

بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کینولون در ایزوله‌های بالینی اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری افراد بستری در بیمارستان‌های شهر تهران در سال ۱۳۹۶

مهری حبیبی^۱، امید عزیزی^۲، محمدرضا اسدی کرم^{۱*}

۱. واحد بیولوژی ملکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کینولون به عنوان یکی از عوامل درمانی اشریشیاکلی‌های عامل ادراری در جهان در حال افزایش است. بنابراین این مطالعه با هدف بررسی مقاومت به کینولون‌ها در ایزوله‌های بالینی اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری افراد بستری در بیمارستان‌های شهر تهران در سال ۱۳۹۶ انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه تعداد ۱۵۰ نمونه اشریشیاکلی از ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری و بستری در بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری شد. بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کینولون با روش دیسک دیفیوژن انجام گردید. پس از تخلیص ژنوم ایزوله‌ها با روش فلن-کلروفرم، تکثیر ژنهای *qnrA* و *qnrB* با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی انجام شد.

نتایج: مقاومت ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و لووفلوکساسین به ترتیب ۷۶٪، ۴۸٪، ۳۰٪ و ۱۸٪ بود. نتایج تکثیر ژن‌های *qnr* نشان داد که ۴۰٪ از ایزوله‌ها حداقل یکی از ژنهای *qnrA*، *qnrB* و یا *qnrS* را حمل می‌کنند. از بین ۶۰ ایزوله دارای ژن *qnr*، ۷۳/۳٪ دارای ژن *qnrS*، ۲۳/۳٪ دارای ژن *qnrB* و ۳/۴٪ دارای ژن *qnrA* بودند. آنالیز آماری نشان داد که بین حضور همزمان ژن‌های *qnrB* و *qnrS* و مقاومت همزمان به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین ارتباط معنی‌داری وجود دارد.

نتیجه‌گیری: مقاومت قابل توجهی به آنتی‌بیوتیک‌های کینولون‌دار در بین ایزوله‌های اشریشیاکلی عامل عفونت ادراری در بین بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر تهران وجود داشت که این مقاومت با شیوع نسبتاً زیادی از ژن‌های مقاوم همراه بود. پیشنهاد می‌گردد مطالعات بعدی در رابطه با منشاء عفونت این نمونه‌ها انجام گردد.

کلید واژه‌ها:

اشریشیاکلی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کینولون

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

مقدمه

خصوص در بین زنان است و طبق تحقیقات انجام شده نزدیک به نیمی از زنان حداقل یک عفونت ادراری را در طول زندگی خود تجربه کرده و از هر ۴ نفر مبتلا به این عفونت ۱ نفر حالت عودکنندگی را در عرض ۶ ماه یا کمتر از آن نشان می‌دهد (۲).

عفونت دستگاه ادراری به مجموعه عفونت‌هایی اطلاق می‌شود که اجزای مختلف دستگاه ادراری از جمله مثانه و کلیه را درگیر کرده و سبب عفونت در این قسمت‌ها می‌شود (۱). عفونت‌های دستگاه ادراری جزو شایع‌ترین عفونت‌های بیمارستانی به

هستند (۷). در سالهای اخیر به دلیل استفاده بی رویه از کینولون ها روز به روز مقاومت نسبت به این داروها در حال افزایش می باشد. مکانیسم های عمده مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های کینولونی شامل جهش در جایگاه هدف داروها، جهش کاهش دهنده تجمع دارو و نیز کسب مقاومت از طریق پلاسمیدها است (۸). ژن های *qnr* جزء عوامل مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید (PMQR) هستند که به دلیل قرارگیری بر روی اینتگرن های مختلف باعث گسترش بسیار سریع مقاومت در باکتری های خانواده انتروباکتریاسه می شوند (۹). ژن های *qnr* نیز انواع متعددی داشته که از بین آنها ژن *qnrA* از مهم ترین آنها است که یک پروتئین ۲۱۸ اسید آمینه ای متعلق به خانواده ی پنتا پپتیدی را کد می کند و از طریق ممانعت از اتصال کینولون به DNA ژیراز و توپوایزومراز IV باعث حفاظت از DNA باکتری می شود (۱۰).

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در کشورهای مختلف به صورت دوره ای گزارش می شود که این گزارش ها بر اساس زمان و محیط های مختلف متفاوت است. در نتیجه در جوامع مختلف، غربالگری دوره ای باکتری های پاتوژن رایج به منظور تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی و عناصر ژنتیکی قابل انتقال در نمونه های بالینی به ویژه برای مطالعات اپیدمیولوژی حائز اهمیت است (۱۱). بنابراین این مطالعه با هدف بررسی مقاومت به کینولون ها در ایزوله های بالینی اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری بیماران بستری در بیمارستان شهر تهران در سال ۱۳۹۶ انجام شد.

