مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ۳: از ۲۳-۳۰
پاییز ۱۳۸۹

بررسی مولکولی ژن *aac(3)- IIa (aacC2)* در اشریشیا کلی‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید جدا شده از ادرار

ندا سلیمانی[1]، مرتضی ستاری[2*]، محمدعلی برومند[3]، سعید سپهری‌سرشت[4]**

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه پاتولوژی، مرکز قلب تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- دکتری تخصصی، بخش مولکولار پاتولوژی، مرکز قلب تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۹/۰۳/۰۹ پذیرش مقاله: ۸۹/۰۵/۲۰

چکیده

هدف: اشریشیا کلی شایع‌ترین عامل اتیولوژیک عفونت مجاری ادراری بوده که ۸۰ درصد از این موارد را به خود اختصاص داده است. غیرفعال‌سازی آنزیماتیک آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزید توسط آنزیم‌های تغییردهندهٔ آمینوگلیکوزیدها اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در اشرشیاکلی است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی شیوع ژن مقاومت *aac(3)- IIa* در میان جدایه‌های بالینی اشریشیا کلی جدا شده از ادرار با استفاده از روش PCR است.

مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری ۲۵۰ جدایه اشریشیا کلی جدا شده از ادرار، الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین، توبرامایسین، کانامایسین، آمیکاسین و نتیل‌میسین (MAST Co, UK) به روش انتشار از دیسک با رعایت اصول CLSI تعیین شد. سپس DNA پلاسمیدی جدایه‌ها توسط کیت، استخراج و برای تشخیص ژن مقاومتی *aac(3)-IIa* روی پلاسمید از روش PCR استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که ۹۶ درصد از جدایه‌های اشریشیا کلی به توبرامایسین، ۹۰ درصد به کانامایسین، ۸۲ درصد به جنتامیسین، ۳۰ درصد به نتیل‌میسین و ۸ درصد به آمیکاسین مقاوم بودند. ژن *aac(3)- IIa* در ۵٤/۸۳ درصد از جدایه‌های اشریشیا کلی شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: از آن‌جایی که شیوع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی به دلیل انتقال مقاومت در میان باکتری‌ها توسط عناصر قابل انتقال نظیر ترانسپوزون‌ها و پلاسمیدها بالاست، بنابراین ردیابی مسیرهای انتقال در بین باکتری‌های مختلف بسیار مهم است.

کلیدواژگان: مقاومت آمینوگلیکوزیدی، اشریشیا کلی، ژن *aac(3)-IIa*، عفونت ادراری

۱- مقدمه

شایع‌ترین عامل اتیولوژیک عفونت سیستم ادراری (Urinary Tract Infection: UTI)، باکتری اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) است که ۸۰ درصد از این موارد را به خود اختصاص داده است [۱، ۲]. عفونت‌های ادراری ۳۰ تا ۴۰

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری‌شناسی، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦
Email: sattarim@modares.ac.ir

****نشانی مکاتبه:** تهران، خیابان کارگر شمالی، مرکز قلب تهران، بخش پاتولوژی، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۳۸
Email: mabroumand@yahoo.com

