مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۳، شماره۳، مرداد و شهریور۱۳۹۷(شماره پی در پی۱۲۸)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 20:25 +0330 on Saturday January 23rd 2021

مقایسه مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های حدت در *اشریشیا کلی*‌های ادراری و مدفوعی افراد مبتلا به عفونت دستگاه ادراری

مریم بهادری[۱]، محمد معتمدی فر[۲]، عبد الله درخشنده[۱*]، آذر معتمدی بروجنی[۱]، محسن علی‌نژاد[۳]، زهرا نظیری[۱]

[۱] گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران، [۲]مرکز تحقیقات HIV/ ایدز شیراز، بنیاد سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، [۳]گروه یورولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۶/۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های دستگاه ادراری یکی از مهم‌ترین عفونت‌های باکتریایی هستند و شایع‌ترین عامل این عفونت‌ها باکتری *اشریشیا کلی* می‌باشد. با توجه به اهمیت *اشریشیا کلی*‌های فلور طبیعی دستگاه گوارش در ایجاد عفونت ادراری، مطالعه حاضر به منظور مقایسه *اشریشیا کلی*‌های عامل عفونت دستگاه ادرای با *اشریشیا کلی*‌های غالب فلور طبیعی دستگاه گوارش براساس مقاومت آنتی‌بیوتیکی و برخی ژن‌های حدت انجام گرفت.

روش بررسی: برای انجام این مطالعه توصیفی پس از اخذ رضایت‌نامه، از ۳۰ خانم مبتلا به عفونت دستگاه ادراری نمونه ادراری و مدفوعی جمع‌آوری شد و پس از کشت و تأیید بیوشیمیایی سه پرگنه به صورت تصادفی از قسمت‌های مختلف هر پلیت(نمونه مدفوع و ادرار هر فرد) برای بررسی انتخاب شدند. فراوانی ژن‌های *hlyD* و *cnf1* با استفاده از روش PCR تعیین شد و بررسی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی انجام گرفت. تحلیل داده‌ها با استفاده از روش آماری توصیفی و آزمون مربع کای انجام گرفت.

یافته‌ها: به طور کلی ۹۰ جدایه ادراری و ۹۰ جدایه مدفوعی از نمونه‌های به دست آمده جداسازی شد. با مقایسه نتایج به دست آمده بین جدایه‌های ادراری و مدفوعی مشاهده شد که میزان شیوع ژن‌های حدت بررسی شده در بین جدایه‌های ادراری نسبت به جدایه‌های مدفوعی بیشتر است($p<۰/۰۵$). بیشترین مقاومت در فلور غالب مدفوع و ادرار نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تریمتوپریم- سولفامتوکسازول و جنتامایسین دیده شد. در جدایه‌های ادراری بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین(۳۲/۲ درصد) نشان داده شد. در گروه‌های *اشریشیا کلی* ادراری و مدفوعی به ترتیب ۳۷/۷ درصد و ۴۶/۶ درصد از جدایه‌ها مقاوم به سه آنتی‌بیوتیک و بیشتر بودند. در ۹ بیمار از ۳۰ بیمار بررسی شده، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های حدت دارای الگوی یکسان بودند.

نتیجه‌گیری: احتمالاً فلور غالب مدفوع عامل عفونت نیست بلکه جدایه‌هایی که ژن حدت بیشتر دارند در ایجاد عفونت مؤثر هستند. با توجه به بیشتر بودن مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تریمتوپریم - سولفامتوکسازول و جنتامایسین در هر دو گروه بررسی شده، احتمالاً فلور مدفوع می‌تواند در انتقال ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ادرار نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیا کلی* مولد عفونت ادراری، *اشریشیا کلی* فلور نرمال، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن‌های حدت

نویسنده مسئول: **عبد الله درخشنده**، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

Email: drkhshnd77@gmail.com

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 20:25 +0330 on Saturday January 23rd 2021

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 20:25 +0330 on Saturday January 23rd 2021

مقدمه

عفونت‌های دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در سطح دنیا می‌باشند(۱). بیشترین عامل ایجاد کننده عفونت ادراری باکتری‌ها هستند، ممکن است قارچ‌ها و ویروس‌ها نیز به ندرت باعث ایجاد این عفونت شوند. باکتری‌های *پروتئوس*، *کلبسیلا*، *اشریشیاکلی* و گونه‌های انتروکوکوس در ایجاد عفونت‌های ادراری نقش دارند(۳و۲). در این میان باکتری *اشریشیاکلی* به عنوان مهم‌ترین عامل عفونت ادراری شناخته شده و در بیش از ۸۰ درصد این عفونت‌ها نقش دارد(۴).

دستگاه ادراری به طور طبیعی محیطی استریل است که به وسیله مکانیزم‌های متنوعی مانع لانه‌گزینی و زنده ماندن باکتری می‌شود. با وجود مطالعه‌های قابل توجه روند بیماری‌زایی در عفونت ادراری به طور دقیق شناسایی نشده، ولی فلور دستگاه گوارش میزبان(واژن در خانم‌ها) به عنوان منابع عفونت برای عامل *اشریشیاکلی* شناخته می‌شوند(۵).

