

بررسی وجود ژن های مقاومت چند دارویی در سویه های اشریشیا کلی اوروپاتوژنیک با روش Multiplex-PCR

الهام سیاسی*^۱، رباب رفیعی طباطبایی^۲، الهام یاسری^۳

۱- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۳- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

*نشانی برای مکاتبه: تهران- میدان هروی - خیابان مکران جنوبی - بوستان دهم - دانشکده علوم زیستی - گروه میکروبیولوژی (هیئت علمی تمام وقت).

تلفن: ۰۹۱۲۴۰۵۶۷۴۶ - شماره: ۰۲۱۲۲۹۲۴۸۳۳ - emi_biotech2006@yahoo.ca

پذیرش برای چاپ: آذر نود و پنج

دریافت مقاله: مهر نود و پنج

چکیده

سابقه و هدف: عفونت دستگاه ادراری یکی از شایع ترین بیماری ها در تمامی گروه های سنی در جهان است. مطالعه حاضر با هدف تعیین حضور ژن های *cat1* و *tetB bla TEM dfra1* مقاوم به چندین دارو در سویه های اشریشیا کلی اوروپاتوژنیک انجام شد. **روش کار:** ۱۰۰ نمونه ادرار از بیماران دارای عفونت ادراری جمع آوری گردید. باکتری اشریشیا کلی با تست های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی شناسایی شد. با آزمون آنتی بیوگرام سویه های اشریشیا کلی مقاوم به دارو جداسازی گشت. سپس حضور ژن های مقاوم به چند دارو در اشریشیا کلی های اوروپاتوژنیک به روش *Multiplex-PCR* مشخص شد. یافته ها: از ۱۰۰ نمونه ادراری، ۶۳ سویه اشریشیا کلی جداسازی شد. بیشترین و کمترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیا کلی نسبت به کلرامفنیکل (۹۲/۱٪) و تتراسایکلین (۳۳/۳٪) بود. با آنالیز مولکولی فراوانی ژن های مورد مطالعه، *dfra1* (۳۸/۱٪)، *TEM bla* (۶۵/۱٪)، *cat1* (۹۲/۱٪) (بیشترین) و *tetB* (۲۵/۴٪) (کمترین) به دست آمد.

نتیجه گیری: شیوع عفونت های ادراری با اشریشیا کلی در جامعه و انتشار فاکتورهای مقاومت و بیماریزایی آن، شناسایی سریع و دقیق این باکتری و عوامل مقاومتی آن جهت درمان این گونه عفونت ها، ضروری به نظر می رسد.

واژگان کلیدی: ژن های (*cat1* و *tetB bla TEM dfra1*)، اشریشیا کلی اوروپاتوژنیک، *Multiplex-PCR*

مقدمه

آناتومی بدن زنان، مقاربت جنسی، سابقه خانوادگی، سن بالا، دیابت شیرین و ضعف مثانه از جمله عوامل خطر ساز جهت ایجاد این نوع عفونت ها محسوب می شوند. شدت عفونت ادراری بستگی به عواملی مانند حساسیت میزبان و وجود فاکتورهای بیماری زایی در سویه های مولد عفونت دارد (۵،۴). مقاومت این باکتری در مقابل آنتی بیوتیک ها مخصوصاً در بیمارانیستری در بیمارستان از اهمیت بالایی برخوردار است (۶). افزایش مقاومت دارویی در سالهای اخیر در بین پاتوژن ها بویژه عوامل مسبب UTI معضل بزرگی است که دلیل اصلی پیدایش سویه های مقاوم، بویژه سویه های مقاوم به چند دارو (Multi drug resistance-MDR)، انتشار عوامل مقاومتی به سویه های حساس، افزایش هزینه های درمانی و

اشریشیاکلی باسیلی گرم منفی، متحرک، بی هوازی اختیاری و بدون اسپور بوده که فلور طبیعی روده انسان ها و دیگر جانوران خونگرم است (۱). این ارگانیسم شایع ترین عامل عفونت مجاری ادراری (UTI-Urinary Tract Infection) بویژه در خانم های جوان می باشد (۲). اشریشیا کلی عامل بیش از ۸۰-۹۰ درصد از عفونت های مجاری ادراری کسب شده از جامعه و ۳۰-۵۰ درصد موارد UTI بیمارستانی است و از عوامل عمده بستری شدن در بیمارستان با عوارض قابل توجه و هزینه های مراقبتی بهداشتی بالا می باشد.