روش ها

این مطالعه بصورت مقطعی در فاصله زمانی مهر تا دی ماه سال ۱۳۹۶ انجام شد. مراکز آزمایشگاهی سه بیمارستان بزرگ شهر تهران که ظرفیت پذیرش بیمار بالایی داشتند، بصورت در دسترس برای محیط مطالعه انتخاب شدند. تعداد ۱۵۰ پلیت کشت ادرار (هر بیمارستان ۵۰ پلیت) از ادرار بیماران بستری در این بیمارستانها که عاملیت عفونت ادراری آنها اشریشیاکلی گزارش شده بود، برای مطالعه جمع آوری شدند.

عفونت دستگاه ادراری عامل حدود ۴۰٪ تمام عفونت های کسب شده از بیمارستان و نیز عامل نیمی از موارد باکتری می است که می توان آنها را از لحاظ بالینی به دو دسته پیچیده و غیر پیچیده تقسیم بندی کرد (۲، ۳). پاتوژن های باکتریایی مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونت ادراری بوده که از بین آنها اشریشیاکلی به عنوان شایعترین و مهمترین عامل این عفونت ها می باشد، بطوریکه این باکتری را عامل ۸۰٪ عفونت های غیر پیچیده ادراری و ۹۵٪ عفونت های اکتسابی از جامعه و نیز عامل ۵۰٪ عفونت های اکتسابی از بیمارستان می دانند (۴).

درمان روتین عفونت ادراری بر پایه استفاده از آنتی بیوتیک ها است و مطالعات مختلف در زمینه بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های اشریشیاکلی جدا شده از بیماران دارای عفونت ادراری میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف را با درصدهای متفاوتی ذکر کرده اند. با این وجود مطالعات انجام شده در مناطق مختلف مقاومت بالا به بسیاری از این داروها را نشان داده که این مقاومت در حال افزایش نیز می باشد (۵، ۶). کینولون ها از مشتقات کینولونیک کربوکسیلیک بوده که فعالیت باکتریوسیدال با طیف وسیع، سطح سرمی بالا، جذب خوراکی بالا، اثرات جانبی نسبتاً کم و سهولت در مصرف همگی از عواملی هستند که موجب شد پس از عرضه به بازار مصرف در زمان بسیار کوتاهی به عنوان داروی خط اول درمان در بسیاری از موارد بالینی به خصوص در درمان عفونت های ادراری مورد مصرف قرار گیرند. نالیدیکسیک اسید به عنوان اولین داروی تجاری سنتتیک در خانواده کینولون ها است. سایر کینولون ها آنالوگ های سنتزی نالیدیکسیک اسید هستند و آنها را بر اساس فعالیت ضد میکروبی به ۴ نسل تقسیم بندی کرده اند. از مهمترین این آنتی بیوتیکها می توان به نالیدیکسیک اسید (نسل ۱)، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین (نسل ۲) و لوفلوکساسین (نسل ۳) اشاره کرد. کینولون ها همگی به وسیله ی مهار سنتز DNA عمل می کنند. هدف این گروه از آنتی بیوتیک ها DNA ژیراز (توپوایزومراز II) و توپوایزومراز IV می باشد که هر دو از آنزیم های ضروری برای تکثیر باکتری

۲۴ ساعت انکوبه شدند و پس از این مدت زمان منطقه مانعیت از رشد برحسب میلی متر اندازه گیری و نتایج ثبت شدند. همچنین از سویه اشریشیاکلی ATCC25922 به عنوان کنترل کیفی استفاده شد.

برای تخلیص ژنوم ایزوله‌های اشریشیاکلی تأیید شده از روش فنل- کلروفرم استفاده شد. در این روش در چندین مرحله از موادی مانند لیزوزیم، پروتئیناز K (۲۰ mg/ml) و مخلوط فنل و کلروفرم استفاده شد و در نهایت رسوب با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و در بافر TE 1x حل گردید. در نهایت غلظت و کیفیت تخلیص انجام شده توسط الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ و نیز اندازه گیری با استفاده از دستگاه نانو دراپ مورد بررسی قرار گرفت.

برای تکثیر ژنهای *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* در ژنوم تخلیص شده ایزوله‌های اشریشیاکلی از روش PCR یا واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی استفاده شد. در این واکنش مواد مورد نیاز طبق حجم و غلظتهای ذکر شده تهیه گردید: ۲۰۰ میکرومول از dNTPs، ۲ میکرومول از MgCl₂، ۱۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت، ۱ واحد از آنزیم *Pfu polymerase* (Fermentas، لیتوانی) و ۵۰ نانوگرم از DNA الگو در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از واکنش PCR. همچنین این واکنش طبق برنامه ذیل انجام گرفت: واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشت در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها به مدت ۱ دقیقه در دماهای ذکر شده در جدول ۱، گسترش در ۷۲ درجه