سویه‌های *اشریشیاکلی* بر اساس خصوصیات کلینیکی در انسان به سه گروه اصلی همزیست، بیماری‌زای روده‌ای و بیماری‌زای خارج روده‌ای تقسیم می‌شوند(۶). *اشریشیاکلی*‌های مولد عفونت ادراری معمول‌ترین پاتوتیپ *اشریشیاکلی*‌های بیماری‌زای خارج روده‌ای هستند که از ادرار بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری جدا شده‌اند(۷). برخی عوامل از جمله میزان شیوع ژن‌های حدت بین سویه‌های *اشریشیاکلی* مولد عفونت ادراری و *اشریشیاکلی*‌های همزیست متفاوت است(۹ و۸). به طور کلی فاکتورهای حدت سویه‌های *اشریشیاکلی* عامل عفونت ادراری به دو دسته کلی تقسیم می‌شوند که شامل فاکتورهای حدت مربوط به سطح باکتری و فاکتورهای ترشحی به وسیله باکتری می‌باشند. از مهم‌ترین فاکتورهای ترشحی به وسیله باکتری می‌توان به توکسین‌های نکروز دهنده سیتوتوکسیک و همولیزین اشاره کرد. *hlyD* یک ژن مولد همولایزین است. سویه‌های *اشریشیاکلی* مرتبط با پیلونفریت اغلب تولید همولیزین می‌کنند. همولیزین اریتروسیت‌ها را لیز کرده و باعث ایجاد صدمه به سلول‌های مختلف میزبان می‌گردد. همولیزین با جایگزینی خود در غشا به واسطه تشکیل کانال‌های انتخابی کاتیون، به غشا سلول آسیب می‌رساند(۱۰). هم‌چنین دو نوع از توکسین‌های نکروز دهنده سیتوتوکسیک شناسایی شده‌اند که شامل ژن کد کننده Cnf1 کروموزومی و ژن کد کننده *Cnf2* پلاسمیدی می‌باشند. توکسین‌های نکروز دهنده سیتوتوکسیک از قابلیت حمله به سلول‌های میزبان برخوردارند(۱۱).

برخی مطالعه‌ها نشان دهنده نقش فلور واژن، غذای آلوده، ارتباط با حیوان‌ها و فعالیت جنسی در ایجاد عفونت ادراری می‌باشند، ولی باور معمول این است که جدایه‌های *اشریشیاکلی* مولد عفونت ادراری از فلور روده‌ای منشا می‌گیرد. (۱۵ــ۱۲) سوالی که هم‌چنان در این زمینه مطرح است این است که فلور غالب مدفوع باعث ایجاد این عفونت

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 20:25 +0330 on Saturday January 23rd 2021

می‌شود و یا جدایه‌های مدفوعی که دارای حدت بیشتری هستند.

مقاومت زیاد به دسته‌های متفاوت آنتی‌بیوتیکی به علت مصرف نامناسب آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های مختلف *اشریشیاکلی* مولد عفونت ادراری مشاهده شده و باعث ایجاد نگرانی در درمان عفونت‌های دستگاه ادراری شده است. با توجه به این که سویه‌های *اشریشیاکلی* مدفوعی به عنوان مخزن مهمی برای ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی شناخته شده‌اند(۱۶) و از آنجایی که برخی از این ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعدادی از ژن‌های ویرولانس بر روی قطعات ژنی متحرک قرار گرفته‌اند(۱۷)، امکان انتقال این ژن‌ها از جدایه‌های مدفوعی به جدایه‌های ادراری وجود دارد. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اشریشیاکلی* در محیط‌ها و زمان‌های مختلف متفاوت است، بنابر این بررسی دوره‌ای مقامت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های معمول در جوامع مختلف مورد نیاز است.

هدف از مطالعه حاضر بررسی و مقایسه شیوع دو ژن مولد توکسین(*cnf1* , *hly*D) و هم‌چنین میزان مقاومت به شش آنتی‌بیوتیک معمول، در *اشریشیاکلی‌های* جدا شده از ادرار بیماران مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری و فلور نرمال دستگاه گوارش آنها می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی در فاصله زمانی دی ماه سال ۱۳۹۳ تا خرداد ماه سال ۱۳۹۴ از ۳۰ خانم مبتلا به عفونت دستگاه ادراری، نمونه میانه ادرار گرفته شد. نمونه مدفوع این افراد در ظروف پلاستیکی جمع‌آوری شد. بیماران از بین خانم‌های متأهل ۲۰ تا ۷۰ ساله که طی ۳۰ روز گذشته آنتی‌بیوتیک مصرف نکرده بودند و جهت تشخیص و درمان عفونت دستگاه ادراری به آزمایشگاه‌های سطح شهر کرمان مراجعه می‌کردند، انتخاب می‌شدند.

تمامی افراد مورد بررسی به طور کامل در جریان روند مطالعه قرار گرفته و فرم رضایت‌نامه را مطالعه و امضا نمودند. هم‌چنین روش‌های مورد استفاده در این پژوهش به وسیله کمیته اخلاقی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز تأیید گردید.

