Original Article

Molecular Evaluation of the 2'-aminoglycoside Nucleotidyltransferase Gene in *Escherichia coli* Isolates that Produce Hemolysin and are Sensitive to Mannose Type I pili and P

Neda Soleimani[1], Baharak Farhangi[2], Morteza Sattari[3], Abbas Yadegar[1], Majid Sadeghizadeh[4*]

1- Ph.D. Candidate, Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- M.Sc., Department of Genetics, Faculty of Pardis, Guilan University, Rasht, Iran
3- Associated Professor, Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: sadeghma@modares.ac.ir

Received: 17/Mar/2014, Accepted: 17/May/2014

Abstract

Objective: Aminoglycosides are highly potent, broad-spectrum antibiotics with many desirable properties for the treatment of life-threatening infections. *Escherichia coli (E. coli)* is the most common cause of urinary tract infection (UTI). Antibiotic resistance has recently become prevalent. Enzymatic inactivation of aminoglycosides by aminoglycoside-modifying enzymes is the main mechanism of resistance to these antibiotics in *E. coli*. The main purpose of this research is to evaluate the presence of the 2'-aminoglycoside nucleotidyltransferase (*ant(2'')-Ia)* gene in *E. coli* isolates sensitive to mannose and hemolysin production.

Methods: After collecting 276 *E. coli* isolates from patients that referred to Tehran Heart Center, we used the disk diffusion method to determine the resistance patterns of isolates toward Gentamicin, Tobramycin, Kanamycin, Amikacin and Netilmicin antibiotics according to the CLSI principles. We evaluated hemolysin production by assessing the ability of the isolates to grow on sheep and human blood agar media. Chromosomal DNA of the isolates was extracted using DNA extraction kits and PCR method used for the detection of the *ant(2'')-Ia* gene. In order to study mannose sensitivity we used human RBCs.

Results: Results obtained from antibiotic resistance determination tests showed that the highest rate of resistance was observed against tobramycin (24/63%). Of those resistant, 6% could produce hemolysin in both sheep and human blood agar media. Mannose sensitivity was observed in 14% of isolates during agglutination. There were 24.63% of *E. coli* isolates resistant to Tobramycin, 23.18% resistant to kanamycin, 21.01% resistant to gentamicin, 6.15% resistant to netilmicin and 3.62% resistant to amikacin. *ant(2'')-Ia* gene was detected in 47.88% of *E. coli* isolated from urine.

Conclusion: Due to the high prevalence of urinary tract infections caused by uropathogenic *E. coli* (UPEC) strains and the increasing rate of antibiotic resistance, periodic evaluations should be conducted for outbreaks of resistance in order to select the most suitable treatment to prevent routinely increasing antibiotic resistance.

Keywords: Broad-spectrum antibiotics, Aminoglycoside resistance, Urinary tract infection

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 2, Summer 2014, Pages: 59-70

مقاله اصیل

ارزیابی مولکولی حضور ژن رمز کننده ۲- آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفراز در جدایه‌های اشریشیا کلی دارای حساسیت مانوزی (پیلی تیپ I و P) و تولید کننده همولیزین

ندا سلیمانی[۱]، بهارک فرهنگی[۲]، مرتضی ستاری[۳]، عباس یادگار[۱]، مجید صادقی‌زاده[۴]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی پردیس گیلان، رشت، ایران
۳- دانشیار، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک
Email: sadeghma@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۲/۱۲/۲۶ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۲/۲۷

چکیده

هدف: آمینوگلیکوزیدها از جمله آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف هستند که برای درمان عفونت‌های باکتریایی کاربرد دارد. اشریشیا کلی شایع‌ترین عامل عفونت مجاری ادراری است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشریشیا کلی رو به افزایش است. غیر فعال سازی آنزیمی آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزید توسط آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها اصلی ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در اشریشیا کلی است. هدف اصلی این مطالعه ارزیابی مولکولی حضور ژن رمز کننده *ant(2")-Ia* در جدایه‌های اشریشیا کلی دارای حساسیت مانوزی (پیلی تیپ I و P) و تولید کننده همولیزین است.

مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری ۲۷۶ جدایه اشریشیا کلی از بیماران مراجعه کننده به مرکز قلب تهران، الگوی مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین، توبرامایسین، کانامایسین، آمیکاسین و نتیل‌میسین به روش انتشار از دیسک و با رعایت اصول CLSI تعیین شد. برای بررسی حساسیت به مانوز از گلبول قرمز انسان و برای بررسی قدرت تولید همولیزین جدایه‌ها از محیط بلاد آگار حاوی خون گوسفند و انسان استفاده شد. DNA کروموزومی با کیت استخراج و PCR برای ژن *ant(2")-Ia* انجام شد.