بروز عفونت های دستگاه ادراری معمولاً در زنان نسبت به مردان بیشتر است و حداقل نیمی از زنان در طول زندگی خود حداقل یک بار این عفونت را تجربه می کنند و عود عفونت امری شایع است (۳).

باکتری در مناطق مختلف دنیا همچنین پیدایش سویه های مقاوم به دارو، مطالعه بررسی عوامل مرتبط با بیماریزایی در باکتری های جدا شده و دارای مقاومت دارویی ضروری بنظر می رسد. لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین حضور ژن های *tetB*, *bla_{TEM}*, *dfra1* و *cat1* در سویه های اوروپاتوژنیک اشریشیا کلی (UPEC) که مقاوم به چندین دارو شده اند، با روش Multiplex-PCR انجام شد.

روش کار

در این مطالعه توصیفی مقطعی که در بازه زمانی شش ماهه انجام شد تعداد ۱۰۰ نمونه ادرار به روش *Mide-stream* از بیماران ادراری با علائم عفونت ادراری جمع آوری گردید. عفونت ادراری توسط کادر پزشکی بیمارستان و بر پایه تظاهرات کلینیکی و تفسیر تست های آزمایشگاهی تشخیص داده شد. معیار آزمایشگاهی UTI یک کشت مثبت از ارگانیسم با حداقل 10^5 cfu/ml در نظر گرفته شد. به منظور جداسازی سویه های اشریشیاکلی، هر کدام از نمونه ها به طور مجزا بر روی محیط های افتراقی شامل مک کانکی، بلاد آگار و آئوزین متیلن بلو آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. همچنین از تست های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژی نظیر رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، اکسیداز و استفاده از محیط های افتراقی مانند *MR-VP*, *SIM*, *TSI*, *MR-VP*, *SIM*, *TSI*، سیمون سیرتات، اوره آز، تولید H_2S ، تست تخمیر قندها و احیای نیترات استفاده شد. از سویه رفرنس اشریشیاکلی ATCC 25922 به عنوان کنترل کیفی استفاده شد. سویه های شناسایی شده در محیط عصاره قلب-مغز آگار (BHI) (مرک، آلمان) حاوی ۱۵٪ گلیسرول کشت و در ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند و در مراحل بعدی کار مورد استفاده قرار گرفتند.

پروفایل حساسیت آنتی بیوتیکی بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) بر اساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه (CLSI, 2013) (۱۴) و با استفاده از روش انتشار از دیسک برای آنتی بیوتیک های (تهیه شده از شرکت Mast، انگلیس) تریمتوپریم - سولفامتوکسازول ($25\mu g$)، کلرامفنیکل ($30\mu g$)، تتراسیکلین ($30\mu g$)، آمپی سیلین ($25\mu g$) انجام شد.

به منظور انجام Multiplex-PCR، استخراج DNA ژنومی سویه ها از کشت ۲۴ ساعته در محیط لوریا برتانی برات (مرک، آلمان) در ۳۷ درجه سلسیوس استفاده شد. استخراج طبق دستورالعمل کیت استخراج سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR881613) (البرز، ایران) انجام گردید. جهت تایید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad, USA) استفاده گردید.

شکست درمان (Drug therapeutic failure -DTF)، افزایش از کار افتادگی و مرگ و میر است (۶،۷).

بتالاکتامازها آنزیم هایی هستند که با هیدرولیز حلقه بتالاکتام و بی اثر شدن این آنتی بیوتیک ها سبب بروز مقاومت به بتالاکتام ها می شوند (۷). این آنزیم ها در باکتری ها بسیار متنوع هستند و در پاسخ به فشار انتخابی (selective pressure) آنتی بیوتیک ها، به طور دائم در حال موتاسیون و یا جایگزینی اسیدهای آمینه بویژه در جایگاه فعال آنزیم هستند به طوری که باعث ظهور انواع جدیدی از بتالاکتامازها با طیف وسیع (β -Extended Spectrum Lactamases-ESBLs) شده است (۸). اولین شناسایی شده TEM می باشد و انواع مختلفی از بتالاکتاماز نوع TEM با جایابی در توالی اسید های آمینه از TEM-1 بوجود آمده اند. TEM-1 به عنوان اولین بتالاکتاماز کد شده به وسیله پلاسמיד در انتروباکتریاسه ها بود که سایر باکتری ها از قبیل پseudomonas آئروژینوزا و هموفیلوس آفلوانزا نیز قادر به تولید آن هستند (۹). دسته داروهای آنتی فولات شامل کوتریموکسازول و تری متوپریم که در گذشته ای نه چندان دور به عنوان داروی خط اول جهت درمان عفونت های ادراری بودند، امروزه به دلیل بروز مقاومت سطح بالا (High Level Resistance-HLR) کاربرد بالینی زیادی ندارند (۱۰).