جدایه‌های *اشریشیاکلی* از نمونه‌های جمع‌آوری شده جداسازی شد، بدین ترتیب که نمونه‌ها روی محیط مک کانکی آگار، کشت داده شدند و پس از یک شبانه روز گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کلونی‌های تخمیر کننده لاکتوز به روی محیط ائوزین متیلن بلو آگارکشت داده شدند. جهت تأیید تشخیص از آزمایش IMViC (که شامل تست‌های حرکت و اندول(در محیط SIM)، MR-VP و سیترات می‌باشد) استفاده گردید. کلیه محیط‌ها و تست‌های بیوشیمیایی در این بخش مربوط به شرکت مرک آلمان بودند. پس از کشت و تأیید بیوشیمیایی سه پرگنه به صورت تصادفی از قسمت‌های مختلف

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 20:25 +0330 on Saturday January 23rd 2021

هـر پلیـت(نمونـه مـدفوع وادرار هـر فـرد) انتخـاب شدند و در نتیجه بررسـی‌هـای بعـدی در مجمـوع بـر روی ۹۰ جدایـه ادراری و ۹۰ جدایـه مـدفوعی انجـام گرفت.

بـرای اسـتخراج DNA از روش جوشـاندن استفاده شد برای این منظور از باکتری‌های رشد کرده روی محیط نوترینت آگار چند کلنی برداشـته و داخـل میکروتیوب ۱۵۰۰ میکرولیتری حاوی ۲۰۰ میکرولیتـر آب مقطر استریل منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه جوشـانده شـد. در ادامـه بـه مـدت ۵ دقیقـه بـا دور ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردیـد و در انتهـا ۵۰ میکرولیتـر از مـایع رویی به داخـل میکروتیـوب ۷۵۰ میکرولیتـری منتقـل کرده و تا زمان استفاده داخل فریز ۲۰- نگه‌داری شد.

بـرای ارزیـابی شـیوع ژنهـای حـدت از روش PCR[1] اسـتفاده شـد. تـوالی پرایمرهـای بـه کـار رفتـه در ایـن مرحلـه در جـدول ۱ نشـان داده شـده است(۱۸).

مواد مورد نیاز برای تکثیر ژن *cnf-1* بـه ایـن شرح در میکروتیوب‌هایی عاری از DNAase با یکـدیگر مخلوط شدند. ۰/۷۵میکرولیترdNTP(سـیناژن، ایـران)، یک زوج پرایمر هر کدام ۱ میکرولیتر(سیناژن، ایـران)، ۱/۵ میکرولیتر($MgCl_2$سیناژن، ایـران)، ۲/۵ میکرولیتـر بافر آنزیم(سیناژن، ایـران) ، ۰/۲میکرولیتـر(Taq DNA polymerase سیناژن، ایران)، ۳ میکرولیتر DNA نمونه و در آخر حجم نهایی با افـزودن آب مقطـر بایـد بـه ۲۵ میکرولیتر رسید. به منظور انجام PCR ژن *hlyD* تمامی مـواد مشـابه قبـل تنهـا $MgCl_2$ بـه میـزان ۰/۷۵ میکرولیتر اسـتفاده شـد. شـرایط دمـایی بـرای انجـام واکـنش بـر اسـاس آنچـه پـیش از ایـن بـه وسـیله رودریگزر- سیک و همکاران گزارش شده بـود تنظـیم شد(۱۹).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌هـای *اشریشـیاکلی* نسبت به شش آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش دیسـک آگـار دیفیـوژن و بـر اسـاس دسـتورالعمل موسسـه استاندارد آزمایشگاهی و بـالینی(CLSI)[2] بررسـی شـد. آنتی‌بیوتیک‌هایی که در این مطالعه مورد ازریابی قرار گرفتنـد؛ شـامل آمینوگلیکوزیـدها(جنتامایسـین (GM,۱۲۰میکروگـرم))، سفالوسـپورین‌هـای نسـل ۳ (سفوتاکسـیم (CFM، ۳۰ میکروگـرم) و سـفتازیدیم (CAZ، ۳۰ میکروگـرم))، تـریمتوپـریم (تریمتوپریم - سولفامتوکسازول(SXT ، ۲۵ میکروگـرم)) و فلوروکینـون‌هـا (سیپروفلوکساسـین(CP، ۵ میکروگـرم)) و نیتروفورانتـوئین(FM ، ۳۰۰ میکروگـرم) از شـرکت پادتن طب بودند. از سـویه اسـتاندارد *اشریشـیا کلـی* ATCC25922 به عنـوان کنتـرل آنتـی‌بیـوگرام اسـتفاده شد.

آنـالیز آمـاری بـا اسـتفاده از روش آمـاری توصیفی و آزمون مربع کـای بـه وسـیله نـرم افـزار SPSS انجام گرفت.

1-Polymerase Chain Reaction (PCR)
2-Clinical and Laboratory Standards Institute

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 20:25 +0330 on Saturday January 23rd 2021

یافته‌ها

پس از کشت و تأیید بیوشیمیایی از قسمت‌های مختلف هر پلیت(نمونه مدفوع و ادرار هر فرد)، سه پرگنه به صورت تصادفی انتخاب شدند و بررسی‌های بعدی در مجموع بر روی ۹۰ جدایه ادراری و ۹۰ جدایه مدفوعی انجام گرفت.

