

بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن های مقاومت به تتراسیکلین (*tetB* و *tetA*) در جدایه های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک

نوشین کامرانی همت^۱، محسن میرزایی^{۲*}، شهین نجارپیرایه^۳

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

۲- گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

۳- گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده:

سابقه و هدف: عفونت مجاری ادراری یکی از بیماری های شایع جوامع انسانی است. متأسفانه مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها موجب بروز مقاومت تدریجی در باکتری ها شده است. هدف از این مطالعه، تعیین میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی و ژن های مقاومت به تتراسیکلین در اشریشیاکلی های مولد عفونت ادراری بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، ۲۱۰ نمونه ادراری طی ۴ ماه جمع آوری شد. با استفاده از روش انتشار از دیسک مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها بررسی شد. سپس از روش PCR برای شناسایی ژن های *tetA* و *tetB* استفاده گردید.

یافته ها: از ۲۱۰ نمونه ادرار جمع آوری شده، ۱۵۰ ایزوله اشریشیاکلی جدا گردید. بیشترین میزان مقاومت مربوط به تتراسیکلین (۶۸٪) و کمترین میزان مقاومت مربوط به کلرامفنیکل (۸/۶۶٪) بود. در میان جدایه های مقاوم به تتراسیکلین، ۸۸ جدایه (۸۶/۲۷٪)، دارای ژن *tetA* و در ۸۳ جدایه (۸۱/۳۷٪) ژن *tetB* تشخیص داده شد. ۷۴ جدایه (۷۲/۴۵٪) همزمان هر دو ژن را داشتند و ۵ جدایه (۴/۹۰٪) فاقد ژن های مورد مطالعه بودند.

بحث: مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک و همچنین درصد ژن های مقاومت به تتراسیکلین در بیماران مبتلا به عفونت ادراری بالا است.

نتیجه گیری: افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی می تواند نشان دهنده مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها باشد. لذا بهتر است که نسبت به استفاده از روش های درمانی رایج، اقدام های مناسب تری به عمل آید.

کلمات کلیدی: اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک، تتراسیکلین، Duplex-PCR، *tetA* و *tetB*

مقدمه

ادراری در زنان شایع تر از مردان می باشد. به طوری که حدود نیمی از خانم ها حداقل یکبار عفونت پژوهش های انجام گرفته در جوامع مختلف نشان می دهد باسیل های گرم منفی به عنوان شایع ترین عامل اتیولوژیک UTI بوده و در بین آن ها اشریشیاکلی بیش از ۸۰٪ موارد عفونت های حاد دستگاه ادراری را تشکیل می دهد (۶).

اساس درمان مناسب در عفونت های ادراری انتخاب یک آنتی بیوتیک مناسب با کارایی و اثربخشی بالا می باشد (۸). متأسفانه مصرف بی رویه و گاهی نادرست آنتی بیوتیک ها سبب نابودی بعضی از ارگانسیم های حساس شده و شرایط زیست را برای بقای باکتری های مقاوم مساعد نموده است به نحوی که

عفونت دستگاه ادراری به حضور پاتوژن های میکروبی درون دستگاه ادراری اطلاق می شود و یکی از شایع ترین عفونت ها در بیماران سرپایی و بستری در بیمارستان می باشد (۹). دستگاه ادراری را در طول عمر خود تجربه کرده اند. فراوانی عفونت

نویسنده مسئول :

گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

پست الکترونیکی: Mirzaei.iaub@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۸

از کارایی بعضی از آنتی بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌ها کاسته شده است (۱).