در آزمایشگاه بیولوژی ملکولی انسستیتو پاستور ایران برای اطمینان و تأیید، مجدداً تست‌های تشخیصی مربوط به اشریشیاکلی شامل کشت در محیط‌های مختلف افتراقی، انجام تست‌های بیوشیمیایی افتراقی مانند رشد در محیط TSI، SIM، تولید گاز و H₂S، تولید اندول، رشد در محیط MR/VP، تست سیمون سیترات و احیای اسیدهای آمینه انجام شد تا حضور اشریشیاکلی در این نمونه‌ها تأیید شود. همچنین شناسایی قطعی عفونت ادراری این بیماران بر مبنای معیارهای بالینی و آزمایشگاهی مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC) شامل دمای بالای ۳۸ درجه سانتی گراد، نیاز به دفع شدید ادرار، تکرر ادرار، ادرار همراه با سوزش، تخلیه ناکامل ادرار، درد ناحیه سوپراپوبیک و درد پهلوها، حضور لکوسیت و یا خون در ادرار و در نهایت یک کشت مثبت با تعداد کلنی $\leq 10^6$ cfu/ml بود.

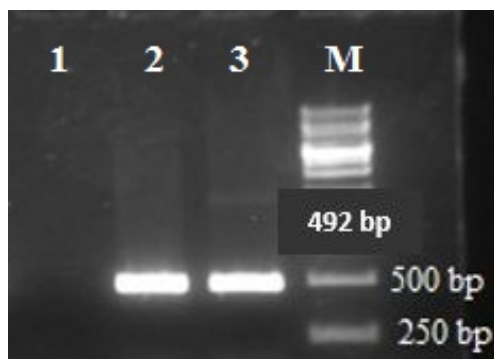
در مرحله بعد بررسی حساسیت فنوتیپی این ایزوله‌ها به آنتی بیوتیک‌های کینولون (سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم، نالیدیکسیک اسید ۳۰ میکروگرم، نورفلوکساسین ۱۰ میکروگرم و لووفلوکساسین ۱۰ میکروگرم) با روش استاندارد دیسک دیفیوژن و بر اساس دستورالعمل CLSI انجام شد (۱۲). در این روش تعداد چند کلنی از هر کشت خالص در ۲ میلی لیتر محیط مولر هینتون براث (Merck، آلمان) تلقیح شد و به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. سپس کدورت آن‌ها با لوله ۰/۵ مک فارلند معادل سازی و در سطح پلیت‌های مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت انجام شد و دیسک‌ها (MAST، انگلیس) در سطح پلیت‌ها قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن‌های مختلف

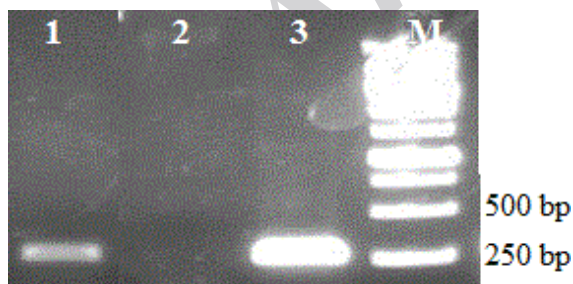
نام ژن	توالی پرایمر (۵' به ۳')	دمای اتصال پرایمر (درجه سانتی گراد)	اندازه محصول (جفت باز)	منبع
<i>qnrA</i>	F-ATTTCTCACGCCAGGATTTG R-GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	۵۴	۴۹۲	(۱۴، ۱۳)
<i>qnrB</i>	F- GATCGTGAAAGCCAGAAAGG R- ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	۵۱	۲۶۲	(۱۵)
<i>qnrS</i>	F- ACGACATTCGTCAACTGCAA R- TAAATTGGCACCTGTAGGC	۵۳	۵۶۶	(۱۶)

نشان دادند و بنابراین ۱۸٪ از ایزوله‌ها به تمامی کینولون‌های تست شده مقاوم بودند.

در مرحله بعدی تخلیص ژنومی ایزوله‌های اشریشیاکلی با روش فنل کلروفورم انجام شد و نتایج الکتروفورز آن‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ و استفاده از اسپکتوفتومتری ماوراء بنفش، درجه خلوص و غلظت DNA موجود در ایزوله‌ها تعیین گردید که در نتیجه این نمونه‌ها از درجه خلوص و غلظت مناسبی برخوردار بودند (OD260/OD280~1.8). سپس تکثیر ژنهای *qnr* در ایزوله‌های اشریشیاکلی با پرایمرهای مورد نظر با برنامه PCR بهینه شده انجام گرفت که نتایج تکثیر این ژنها در ایزوله‌های اشریشیاکلی در شکل‌های ۱ تا ۳ نشان داده شده است.



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن *qnrA* روی ژل آگاروز. شماره ۱، کنترل منفی اشریشیاکلی K12، شماره ۲، نمونه دارای ژن؛ شماره ۳، نمونه کنترل مثبت



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR ژن *qnrB* روی ژل آگاروز. شماره ۲، کنترل منفی اشریشیاکلی K12؛ شماره ۱، نمونه دارای ژن؛ شماره ۲، نمونه کنترل مثبت

سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. بعد از انجام مراحل PCR، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR در کنار مارکر ۱ kb روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و سپس بررسی باندهای مربوط به هر کدام از ژنها در دستگاه ژل داگ انجام گرفت.