درصد از عفونت‌های بیمارستانی را تشکیل داده و مهم‌ترین منشاء سپتی‌سمی گرم منفی در بیماران بستری در بیمارستان به‌شمار می‌رود [۳، ٤]. عفونت ادراری عامل مهمی در ایجاد اسکار (Scar) و تخریب پیشرونده ساختمان کلیه‌ها، نارسایی کلیه، سوء رشد، سنگ‌های ادراری و افزایش فشار خون (Hypertension) در کودکان است [٥]. امروزه جدایه‌های اشرشیاکلی مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله آمینوگلیکوزیدها نشان می‌دهند. اهمیت بالینی آمینوگلیکوزیدها از آن نظر است که بر علیه طیف وسیعی از باکتری‌های هوازی به‌ویژه باکتری‌های گرم منفی، بسیاری از استافیلوکوک‌ها (*Staphylococcus*) و برخی استرپتوکوک‌ها (*Streptococcus*) مؤثر است و بیشترین کاربرد را در درمان عفونت‌های ناشی از باسیل‌های گرم منفی هوازی و بی‌هوازی اختیاری نشان می‌دهد. جنتامیسین (Gentamicin) دارای فعالیت نسبتاً بیشتری علیه اشریشیا کلی و گونه‌های سراشیا (*Serratia* spp.) است [٦]. ترکیب یک آمینوگلیکوزید با یک عامل ضد دیواره مانند بتالاکتام (β-Lactam) یا گلیکوپپتیدها ایجاد اثر هم‌افزایی (Synergistic Effect) روی جدایه‌های حساس نموده و می‌تواند در درمان عفونت‌ها مؤثر باشد. مقاومت اکتسابی به آمینوگلیکوزیدها هم در باکتری‌های گرم منفی و هم در باکتری‌های گرم مثبت گزارش شده است. سه مکانیسم مقاومت شامل تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، کاهش در نفوذپذیری دارو و غیرفعال‌سازی آنزیماتیک دارو، مسئول مقاومت به آمینوگلیکوزیدها است [۷]. از این بین غیرفعال‌سازی آنزیماتیک آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم‌های تغییردهندهٔ آن‌ها، اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در باکتری‌های گرم منفی است. سویه‌های مقاوم، توانایی تغییر در ساختار بیوشیمیایی آمینوگلیکوزیدها را توسط آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (Aminoglycosides Modifying Enzymes: AMEs) دارا هستند. سویه‌های تولید کننده AMEs اثر هم‌افزایی بین آمینوگلیکوزیدها و عوامل ضد دیواره‌ای گوناگون را از بین می‌برند [۸]. ژن مقاومت *aac(3)-IIa* از جمله ژن‌های تغییر دهندهٔ آمینوگلیکوزیدها است. آنزیم رمز شده توسط این ژن باعث مقاومت به جنتامیسین و توبرامایسین (Tobramycin) می‌شود. گزارش‌های بسیاری از AMEهای گوناگون در سراسر دنیا وجود دارد. توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌ویژه مقاومت به آمینوگلیکوزیدهایی که با واسطه پلاسمید عمل می‌کند، سریعاً باعث انتقال ژن مقاومت به سایر باکتری‌ها از جمله باکتری‌های گرم منفی شده و ارگانیسم‌ها را نسبت به درمان مقاوم می‌کند [۹، ۱۰]. با توجه به اهمیت مقاومت آمینوگلیکوزیدی و نیز دخالت ژن *aac(3)-IIa* و نقش احتمالی پلاسمیدها در بروز این پدیده، هدف اصلی پژوهش حاضر بررسی حضور ژن مقاومت *aac(3)-IIa* بر پلاسمید در بین جدایه‌های بالینی اشریشیا کلی مقاوم به آمینوگلیکوزید جدا شده از ادرار به روش PCR بوده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری و تشخیص باکتری‌ها

تعداد ۲۵۰ جدایه اشریشیا کلی جدا شده از UTI بیماران مراجعه کننده به مرکز قلب تهران در طی شش ماه اول سال ۱۳۸۸ جمع‌آوری شدند. هویت جدایه‌های اشریشیا کلی با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل چگونگی تخمیر قندها در محیط TSI (Triple Sugar Iron Agar)، تولید اندول و حرکت در محیط SIM (Sulfide Indole Motility)، واکنش در محیط MR (Methyl Red) و VP (Voges-Proskauer) و عدم رشد در محیط سیمون سیترات (Simmon citrate) و در نهایت مقایسه نتایج با جداول استاندارد، تأیید شد. در نهایت تمامی جدایه‌ها در محیط تریپتیک سوی براث (Tryptic Soy Broth: TSB) (از شرکت Merck آلمان) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول استوک (Glycerol Stock) کشت داده شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۲- تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