سولفانامیدها به دلیل شباهت ساختمانی با پارا آمینو بنزوتیک اسید (PABA) بطور رقابتی آنزیم دی هیدرو پتروات سنتتاز (DHPS) باکتریایی را که مسئول تبدیل کردن PABA به اسید دی هیدرو فولیک است، مهار می کنند در نتیجه اسید فولیک ساخته نمی شود. اسید فولیک (ویتامین B9) نوعی کوفاکتور در ساخت پورین ها، تیمیدین و DNA می باشد (۱۱). در نتیجه سولفونامید ها با مهار سنتز DNA، سبب توقف رشد باکتری ها (باکتریواستاتیک) می شوند (۹ و ۱۰). کد شدن ژن های پلاسمیدی *sul* و *dfra* سبب بروز مقاومت به سولفونامیدها می گردد. DHPS حاصل از کد شدن ژن های مذکور شباهت کمی را به PABA از خود نشان می دهد. ژن *dfra* در اینتگرون کلاس II وجود دارد و با کد کردن آنزیمی به نام دی هیدروفولات ردوکتاز سبب بروز مقاومت به تریمتوپریم می شود (۱۲).

مقاومت به کلرامفنیکل (chi^I) به دو روش آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک بروز می کند. غیر فعال شدن آنزیمی بسیار شایع تر از نوع غیر آنزیماتیک می باشد. کلرامفنیکل استیل ترانسفراز (CAT) با استیلاسیون آنتی بیوتیک سبب ناتوانی آنتی بیوتیک در فرایند ترجمه می شود. ژن *cat* نوعی ژن ترانسپوزونی بوده (Tn916) که با کد نمودن آنزیم CAT سبب بروز مقاومت به کلرامفنیکل می شود (۱۳). بنابراین با توجه به افزایش روزافزون عفونت های مرتبط با اشریشیاکلی و متفاوت بودن فاکتورهای دخیل در بیماریزایی

دستگاه گرادینانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۵ سیکل که در جدول ۳ ذکر شده اند انجام گرفت. محصولات واکنش Multiplex-PCR در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برامید در مقایسه با سویه استاندارد اشریشیا کلی ATCC 25922 آنالیز شدند.

برای تکثیر ژن های *cat1* و *tetB*، *bla* TEM، *dfrA1* های اختصاصی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای تهیه شده از شرکت سیناکلون (تهران، ایران) استفاده شد که در جدول ۱ آورده شده اند (۱۵،۱۶). در نهایت، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل موادی که در جدول ۲ آمده است و برنامه

جدول ۱. توالی اولیگونوکلئوتیدی پرایمر های مورد استفاده

نام ژن	توالی اولیگونوکلئوتیدی (۵'→۳')	طول قطعه (bp)
<i>tetB</i>	F=5'-GCCAGTCTTGCCAACGTTAT-3' R= 5'-CGATGCGCCTATTAATGACA-3'	178
<i>DfrA1</i>	F= 5'-TGGTAGCTATATCGAAGAATGGAGT-3'-3' R=5'-TATGTTAGAGGCGAAGTCTTGGGTA-3'	425
<i>bla</i> TEM	F=5'-AAAATTCTTGAAGACG-3' R=5'-TTACCAATGCTTAATCA-3'	1080
<i>cat 1</i>	F= 5'-TTATACGCAAGGCGACAAGG-3' R= 5'-GATCTTCCGTCACAGGTAGG-3'	523

جدول ۲- مواد مورد استفاده برای واکنش Multiplex-PCR

مقدار مواد (μl)	مواد PCR
۱۴/۱	• آب دوبار تقطیر و غیر یونیزه
۸/۷	• PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران)
۰/۸	• هر یک از پرایمر ها به غلظت ۰/۸ میکرومولار (سیناکلون، ایران)
۰/۶	• DNA الگو (۱۰ نانو گرم)
۲۵	حجم کلی بر حسب μl