از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ جهت آنالیز آماری نتایج استفاده شد و ارتباط بین مقاومت آنتی بیوتیکی و حضور ژنهای مقاومت با آزمون کای دو بررسی گردید. سطح معنی دار آماری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه تعداد ۱۵۰ ایزوله اشریشیاکلی از ادرار بیماران بستری در بیمارستان‌های مورد مطالعه جمع آوری گردید. این ایزوله‌ها از بیماران بستری در بخش‌های عفونی، ICU، CCU، زنان، ارولوژی و جراحی این بیمارستانها جمع آوری شدند. همگی این ایزوله‌ها مربوط به بیماران زن بستری با دامنه سنی بین ۱۰ تا ۶۰ سال بود. پس از مشاهده کلنی‌های لاکتوز مثبت در محیط مک کانکی آگار و در نهایت با استفاده از تست‌های تکمیلی بیوشیمیایی (تخمیر قندها، اندول، حرکت، تولید گاز و H_2S و MR مثبت ولی تولید سیترات و VP منفی) ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده مورد تأیید قرار گرفته و به عنوان ایزوله‌های مورد بررسی در این مطالعه انتخاب گردیدند.

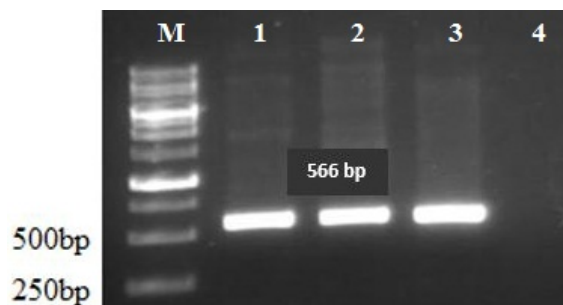
بررسی نتایج مقاومت فنوتیپی ایزوله‌های اشریشیاکلی تست شده به کینولون‌ها نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید است بطوریکه ۱۱۴ ایزوله (۷۶٪) به این آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند. همچنین درصد مقاومت این ایزوله‌ها به دیگر آنتی بیوتیکها به شرح ذیل بود: سیپروفلوکساسین (۴۸٪)، نورفلوکساسین (۳۰٪) و لووفلوکساسین (۱۸٪). در این مطالعه همچنین مشاهده گردید که تمامی ۲۷ ایزوله اشریشیاکلی مقاوم به آنتی بیوتیک لووفلوکساسین به بقیه آنتی بیوتیکهای تست شده نیز مقاومت

سیپروفلوکساسین ارتباط معنی داری وجود دارد ($P=0/035$) بطوریکه ۹ ایزوله از ۱۰ ایزوله (۹۰٪) اشریشیاکلی با داشتن ژنهای *qnrB* و *qnrS* به صورت همزمان توانستند مقاومت بالایی به آنتی بیوتیکهای نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین نشان دهند ($P=0/035$). همچنین در بررسی توزیع مقاومت آنتی بیوتیکی بین ایزوله‌های بررسی شده در ارتباط با فاکتورهای مقاومت ژنوتیپی، ارتباط معنی داری بین حضور ژن *qnrB* مقاومت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین، حضور ژن *qnrS* و مقاومت به نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید مشاهده شد ($P=0/04$).

بحث

عفونت دستگاه ادراری به عنوان یکی از عفونتهای معمول هم در سطح بیمارستان و هم در سطح جامعه شناخته می‌شود که علاوه بر مرگ و میر بالا هزینه‌های درمانی بالایی نیز برای کشورها در پی دارد. مطالعات مختلف نشان داده است که در اغلب موارد اشریشیاکلی یورپاتوژنیک شایعترین پاتوژن جدا شده از بیماران با عفونت ادراری بوده است (۱۷، ۱۸). در مطالعه صفر و همکاران (۱۹) روی ۵۶۰۰ بیمار در بیمارستانهای ساری، ۷۰۳ مورد (۱۲/۶٪) عفونت ادراری گزارش شد که اغلب آنها توسط اشریشیاکلی ایجاد شده بودند. در مطالعه یوسفی و همکاران (۲۰) روی ۹۱۲ کودک در بیمارستانهای همدان، ۳۴/۲٪ آنها عفونت ادراری داشتند که اشریشیاکلی شایع‌ترین (۵۷/۴٪) عامل ایجاد آن بود. در بررسی فرج نیا و همکاران (۲۱) روی ۵۱۳۶ بیمار مشکوک به عفونت ادراری در تبریز، شیوع این عفونت برابر ۱۳/۲٪ گزارش شد که ۷۴/۶٪ از این عفونتها متعلق به اشریشیاکلی بود. این تحقیقات نشان می‌دهد که در اکثر زمان‌ها و مکان‌های مختلف عامل اصلی باکتریایی عفونت ادراری تغییری نکرده است.