ایجاد مقاومت در مقابل آنتی بیوتیک‌ها از این جهت مهم است که در بسیاری از موارد در هنگام بروز بیماری و زمانی که درمان با آنتی بیوتیک الزامی است، میکروارگانسیم‌های مقاوم شده به درمان پاسخ نداده و درمان بیماری با شکست مواجه می‌شود (۱۶). در میان اشریشیاکلی‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها، شیوع سویه‌های مقاوم به تتراسیکلین از فراوانی بالایی برخوردار است (۱۴). تتراسیکلین نوعی آنتی بیوتیک باکتریواستاتیک می‌باشد که در سال ۱۹۴۸ وارد طب پزشکی شد و مقاومت نسبت به آن اولین بار در سال ۱۹۵۳ گزارش شد. عملکرد تتراسیکلین اتصال به ریبوزوم و ممانعت از مرحله تولید شدن سنتز پروتئین می‌باشد. مقاومت به تتراسیکلین‌ها توسط سه مکانیسم صورت می‌گیرد: افلاکس تتراسیکلین، محافظت ریبوزومی و تغییر شیمیایی (۲). مقاومت نسبت به تتراسیکلین اغلب به وسیله یکسری از ژن‌ها ایجاد می‌شود. این ژن‌ها مکانیسم پمپ یونی افلاکس یا پروتئین‌های حفاظت کننده ریبوزومی را فعال می‌کنند. تعداد زیادی از این ژن‌ها با پلاسمیدهای متحرک یا ترانسپوزون‌ها در ارتباط می‌باشند. شمار محدودی از باکتری‌ها مقاومت نسبت به تتراسیکلین را از طریق موتاسیون کسب می‌کنند که باعث تغییر در قابلیت نفوذپذیری پورین‌های غشای خارجی، لیپو پلی ساکاریدهای غشای خارجی و همچنین تغییر در جزء 16S rRNA ریبوزوم و یا موتاسیون در ژن‌های مرتبط با مکانیسم پمپ یونی افلاکس می‌شود (۲، ۳). ژن‌های در ارتباط با پمپ یونی افلاکس پروتئین‌های مرتبط با غشا را کد می‌کنند که این پروتئین‌ها تتراسیکلین را از درون سلول باکتری به خارج انتقال داده و منجر به کاهش غلظت تتراسیکلین در درون باکتری شده و به این طریق ریبوزوم باکتریایی در برابر تتراسیکلین حفاظت می‌شود. در باکتری‌های گرم منفی ژن‌های در ارتباط با پمپ یونی افلاکس شامل *tetC*، *tetB*، *tetA* و *tetD* می‌باشند (۳). ژن‌های *tetA* و *tetB* با واسطه کد کردن پمپ افلاکس طی یک روند وابسته به انرژی باعث کاهش تجمع آنتی بیوتیک درون باکتری می‌شود. این پمپ با مکانیسم *metal-tetracycline/H⁺ antiporter* باعث کاهش غلظت آنتی بیوتیک درن سلول می‌شود. تشخیص و جداسازی ژن‌های *tetA* و *tetB* نسبت به ژن‌های دیگر *tet* بیش‌تر دیده شده و از اهمیت بیش‌تری برخوردار هستند (۲۶، ۲۲، ۲۰، ۱۳، ۲). پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها از عوامل اصلی گسترش سریع ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین در میان سویه‌های

اشریشیاکلی می‌باشند (۲۰). شیوع مقاومت به تتراسیکلین، نشانگر مناسبی برای ارزیابی ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک است و ارزیابی اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های مقاوم به چند دارو می‌تواند موجب دقت در تجویز داروهای مناسب و جلوگیری از شیوع سویه‌های مقاوم گردد (۱۰). مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی و هم‌چنین تعیین میزان توزیع ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین (*tetA* و *tetB*) با استفاده از روش Duplex-PCR در میان سویه‌های اشریشیاکلی یورپاژنیک می‌باشد.

روش کار:

در یک مطالعه توصیفی- مقطعی، طی مدت ۴ ماه (از اسفند ۱۳۹۳ لغایت خرداد ۱۳۹۴)، ۲۱۰ نمونه ادرار از افراد مبتلا به علائم عفونت ادراری به روش mid-stream (قسمت میانی جریان ادرار) از بیمارستان‌های امام خمینی (ره) بروجرد، بعثت سنج و بقیه الله (عج) تهران جمع آوری گردید. ابتدا نمونه‌ها روی محیط‌های مک کانکی آگار و EMB کشت داده شدند؛ سپس با استفاده از آزمایش‌های رایج بیوشیمیایی مانند اوره، ^۱SIM، ^۲MR/VP، ^۳TSI و سیمون سترات (تمامی محیط‌های فوق ساخت شرکت مرک آلمان)، تعداد ۱۵۰ جدایه اشریشیاکلی جمع آوری شد.

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های جدا سازی شده با تعداد ۱۰ عدد دیسک آنتی بیوتیک رایج ساخت شرکت روسکو (هلند) مورد استفاده قرار گرفت که عبارت بودند از: تتراسیکلین (۳۰ μg)، استرپتومایسین (۱۰ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، سفتریاکسون (۳۰ μg)، سفتازیدیم (۳۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg)، افلوکساسین (۵ μg)، کلرامفنیکل (۳۰ μg)، تری متوپریم (۵ μg) و سولفونامید (۲۴۰ μg). به این منظور از روش انتشار دیسک بر اساس روش کار (CLSI) بهره گرفته شد (۴). در این مرحله از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان نمونه کنترل در آزمایش آنتی بیوگرام استفاده شد.