برای تعیین الگوی حساسیت جدایه‌های اشرشیاکلی از روش انتشار از دیسک کربی- بائر (Kirby Bauer Disk

(Diffusion Method) با به‌کارگیری دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (از شرکت Mast انگلستان) استفاده شد و تفسیر نتایج حاصل مطابق با استانداردهای CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام شد. حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (Amikacin) (۳۰ میکروگرم)، نتیل‌میسین (Netilmicin) (۳۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم) و کانامایسین (Kanamycin) (۳۰ میکروگرم) بررسی شد. برای کنترل کیفی دیسک‌ها از سویه‌های استاندارد اشریشیا کلی ATCC 25922، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923 موجود در آزمایشگاه تربیت مدرس و از کلبسیلا پنومونیه (Klebsiella pneumoniae) 23823 (*aac(3)-IIa*$^{+}$) و اشریشیا کلی 85085 (*ant(2")-Ia*$^{+}$) تهیه شده از انستیتو دانمارک (Statens Serum Institute of Denmark) برای کنترل مقاومت به آمینوگلیکوزیدها استفاده شد.

۲-۳- استخراج پلاسمید

برای استخراج و خالص‌سازی DNA پلاسمیدی از جدایه‌های اشریشیا کلی و سویه‌های استاندارد، به‌منظور به‌دست آوردن الگوی پلاسمیدی جدایه‌ها و انجام واکنش‌های PCR از کیت استخراج DNA پلاسمیدی (Bioneer) استفاده شد. تک کلونی از جدایه‌ها در محیط مایع LB (Lysogeny Broth) کشت داده و به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و پس از سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲ دقیقه، رسوب حاصل برای استخراج DNA پلاسمیدی استفاده شد. غلظت DNA پلاسمیدی از طریق اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۲٦۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer) (شرکت Labsystems فنلاند) اندازه‌گیری شد. الکتروفورز DNA پلاسمیدی استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام شد. الکتروفورز به‌صورت افقی و با استفاده از بافر TAE (Tris-acetate-EDTA) و ولتاژ ۸۰ ولت انجام شد. ژل آگارز پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با دستگاه ژل داک (Gel Doc) (شرکت Biometra آلمان) بررسی شد.

۲-٤- واکنش PCR

برای تکثیر ژن *aac(3)-IIa* از دو جفت آغازگر (Primer) اختصاصی که توسط ماینارد (Maynard) و همکاران [۱۱] معرفی شده، استفاده شد (جدول ۱). مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۱ میکرومول از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۲/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مول dNTPs، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱/۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز *Taq* (*Taq* DNA polymerase) (از شرکت CinnaGen) بود. حجم نهایی با آب دیونیزه استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler gradient از شرکت Eppendorf آلمان) نیز به این صورت تنظیم شد: واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، بعد از آن ۳۰ چرخه شامل واسرشتگی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در ٦۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه. پس از اتمام ۳۰ چرخه، تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. در واکنش‌های PCR از DNA الگو سویه استاندارد اشریشیا کلی ATCC25922 به‌عنوان کنترل منفی و از سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه 23823 (*aac(3)-IIa*) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محصولات PCR توسط الکتروفورز روی ژل ۱ درصد آگارز از یکدیگر جدا شد. برای تعیین سایز محصولات PCR از یک نشانگر (Marker) مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی (شرکت Fermentas لیتوانی) استفاده شد. ژل آگارز حاصل پس از رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید با استفاده از ترانس ایلومیناتور (Transilluminator) و ژل داک مجهز به دوربین دیجیتال عکس‌برداری شد و باندهای ایجاد شده با کنترل‌های مثبت و منفی مقایسه شد.

