مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و پنجم - زمستان ۱۳۹۵

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن های مقاومت به تتراسیکلین (*tetA* و *tetB*) 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 بیماری‌های شایع جوامع انسانی است. متأسفانه مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها موجب بروز مقاومت تدریجی در باکتری‌ها شده است. هدف از این مطالعه، تعیین میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی و ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین در اشریشیاکلی‌های مولد عفونت ادراری بود.

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

یافته‌ها: از ۲۱۰ نمونه ادرار جمع آوری شده، ۱۵۰ ایزوله اشریشیاکلی جدا گردید. بیش‌ترین میزان مقاومت مربوط به تتراسیکلین (۶۸٪) وکم‌ترین میزان مقاومت مربوط به کلرامفنیکل (۸/۶۶٪) بود. در میان جدایه‌های 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 ژن‌های مورد مطالعه بودند.

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

نتیجه گیری: افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی می‌تواند نشان دهنده مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک ها باشد. لذا بهتر است که نسبت به استفاده از روش‌های درمانی رایج، اقدام‌های مناسب‌تری به عمل آید.

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

مقدمه

عفونت دستگاه ادراری به حضور پاتوژن‌های میکروبی درون دستگاه ادراری اطلاق می‌شود و یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در بیماران سرپایی و بستری در بیمارستان می‌باشد (۹). دستگاه ادراری را در طول عمر خود تجربه کرده اند. فراوانی عفونت ادراری در زنان شایع‌تر از مردان می باشد. به طوری که حدود نیمی از خانم‌ها حداقل یک‌بار عفونت پژوهش‌های انجام گرفته در جوامع مختلف نشان می دهد باسیل‌های گرم منفی به عنوان شایع‌ترین عامل اتیولوژیک UTI بوده و در بین آن‌ها اشریشیاکلی بیش از ۸۰٪ موارد عفونت‌های حاد دستگاه ادراری را تشکیل می‌دهد (۶).

اساس درمان مناسب در عفونت‌های ادراری انتخاب یک آنتی بیوتیک مناسب با کارایی و اثربخشی بالا می‌باشد (۸). متأسفانه مصرف بی‌رویه و گاهی نادرست آنتی بیوتیک‌ها سبب نابودی بعضی از ارگانیسم‌های حساس شده و شرایط زیست را برای بقای باکتری‌های مقاوم مساعد نموده است به نحوی که

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.3.7]

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، میکروارگانیسم‌های 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 طویل 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 می کنند 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 ژن-های در ارتباط با پمپ یونی افلاکس شامل *tetA*، *tetB*، *tetC*، *tetD* و *tetG* 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 یوروپاتوژنیک 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 سنندج و بقیه الله (عج) تهران جمع آوری گردید. ابتدا نمونه‌ها روی محیط های مک کانکی آگار و EMB کشت داده شدند؛ سپس با استفاده از آزمایش‌های رایج بیوشیمیایی مانند اوره، SIM[1]، MR/VP[2]، TSI[3] و سیمون سیترات (تمامی محیط های 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 (۳۰µg)، استرپتومایسین (۱۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، سفتریاکسون (۳۰µg)، سفتازیدیم (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، افلوکساسین (۵µg)، کلرامفنیکل (۳۰µg)، تری متوپریم (۵µg) و سولفونامید (۲۴۰µg). 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.3.7]

استخراج DNA و بررسی فراوانی ژن‌های 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 سویه‌های 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 سویه‌های کنترل مثبت حاوی ژن های *tetA* و *tetB* استفاده شد.

الکتروفورز محصول PCR

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

تجزیه تحلیل آماری:

داده‌های 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 $P< ۰/۰۵$ قرار داده شد.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های مورد مطالعه

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

جدول ۲: حجم، فرایند دمایی و تعداد سیکل واکنش‌های زنجیره ای پلیمراز

حجم واکنش (۵۰ میکرولیتر)	برنامه PCR	ژ ن های هدف
25µL Taq 2x Master Mix 1x: Tris-Hcl Ph 8.5, $(NH4)_2SO_4$, 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	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	*E. coli 16S rRNA*
25µL Taq 2x Master Mix 1x: Tris-Hcl Ph 8.5, $(NH4)_2SO_4$, 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	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	*tetA,tetB*

یافته‌ها:

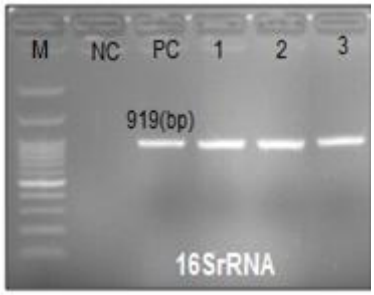
از مجموع ۲۱۰ نمونه مورد بررسی، ۱۵۰ ایزوله اشریشیاکلی مولد عفونت ادراری شناسایی گردید (شکل ۱). فراوانی باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک جداشده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد از میان ۱۵۰ ایزوله، ۳۹ مورد (۲۶٪) مربوط به جنس مذکر و ۱۱۱ مورد (۷۴٪) مربوط به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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.3.7]