با توجه به درمان معمول عوامل عفونت ادراری توسط آنتی بیوتیکهایی از کلاسهای مختلف و افزایش رو به افزون مقاومت به این آنتی بیوتیکها، بررسی دوره‌ای مقاومت ایزوله‌های مختلف به آنتی بیوتیکهای درمانی ضروری به نظر می‌رسد که



شکل ۳. الکتروفورز محصول PCR ژن *qnrS* روی ژل آگاروز. شماره ۴، کنترل منفی اشریشیاکلی K12؛ شماره ۲ تا ۳، نمونه دارای ژن؛ شماره ۱، نمونه کنترل مثبت

همانگونه که در شکل‌های ۱-۳ مشاهده می‌شود ژنهای *qnrA* و *qnrB* به ترتیب باندی معادل ۴۹۲، ۲۶۲ و ۵۶۶ جفت باز را بر روی ژل آگاروز نشان دادند. در نهایت این مطالعه نشان داد که ۶۰ ایزوله (۴۰٪) از ایزوله‌های مورد نظر حداقل یکی از ژنهای *qnrA*، *qnrB* و یا *qnrS* را حمل می‌کنند. همچنین مشاهده شد که از بین این ۶۰ ایزوله دارای ژن *qnr*، ۴۴ ایزوله (۷۳/۳٪) دارای ژن *qnrS*، ۱۴ ایزوله (۲۳/۳٪) دارای ژن *qnrB* و ۲ ایزوله (۳/۴٪) دارای ژن *qnrA* بود. در این مطالعه تمامی ایزوله‌های دارای یکی از ژنهای *qnr* حداقل به یکی از آنتی بیوتیکهای نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و لووفلوکساسین در روش دیسک دیفیوژن مقاومت نشان دادند. در صورتیکه هیچ یک از ژنهای کینولونی در ایزوله‌هایی که به آنتی بیوتیکهای کینولونی حساسیت نشان داده بودند مشاهده نشد. آنالیز نتایج نشان داد که ۲ ایزوله دارای ژن *qnrA* به صورت همزمان نیز دارای ژنهای *qnrB* و *qnrS* بود که این دو سویه در تست دیسک دیفیوژن نیز مقاومت بالایی به آنتی بیوتیکهای نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و لووفلوکساسین نشان دادند. همچنین حضور همزمان ژنهای *qnrB* و *qnrS* در ۱۰ ایزوله (۱۶/۷٪) از ۶۰ ایزوله دارای یکی از ژنهای *qnr* مشاهده شد که مقاومت قابل توجهی نیز به آنتی بیوتیکهای کینولونی نشان دادند. آنالیز آماری کای دو نشان داد که بین حضور همزمان ژنهای *qnrB* و *qnrS* و مقاومت همزمان به نالیدیکسیک اسید و

توسط نخجوانی و همکارانش (۲۰۰۷) در ایران انجام شد، از بین ۱۶۰ ایزوله اشریشیاکلی میزان مقاومت به نالیدیکسیک اسید، نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین را به ترتیب ۴۹/۳٪، ۴۱/۴٪ و ۴۰/۲٪ گزارش کردند (۲۷) که مقاومت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین کمتر از مطالعه ما و مقاومت به نورفلوکساسین را بیشتر از مطالعه ما گزارش کردند. البته این تفاوت در نتایج درصد مقاومت به کینولونها در کشورها و مطالعات مختلف می‌تواند به دلیل تفاوت منطقه جغرافیایی، تفاوت در نمونه گیری، تفاوت در آداب و فرهنگ، تفاوت در خصوصیات میزبان‌ها و تفاوت در سطح بهداشتی جوامع باشد. نتایج این مطالعه و دیگر بررسیها در کشورهای مختلف نشان می‌دهد که مصرف بی رویه و بیش از حد آنتی بیوتیکهای کینولونی به خصوص نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین از جمله در کشورمان می‌تواند اصلی‌ترین عامل ایجاد این مقاومت در بین ایزوله‌های اشریشیاکلی باشد و این هشدار ممکن است منجر به محدود شدن مصرف این داروها در جهت درمان عفونت‌های باکتریایی مانند عفونت ادراری و استفاده از دیگر کلاسهای آنتی بیوتیکی شود.