جدول ۱ توالی آغازگر مورد استفاده به همراه اندازه قطعات محصول PCR

ژن	توالی	تعداد نوکلئوتید	طول قطعه محصول (جفت‌باز)	مرجع
aac(3)-IIa	پیشرونده 5́ CGGAAGGCAATAACGGAG 3́	۱۸	۷٤۰	۱۱
	برگشتی 5́ TCGAACAGGTAGCACTGAG 3́	۱۹		

۳- نتایج

۳-۱- نتایج فنوتیپی مقاومت به آمینوگلیکوزیدها

جدایه‌های جمع‌آوری شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز قلب تهران با روش‌های مرسوم آزمایشگاهی تأیید هویت شدند. کلیه جدایه‌ها از نظر تخمیر گلوکز و لاکتوز، حرکت، آزمایش MR و تولید اندول مثبت بودند و از نظر استفاده از سیترات، آزمایش VP، تولید اکسیداز و تولید اوره‌آز منفی گزارش شدند. نتایج مقاومت جدایه‌های مورد مطالعه در برابر آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزید نشان داد که ۹۶ درصد از جدایه‌ها به توبرامایسین مقاوم بودند و پس از آن بیشترین میزان مقاومت به‌ترتیب در برابر کانامایسین (۹۰ درصد)، جنتامیسین (۸۲درصد)، نتیل‌میسین (۳۰ درصد)، آمیکاسین (۸ درصد) مشاهده شد. از میان کل جدایه‌های بررسی شده، هر ٦٢ جدایه حداقل نسبت به یکی از آمینوگلیکوزیدهای مورد آزمایش در روش انتشار از دیسک مقاومت نشان دادند. براساس نتایج فنوتیپی، بیشترین درصد مقاومت همزمان در ۹٤ درصد از جدایه‌ها نسبت به توبرامایسین وکانامایسین دیده شد و پس از آن ۸۲ درصد از جدایه‌ها مقاومت همزمان به توبرامایسین، کانامایسین و جنتامیسین و ۲۷ درصد از جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های توبرامایسین، کانامایسین، نتیل‌میسین و جنتامیسین مقاومت نشان دادند. تنها ٦ درصد از جدایه‌ها به‌طور همزمان نسبت به همه آنتی‌بیوتیک‌های به‌کار برده شده مقاوم بودند (جدول ۲).

جدول ۲ نتایج فنوتیپ مقاومت و درصد جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزید (٦٢ جدایه)

درصد جدایه‌های مقاوم	فنوتیپ مقاومت آنتی‌بیوتیکی
٦	K، TN، N، AK، GM
٦	N، TN، AK، GM
٦	K، AK، N، GM
۲۷	K، TN، N، GM
۸۲	K، TN، GM
٦	K، TN، AK
۹٤	K، TN
۹۰	K
۹٦	TN
۸۲	GM
۲۷	K، TN، N

GM: جنتامیسین، AK: آمیکاسین، N: نتیل میسین، TN: توبرامیسین، K: کانامایسین

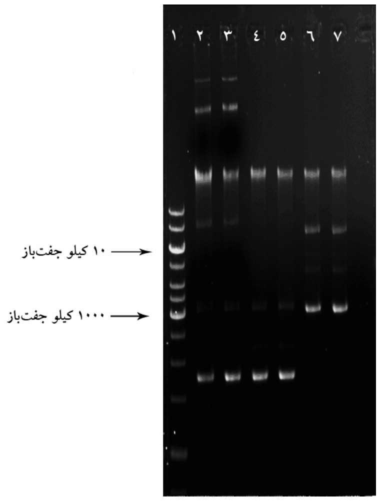
۳-۲- نتایج الگوی پلاسمیدی

پس از الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده از جدایه‌های اشرشیاکلی، پلاسمید در ۹٦ درصد جدایه‌ها مشاهده شد که این تعداد در بیست و هشت الگوی متفاوت با وزن بین ۱ کیلوباز تا ۲۰ کیلوباز قرار گرفت (شکل ۱).