1 Sulfide, Indole, Motility
2 Methyl Red Voges Proskauer
3 Triple sugar iron agar

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن های مورد مطالعه

منبع	طول محصول (bp)	توالی پرایمرها (5'-3')	ژن ها
۱۴	۵۷۷	GGTTCACTCGAACGACGTCAC CTGTCCGACAAGTTGCATGA	<i>tetA</i>
۱۴	۶۳۴	CCTCAGCTTCTCAACGCGTG GCACCTTGCTGATGACTCTT	<i>tetB</i>
۱۴	۹۱۹	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CCGTCAATTCATTTGAGTTT	<i>E. coli 16S rRNA</i>

جدول ۲: حجم، فرایند دمایی و تعداد سیکل واکنش های زنجیره ای پلیمرز

ژن های هدف	برنامه PCR	حجم واکنش (۵۰ میکرولیتر)
<i>E. coli 16S rRNA</i>	1 cycle: 95°C-----6 min 31 cycle: 95°C-----45 s 58°C-----60 s 72°C-----60 s 1 cycle: 72°C-----5 min	25μL Taq 2x Master Mix 1x: Tris-Hcl Ph 8.5, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 3Mm Mgcl ₂ , 0.2% Tween 20 – 0.4 Mm dNTPs- 0.2 units/μl Ampliqon Taq DNA polymerase (Pishgam) 1 μM of each primers F & R (Pishgam) 3 μL DNA template
<i>tetA, tetB</i>	1 cycle: 94°C-----8 min 32 cycle: 95°C-----60 s 55°C-----70 s 72°C-----2 min 1 cycle: 72°C-----8 min	25μL Taq 2x Master Mix 1x: Tris-Hcl Ph 8.5, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 3Mm Mgcl ₂ , 0.2% Tween 20 – 0.4 Mm dNTPs- 0.2 units/μl Ampliqon Taq DNA polymerase (Pishgam) 1 μM of each primers F & R (Pishgam) 3 μL DNA template

یافته ها:

از مجموع ۲۱۰ نمونه مورد بررسی، ۱۵۰ ایزوله اشریشیاکلی مولد عفونت ادراری شناسایی گردید (شکل ۱). فراوانی باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک جداشده از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد از میان ۱۵۰ ایزوله، ۳۹ مورد (۲۶٪) مربوط به جنس مذکر و ۱۱۱ مورد (۷۴٪) مربوط به جنس مؤنث بود. بیشترین شیوع اشریشیاکلی مولد عفونت ادراری در خانم ها در گروه سنی ۳۰ تا ۵۰ سال (۱۷/۳۳٪) و در آقایان در گروه سنی بالاتر از ۶۵ سال (۸/۶۶٪) دیده شد.

استخراج DNA و بررسی فراوانی ژن های

مقاومت به تتراسیکلین

استخراج DNA باکتری با روش جوشاندن انجام گرفت، به طور خلاصه یک کلنی خالص از کشت تازه باکتری در میکروتیوپ حاوی محیط LB (مرک، آلمان) تلقیح گردید و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. میکروتیوپ در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد و به خوبی مخلوط گردید. میکروتیوپ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس قرار داده شد و سپس در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاوی DNA است که در میکروتیوپ دیگر ریخته شد. تا زمان انجام واکنش PCR در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگه داری شدند. به منظور تشخیص حضور ژن های مقاومت به تتراسیکلین (*tetA* و *tetB*) از روش Duplex-PCR استفاده گردید. در جدول ۱ توالی پرایمرهای استفاده شده (پیشگام- ایران) آورده شده است. هریک از سویه های دریافت شده در آزمایشگاه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *16S rRNA* باکتری اشریشیاکلی تأیید شدند. اجزاء واکنش، حجم واکنش و برنامه حرارتی در جدول ۲ آمده است. جهت کنترل صحت روش PCR از سویه های کنترل مثبت حاوی ژن های *tetA* و *tetB* استفاده شد.

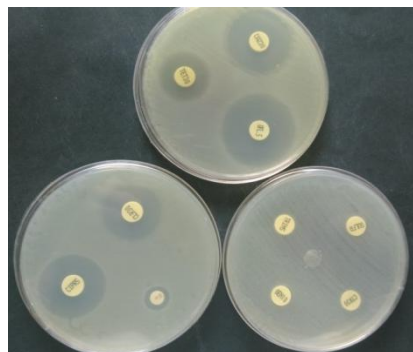
الکتروفورز محصول PCR

برای بررسی محصول های PCR از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی DNA با رنگ safe stain (سیناژن) انجام شد. ژل ها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند.

تجزیه تحلیل آماری:

داده های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (شماره ۱۶) و آزمون های آماری مربع کای و فیشر تجزیه و تحلیل گردید. مرز معنی داری روی $P < 0.05$ قرار داده شد.

چندگانه نیز بررسی شد و مقاومت دوگانه بیشترین میزان مقاومت را به خود اختصاص داد (جدول ۶).

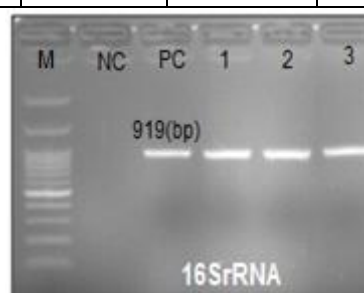


شکل ۲: بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های اشریشیاکلی از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری (روش انتشار از دیسک)

فراوانی ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی (*tetA* و *tetB*) در باکتری اشریشیاکلی جدا سازی شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری در جدول ۷ آمده است. برطبق نتایج به دست آمده در میان جدایه‌های مقاوم به تتراسیکلین، ۸۸ جدایه ($86/27\%$)، دارای ژن *tetA* بودند و در ۸۳ جدایه ($81/37\%$) ژن *tetB* تشخیص داده شد. ۷۴ جدایه ($72/54\%$) همزمان هر دو ژن را داشتند و ۵ جدایه ($4/90\%$) فاقد ژن‌های مورد مطالعه بودند. واکنش PCR نشان دهنده حضور باندهای اختصاصی برای ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی *tetA* و *tetB* در اشریشیاکلی‌های جدا سازی شده از افراد مبتلا به عفونت‌های ادراری بود.