انتشار پلاسمیدهای عامل مقاومت به عنوان یکی از عوامل اصلی مقاومت به کینولون‌ها در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از موارد عفونت ادراری شناخته شده است. در مطالعه حاضر شیوع قابل توجهی از ژن‌های مقاومت کینولونی (۴۰٪) مشاهده شد که از بین آنها *qnrS* شایعترین ژن بود. در مطالعه‌ای که توسط صدیقی و همکارانش در سال ۲۰۱۴ در ایران انجام شد فراوانی ژن‌های *qnrB* و *qnrS* را در بین ۱۲۰ ایزوله اشریشیاکلی به ترتیب ۸ (۶/۶٪) و ۶ (۵٪) ایزوله گزارش کردند (۱۵). در مطالعه‌ای که توسط بخارایی و همکارانش (۲۰۱۰) در مراکش بر روی ۸۳ ایزوله انجام شد، شیوع ژن *qnr* برابر ۳۷/۸٪ در ایزوله‌های اشریشیاکلی گزارش شد (۲۸).

در مطالعه‌ای که توسط Zhou و همکارانش (۲۰۱۱) در چین انجام شد فراوانی ژن‌های *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* را در بین ۵۱۴ ایزوله اشریشیاکلی به ترتیب ۲ (۰/۴٪)، ۶ (۱/۲٪) و ۱۴ (۲/۷٪)

این امر می‌تواند در سیستم‌های بهداشتی به منظور پیشگیری و درمان بهتر این عفونت‌ها و کاهش هزینه‌های سلامت کمک شایانی نماید (۲۲). امروزه با توجه به مقاومت بالای عوامل عفونت ادراری به آنتی بیوتیکهای خانواده بتالاکتام‌ها مانند آمپی سیلین، کینولون‌ها به یکی از رایج‌ترین آنتی بیوتیک‌های تجویزی برای درمان عفونت‌های ادراری ایجاد شده توسط سویه‌های اشریشیاکلی مورد استفاده می‌باشند، لیکن توسعه مقاومت به این آنتی بیوتیک‌ها در سالهای اخیر تصمیمات درمانی را مشکل کرده و در برخی موارد از آنتی بیوتیکهای جایگزین استفاده می‌شود (۲۳).

در مطالعه حاضر با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مشاهده شد که از بین آنتی بیوتیکهای بررسی شده بیشترین مقاومت در بین ایزوله‌ها به نالیدیکسیک اسید وجود دارد که با توجه به اینکه از زمان تولید نالیدیکسیک اسید در سال ۱۹۶۲ به عنوان اولین داروی خانواده کینولون‌ها بیش از پنج دهه می‌گذرد و به دلیل اینکه از این دارو در همان ابتدا در درمان عفونت‌های ادراری استفاده شده است، بنابراین انتظار می‌رود که مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک از دیگر آنتی بیوتیک‌های خانواده کینولونی بالاتر باشد. همچنین در تطابق با دیگر مطالعات در ایران و دیگر نقاط دنیا مقاومت قابل توجهی به دیگر آنتی بیوتیکهای کینولونی از جمله سیپروفلوکساسین مشاهده شده است. در یک مطالعه انجام شده توسط Cao و همکارانش در چین، مقاومت ایزوله‌های اشریشیاکلی به سیپروفلوکساسین ۷۵٪ گزارش شد که این درصد حتی از مطالعه ما نیز بالاتر بود (۲۴).

در مطالعه‌ای دیگر که توسط Santiso و همکاران انجام شد از بین ۹۵ ایزوله اشریشیاکلی، ۷۴ (۷۷/۹٪) ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند (۲۵) که در مقایسه با این مطالعه فراوانی بیشتری را نشان دادند. در مطالعه‌ای که توسط Colondner انجام شد میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین را ۵۰٪ گزارش کردند (۲۶) که این درصد مقاومت با نتایج یافت شده در مطالعه حاضر تقریباً همخوانی دارد. در مطالعه‌ای که

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مقاومت قابل توجهی به آنتی بیوتیک‌های کینولون دار در بین ایزوله‌های اشریشیاکلی عامل عفونت ادراری در بین بیماران بستری در بیمارستانهای شهر تهران وجود داشت که این مقاومت با شیوع نسبتاً زیادی از ژن‌های مقاومت همراه بود. بنابراین پیشنهاد می‌شود با انجام مطالعات بیشتر در این زمینه و تعیین اینکه این مقاومت در ایزوله‌ها مربوط به کسب آنها از محیط بیمارستانی بوده و یا مربوط به محیط خارج از بیمارستان است بتوان با رعایت بیشتر شرایط بهداشتی بیماران و یا تغییر استراتژی مصرف آنتی بیوتیک، شرایط مناسبی را در جهت جلوگیری از انتقال این مقاومت‌ها فراهم نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از انستیتو پاستور ایران جهت تأمین بودجه انجام این پروژه کمال تشکر و قدردانی نمایند.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافعی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