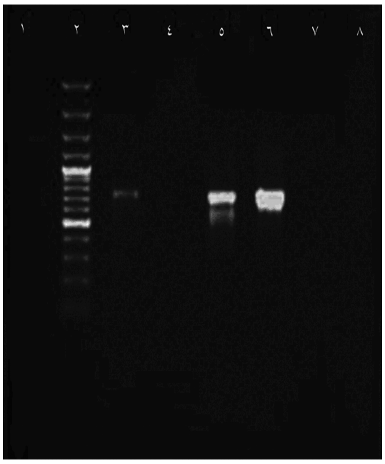
۳-۳- نتایج PCR

نتایج PCR جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد که ٣٤ جدایه (٥٤/٨٣ درصد) دارای ژن *aac(3)-IIa* بودند (شکل ۲). نتایج فنوتیپ مقاومت آنتی‌بیوتیکی و درصد حضور ژن *aac(3)-IIa* نشان داد که ۵۰ درصد از باکتری‌های دارای مقاومت همزمان

نسبت به کانامایسین، توبرامایسین و جنتامیسین، ژن *aac(3)-IIa* را داشتند و پس از آن بیشترین درصد مربوط به فنوتیپ مقاومت همزمان به توبرامایسین وجنتامیسین (۱۴/۷۰) بود (جدول ۳).



شکل ۱ الکتروفورز DNA پلاسمیدی استخراج شده از جدایه‌های مختلف اشریشیا کلی جدا شده از ادرار؛ Ladder مورد استفاده از نوع ۱ کیلوباز (از شرکت Fermentas لیتوانی) است. **ستون ۱)** Ladder، **ستون۲-۷)** به‌ترتیب جدایه‌های شماره ۲، ۱۴، ۵۷، ۹۱، ۱۲۲ و ۱۳۴ است.



شکل ۲ الکتروفورز محصول PCR ژن مقاومت *aac(3)-IIa* جدایه‌های اشریشیا کلی جدا شده از ادرار؛ Ladder مورد استفاده از نوع ۱۰۰ جفت‌باز (از شرکت Fermentas لیتوانی) است. **ستون ۱)** کنترل منفی، **ستون ۲)** Ladder، **ستون۳)** کنترل مثبت، **ستون‌های ۵ و ۶)** جدایه دارای ژن مقاومت، **ستون‌های ۴، ۷ و ۸)** جدایه‌های فاقد ژن مقاومت

جدول ۳ نتایج فنوتیپ مقاومت و حضور ژن *aac(3)-IIa* در میان جدایه‌های دارای ژن مقاومت

درصد ژن *aac(3)-IIa*	**فنوتیپ مقاومت آنتی‌بیوتیکی**
۰	GM ،AK ،N ،TN ،K
۲	GM ،K ،TN ،N
۲	GM ،N ،TN
۲	GM ،AK ،TN ،K
۱۴	GM ،TN ،K
۲	AK ،TN ،K
۲	TN ،K
۰	N ،TN
۱	TN
۳	GM
۶	TN ،GM

GM: جنتامیسین، AK: آمیکاسین، N: نتیل میسین، TN: توبرامیسین، K: کانامایسین

۴- بحث

آمینوگلیکوزیدها با وجود داشتن عوارض جانبی و مشکلاتی که در ارتباط با افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به این داروها دارد، همچنان در درمان عفونت‌های باکتریایی با ارزش است. معمول‌ترین مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در اشرشیاکلی، تغییر آن‌ها توسط آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها است، به‌صورتی که این آنتی‌بیوتیک‌ها دیگر قادر به اتصال به ریبوزوم سلول نیستند [۱۲]. ژن‌های رمز کننده این آنزیم‌ها توسط پلاسمید یا کروموزوم حمل شده و اغلب توسط عناصر ژنتیک قابل انتقال نظیر ترانسپوزون‌ها انتقال می‌یابد [۱۳]. ژنوم باکتری کاملاً تغییرپذیر است. علاوه بر اضافه شدن و حذف ژن‌های موجود در کروموزوم، فنوتیپ باکتری با از دست دادن یا کسب پلاسمیدها تغییر می‌یابد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌ها از طریق پلاسمیدهای R منتقل می‌شود [۱۴]. شیوع یک خصوصیت از طریق انتقال پلاسمیدها (انتقال افقی) بهتر از انتقال یک کلون باکتریایی خاص اتفاق می‌افتد و موجب بروز پدیده مقاومت در باکتری‌های دارنده این پلاسمیدها می‌شود