جدول ۳: فراوانی باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک جدا شده از افراد مبتلا به عفونت‌های ادراری

جنس گروه های سنی (سال)	زن تعداد (%)	مرد تعداد (%)
< ۱	۵ (۳۳/۳)	۱ (۶۶/۰)
۱-۵	۱۴ (۳۳/۹)	۴ (۶۶/۲)
۵-۱۲	۰	۰
۱۲-۲۰	۰	۱ (۶۶/۰)
۲۰-۳۰	۱۷ (۳۳/۱۱)	۱ (۶۶/۰)
۳۰-۵۰	۲۶ (۳۳/۱۷)	۱۱ (۳۳/۷)
۵۰-۶۵	۲۴ (۱۶/۵)	۸ (۳۳/۵)
> ۶۵	۲۵ (۶۶/۱۶)	۱۳ (۶۶/۸)
کل	۱۱۱ (۷۴/۰)	۳۹ (۲۶/۰)



شکل ۳: واکنش PCR برای ردیابی ژن 16S rRNA باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک در نمونه‌های ادرار بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری
M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت، شماره ۱-۳ نمونه های مثبت

فراوانی باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری برحسب بیمارستان، جنسیت و بخش بستری در جدول ۴ نشان داده شده است. ۶۰٪ نمونه‌ها از بخش داخلی، ۲۶/۶۶٪ از اورژانس، ۴/۶۶٪ از بخش ICU، ۲/۶۶٪ از بخش قلب، ۲/۶۶٪ بیماران سرپایی، ۱/۳۳٪ از بخش CCU و ۲٪ از بخش ارولوژی و سایر بخش‌ها.

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری اشریشیاکلی جدا سازی شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری در بیمارستان‌های مورد مطالعه در جدول ۵ آمده است. بیشترین میزان مقاومت مربوط به تتراسیکلین (68%) و کمترین میزان مقاومت مربوط به کلرامفنیکل ($8/66\%$) بود (جدول ۵). اختلاف معنی دار آماری ($P < 0/05$) بین میزان شیوع مقاومت اشریشیاکلی‌ها به تتراسیکلین و کلرامفنیکل مشاهده شد (شکل ۲). از آن جایی که استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها اساس مقاومت چندگانه می‌باشد، لذا در این مطالعه درصد مقاومت‌های

جدول ۴: فراوانی باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری برحسب بیمارستان، جنسیت و بخش بستری

بیمارستان نمونه مثبت (%)	جنس	داخلی	اورژانس	ICU	قلب	سرپایی	CCU	ارولوژی و سایر
بقیه الله (عج) تهران	مذکر (۱۰)	۱۰ (۱۰۰)	-	-	-	-	-	-
	مونث (۴۴)	۴۰ (۹۰/۹۰)	۲ (۴/۵۴)	-	۲ (۴/۵۴)	-	-	-
	کل (۵۴)	۵۰ (۹۲/۵۹)	۲ (۳/۷۰)	-	۲ (۳/۷۰)	-	-	-
بعثت سنندج	مذکر (۱۸)	۸ (۴۴/۴۴)	۶ (۳۳/۳۳)	۱ (۵/۵۵)	-	۱ (۵/۵۵)	-	۲ (۱۱/۱۱)
	مونث (۳۳)	۱۵ (۴۵/۴۵)	۱۵ (۴۵/۴۵)	-	-	۳ (۹/۰۹)	-	-
	کل (۵۱)	۲۳ (۴۵/۰۹)	۲۱ (۴۱/۱۷)	۱ (۱/۹۶)	-	۴ (۷/۸۴)	-	۲ (۳/۹۲)
امام خمینی (ره) بروجرد	مذکر (۱۱)	۱ (۹/۰۹)	۷ (۶۳/۶۳)	۲ (۱۸/۱۸)	۱ (۹/۰۹)	-	-	-
	مونث (۳۴)	۱۶ (۴۷/۰۵)	۱۰ (۲۹/۴۱)	۴ (۱۱/۷۶)	۱ (۲/۹۴)	-	۲ (۵/۸۸)	۱ (۲/۹۴)
	کل (۴۵)	۱۷ (۳۷/۷۷)	۱۷ (۳۷/۷۷)	۶ (۱۳/۳۳)	۲ (۴/۴۴)	-	۲ (۴/۴۴)	۱ (۲/۲۲)
کل	(۱۵۰)	۹۰ (۶۰)	۴۰ (۲۶/۶۶)	۷ (۴/۶۶)	۴ (۲/۶۶)	۴ (۲/۶۶)	۲ (۱/۳۳)	۳ (۲)