References

1. Wright KJ, Seed PC, Hultgren SJ. Uropathogenic *Escherichia coli* flagella aid in efficient urinary tract colonization. *Infection and Immunity*. 2005;73(11):7657-68.
2. Nielubowicz GR, Mobley HL. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature Review Urology*. 2010;7(8):430-41.
3. Nesta B, Spraggon G, Alteri C, Moriel DG, Rosini R, Veggi D, et al. FdeC, a novel broadly conserved *Escherichia coli* adhesin eliciting protection against urinary tract infections. *MBio*. 2012; 3(2):1-9.
4. Dhakal BK, Kulesus RR, Mulvey MA. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Investigation*. 2008;38 Suppl 2:2-11.
5. Magliano E, Grazioli V, Deflorio L, Leuci AI, Mattina R, Romano P, et al. Gender and age-dependent etiology of community-acquired urinary tract infections. *Scientific World Journal*. 2012;2012:1-6.
6. Mabbett AN, Ulett GC, Watts RE, Tree JJ, Totsika M, Ong CL, et al. Virulence properties of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2009;299(1):53-63.
7. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and

ایزوله گزارش کردند (۲۹) که در این مطالعه بر خلاف مطالعه ما آمار پایین‌تری از شیوع ژنهای *qnrS* و *qnrB* گزارش شد. مطالعه‌ای که Tarchouna و همکارانش در تونس در سال ۲۰۱۵ انجام دادند، از مجموع ۱۱۲ ایزوله اشریشیاکلی، فراوانی ژن *qnr* را ۱۲٪ گزارش کردند که از میان آن‌ها فراوانی ژن‌های *qnrB* (۱۲/۵٪)، *qnrA* (۵/۳٪) و *qnrS* (۳/۵٪) بود (۳۰)، که بر خلاف مطالعه حاضر ژن *qnrS* به عنوان ژن *qnr* با کمترین شیوع گزارش شد. در مطالعه‌ای که توسط منصوری و همکارانش (۲۰۱۳) در ایران بر روی ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های بالینی انجام شد میزان شیوع ژن‌های *qnrA* (۳۱/۸٪)، *qnrB* (۵۶/۵٪) و *qnrS* (۲۸/۹٪) گزارش شد (۳۱)، در حالیکه میزان شیوع ژن *qnrA* در مطالعه آنها به طور شاخصی بالاتر از مطالعه ما بود. این تفاوت در شیوع ژن‌های *qnr* نیز می‌تواند به دلیل تفاوت در ناحیه جغرافیایی تحت مطالعه، نمونه‌گیری متفاوت و سطح بهداشت متفاوت جوامع باشد. از دیگر یافته‌های این مطالعه ارتباط حضور ۲ یا ۳ ژن *qnr* در ایزوله‌ها با مقاومت بالاتر به آنتی بیوتیک‌های کینولونی بود که نشان می‌دهد ایزوله‌هایی که بتوانند همزمان از حضور ژن‌های مختلف *qnr* استفاده کنند شانس بالاتری برای مقاوم شدن به آنتی بیوتیک‌های کینولونی و در نتیجه بقا در محیط میزبان خواهند داشت.

- epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2010;10(9):597-602.
8. Guan X, Xue X, Liu Y, Wang J, Wang Y, Wang J, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance—current knowledge and future perspectives. *Journal of International Medical Research*. 2013;41(1):20-30.
 9. Cavaco LM, Frimodt-Møller N, Hasman H, Guardabassi L, Nielsen L, Aarestrup FM. Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microbial Drug Resistance*. 2008;14(2):163-9.
 10. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet Infectious Diseases*. 2006;6(10):629-40.
 11. Farshad S, Ranjbar R, Japoni A, Hosseini M, Anvarinejad M, Mohammadzadegan R. Microbial susceptibility, virulence factors, and plasmid profiles of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children in Jahrom, Iran. *Archives of Iranian Medicine (AIM)*. 2012;15(5).
 12. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*. 2009;49(11):1749-55.
 13. Juma BW, Kariuki S, Waiyaki PG, Mutugi MW, Bulimo WD. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance genes in isolates obtained from patients with diarrhea in Machakos District Hospital, Kenya. *African Journal of Pharmacology and Therapeutics*. 2016; 5(3):118-127.
 14. Silva-Sánchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H, Reyna-Flores F, Sánchez-Pérez A, Garza-Ramos U, et al. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae pediatric clinical isolates in Mexico. *PLoS One*. 2013;8(10):e77968.
 15. Sedighi I, Arabestani MR, Rahimbakhsh A, Karimitabar Z, Alikhani MY. Dissemination of Extended-Spectrum β -Lactamases and Quinolone Resistance Genes Among Clinical Isolates of Uropathogenic *Escherichia coli* in Children. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2015; 8(7):1-6.
 16. Akiyama T, Khan AA. Molecular characterization of strains of fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund carrying multidrug resistance isolated from imported foods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(1):101-10.
 17. Gikas A, Padiaditis J, Papadakis JA, Starakis J, Levidiotou S, Nikolaides P, et al. Prevalence study of hospital-acquired infections in 14 Greek hospitals: planning from the local to the national surveillance level. *Journal of Hospital Infection*. 2002;50(4):269-75.
 18. Adjei O, Opoku C. Urinary tract infections in African infants. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2004;24 Suppl 1:S32-4.
 19. Saffar MJ, Enayati AA, Abdolla IA, Razai MS, Saffar H. Antibacterial susceptibility of uropathogens in 3 hospitals, Sari, Islamic Republic of Iran 2002-2003. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 2008;14(3):556-63.
 20. Mashouf RY, Babalhavaeji H, Yousef J. Urinary tract infections: bacteriology and antibiotic resistance patterns. *Indian Pediatrics*. 2009;46(7):617-20.
 21. Farajnia S, Alikhani MY, Ghotaslou R, Naghili B, Nakhband A. Causative agents and antimicrobial susceptibilities of urinary tract infections in the northwest of Iran. *International Journal of Infectious Diseases*. 2009;13(2):140-4.
 22. Lavilla S, Gonzalez-Lopez JJ, Sabate M, Garcia-Fernandez A, Larrosa MN, Bartolome RM, et al. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008;61(2):291-5.
 23. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009;22(4):664-89.
 24. Cao X, Cavaco LM, Lv Y, Li Y, Zheng B, Wang P, et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections in 20 Chinese hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(7):2496-501.
 25. Santiso R, Tamayo M, Fernández JL, del Carmen Fernández M, Molina F, Villanueva R, et al. Rapid and simple determination of ciprofloxacin resistance in clinical strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47(8):2593-5.
 26. Colodner R, Kometiani I, Chazan B, Raz R. Risk factors for community-acquired urinary tract