[۱۵]. دراین تحقیق شیوع ژن مقاومت *acc(3)-IIa* در میان ٦۲ جدایه مقاوم به آمینوگلیکوزیدی از ۲۵۰ جدایه اشریشیاکلی UTI بیماران مراجعه کننده به مرکز قلب تهران با استفاده از روش PCR بررسی شد. در مطالعه حاضر مشخص شد که ۹٦ درصد از جدایه‌ها (از ٦۲ جدایه مقاوم آمینوگلیکوزیدی) به توبرامایسین مقاوم بودند و پس از آن بیشترین میزان مقاومت به‌ترتیب در برابر کانامایسین (۹۰ درصد)، جنتامیسین (۸۲درصد)، نتیل‌میسین (۳۰ درصد)، آمیکاسین (۸ درصد) مشاهده شد. وان‌هوف (Vanhoof) و همکاران در سال ۱۹۹۹ با بررسی ۸۹۷ جدایه انتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae) جدا شده از خون، مشاهده کردند ۵/۹ درصد جدایه‌ها نسبت به جنتامیسین، ۷/۷ درصد نسبت به توبرامایسین، ۷/۵ درصد به نتیل‌میسین و ۲/۸ درصد آمیکاسین مقاومت دارند [۱٦]. در مطالعه کونگ (Kong) و همکاران در سال ۲۰۰٦ روی ٤٤ جدایه بالینی اشریشیا کلی، ۱۸/۱۸ درصد مقاومت نسبت به آمیکاسین، ۵٦/۸۲ درصد جنتامیسین، ٦۳/۳٦ درصد توبرامایسین را نشان دادند [۱۷]. طی مطالعه لنگ‌هو (Leung Ho) و همکاران درسال ۲۰۱۰ بر ۲٤۹ جدایه اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های بالینی انسان، ۸۳/۳ درصد از جدایه‌ها نسبت به جنتامیسین مقاوم گزارش شدند [۱۸]. در مقایسه بین نتایج مطالعات مختلف مشاهده می‌شود که با گذشت زمان میزان مقاومت اشرشیاکلی به آمینوگلیکوزیدها رو به افزایش است، اما تفاوتی که در نتایج به‌دست آمده از سایر مطالعات و مطالعه حاضر مشاهده می‌شود، می‌تواند به دلیل تفاوت در منطقه جغرافیایی یا تفاوت در تعداد جدایه‌های مورد آزمایش باشد که نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. از سوی دیگر، برای اثبات افزایش شیوع مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، لازم است مطالعه حاضر به‌صورت سالیانه مجدداً در همین مرکز درمانی تکرار شود. در مطالعه حاضر ۹٦ درصد از جدایه‌ها حاوی پلاسمید با اندازه بیش از ۱۰ کیلوباز بودند. مطالعه ورلاند (Vorland) و همکاران نشان داد که ۸۷/۵ درصد از جدایه‌های اشریشیا کلی دارای پلاسمید بودند و تعداد پلاسمیدها از ۱ تا ٦ باند گزارش شد [۱۹]. در مطالعهٔ سلبی (Celebi) و همکاران از ۱ تا ۱۰ باند پلاسمیدی در جدایه‌های اشرشیاکلی دیده شد که پلاسمیدی با اندازه ۱۹ کیلوباز بیشترین فراوانی را در بین جدایه‌ها داشت. همچنین اندازه پلاسمیدها از ۱ کیلوباز تا ۲٤ کیلوباز گزارش شد [۲۰]. علت این تفاوت در نتایج را می‌توان در اختلاف منطقه جغرافیایی جداسازی جدایه‌ها جستجو کرد که نیاز به بررسی‌های بین اقلیمی دارد. در میان جدایه‌های مقاوم مورد مطالعه، بیست و هشت الگوی پلاسمیدی متفاوت به‌دست آمد که بیانگر شیوع بالای حضور پلاسمید در جدایه‌های اشریشیا کلی است. از آن‌جا که ۹٦ درصد از جدایه‌ها حاوی پلاسمید با اندازه بیش از ۱۰ کیلوباز بودند و از طرف دیگر، ۹۵ درصد از آن‌ها به توبرامایسین مقاوم بودند، این احتمال وجود دارد که ژن رمز کننده مقاومت در برابر توبرامایسین روی پلاسمید با اندازه بیش از ۱۰ کیلوباز قرار گرفته باشد که نیاز به بررسی‌های مولکولی دارد. نتایج حاصل از PCR نشان داد که ۵٤/۸۳ درصد از جدایه‌ها ژن مقاومت *aac(3)-IIa* را دارند. بین نتایج به‌دست آمده از مطالعه اخیر و سایر مطالعات هماهنگی وجود دارد، به‌گونه‌ای که ماینارد وهمکاران در سال ۲۰۰٤ نشان دادند که ۱۷ درصد از جدایه‌های حیوانی و۳۳ درصد از جدایه‌های انسانی دارای ژن مقاومت *aac(3)-IIa* بودند [۱۱]. جاکوبسن (Jakobsen) و همکاران در سال ۲۰۰۷ با مطالعه روی ۱۲۰ جدایه اشرشیاکلی، ۵۲ جدایه (٤۳/۳ درصد) را از نظر حضور ژن *aac(3)-IIa* مثبت گزارش کردند [۲۱]، اما در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که از ۷٦ جدایه مقاوم به جنتامیسین اشرشیاکلی، ٦۳/۱۵ درصد جدایه‌ها این ژن را حمل می‌کردند [۲۲]. همان‌گونه که به وضوح از مطالعه جاکوبسن و همکاران استدلال می‌شود، با گذشت زمان میزان شیوع ژن مورد نظر افزایش یافته که این امر نیز لزوم بررسی سالیانه مطالعه اخیر را بیان می‌کند و تفاوت مشاهده شده به علت تفاوت در اپیدمیولوژی مولکولی خواهد بود. حضور پلاسمید در جدایه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید با شیوع بالا مشاهده شد و