جدول ۵: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری بر حسب بیمارستان

میزان مقاومت آنتی بیوتیکی (%)										بیمارستان ها
CAM	TET	SU	TMP	STR	GEN	CIP	OFX	CTR	CAZ	
(۱۴/۸۱)	(۷۲/۲۲)	(۶۱/۱۱)	(۶۱/۱۱)	(۱۱/۱۱)	(۱۴/۸۱)	(۲۷/۷۷)	(۳۳/۴۸)	(۳۵/۱۸)	(۱۱/۱۱)	بقیه الله (عج) تهران (۵۴)
(۵/۸۸)	(۷۰/۵۸)	(۶۲/۷۴)	(۵۲/۹۴)	(۷/۸۴)	(۲۹/۴۱)	(۴۹/۰۹)	(۴۷/۰۵)	(۵۰/۹۸)	(۲۵/۴۹)	بعثت سنندج (۵۱)
(۴/۴۴)	(۶۰)	(۵۵/۵۵)	(۶۰)	(۸/۸۸)	(۱۷/۷۷)	(۲۸/۸۸)	(۲۸/۸۸)	(۵۱/۱۱)	(۱۵/۵۵)	امام خمینی بروجرد (۴۵)
۱۳ (۸/۶۶)	(۶۸)	(۶۰)	(۵۸)	(۹/۳۳)	(۲۰/۶۶)	(۳۳/۳۳)	(۳۶)	(۴۵/۳۳)	(۱۷/۳۳)	کل (۱۵۰)

سفتازیدیم: CAZ، سفتریاکسون: CTR، افلوکساسین: OFX، سیپروفلوکساسین: CIP، جنتامایسین: GEN، استرپتومایسین: STR، تری متوپریم: TMP، سولفونامید: SU، تتراسیکلین: TET، کلرامفنیکل: CAM

جدول ۶: فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری

نوع مقاومت (%)									بیمارستان ها
هشت گانه	هفت گانه	شش گانه	پنج گانه	چهارگانه	سه گانه	دوگانه	مقاوم به همه آنتی بیوتیک ها	حساس به همه آنتی بیوتیک ها	
(۹/۲۵)	(۱/۸۵)	(۲)	(۴)	(۶)	(۴)	(۸)	۰	(۳/۷۰)	بقیه الله (عج) تهران (۵۴)
(۲)	(۱۹/۶۰)	(۲)	(۴)	(۱۵/۶۸)	(۳/۹۲)	(۱۳/۷۲)	۰	(۲)	بعثت سنندج (۵۱)
(۲)	(۲/۲۲)	(۲/۲۲)	(۶)	(۴)	(۱۵/۵)	(۴)	۰	(۴/۴۴)	امام خمینی بروجرد (۴۵)
(۷/۳۳)	(۸)	(۴/۶۶)	(۱۴)	(۱۵/۳۳)	(۱۰)	(۱۶/۶۶)	۰	(۴/۶۶)	کل (۱۵۰)

جدول ۷: فراوانی ژن های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی (*tetA* و *tetB*) در باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک جدا سازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری برحسب بیمارستان و جنسیت

ژن های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی (%)			بیمارستان	نمونه های مقاوم نسبت به تتراسیکلین ۱۰۲
<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	جنس		
۷ (۷۰)	۶ (۶۰)	مذکر (۱۰)	بقیه الله (عج) تهران	
۲۷ (۶۱/۳۶)	۲۸ (۶۳/۶۳)	مونث (۴۴)		
۳۴ (۶۲/۹۶)	۳۴ (۶۲/۹۶)	کل (۵۴)		
۹ (۵۰)	۸ (۴۴/۴۴)	مذکر (۱۸)	بعثت سنندج	
۱۹ (۵۷/۵۷)	۲۲ (۶۶/۶۶)	مونث (۳۳)		
۲۸ (۵۴/۹۰)	۳۰ (۵۸/۸۲)	کل (۵۱)		
۴ (۳۶/۳۶)	۵ (۴۵/۴۵)	مذکر (۱۱)	امام خمینی (ره) بروجرد	
۱۷ (۵۰)	۱۹ (۵۵/۸۸)	مونث (۳۴)		
۲۱ (۴۷/۷۲)	۲۴ (۵۴/۵۴)	کل (۴۴)		
۸۳ (۸۱/۳۷)	۸۸ (۸۶/۲۷)		کل (۱۰۲)	

بحث:

