Noor R. Study of extended-spectrum b-lactamase-producing bacteria from urinary tract infections in Bangladesh. Tzu ChiMed J. 2013; 25(1): 39-42.

۴. Schaeffer AJ. Potential role of phase variation of type I pilli in urinary tract infection and bacterial prostitutes. Infect Dis. 2005; 3:144-149.

۵. Heidari M, Momtaz H, Madani M. Detection of the antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* isolated from human infections and bovine mastitis. African J Microbiol Res. 2011; 5(31): 5745-5749.

۶. 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

۷- نخعی مقدم م، مشرفی ش. تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های ادراری *اشریشیا کلی* و شیوع بتالاکتامازهای وسیع طیف در بین آن‌ها. مجله ی دانشگاه

۱۳. Norouzi J, Akhavan sepahy A, Bazzazzadeh N. Detection of *Sul2* Gene in *Escherichia coli* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections Admitted to Clinical Centers of Khoy City. Zanjan Univ Med Sci. 2013; 21(88): 76-83.

۱۴. 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 (4): 235-239.

۱۵. 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 (3): 99-105.

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

Determination of phenotypic and genotypic patterns of antibiotic resistance in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from clinical samples in Shahrekord.

Amin Roozbehi*

Department of Biology, ShK.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Corresponding author: amin.roozbehi.1370@gmail.com

Abstract:

Escherichia coli is one of the most common microbial causes of urinary tract infections. Antibiotic resistance is one of the biggest causes of failure in antibiotic treatment due to the widespread use of antibiotics. The aim of this study was to determine the phenotypic and genotypic pattern of antibiotic resistance in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical samples in Shahrekord city. This descriptive-analytical and cross-sectional study was conducted on 130 patients with urinary tract infections referred to medical diagnostic laboratories in Shahrekord city. All isolates were confirmed using biochemical methods and molecular techniques based on *16srRNA* gene detection, and the antibiotic resistance of the isolates was investigated using the disk diffusion method and molecular methods based on (*qnr*, *tet A*, *tet B*, *aac (3)IIa* and *sul1*) genes.

Of the 130 samples studied in the study of antimicrobial resistance pattern, the highest resistance was to ampicillin (96.67%) and the lowest resistance was to nitrofurantoin (53.1%). The *aac (3)IIa* gene (encoding resistance to gentamicin) with a frequency of 95.86% and the qnr gene (encoding resistance to ciprofloxacin) with a frequency of 58.14% were the highest and lowest antibiotic resistance genes detected in *E. coli* isolates. These results indicate an increase in *E. coli* resistance to gentamicin and tetracycline antibiotics compared to previous studies. Further research in this field will increase our knowledge and more effectively confront antibiotic resistance of pathogenic microorganisms.

Keywords: Antibiotic resistance, Phenotypic pattern, Uropathogenic *E. coli*,