با بررسی در میان ۹۰ جدایه ادراری، ژن *hlyD* در ۱۷(۱۸/۸ درصد) جدایه و ژن *cnf1* در ۳(۳/۳ درصد) جدایه مشاهده شد. در ۹۰ جدایه مدفوعی افراد مبتلا به عفونت دستگاه ادراری ، ژن *hlyD* در ۱۲(۱۳/۳درصد) جدایه و ژن *cnf1* در ۲(۲/۲ درصد) جدایه شیوع داشت. نمونه‌ای از تکثیر این ژن‌های حدت در تصاویر ۱ و ۲ مشخص شده است.

میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *اشریشیاکلی* در جدول ۲ نشان داده شده است و همان‌طور که مشاهده می‌شود در جدایه‌های ادراری بیشترین مقاومت نسبت به تریمتوپریم ـ سولفامتوکسازول و سپس سفتازیدیم دیده می‌شود. جدایه‌های‌های مدفوعی بیشترین مقاومت را به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و سیپروفلوکساسین داشتند. جدایه‌های ادراری در مقایسه با جدایه‌های مدفوعی بیماران نسبت به سفتازیدیم مقاوم بودند.

تعداد جدایه‌های مقاوم به چند دارو (MDR)[1] که به سه آنتی‌بیوتیک و بیشتر مقاوم بودند در گروه *اشریشیاکلی*های ادراری ۳۴ جدایه(۳۷/۷ درصد) ارزیابی شد که ۶ جدایه به پنج آنتی‌بیوتیک و ۱۴ جدایه به شش آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. در گروه *اشریشیاکلی*های مدفوعی افراد بیمار۴۲ جدایه(۴۶/۶ درصد) مقاوم به چند دارو بودند که ۱۵ جدایه به پنج آنتی‌بیوتیک و ۵ جدایه به شش آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند.

با مقایسه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک و ژن حدت در جدایه‌های ادراری و مدفوعی هر بیمار مشاهده شد که، به ترتیب؛ ۱۷، ۱۴، ۱۱، ۱۰، ۹ و ۸ بیمار مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تریمتوپریم- سولفامتوکسازول، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، نیتروفورانتوئین، سفتازیدیم و سفوتاکسیم را هم در جدایه‌های مدفوعی و هم در جدایه‌های ادراری داشتند. شیوع دو ژن حدت بررسی شده در ادرار و مدفوع ۱۳ فرد از بین ۳۰ فرد ارزیابی شده دارای الگوی یکسانی بود. از این بین در ۷ بیمار ژن *hlyD* هم در نمونه مدفوعی و هم در نمونه ادراری وجود داشت. هر دو بیماری که ژن *cnf1* را در جدایه‌های مدفوعی خود داشتند این ژن را در جدایه‌های ادراری آنها هم دارا بودند. در مجموع تعداد بیمارانی که دارای الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن حدت یکسان می‌باشند ۹ بیمار بود.

1- Multidrug Resistance (MDR)

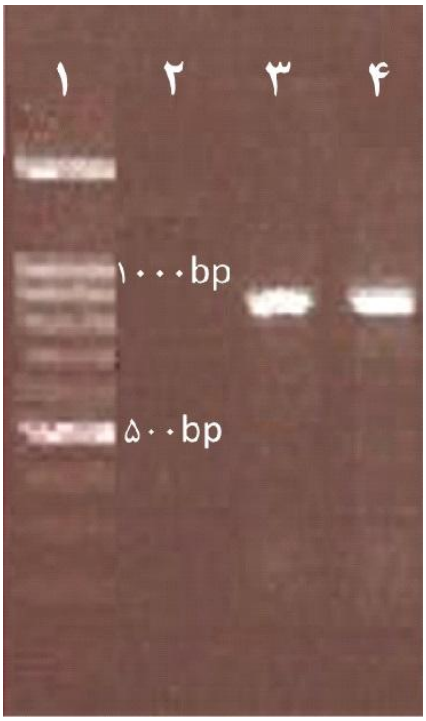
Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 20:25 +0330 on Saturday January 23rd 2021

جدول ۱: پرایمر های به کار رفته جهت تکثیر ژن‌های حدت

ژن	توالی نوکلئوتیدی ۳' به ۵'	اندازه محصول (جفت باز)	دمای آنیلینگ (درجه سانتی‌گراد)	منابع
cnf1	F-TATTAATCTTCACAGAGGAG R-GGCCAATAAATAATTTCCCGAATC	۹۳۰	۶۰	(۱۸)
hlyD	F- TCCGGTACGTGAAAAGGAC R- GCCCTGATTACTGAAGCCTG	۴۹۸	۶۸	(۱۸)