توجه به این امر، الگوهای درمانی مورد استفاده در نقاط مختلف، متفاوت و براساس ویژگی های خاص هر منطقه تعریف می شود. بررسی حاضر نشان دهنده حضور بالای سویه های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک مقاوم به چندین آنتی بیوتیک در بیماران مبتلا به عفونت های ادراری در مناطق مورد بررسی می باشد. به طوری که درصد بالایی از ایزوله ها به بیش از دو آنتی بیوتیک مقاوم بودند. سطح مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری از کشوری به کشور دیگر متغیر است. به طوری که در ایالات متحده در سال ۲۰۰۰ و در اسلووانیا در سال ۲۰۰۶ و در ایران در سال ۲۰۰۸ درصد سویه های دارای مقاومت چندگانه به ترتیب ۷/۱ درصد، ۴۲ درصد و ۸۲/۵ درصد بود (۱۵، ۲۱، ۱۲). چنین مقاومت های دارویی، مشکل پیچیده ای را برای درمان های تجربی عفونت های ایجاد شده توسط اشریشیاکلی ایجاد می کنند. در این مطالعه، از ۱۵۰ مورد اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری بیشترین میزان مقاومت به ترتیب در آنتی بیوتیک های تتراسیکلین (۶۸٪)، سولفونامید (۶۰٪)، تری متو پریم (۵۸٪) و سفتریاکسون (۴۵/۳۳٪) نشان داده شد. در بررسی Lazarevic و همکارانش که در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت، نتایج نشان دهنده میزان بالایی از مقاومت دارویی در بیماران مبتلا به عفونت های ادراری بود. در نتایج به دست آمده توسط این گروه درصد بالایی از سویه های اشریشیاکلی جدا شده، به تتراسیکلین مقاوم داشتند و هم-

عفونت مجاری ادراری شامل عفونت های کلیه ها و مثانه است که از نظر شیوع، دومین نوع عفونت باکتریایی پس از عفونت مجاری تنفسی است. باکتری اشریشیاکلی، شایع ترین عامل عفونت مجاری ادراری شناخته شده است (۶). امروزه یکی از مشکل های مطرح و قابل توجه بهداشت جهانی، افزایش شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی پاتوژن ها در جمعیت های مختلف انسانی و حیوانی می باشد. عامل اصلی افزایش مقاومت باکتری های پاتوژنیک، استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک ها است و این امر منجر به پیدایش و انتشار پاتوژن های مقاوم و ژن های مقاومت در آن ها می شود. در جمعیت های انسانی و حیوانی، آنتی بیوتیک ها به منظور درمان و جلوگیری از بیماری های عفونی استفاده می گردند به دلیل استفاده زیاد از داروهای آنتی میکروبی، شیوع و انتشار کلون های مقاوم و ژن های مقاومت در بیمارستان ها افزایش یافته است (۲۷). در این مطالعه از سه منطقه مختلف ایران نمونه برداری انجام گرفت با توجه به مقایسه درصدهای مختلف نتایج آنتی بیوگرام با آزمایش های مشابه، باید توجه داشت که تفاوت منطقه ای در نقاط مختلف دنیا یا حتی یک کشور، پاسخ های درمانی متفاوتی را نسبت به داروهای ضد میکروبی ایجاد می کند. منشأ این تفاوت ها در نقاط مختلف را می توان، تفاوت های ژنتیکی سویه ها و تفاوت در زمینه های دیگر دانست که با

در سال ۲۰۱۴ (۱۱) که شیوع ژنهای *tetA* و *tetB* را در سویه‌های اشریشیاکلی ۰/۸۵/۰۶٪ و ۸۴/۴۱٪ گزارش کردند و مشایخی و همکاران در سال ۲۰۱۴ (۱۷) که نشان دادند میزان حضور ژنهای القاکننده مقاومت در مقابل آنتی بیوتیک تتراسیکلین (*tetA* و *tetB*) ۷۱/۱٪ بود و دورمنش و همکارانش در سال ۲۰۱۳ (۵) که شیوع ژنهای *tetA* و *tetB* علیه تتراسیکلین را ۸۲/۲٪ و ۶۴/۵٪ گزارش کردند هم‌خوانی دارد. Sandalli و همکاران در سال ۲۰۱۰، ژنهای مقاومت به تتراسیکلین را در تعدادی از باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه‌های مقاوم به تتراسیکلین مورد بررسی قرار دادند. نتایج این گروه نشان داد که از ۵۲ سویه مقاوم به تتراسیکلین، ۱۵/۳٪ از آن‌ها داری ژن *tetA* و ۱۹/۲٪ دارای ژن *tetB* بودند و تنها در یک مورد از آن‌ها هر دو ژن *tetA* و *tetB* یافت شد (۲۴). در مطالعه حاضر نتایج حاصل از PCR ژنهای *tet* نشان داد که سویه‌هایی نیز وجود دارند که نسبت به آنتی بیوتیک تتراسیکلین مقاومت داشته اما در عین حال هیچ یک از ژنهای *tet* مورد بررسی را حمل نمی‌کنند. با این وجود، نتایج به دست آمده در مطالعه Bryan و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۲۲) و Saenz (۲)، همکاران در سال ۲۰۰۴ (۲۲) و کریمی و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۱۳) نشان داد که ژنهای *tetA* و *tetB* با درصد متفاوتی، در تمامی سویه‌های اشریشیاکلی که به صورت فنوتیپی به تتراسیکلین مقاومت دارند، وجود دارد. نکته جالب در مطالعه حاضر این بود که با توجه به شیوع بالای ژنهای *tetA* و *tetB* در سویه‌های اشریشیاکلی مقاوم به تتراسیکلین، نتایج این پژوهش نشان داد که ژن *tetA* از فرکانس و شیوع بیشتری نسبت به ژن *tetB*، در سویه‌های اشریشیاکلی مورد بررسی دارد (۸۶/۲۷٪ در برابر ۸۱/۳۷٪). هم‌سوی با نتایج به دست آمده در این مطالعه که ژن *tetA* بیش‌ترین فراوانی را داشت، در مطالعه ای که توسط Sianglum و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام گرفت نیز در ۱۵ مورد از ۱۸ ایزوله ای که مقاومت به تتراسیکلین داشتند، ۸۳/۳٪ ایزوله‌ها دارای ژن *tetA* بودند (۲۵).