از سوی دیگر نشان داده شد که یکی از ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها با شیوع بالایی روی پلاسمید حمل می‌شود. از آن‌جایی که انتقال پلاسمید در باکتری‌های گرم منفی به وفور انجام می‌گیرد، احتمال پراکندگی و افزایش مقاومت به آمینوگلیکوزید در سایر باکتری‌ها نیز وجود دارد. با توجه به مقاومت بالای اشرشیاکلی که در پژوهش حاضر و پژوهش‌های مشابه گزارش شده است [١٤، ١٦- ١٨] و فراگیر بودن آن در محیط‌های بیمارستانی، برای پیشگیری از انتشار سویه‌های مقاوم، روش‌های کنترل مؤثرتر در ضد عفونی محیط بیمارستان از یک طرف و کاهش مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف از طرف دیگر باید مورد توجه قرار گیرد. همچنین به علت افزایش شیوع مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، تشخیص سریع و به موقع سویه‌های مقاوم به‌منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به‌نظر می‌رسد.

۵- تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی مصوب دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است. نگارندگان بدین‌وسیله از حمایت‌های دانشگاه و نیز پرسنل آزمایشگاه و مرکز تحقیقات مرکز قلب تهران که مساعدت‌های لازم را مبذول داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

٦- منابع

[1] von Baum H, Marre R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. Int J Med Microbiol 2005; 295(6-7): 503–11.

[2] Santo E, Salvador MM, Marin JM. Multidrug-resistant urinary tract isolates of *Escherichia coli* from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Braz J Infect Dis 2007; 11(6): 575-8.