جدول ۳- شرایط تنظیم دستگاه ترموسایکلر برای واکنش Multiplex-PCR

مرحله	دما	زمان
واسرشتگی اولیه	۹۵ ° C	دقیقه ۵
واسرشتگی	۹۵ ° C	ثانیه ۴۰
اتصال	۵۸ ° C	ثانیه ۶۰
طویل شدن	۷۲ ° C	دقیقه ۷۵
طویل شدن نهایی	۷۲ ° C	دقیقه ۵
تعداد چرخه	۳۵	

یافته ها

در این مطالعه از ۱۰۰ بیمار دارای علائم عفونت ادراری و مراجعه کننده به بیمارستان، ۶۷ مورد زن و ۳۳ نفر مرد بودند. میانگین سنی بیماران 69 ± 16 سال بود که بیشترین میانگین سنی بین ۳۸-۲۵ سال بود. از مجموع ۱۰۰ نمونه ادرار جمع آوری شده تعداد ۶۳ نمونه (۶۳٪) حاوی اشریشیا کلی بودند. همچنین آنالیز میکروبی ۳۷

نمونه دیگر از ۱۰۰ نمونه ادراری نشان داد که ۹ نمونه (۹٪) کلبسیلا پنومونیه، ۷ ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا، ۶ نمونه انتروباکتر، ۶ ایزوله پروتئوس، ۵ نمونه سیتروباکتر و ۴ ایزوله سرائشیا بودند. به ترتیب بیشترین و کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های اشریشیا کلی مربوط به کلرامفنیکل (۵۸ نمونه) ۹۲/۱٪ و تتراسیکلین (۲۱ نمونه) ۳۳/۳٪ بود (جدول ۴).

جدول ۴. نتایج آزمایش تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن

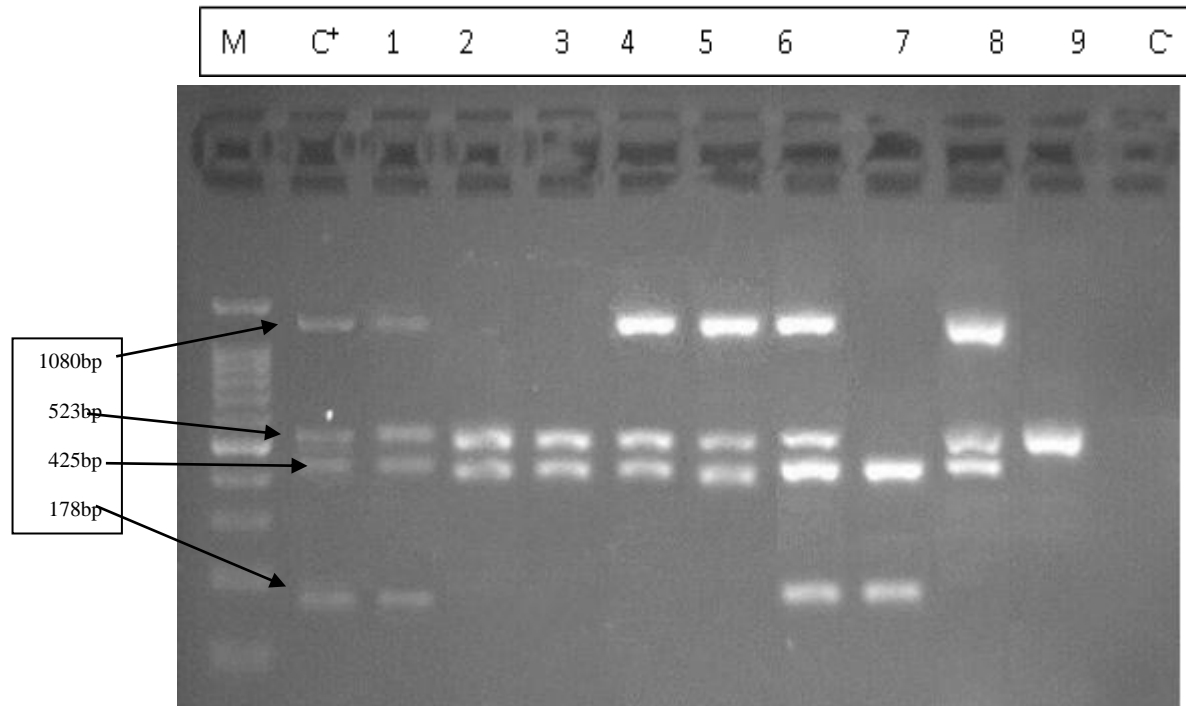
نوع	تعداد (٪) سویه های حساس (S)	تعداد (٪) سویه های نیمه حساس (I)	تعداد (٪) سویه های مقاوم (R)
	Sensitive	Intermediate	Resistance
انتی بیوتیک			
تتراسایکلین	۳۸ (٪۶۰/۳)	۴ (٪۶/۳)	۲۱ (٪۳۳/۳)
کوتریموکسازول	۱۶ (٪۲۵/۴)	۱۰ (٪۱۵/۸)	۳۷ (٪۵۸/۷)
آمپی سیلین	۷ (٪۱۱/۱)	-----	۵۶ (٪۸۸/۸)
کلرامفنیکل	۳ (٪۴/۷)	۲ (٪۳/۲)	۵۸ (٪۹۲/۱)