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

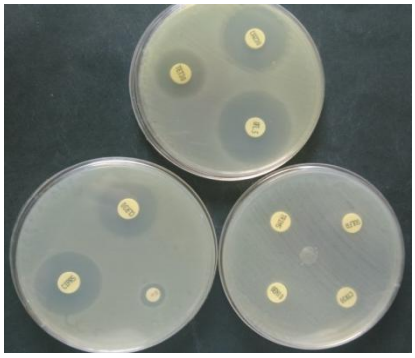
	جنس گروه های سنی (سال)	زن تعداد (٪)	مرد تعداد (٪)
اشریشیاکلی ۱۵۰	<۱	۵ (۳/۳۳٪)	۱ (۰/۶۶٪)
	۱-۵	۱۴ (۹/۳۳٪)	۴ (۲/۶۶٪)
	۵-۱۲	۰	۰
	۱۲-۲۰	۰	۱ (۰/۶۶٪)
	۲۰- ۳۰	۱۷ (۱۱/۳۳٪)	۱ (۰/۶۶٪)
	۳۰- ۵۰	۲۶ (۱۷/۳۳٪)	۱۱ (۷/۳۳٪)
	۵۰- ۶۵	۲۴ (۱۶٪)	۸ (۵/۳۳٪)
	>۶۵	۲۵ (۱۶/۶۶٪)	۱۳ (۸/۶۶٪)
	کل	۱۱۱ (۷۴٪)	۳۹ (۲۶٪)



شکل ۱: 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 ۳-۱ 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 (۶۸٪) و کم‌ترین میزان مقاومت مربوط به کلرامفنیکل (۸/۶۶٪) بود (جدول ۵). اختلاف معنی دار آماری (P<۰/۰۵) بین میزان شیوع مقاومت اشریشیاکلی‌ها به تتراسیکلین و کلرامفنیکل مشاهده شد (شکل ۲). از آن جایی که استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها اساس مقاومت چندگانه می‌باشد، لذا در این مطالعه درصد مقاومت‌های 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 (۸۶/۲۷٪)، دارای ژن *tetA* بودند و در۸۳ جدایه (۸۱/۳۷٪) ژن *tetB* تشخیص داده شد. ۷۴ جدایه (۷۲/۵۴٪) همزمان هر دو ژن را داشتند و ۵ جدایه (۴/۹۰٪) 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.3.7]

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
باکتری اشریشیاکلی ۱۵۰	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 عفونت‌های ادراری بر حسب بیمارستان

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

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 عفونت‌های ادراری

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.3.7]

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

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

بحث:

عفونت مجاری ادراری شامل عفونت‌های کلیه‌ها و مثانه است که از نظر شیوع، دومین نوع عفونت باکتریایی پس از عفونت مجاری تنفسی است. باکتری *اشریشیاکلی*، شایع‌ترین عامل عفونت مجاری ادراری شناخته شده است (۶). امروزه یکی از مشکل‌های مطرح و قابل توجه بهداشت جهانی، افزایش شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی پاتوژن‌ها در جمعیت‌های مختلف انسانی و حیوانی می‌باشد. عامل اصلی افزایش مقاومت باکتری های پاتوژنیک، استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک‌ها است و این امر منجر به پیدایش و انتشار پاتوژن‌های مقاوم و ژن‌های مقاومت در آن‌ها می‌شود. در جمعیت‌های انسانی و حیوانی، آنتی بیوتیک‌ها به منظور درمان و جلوگیری از بیماری‌های عفونی استفاده می‌گردند به دلیل استفاده زیاد از داروهای آنتی میکروبی، شیوع و انتشار کلون‌های مقاوم و ژن‌های مقاومت در بیمارستان‌ها 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 آزمایش‌های مشابه، باید توجه داشت که تفاوت منطقه ای در نقاط مختلف دنیا یا حتی یک کشور، پاسخ‌های درمانی متفاوتی را نسبت به داروهای ضد میکروبی ایجاد می‌کند. منشأ این تفاوت‌ها در نقاط مختلف را می‌توان، 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. بررسی حاضر نشان دهنده حضور بالای سویه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک مقاوم به چندین آنتی بیوتیک در بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری در مناطق مورد بررسی می‌باشد. به طوری که درصد بالایی از ایزوله‌ها به بیش از دو آنتی بیوتیک مقاوم بودند. سطح مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه‌های 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 سویه‌های دارای مقاومت چندگانه به ترتیب ۷/۱ درصد، ۴۲ درصد و ۸۲/۵ درصد بود (۲۱، ۱۵ ، ۱۲). چنین مقاومت-های دارویی، مشکل پیچیده‌ای را برای درمان‌های تجربی عفونت‌های ایجاد شده توسط اشریشیاکلی ایجاد می‌کنند. در این مطالعه، از ۱۵۰ مورد اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری بیش‌ترین میزان مقاومت به ترتیب در آنتی بیوتیک‌های 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 عفونت‌های ادراری بود. در نتایج به دست آمده توسط این گروه درصد بالایی از سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده، به تتراسیکلین مقاومت داشتند و هم-

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.3.7]

چنین ایزوله های 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). هم چنین 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 عفونت های 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 کم-تر مورد استفاده قرار می گیرد، 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 می باشد، 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 درسال ۲۰۱۴ (۱۱) که شیوع ژن‌های *tetA* و *tetB* را در سویه‌های اشریشیاکلی 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 همکارنش 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 (۲)، Saenz و 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٪). هم سوی 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 ۱۵مورد از ۱۸ ایزوله ای که مقاومت به تتراسیکلین داشتند، ۸۳/۳٪ ایزوله ها 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.3.7]

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

سپاسگزاری:

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.3.7]

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, Blenden DC. Transmissible drug resistance of *E.coli* and their rural environments. J Infect Dis. 1975;132(3):296-302.
17. Mashayekhi F, Moghny M, Faramarzpoor 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, Safarpoor 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.3.7]

21. Rijavec M, Starcic Erjavec M, Ambrozic Avgustin J, Reissbrodt R, Fruth A, Krizan-Hergouth V, et al. High prevalence of multidrug resistance and ran dom 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. Sahm 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, Orlowski 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.3.7]