جدول ۲: تعداد (درصد) مقاومت آنتی بییوتیکی جدایه ها در دو گروه مورد بررسی

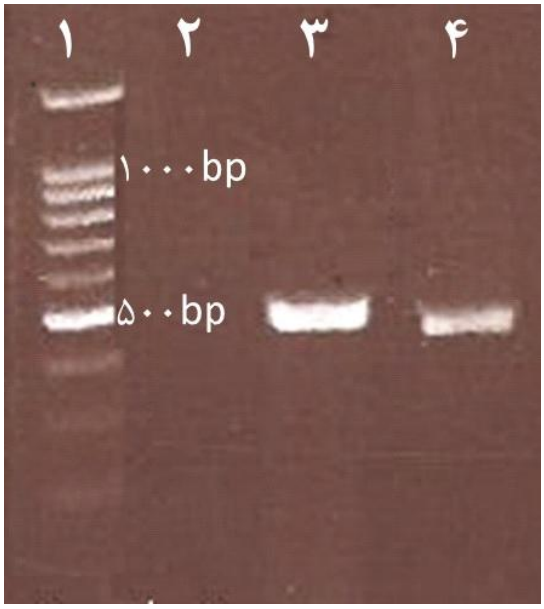
آنتی بیوتیک ها	جدایه های ادراری (۹۰ جدایه)	جدایه های مدفوعی(۹۰ جدایه)
سفتازیدیم	۴۳ (۴۷/۸ درصد)	۲۷ (۳۰درصد)
تریمتوپریم ـ سولفامتوکسازول	۴۶(۵۱/۱ درصد)	۵۵(۶۱/۱ درصد)
جنتامایسین	۴۱ (۴۵/۶ درصد)	۳۵ (۳۸/۹ درصد)
سیپروفلوکساسین	۲۹ (۳۲/۲ درصد)	۳۱ (۳۴/۴ درصد)
سفوتاکسیم	۳۴ (۳۷/۸ درصد)	۲۳ (۲۵/۶ درصد)
نیتروفورانتوئین	۳۲ (۳۵/۶ درصد)	۲۳ (۲۵/۶ درصد)



شکل۱: تصویر ژل حاصل از تکثیر ژن *hlyD*

(چاهک اول: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک دوم: کنترل منفی، چاهک سوم: کنترل مثبت و چاهک چهارم: نمونه مجهول اندازه محصول ۹۳۰ جفت باز ژن *hlyD* است.)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 20:25 +0330 on Saturday January 23rd 2021



شکل۲: تصویر ژل حاصل از تکثیر ژن *cnf1*

(چاهک اول: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک دوم: کنترل منفی، چاهک سوم: کنترل مثبت و چاهک چهارم: نمونه مجهول اندازه محصول ۴۹۸ جفت باز مربوط به ژن *cnf1* است.)

بحث

برخی مطالعه‌های پیشین فلور غالب مدفوع را عامل عفونت ادراری می‌دانستند و در برخی دیگر از این مطالعه‌ها جدایه‌های مدفوعی که دارای ژن‌های حدت بیشتری بودند به عنوان عامل این عفونت‌ها در نظر گرفته شدند(۲۱و۲۰). در مطالعه حاضر جدایه‌های ادراری را با جدایه‌های غالب فلور مدفوع افراد مبتلا به عفونت دستگاه از نظر دو ژن حدت مقایسه شدند.

بر اساس نتایج به دست آمده ۱۸/۸ درصد از جدایه‌های ادراری و ۱۳/۳ درصد از جدایه‌های مدفوعی افراد مبتلا به عفونت دستگاه ادراری حامل ژن *hlyD* هستند. ژن *cnf-1* در ۳/۳ درصد از *اشریشیاکلی*های ادراری و ۲/۲ درصد از *اشریشیاکلی*های مدفوعی افراد مبتلا وجود دارد و با توجه به این که فراوانی ژن‌های حدت در جدایه‌های ادراری بیشتر از جدایه‌های مدفوعی بود می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً فلور غالب مدفوع عامل عفونت نیست بلکه جدایه‌هایی که ژن حدت بیشتر دارند در ایجاد عفونت مؤثر هستند.

مطالعه‌های متعددی درباره حضور دو ژن *hlyD* و *cnf-1* انجام گرفته است. فراوانی ژن‌های حدت بررسی شده در این تحقیق با مطالعه‌های گذشته مشابه بود. به طوری که بر اساس بررسی نویدینیا و همکاران در ایران مشخص شد که ژن *hlyD* در ۲۶ درصد از سویه‌های *اشریشیاکلی*های ادراری و ۲ درصد از جدایه‌های مدفوعی وجود دارد(۲۲). درخشنده و همکاران در یک بررسی نشان دادند که به ترتیب ۲۱/۲ و ۲/۵ درصد از سویه‌های *اشریشیاکلی* ادراری دارای ژن‌های *hlyD* و *cnf-1* هستند(۲۳). تراکونا و همکاران شیوع ژن‌های *hlyD* و *cnf-1* را به

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 20:25 +0330 on Saturday January 23rd 2021

ترتیب در ۱۹ و ۳ درصد در سویه‌های هم‌زیست *اشریشیاکلی* گزارش کردند(۲۴). بر اساس نتایج این مطالعه ژن *cnf-1* مانند مطالعه‌های پیشین در میان ژن‌های مورد بررسی کمترین شیوع را داشت(۲۵).

در ۹ بیمار از ۳۰ بیمار بررسی شده، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن حدت دارای الگوی یکسان می‌باشند ودر ۲۱ فرد دیگر این الگوها متفاوت است. این مشاهده می‌تواند تأییدی بر این مساله باشد که احتمال ایجاد عفونت ادراری به وسیله جدایه‌های مدفوعی که دارای حدت بیشتری هستند بیشتر از جدایه‌های غالب است.