از مجموع ۶۳ نمونه ادراری تهیه شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری که وجود باکتری اشریشیا کلی در آنها به اثبات رسیده بود، بیشترین و کمترین شیوع به ترتیب مربوط به ژن های *cat1* و *tetB* با فراوانی ٪۹۲/۱ و ٪۲۵/۴ بود (جدول ۵). باندهای مربوط به محصولات PCR multiplex- حاصل از تکثیر ژن های مورد مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است.

از مجموع ۶۳ نمونه ادراری تهیه شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری که وجود باکتری اشریشیا کلی در آنها به اثبات رسیده بود، بیشترین و کمترین شیوع به ترتیب مربوط به ژن های

جدول ۵. فراوانی ژن های مورد مطالعه

نام ژن هدف	طول قطعه مورد نظر	تعداد (٪) سویه های مثبت
<i>tetB</i>	۱۷۸	۱۶ (٪۲۵/۴)
<i>dfrA1</i>	۴۲۵	۲۴ (٪۳۸/۱)
<i>TEM</i>	۱۰۸۰	۴۱ (٪۶۵/۱)
<i>cat1</i>	۵۲۳	۵۸ (٪۹۲/۱)



شکل ۱- محصول الکتروفورز واکنش زنجیره پلی مرز چندگانه (multiplex-PCR): خانه های ژل به ترتیب از چپ به راست: (M) مارکر مولکولی DNA marker 100 bp pulse (سیناکلون، ایران) است، (C⁻) کنترل منفی که آب دو بار تقطیر شده (آب مقطر دیونیزه) استریل می باشد، خانه های شماره ۱-۹ همان نمونه های بالینی حاصل از ادرار می باشند و قطعات ژنی 1080bp و 523bp, 425bp, 178bp به ترتیب قطعات حاصل از تکثیر ژن های *tetB*، *cat1* و *bla*_{TEM}، *dfrA1* می باشند، (C⁺) کنترل مثبت که همان اشریشیا کلی با شماره استاندارد ATCC25923 است.

بحث

(۷۵/۵٪) اشریشیا کلی بدست آورد. امیدی و همکاران (۱۹) نیز در سال ۲۰۱۳ از مجموع ۱۳۴۴ نمونه ادرار گرفته شده از بیمارستان شهید فقیهی شیراز ۹/۲۰٪ اشریشیا کلی بدست آوردند. همچنین بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها نسبت به کلرامفتیکل به میزان ۹۲/۱٪ و کمترین مقاومت تتراسایکلین ۳۳/۳٪ گزارش شد. علی پور و همکاران (۲۰) در بررسی مقاومت دارویی سویه های *E. coli* جدا شده از عفونت ادراری اظهار کردند که مروپنم، آمیکاسین، نیتروفورانئوتین، جنتامایسین و سیپروفلوکسازین برای درمان اکثریت عفونت های مجاری ادراری مرتبط با *E. coli* مناسب هستند. تامبرکار و همکاران (۲۱) در مطالعه ای بر روی ۶۸ نمونه ادراری در هند در سال ۲۰۰۶، اشریشیا کلی را از ۵۹٪ موارد جدا کردند و بیشترین میزان مقاومت را نسبت به آمپی سیلین (۸۷٪) و کوتریموکسازول (۹۱٪) و کمترین مقاومت را نسبت به نیتروفورانئوتین (۲۹٪) گزارش نمودند. امینی و همکاران (۲۲) در

اشریشیا کلی عامل بیش از ۸۰ درصد موارد UTI در تمامی رده های سنی است. بیشتر سویه های جدا شده از موارد عفونت های ادراری ناشی از اشریشیا کلی، واجد ژن های ویروالانس و مقاومت مختلفی می باشند که تعدادی از این ژن ها در مقاومت این نوع عفونت های ادراری نقش مهمی دارند. از این رو مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی فراوانی در زمینه کشف و شناسایی این عوامل ویروالانس صورت می گیرد (۱۷).