نتیجه گیری

با توجه به مشاهده روز افزون مقاومت به برخی از آنتی بیوتیک‌ها و تغییرهای گسترده طیف اثر بخشی نسبت به داروها و جلوگیری از افزایش موارد مقاوم به دارو، ضرورت

چنین ایزوله‌های مورد مطالعه حساسیت بالایی ۷۰ الی ۸۰٪ نسبت به کلرامفنیکل داشتند (۱۵). در مطالعه حاضر نیز بیش‌ترین مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به تتراسیکلین (۶۸٪) و کم‌ترین مقاومت مربوط به کلرامفنیکل (۸/۶۶٪) بود. مهاجری و همکاران میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک تتراسیکلین را ۷۴/۲٪ گزارش کردند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۱۸). در گزارشی دیگر، ممتاز و همکارانش در سال ۲۰۱۳، میزان مقاومت دارویی را در مورد ایزوله‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک در ۱۲۳ بیمار مبتلا به عفونت ادراری مورد مطالعه قرار دادند، در میان ایزوله جداشده، ۷۳/۹۸٪ نسبت به تتراسیکلین مقاومت نشان دادند (۱۹). هم‌چنین درمنش و همکارانش در سال ۲۰۱۴، مطالعه ای بر روی میزان شیوع سویه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک و مقاومت میکروبی شایع در میان نمونه‌های ادرار کودکان انجام دادند که نتایج حاکی از آن بود که مقاومت بالایی نسبت به تتراسیکلین (۶۲/۹٪) وجود داشت. هم‌چنین این گروه داروی مؤثر در درمان عفونت‌های ایجاد شده را ایمی پنم گزارش کردند (۵). نکته جالب توجه در این مطالعه و سایر مطالعه‌های صورت گرفته این است که سویه‌های مقاوم به تتراسیکلین و حامل ژنهای *tet*، مقاومت بیش‌تری به آنتی بیوتیک‌ها نسبت به سویه‌هایی که به تتراسیکلین حساس می‌باشند دارند. با وجود این که از تتراسیکلین در درمان عفونت‌های انسانی کم‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما کماکان شیوع بالای مقاومت به آن مشاهده می‌شود. از طرفی یکی از دلایل مقاومت بالا به تتراسیکلین، درمان سایر عفونت‌های روده ای در انسان و حیوان‌ها با استفاده از این آنتی بیوتیک و در نهایت مقاومت باکتری‌ها و انتقال ژن‌ها مقاومت به تتراسیکلین از طریق پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها به باکتری‌ها می‌باشد. استفاده بیش از حد از این آنتی بیوتیک‌ها در دام‌ها یکی دیگر از دلایل مقاومت به این آنتی بیوتیک در انسان و انتقال ژن-های مقاومت از سویه‌های حیوانی به انسانی می‌باشد (۲۲، ۱۳ ، ۲). به همین منظور در مطالعه حاضر، به منظور تعیین میزان توزیع ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین از روش Multiplex-PCR که روشی سریع و با اختصاصیت بالا می‌باشد، استفاده شد. نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که از میان اشریشیاکلی‌های مقاوم به تتراسیکلین ۸۸ ایزوله (۸۶/۲۷٪) دارای ژن *tetA* و ۸۳ ایزوله (۸۱/۳۷٪) دارای ژن *tetB* بود. نتایج این قسمت از این بررسی با نتایج حیدری و همکاران

اجرای آزمون های حساسیت دارویی بسیار ضروری به نظر می رسد. شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک و همچنین درصد بالای ژن های مقاومت به تتراسیکلین در بیماران مبتلا به عفونت های ادراری در این مطالعه، می تواند نشان دهنده مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها باشد. سرانجام این که، شیوع مقاومت به تتراسیکلین، مارکر مفیدی برای بررسی ژن های مقاومت بوده و می تواند در بررسی های اکولوژیکی مفید واقع گردد. به لحاظ مقاومت بالای اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک نسبت به تتراسیکلین، سولفونامید و تری متوپریم این آنتی بیوتیک ها به هیچ وجه در درمان عفونت های ادراری توصیه نمی شود.