در این مطالعه حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مورد بررسی به آنتی‌بیوتیک‌های معمول مشخص شد. جدایه‌های مدفوعی به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و تریمتوپریم سولفامتوکسازول بیشترین مقاومت را دارند و در جدایه‌های ادراری مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و تریمتوپریم سولفامتوکسازول و سفتازیدیم بیشترین میزان را نشان داد. در گروه‌های *اشریشیاکلی* ادراری و مدفوعی به ترتیب ۳۷/۷ و ۴۶/۶ درصد از جدایه‌ها مقاوم به سه آنتی‌بیوتیک و بیشتر بودند.

با توجه به این که آنتی‌بیوتیک‌های تریمتوپریم سولفامتوکسازول و جنتامایسین بیشترین مقاومت را در فلور غالب مدفوع و ادرار دارند، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً فلور مدفوع می‌تواند در انتقال ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ادرار نقش داشته باشد.

جدایه‌های ادراری نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بیشترین حساسیت را دارا هستند. مطالعه‌هایی که در شهرهای شهرکرد و تبریز صورت گرفت نشان دادند که میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در مناطق ذکر شده نسبت به شهر کرمان بیشتر است(۲۷و۲۶). در بررسی حاضر مقاومت جدایه‌های ادراری به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوئین ۳۵/۶ درصد نشان داده شد. مطالعه‌های مشابه در خرم آباد و مشهد میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوئین را به ترتیب ۱۸/۹ و ۸/۴ درصد نشان دادند که هر دو با مطالعه حاضر متفاوت است(۲۹و۲۸) میزان مقاومت جدایه‌های ادراری به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم که جزء دسته بتالاکتام‌ها هست، در کرمان ۴۷/۸ درصد است و مشابه نتیجه مطالعه در تبریز است که مقاومت به این آنتی‌بیوتیک ۴۴ درصد ارزیابی شده است(۲۶). میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین در مطالعه حاضر ۴۵/۶ درصد نشان داده شد که بسیار بیشتر از مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در خرم آباد(۱۱/۸درصد) و تایوان (۱۵ درصد) است(۳۰و۲۸).

آمینوگلیکوزیدها مانند جنتامایسین اولین داروی انتخابی در درمان عفونت‌های ادراری تب‌دار هستند(۳۱)، ولی به علت استفاده بی رویه از این آنتی‌بیوتیک در شهر کرمان مقاومت قابل توجهی نسبت به این آنتی‌بیوتیک در مطالعه حاضر نشان داده شده است که این مساله می‌تواند ناکارآمدی این

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 20:25 +0330 on Saturday January 23rd 2021

آنتی‌بیوتیک را در درمان عفونت‌ها در شهر کرمان نشان دهد.

بر خلاف توصیه سازمان جهانی بهداشت مبنی بر درمان عفونت‌های دستگاه ادراری با تریمتوپریم سولفامتوکسازول، مطالعه حاضر مشخص کرد که ایزوله‌های ادراری بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک تریمتوپریم سولفامتوکسازول دارا هستند. که این در تأیید گزارش‌هایی است که نشان می‌دهند این آنتی‌بیوتیک برای درمان عفونت ادراری مناسب نیست(۳۵-۳۲).

با افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک تریمتوپریم سولفامتوکسازول، فلوروکینولون‌ها مثل سیپروفلوکساسین می‌توانند اثرات مفیدی در درمان بیماران سرپایی مبتلا به عفونت ادراری داشته باشند. این داروها به عنوان اولین خط درمان در مناطقی مانند شهر کرمان که در باکتری‌های شایع مقاومت بالایی نسبت به داروهایی نظیر تریمتوپریم سولفامتوکسازول مشاهده می‌شود، در نظر گرفته می‌شوند(۳۱) و به علت کم بودن مقاومت نسبت آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، استفاده از آن در شهر کرمان توصیه می‌شود.

البته در مطالعه حاضر محدودیت‌هایی وجود داشت که توصیه می‌شود در مطالعه‌های آینده در نظر گرفته شود که از آن جمله می‌توان به کم بودن تعداد نمونه‌ها و هم‌چنین ژن‌های حدت مورد بررسی اشاره کرد. انجام مطالعه بیشتر در این زمینه و عدم استفاده بی رویه و بدون مجوز پزشک از آنتی‌بیوتیک‌ها توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

به دلیل تفاوت در الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک در مناطق مختلف بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی جهت تعیین آنتی‌بیوتیک‌های مناسب جهت درمان عفونت ادراری ضروری است. در این بررسی مناسب‌ترین آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت ادراری از بین آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده سیپروفلوکساسین است. علاوه بر این آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و نیتروفورانتوئین هم مناسب ارزیابی شدند. به طور خلاصه در مطالعه حاضر در ۲۱ فرد از ۳۰ فرد بررسی شده بین *اشریشیا کلی*‌های ادراری و مدفوعی از نظر ژن‌های حدت و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی تفاوت دیده شد. این مشاهده می‌تواند تأییدی برای رد نظریه ایجاد عفونت ادراری به وسیله فلور غالب مدفوع باشد. این نتیجه‌گیری احتمال ایجاد عفونت ادراری به وسیله جدایه‌های مدفوعی با حدت بیشتر و یا حتی منابع دیگر نظیر؛ فلور واژن، غذای آلوده، ارتباط با حیوانات و فعالیت جنسی را تقویت می‌کند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بر گرفته از پایانامه دکتری می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه شیراز انجام شد.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 20:25 +0330 on Saturday January 23rd 2021