مطالعه پیش رو نشان داد که بیشترین تعداد (۶۳٪) سویه ایجاد کننده عفونت ادراری اشریشیا کلی می باشد و عامل بیش از نیمی از تمامی موارد عفونت های مجاری ادرار را شامل می شود. این نتایج با مطالعه دیگر محققین همخوانی دارد. جزایری مقدس (۱۸) نشان داد که عامل بیش از نیمی موارد عفونت ادراری اشریشیا کلی می باشد. این محقق از ۹۳۲ نمونه ادرار عفونی تعداد ۷۰۴ سویه

اشریشیا کلی که از لحاظ فنوتیپی به عنوان مولدین ESBL شناخته شده بودند، ۶۳٪ ژنوتیپ TEM بتالاکتاماز را دارا بودند که در مقابل نتایج مطالعه حاضر که ۶۵/۱٪ بتالاکتاماز TEM بود مشابهت بسیار بالایی دارد. یکی از راه های مقاومت در آن به دلیل وجود کلرامفنیکل استیل ترانسفراز (cat) می باشد. در مطالعه پیش رو ۹۲/۱٪ (۵۸ سویه) حامل ژن cat1 بودند که با مطالعه ساموئل و همکاران از مالزی (30) همخوانی داشت. اما با نتایج بدست آمده از پژوهش ممتاز و همکاران مغایرت داشت که این امر می تواند در نتیجه تفاوت در نوع نمونه باشد (۲۸).

از مقایسه نتایج این مطالعه با سایر تحقیقات انجام شده در سراسر دنیا مشخص گردیده است که پیدایش سویه های اشریشیا کلی مقاوم به آنتی بیوتیک های مختلف در نمونه های کلینیکی خصوصا عفونت های ادراری در حال افزایش است و ظهور مقاومت در این سویه ها با فاکتورهای ژنتیکی و انتقال ژن های کد کننده مقاومت به آنتی بیوتیک ها بین سویه ها ی پاتوژن همراه می باشد که مشکل جدی در کنترل و درمان عفونت با این باکتری به شمار می روند و می تواند سبب ایجاد عفونت در بیماران بستری در بیمارستان و عامل مهمی در عفونت های بیمارستانی گردد.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که ادرار بیماران مبتلا به UTI، منبع بالقوه انتشار سویه های اشریشیاکلی با فاکتورهای مقاومتی مختلف می تواند باشد. لذا با توجه به شیوع عفونت ادراری، انتشار فاکتورهای مقاومت و بیماریزایی، شکست درمانی و عواقب ناشی از این عفونت ها مانند پیلونفریت، سیستیت و پروستاتیت، شناسایی سریع و دقیق این سویه ها را ضروری می نماید. همچنین پیدایش سویه های مقاوم به چندین دارو در بین اشریشیا کلی های اوروپاتوژنیک می تواند در اثر انتقال ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک ها که در بین باکتری های گرم منفی معمول بوده و به صورت کروموزومی و پلاسمیدی انجام می گیرد را سبب شود که گاهی می تواند منجر به مقاومت همزمان به چندین داروی آنتی بیوتیکی و در نتیجه عدم درمان موثر گردد. بنابراین با راهکارهایی همچون انجام آنتی بیوگرام و تجویز داروی مناسب با دوز کافی در زمان ابتدای شروع عفونت، جهت جلوگیری از پیدایش سویه های مقاوم و عدم کنترل و درمان به موقع عفونت های حاصل از این باکتری، اقدام موثر را اعمال نمود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مدیریت و کارکنان گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص) که ما را در انجام مراحل این پروژه یاری رساندند تشکر و قدردانی می گردد.