infection due to quinolone-resistant *E. coli*. *Infection*. 2008;36(1):41-5.

27. Nakhjavani F, Mirsalehian A, Hamidian M, Kazemi B, Mirafshar M, Jabalameli F. Antimicrobial susceptibility testing for *Escherichia coli* strains to fluoroquinolones, in urinary tract infections. *Iranian Journal of Public Health*. 2007;36(1):89-92.

28. Bouchakour M, Zerouali K, Claude JDPG, Amarouch H, El Mdaghri N, Courvalin P, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae in Morocco. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2010;4(12):779-803.

29. Zhou T-L, Chen X-J, Zhou M-M, Zhao Y-J, Luo X-H, Bao Q-Y. Prevalence of plasmid-mediated

quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates in Wenzhou, Southern China, 2002-2008. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2011;64(1):55-7.

30. Tarchouna M, Ferjani A, Marzouk M, Guedda I, Boukadida J. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants among Clinical Isolates of *Escherichia coli* in a Tunisian Hospital. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2015;4(3):195-206.

31. Mansouri Jamshidi N, Pakzad I, Tabaraei B, Hadadi A. Evaluating the frequency of ciprofloxacin resistance Qnr genes in *Escherichia coli* strains isolated from clinical samples of Imam Khomani and Milad Hospitals in Ilam and Tehran, Iran. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2013; 21(6) :16-22.

Archive of SID

The phenotypic and genotypic evaluation of resistance to quinolone antibiotics in clinical *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection of hospitalized patients in Tehran, Iran in 2017

Mehri Habibi¹, Omid Azizi², Mohammad Reza Asadi Karam^{3*}

1. Department of Molecular biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

2. Health Sciences Research center, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran

Corresponding author: m_asadi12@yahoo.com

Abstract

Background & Aim: Antibiotic resistance to quinolones as a therapeutic agent of urinary tract infection is increasing in the world. Thus, this study was designed to evaluate the resistance to quinolone antibiotics in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection of hospitalized patients in Tehran, Iran in 2017.

Methods: In the present study, 150 *E. coli* isolates were collected from urine of hospitalized patients with urinary tract infection in Tehran, Iran. Evaluation of resistance to quinolone antibiotics was done by disk diffusion method. After genome extraction with phenol 1& chloroform method, amplification of *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes in the isolates was performed by PCR.

Results: The rate of resistance to antibiotics nalidixic acid, ciprofloxacin, norfloxacin and levofloxacin in these isolates was 76%, 48%, 30%, and 18%. The results of amplification the *qnr* genes showed that 40% of isolates harbored at least one of the *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes. Among the 60 isolates harboring the *qnr* genes, 73.3%, 23.3% and 3.4% had *qnrS*, *qnrB* and *qnrA* genes, respectively. Statistical analysis of results showed that there was a significant relation between the co-presence of *qnrS* and *qnrB* with co-resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin antibiotics.

Conclusion: In this study, a significant rate of resistance to quinolone antibiotics was observed in *E. coli* isolated from patients with urinary tract infection in Tehran hospitals that showed a remarkable rate of resistant genes. It is suggested to study the origin of these infections in the collected samples in the future.

Keywords:

Escherichia coli,
Antibiotic resistance,
Quinolone

©2018 Torbat Heydariyeh
University of Medical Sciences.
All rights reserved.

How to Cite this Article: Habibi M, Azizi O, Asadi Karam MR. The phenotypic and genotypic evaluation of resistance to quinolone antibiotics in clinical *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection of hospitalized patients in Tehran, Iran in 2017. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2018;6(1):1-10.