[3] Karchmer TB, Giannetta ET, Muto CA, Strain BA, Farr BM. A randomized crossover study of silver-coated urinary catheters in hospitalized patients. Arch Intern Med 2000; 160(21): 3294-8.

[4] Robin RH, Contran RS, Tolkoff-Robin NE. Urinary tract infection, pyelonephritis and reflux nephropathy. In: Brenner BM (Editor). Brenner and Rector's the Kidney. 5th ed, Saunders, 1997; p: 1597-654.

[5] Esmaili M. Study of antibiotics effects on bacteria causing urinary infections in children. Iran J Pediatr 2005; 15: 165-73.

[6] Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev 2003; 16(3): 430-50.

[7] Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(4): 727–37.

[8] Murray BE. Diversity among multidrug-resistant *Enterococci*. Emerg Infect Dis 1998; 4(1): 37-47.

[9] Nicas TI, Iglewski BH. Isolation and characterization of transposon-induced mutants of *Pseudomonas aeruginosa* deficient in production of exoenzyme S. Infect Immun 1984; 45(2): 470-6.

[10] Vasil ML, Ochsner UA. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. Mol Microbiol

1999; 34(3): 399-413.

[11] Maynard C, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R, Masson L, Larivière S, Harel J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. J Clin Microbiol 2004; 42(12): 5444–52.

[12] Bellaaj A, Bollet C, Ben-Mahrez K. Characterization of the 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene aac(3)-IIa of a clinical isolate of *Escherichia coli*. Ann Microbiol 2003; 53: 211-217.

[13] Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kang JH, Shin WS, Kang MW. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. J Korean Med Sci 2003; 18(5): 631-6.

[14] Shahid M, Malik A. Resistance due to aminoglycoside modifying enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burns patients. Indian J Med Res 2005; 122(4): 324-9.

[15] Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: focus on infection. Am J Epidemiol 2001; 153(12): 1135-41.

[16] Vanhoof R, Nyssen HJ, Van Bossuyt E, Hannecart-Pokorni E. Aminoglycoside resistance in Gram-negative blood isolates from various hospitals in Belgium and the Grand Duchy of Luxembourg. Aminoglycoside Resistance Study Group. J Antimicrob Chemother 1999; 44(4): 483-8.

[17] Kong HS, Li XF, Wang JF, Wu MJ, Chen X, Yang Q. Evaluation of aminoglycoside resistance phenotypes and genotyping of acetyltransferase in *Escherichia coli*. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2006; 35(1): 83-6.

[18] Ho PL, Wong RC, Lo SW, Chow KH, Wong SS, Que TL. Genetic identity of aminoglycoside- resistance genes in *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. J Med Microbiol 2010; 59(Pt 6): 702-7.

[19] Vorland LH, Carlson K, Aalen O. Antibiotic resistance and small R plasmids among *Escherichia coli* isolates from outpatient urinary tract infections in northern Norway. Antimicrob Agents Chemother 1985; 27(1): 107-13.

[20] Celebi A, Duran N, Ozturk F, Açk L, Aslan G, Aslantas O. Identification of clinic uropathogen *Escherichia coli* isolates by antibiotic susceptibility, plasmid and whole cell protein profiles. Adv Mol Biol 2007: 1: 31-40.

[21] Jakobsen L, Sandvang D, Jensen VF, Seyfarth AM, Frimodt-Møller N, Hammerum AM. Gentamicin susceptibility in *Escherichia coli* related to the genetic background: problems with breakpoints. Clin Microbiol Infect 2007: 13(8): 830-2.

[22] Jakobsen L, Sandvang D, Hansen LH, Bagger-Skjøt L, Westh H, Jørgensen C, Hansen DS, Pedersen BM, Monnet DL, Frimodt-Møller N, Sørensen SJ, Hammerum AM. Characterisation, dissemination and persistence of gentamicin resistant *Escherichia coli* from a Danish university hospital to the waste water environment. Environ Int 2008; 34(1): 108-15.