سال ۱۳۹۳، بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به اریترومیسین (۱۰۰٪) و آمپی سیلین (۹۳/۳٪) و کمترین مقاومت مربوط به نیتروفورانئوتین (۳٪) و آمیکاسین (۰٪) گزارش کردند. تادس و همکاران (۲۳) در آمریکا در بازه زمانی ۱۹۵۰-۲۰۰۲ در مجموع ۱۷۲۹ نمونه اشریشیا کلی را جدا کردند و یک روند رو به افزایش مقاومتی را نسبت به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، سولفونامید، تتراسایکلین و جنتامایسین گزارش نمودند. رامین حمیدی فراهانی و همکاران (۲۴) نیز در سال ۱۳۸۷ و در بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های ادراری به این نتیجه رسیدند که در درمان اولیه عفونت های ادراری آمپی سیلین، کوتریماکسازول و جنتامایسین کمتر استفاده شود. سارا عبدالهی خیرآبادی و همکاران (۲۵) در سال ۱۳۹۱، بررسی الگوی مقاومت دارویی در سویه اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان ولی عصر شهرستان فسا به این نتیجه رسیدند که مقاومت اشریشیاکلی به آنتی بیوتیک های ایمپنم و سیپروفلوکساسین در مقایسه با سایر مطالعات روبه افزایش می باشد. علت مغایرت برخی از نتایج آنتی بیوگرام مطالعات قبلی با مطالعه پیش رو می تواند در نتیجه اختلاف در نوع نمونه ها (ادراری در مقایسه با مدفوعی و موارد کلی باسیلوز دامی)، فاصله جغرافیایی، عدم نظارت صحیح در مصرف آنتی بیوتیک در پزشکی و دامپزشکی، نوع رژیم دارویی در مناطق مختلف و مطابق با الگوی مقاومتی آن منطقه و سال اجرای مطالعه باشد.

آنالیز مولکولی ژن های تحت مطالعه نشان داد که بیشترین و کمترین شیوع ژن ها به ترتیب مربوط به tetB و cat1 با پراکندگی ۹۲/۱٪ و ۲۵/۴٪ بود. همچنین فراوانی ژن های dfrA1 و TEM به ترتیب برابر با ۳۸/۱٪ و ۶۵/۱٪ بود. میثم سرشار و همکاران (۲۶) در سال ۱۳۹۱ از بین ۴۵۰ نمونه مدفوع جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال ۷۷ سویه اشریشیا کلی بدست آوردند که فراوانی ژن tetB برابر ۶۲/۷٪ (۲۷ ایزوله) بود. علت شیوع بالای این ژن در مطالعه فعلی می تواند در نتیجه تفاوت در نوع نمونه (نمونه ادراری در مقابل نمونه مدفوع) باشد. علت شیوع پایین تر ژن tetB در multiplex-PCR (۲۵/۴٪) با مقایسه نتایج حاصل از آنتی بیوگرام (۳۳/۳٪) را می توان چنین توجیه نمود که ژن های دیگر tet از قبیل tetA و افلاکس پمپ، و تغییر در هدف دارو نیز از دیگر مکانیسم های دخیل در بروز مقاومت به تراسیکلین می توانند باشند. این نتایج با مطالعه سرشار و همکاران (۲۶) و سیان گلام و همکاران (۲۷) همخوانی دارد. ممتاز و همکاران (۲۸) در سال ۲۰۱۲ فراوانی ژن های dfrA1 و catA1 را برابر ۳۶/۸٪ اعلام کردند که با مطالعه فعلی همخوانی دارد. فانگ (۲۹) در طی سال های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۶ در سوئد نشان داد که از میان ۸۷ ایزوله

REFERENCES

1. Foxman B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2014; (31): 1-3.
2. Dormanesh B, Mirnejad R, Khodaverdi Daryan A, Momtaz H, Yahaghi E, Safarpour Dehkordi F, et al. Evaluation of virulence factors, antibiotic resistance and serogroups determination uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with pyelonephritis and cystitis. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2013; 7(2): 27-39.
3. Garcia TA, Ventura CL, Smith MA, Merrell DS, O'Brien AD. Cytotoxic necrotizing factor and hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli* elicit different host responses in the murine bladder. *Infection and Immunity*. 2013; (81): 99-109.
4. Nakhaii Moghadam M, Moshrefi SH. Determination of Urinary antibiotic resistance pattern in *E. coli* urinary isolates of and Prevalence of broad spectrum beta-lactamases among them. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2009; 16(4): 228-33.
5. Gulsun S, Oguzoglu N, Inan A, Ceran N. The virulence factors and antibiotic sensitivities of *Escherichia coli* isolated from recurrent urinary tract infections. *Saudi medical journal*. 2005; 26: 1755-58.
6. Tariq N, Jaffery T, Ayub R, Alam AY, Javid MH, Shafique S. Frequency and antimicrobial susceptibility of aerobic bacterial vaginal isolates. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*. 2006; 16: 196-9.
7. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. 2010; (8): 26-38.
8. Kern MB, Klemmensen T, Frimodt-Moller N, Espersen F. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 50: 513-6.
9. Pan H, 1, Zhang J, Kuang D, Yang X, et al. Molecular analysis and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic *Escherichia coli* from diarrheal patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015; (81): 126-131.
10. Tarchoun M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadid J. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *International Journal of Infectious Diseases*. 2013; (17): 450-3.
11. Soto SM, Zuniga S, Ulleryd P, Vila J. Acquisition of Pathogenicity Island in an *Escherichia coli* clinical isolate causing febrile urinary tract infection. *European Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 10: 1258-62.
۱۲. Hammerum A, Sandvay D, Andersen SR. Detection of *sul1*, *sul2*, *sul3*, in sulfonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans pork and pigs in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*. 2006; 106: 235-9.
۱۳. Wu S, Dalsgard A, Hammerum AM, Porsbo L, Jensen LB. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes. Among *E.coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2010; 52: 1-7.