REFERENCES

1.Kulkarni R, Dhakal BK, Slechta, ES, Kurtz Z, Mulvey MA, Thanassi DG. Roles of putative type II secretion and type IV pilus systems in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli.* PLoS One 2009; 4: 1–9.
2.Bouza E, San Juan R, Munoz P, Voss A, Klytmans JA. European perspective on nosocomial urinary tract infections I. Clinical Microbiology and Infection 2001; 7: 523-31.
3.Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. American Journal of Medicine 2002; 113: 14-9.
4.Stamm WE. Catheter-associated urinary tract infection: epidemiology, pathogenesis, and prevention. American Journal of Medicine 1991; 91: 65-71.
5.Pizarro J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. Cell Science 2006; 124(4): 715-27.
6.Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. Journal of Infection Disease 2000; 181: 1753-4.
7.Nicolle LE. Short-term therapy for urinary tract infection: success and failure. International Antimicrobial Agents 2008; 31: 40–5.
8.Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, et al. The pangenome structure of *Escherichia coli:* comparative genomic analysis of *E.coli* commensal and pathogenic isolates. Bacteriology 2008; 190: 6881-93.
9.Lenka M, Juraj B, Martin V, Alena S, David S. Human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains differ in prevalence of virulence factors, phylogroups, and bacteriocin determinants. BMC Microbiology 2016; 16: 2-8.
10.Mellies JL, Navarro-Garcia F, Okeke I, Frederickson J, Nataro JP, Kaper JB. E*spC* pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. Infection and Immunity 2001; 69(1): 315-24.
11.Fabbri A, Gauthier M, Boquet P. The 5' region of cnf1 harbours a translational regulatory mechanism for CNF1 synthesis and encodes the cell-binding domain of the toxin. Molecular Microbiology 1991; 33: 108–18.
12.Foxman B, Shannon DM, Patricia T, Richard B, Lixin Z, James SK. Uropathogenic *escherichia coli* are more likely than commensal *e.coli* to be shared between heterosexual sex partners. American Journal of Epidemiology 2002; 156: 1133-40.
13.Louise B, Amelie G, Josee H, Martine B, Eric N, Charles MD. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2011; 62: 1–10.
14.Randall SS. Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps. Frontiers in Microbiology 2015; 6: 28.
15.Zhang L, Foxman B, Marrs C. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. Clinal Microbiology 2002; 40: 3951–5.
16.Jannine KB, Jeremy LP, Sashindran A, Ruth MH. Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. Medical Microbiology 2010; 59: 1331–9.
17.Rijavec M, Starcic Erjavec M, Ambrozic Avgustin J. High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. Current Microbiology 2006; 53(2): 158-62.
18.Farshad SH, Japoni A, Hosseini M. Low distribution of integrons among multidrug resistant *E. coli* strains isolated from children with community-acquired urinary tract infections in Shiraz, Iran. Polish Journal of Microbiology 2008; 57: 193-8.
19.Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. Microbiology 2005; 151: 2097–110.
20.Moreno E, Andreu A, Pigrau C, Kuskowski MA, Johnson JR, Prats G. Relationship between *escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. Coli* Population of The Host. Clinical Microbiology 2008; 46: 2529–34.
21.Richa S, Jyotsna A, Sugandha S, Bharti M. Role of special pathogenicity versus prevalence theory in pathogenesis of acute cystitis caused by *Escherichia coli*. Medical Microbiology 2014; 63: 1038–43.
22.Navidinia M, Najar Peerayeh S, Fallah F, Bakhshi B, Sadat Sajadinia R. Phylogenetic grouping and pathotypic comparison of urine and fecal *Escherichia coli* isolates from children with urinary tract infection. Brazilian Journal of Microbiology 2014; 45(2): 509-14.
23.Derakhshandeh A, Firouzi R, Motamedifar M, Arabshahi M, Novinrooz A, Motamedi Boroojeni A, Bahadori M, Heidari S. Virulence characteristics and antibiotic resistance patterns among different

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 20:25 +0330 on Saturday January 23rd 2021

phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. Japanese Journal of Infectious Diseases 2015; 68(5): 428-31.
24.Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W. Distribution of uropathogenic virulencegenes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. International Journal of Infectious Disease 2013; 17(6): 450-3.
25.Zhao L, Chen X, Zhu X, Yang W, Dong L. Prevalence of virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu province(China). Urology 2009; 74: 702-7.
26.Soltan Dallal MM, Azarsa M, Shirazi MH, Rastegar Lari A, Owlia P, Mehrabadi JF, et al . The prevalence of extended-spectrum beta-lactamases and CTX-M-1 producing Escherichia coli in urine samples collected at Tabriz city Hospitals. Tehran University Medical Journal 2011; 69(5): 273-8.
27.Heidari-Soureshjani E, Heidari M, Doosti A. Epidemiology of urinary tract infection and antibiotic resistance pattern of *E. coli* in patients referred to Imam Ali hospital in Farokhshahr, Chaharmahal va Bakhtiari, Iran. Journal of Shahrekord University Medical Science 2013; 15(2): 9-15.
28.Tarhani F, Kazemi AH, Abedini MR. Antibiotic resistance to urinary infection in Shahid Madani hospital Khoram abad. Journal of Khoram abad University of Medical Sceinces 1993; 17: 39-44.
29.Ismaeili M. Effect of antibiotics on bacteria causing urinary tract infection in children. Journal of Pediatric Diseases in Iran 2005; 15(2): 165-73.
30.Tseng MH, Lo WT, Lin WJ, Teng CS. Changing trend in antimicrobial resistance of pediatric uropathogens in Taiwan. Pediatrics International 2008; 50: 797-800.
31.Dalkin B, Schaeffer A. Fluoroquinolone antimicrobial agents: use in the treatment of urinary tract infections and clinical urologic practice. In: Carson CI, editor. Problems in urology. Philadelphia: JB Lippin-cott; 1988; 476-85.
32.Farshad S, Ranjbar R, Japoni A, Hosseini M, Anvarinejad M. Microbial susceptibility, virulence factors, and plasmid profiles of uropathogenic Escherichia coli strains isolated from children in Jahrom, Iran. Archives of Iranian Medicine 2012; 15: 312-6.
33.Ramos NL, Dzung DT, Stopsack K, Janko V, Pourshafie MR, Katouli M, et al. Characterisation of uropathogenic *Escherichia coli* from children with urinary tract infection in different countries. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease 2011; 30: 1587-93.
34.Abass SK, Ali MR, Authman SH. Isolation of multi antibiotics resistance *escherichia coli* from urinary tract infection and the detection of papc and fimh virulence genes by polymerase chain reaction technique. Diyala Journal For Pure Science 2014; 10: 112-27.
35.Totsika M, Kostakioti M, Hannan TJ, Upton M, Beatson SA. A FimH inhibitor prevents acute bladder infection and treats chronic cystitis caused by multidrug-resistant *uropathogenic Escherichia coli* ST131. Infectious Disease 2013; 208: 921-8.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 20:25 +0330 on Saturday January 23rd 2021

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Comparison of Antibiotic Resistance and Frequency of Virulence Genes in Urinary and Fecal *Escherichia coli* in Patients with Urinary Tract Infection

Bahadori M[1], Motamedifar M[2], Derakhshandeh AA[1*], Motamedi Borujeni A[1], Ali Nejad M[3], Nazari Z[1]

[1]Department of Pathobiology, Shiraz University, Shiraz, Iran, [2]Shiraz HIV / AIDS Research Center, Health Foundation, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, [3]Department of Urology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Received: 19 Nov 2017 Accepted: 4 Jul 2018

Abstract

Background & Aim: Urinary tract infections are one of the most important bacterial infections, and the most common cause of these infections is *E.coli*. Considering the importance of *E.coli* in the development of urinary tract infection in the gastrointestinal tract, the present study was conducted to compare the *E.coli* causative agent of *E.coli* infection with *E.coli* dominating the natural flora of the gastrointestinal tract on the basis of antibiotic resistance and some acute genes.

Methods: For this descriptive study, 30 women with urinary tract and urinary tract infections were collected from the 30 patients. After colonization and confirmation, three colonies were randomly selected from different parts of each plate (fecal samples and each individual sample) were selected for review. The frequency of hly D and cnf1 genes were determined by PCR method and a phenotypic study of antibiotic resistance of isolates were performed using antibiotic disks. Data were analyzed using descriptive statistics and Chi-square test.

Results: Generally 90 isolates of urine and 90 fecal isolates were isolated from the samples. Comparison of the results of urine and fecal isolates showed that the prevalence of examined genes in urine strains was higher than that of fecal isolates ($p < 0.05$). The highest resistance to stool and urinary flora was observed with trimethoprim sulfamethoxazole and gentamicin antibiotics. The highest susceptibility to ciprofloxacin antibiotic (32.2%) was found in urine isolates. In uric acid and fecal Escherichia coli, 37.7% and 46.6% of isolates were resistant to three antibiotics and more. In 9 out of 30 patients, antibiotic resistance and acute genes had the same pattern.

Conclusion: Most fecal flora is not an infectious agent, but isolates with higher genetic parameters are effective in causing infection. Considering the greater resistance to trimethoprim sulfamethoxazole and gentamicin antibiotics in both groups, fecal flora may be involved in transferring the gene to antibiotic resistance to urine.

Key words: *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infection, Normal *E.coli*, Antibiotic

[*]**Corresponding author**: **Derakhshandeh AA,** Department of Pathobiology, Shiraz University, Shiraz, Iran
Email: drkhshnd77@gmail.com

Please cite this article as follows:
Bahadori M, Motamedifar M, Derakhshandeh AA, Motamedi Borujeni A, Ali Nejad M, Nazari Z. Comparison of Antibiotic Resistance and Frequency of Virulence Genes in Urinary and Fecal *Escherichia coli* in Patients with Urinary Tract Infection. Armaghane-danesh, 2018; 23(3): 378-389