سپاسگزاری:

نویسندگان این مقاله لازم می دانند به این وسیله از کارکنان آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد و همچنین سرکار خانم روح انگیز افتخاری برای زحمات بی دریغ شان در این پروژه قدردانی نمایند.

منابع

1. Betina V. The chemistry and biology of antibiotics. Amsterdam. Elsevier: Scientific Pub Company. 1983.
2. Bryan A, Shapir N, Sadowsky M. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70:2503-7.
3. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65(2):232-60.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-four informational supplement. M100-S21. Wayne Pa: CLSI; 2014.
5. Dormanesh B, Mirnejad R, Khodaverdi Dariyan E, Momtaz H, Yahaghi E, et al. Characterization and study the antibiotic resistance of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pediatrics with pyelonephritis and cystitis in Iran. *Iran J Med Microbiol*. 2013;7(2):27-39.
6. Foxman B. Epidemiology of urinary tractinfections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med*. 2002;113Suppl 1A(5S-13S).
7. Foxman B, Barlow R, d'Arcy H, et al. Urinary tract infection: estimated incidence and associated costs. *Ann Epidemiol*. 2000;10:509-15.
8. Gangoue PJ, Koulla ShS, Ngassam P, Adiogo D, Ndumbe P. Antimicrobial activity against gram negative bacilli from yaounde central hospital, Cameroon. *Afr Health Sci*. 2006;6(4):232-35.
9. Gonzalez CM, Schaeffer AJ. Treatment of urinary tract infection: what's old, what's new, and what works. *World J Urol*. 1999;17:372-82.
10. Gow SP, Waldner CL, Harel J, Boerlin P. Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic *Escherichia coli* isolates from cow-calf herds in western Canada. *App Environ Microb*. 2008;47:3658-66.
11. Heidary M, Momtaz H, Madani M. Characterization of diarrheagenic antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pediatric patients in Tehran, Iran. *Iran Red Crescent Med J*. 2014;16(4):e12329.
12. Japoni A, Gudarzi M, Farshad SH, Basiri E, Ziyaeyan M, Alborzi A, et al. Assay for integrons and pattern of antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* strains by PCR-RFLP in southern Iran. *Jpn J Infect Dis*. 2008;61:85-8.
13. Karami N, Nowrouzian F, Adlerberth I, Wold AE. Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:156-61.
14. Koo HJ, Woo GJ. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. *Int J Food Microbiol*. 2011;14:407- 13.
15. Lazarevic G, Petreska D, Pavlovic S. Antibiotic sensitivity of bacteria isolated from the urine of children whit urinary tract infections. *Srp Art Celok Lek*. 2001;126(11-12):423-9.
16. Marsik FJ, Parsi JT, Blendon DC. Transmissible drug resistance of *E.coli* and their rural environments. *J Infect Dis*. 1975;132(3):296-302.
17. Mashayekhi F, Moghny M, Faramarzpooor M, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E, Tarhriz V, et al. Molecular characterization and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. *Iran J Biotech*. 2014;12(2):e16833.
18. Mohajeri P, Izadi B, Naghshi N. Antibiotic sensitivity of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection referred to Kermanshah central laboratory. *J Kermanshah Uni Med Sci*. 2011;15(1):51-6. [Article in Persian]
19. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpooor Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013;12:8.
20. Ogeppaard H, Steinum MT, Wasteson Y. Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:3732-4.

21. Rijavec M, Starcic Erjavec M, Ambrozic Avgustin J, Reissbrodt R, Fruth A, Krizan-Hergouth V, et al. High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. *Curr Microbiol*. 2006;53:158-62.
22. Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, et al. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:3996-4001.
23. Sahn DF, Thornsberry C, Mayfield DC, Jones ME, Karlowsky JA. Multidrug-resistant urinary tract isolates *Escherichia coli*: prevalence and patient demographics in the United States in 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;45:1402-406.
24. Sandalli Cat, Sevim A, Ozgumus OB. Characterization of tetracycline resistance genes in tetracycline resistant Enterobacteriaceae obtained from a coliform collection. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010;26:2099-103.
25. Sianglum W, Kittiniyom K, Srimanote P, Wonglumsom W. Development of Multiplex PCR assays for detection of antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* and enterococci. *Journal Rapid Methods Autumn Microbiol*. 2009;17:117-34.
26. Tuckman M, Petersen PJ, Howe AY, Orłowski M, Mullen S, Chan K, et al. Occurrence of tetracycline resistance genes among *Escherichia coli* isolates from the phase 3 clinical trials for tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:3205-11.
27. Van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;14:327-35.