- 14- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S25. 2015; 35(3): 44-50.
15. Van TT, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ . Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. International Journal of Food Microbiology. 2008; 124: 217–23.
16. Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJ, Woodward MJ. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2004; 53: 208–16.
17. Sanchez GV, Master RN, Karlowsky JA, Bordon JM. In vitro antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* isolates among U.S. outpatients from 2000 to 2010. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 2012; 56(4): 2181-3.
18. Jazayeri Moghadam A. frequency of the bacterial agents in urinary tract infection and their antibiotic susceptibility pattern in Semnan. J of Semnan University of medical science. 2000; 1(4): 11-6.
19. Omidi S, Pournajaf A, Taghizadeh Armaki M, Gholami M, Karami M, Irajian G. Survey of antibiotic susceptibility pattern in microorganisms isolated from clinical samples in Shahid Faghihi hospital of Shiraz, Iran. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology. 2013; 2: 64-72.
20. Alipour, T., Sadeghifard, N., Amirmozafari, N., Ghafurian, S., Abdulmir, A.S., Mohebi, R., Abu Bakar, F. and Raftari, M. Incidence of Extended Spectrum Beta-lactamase Producing *Pseudomonas Aeruginosa* and Frequency of OXA-2 and OXA-10 Genes. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 2010; 4: 3202-7.
21. Tambekar DH, Dhanorkar DV, Gulhane SR, Khandelwal VK, Dudhane MN. Antibacterial susceptibility of some urinary tract pathogens to commonly used antibiotics. Afr J Biotechnol. 2006; 5(17): 1562-5.
22. Soleimanifard N, Amini K, Moradli Gh. Molecular Identification of *Escherichia Coli* Pathotypes EPEC and EAEC Strains Isolated from Urinary Tract Infections and antibiotic Susceptibility Pattern by Multiplex Polymerase Chain Reaction. J Isfahan Med Sch. 2015; 32(310): 1954-63.
23. Tadesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ, McDermott PF. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. Emerg Infect Dis. 2012; 18: 741–9.
24. Hamid-Farahani R, Tajik AR, Noorifard M, Keshavarz A, Taghipour N, Hossieni-Shokouh J. Antibiotic resistance pattern of *E.coli* isolated from urine culture in 660 Army clinical laboratory center in Tehran 2008. J Army Univ Med Sci. 2012 ; 10(1): 45-9.
25. Abdollahi Kheirabadi S, Najafipour S, Kafilzadeh F, Abdollahi A, Jafari S, Moravej A. Evaluation of Drug Resistance Pattern of *Escherichia coli* Strains Isolated from Fasa Vali-e-Asr Hospital Patients . J. Fasa Univ. Med. Sci. 2013; 2(4): 273-8
26. Sarshar M, Tavafi H, Ghorbani Dalini S, Soud N, Kargar M, Shahrokhi N. Antibiotic resistance and tetracycline resistance genes distribution in diarrheal *Eschreshia coli* strains isolated from children. Iranian Journal of Infectious Diseases. 2012; 17(57): 13-8.

27. 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.
28. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpour Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 2013; 12: 8.
29. Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(2): 707-12.
30. Ng KH, Samuel L, Kathleen MM, Leong SS, Felecia C. Distribution and prevalence of chloramphenicol-resistance gene in *Escherichia coli* isolated from aquaculture and other environment. *International Food Research Journal.* 2014; 21(4): 1321-5.