نتایج: نتایج بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها نشان داد که بیشترین میزان مقاومت در برابر توبرامایسین (۲۴/۶۳ درصد) بود. ٦ درصد از جدایه های مقاوم به‌طور همزمان قدرت تولید همولیزین را در دو محیط بلاد آگار حاوی خون گوسفند و انسان نشان دادند. ١٤ درصد از جدایه‌های حساس به مانوز به‌طور همزمان قدرت آگلوتیناسیون را داشتند. ۲۴/۶۳ درصد از جدایه‌های اشریشیا کلی به توبرامایسین، ۲۳/۱۸ درصد به کانامایسین، ۲۱/۰۱ درصد به جنتامیسین،٦/١٥ درصد به نتیل میسین و ۳/٦۲ درصد به آمیکاسین مقاوم بودند. در ٤٧/٨٨ درصد از جدایه های اشریشیا کلی ژن (*ant(2")-Ia*) شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع بالای عفونت‌های مجاری ادراری توسط سویه‌های اشریشیا کلی پاتوژن دستگاه ادراری و افزایش بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این سویه‌ها، لازم است به‌صورت دوره‌ای میزان مقاومت بررسی شود تا بدین‌وسیله با انتخاب مناسب‌ترین گزینه درمانی از افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی جلوگیری شود.

کلیدواژگان: آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، مقاومت آمینوگلیکوزیدی، عفونت مجاری ادراری

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، صفحات: ۵۹-۷۰

مقدمه

عفونت مجاری ادراری (Urinary Tract Infection: UTI) یکی از شایع ترین عفونت ها در انسان است که تحت تأثیر جنسیت و سن قرار می‌گیرد. اشریشیا کلی شایع‌ترین عامل عفونت ادراری در میان باکتری های جدا شده از بیماران سرپایی یا بستری در بیمارستان در مناطق مختلف جغرافیایی در سراسر جهان است که ۸۰ درصد از عفونت های ادراری را به خود اختصاص داده است [۱]. مهم‌ترین خصوصیت این جدایه ها توانایی کلونیزه شدن آن‌ها در سطح سلول های یورواپیتلیوم (Uroepithelium) میزبان به واسطه داشتن ادهزین (Adhesin) و پیلی (Pili) است و با تولید همولیزین (Hemolysin) سبب آسیب سلولی و بافتی بیشتری در میزبان می‌شوند. عودهای مکرر به دلیل مکانیسم‌های دفاعی باکتری و مقاومت آنتی‌بیوتیکی دیده می‌شود. اهمیت بالینی آمینوگلیکوزیدها به این دلیل است که علیه طیف وسیعی از باکتری‌های هوازی به‌ویژه باکتری‌های گرم منفی، بسیاری از استافیلوکوک‌ها و برخی استرپتوکوک‌ها مؤثر است و بیشترین کاربرد را در درمان عفونت‌های ناشی از باسیل‌های گرم منفی هوازی و بی‌هوازی اختیاری نشان می‌دهد. امروزه جدایه‌های اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله آمینوگلیکوزیدها نشان می‌دهد. جنتامیسین (Gentamicin) دارای فعالیت نسبتاً بیشتری علیه اشریشیا کلی و گونه‌های اسراشیا (*Serratia* ssp.) است [۲-٤]. ترکیب یک آمینوگلیکوزید با یک عامل ضد دیواره مانند بتالاکتام (Beta Lactam) یا گلیکوپپتیدها ایجاد اثر سینرژیستی (Synergism) 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 غیر فعال‌سازی آنزیمی دارو، مسئول مقاومت به آمینوگلیکوزیدها است [٤]. از این بین غیر فعال‌سازی آنزیماتیک آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم‌های تغییر دهنده آن‌ها، اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در باکتری‌های گرم منفی است. آنزیم نوکلئوتیدیل ترانسفرازها با استفاده از مولکول ATP به‌عنوان دهنده، گروه آدنیل را به گروه های هیدروکسیل آمینوگلیکوزیدها انتقال می‌دهد و منجر به غیر فعال شدن آن‌ها می‌شود. در این خانواده پنج عضو وجود دارد که شامل ANT(2″)، ANT(4́)، ANT(3́)، ANT(6́) و ANT(9) است. یکی از شایع‌ترین این آنزیم‌ها ، آنزیم ANT(2″)-I است که سبب مقاومت به جنتامیسین، کانامایسین (Kanamycin)، سیزومایسین (Sisomicin) و توبرامایسین (Tobramycin) می‌شود. این آنزیم به‌طور گسترده در اغلب باکتری‌های گرم منفی حضور دارد. سه ژن *ant(2″)-Ia*، *ant(2″)-Ib* و *ant(2″)-Ic* دارای فعالیت O– نوکلئوتیدیل ترانسفرازهای گزارش شده است [۳، ٤]. جدایه‌های حامل شاخص‌های بیماری‌زایی و در عین حال ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک یک خطر محسوب می‌شود. تشخیص سریع آن‌ها در نمونه‌های ادرار، می‌تواند ما را در تشخیص زود هنگام پیلونفریت احتمالی و تسریع در مدیریت درمانی کمک نماید. هدف از این مطالعه ارزیابی مولکولی حضور ژن [ANT(2')] 2´-aminoglycoside nucleotidyltransferase در جدایه های اشریشیا کلی دارای حساسیت مانوزی (پیلی تیپ I و P) و تولید کننده همولیزین است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و تعیین هویت باکتری‌ها

تعداد ۲۷٦ جدایه اشریشیا کلی جدا شده از عفونت های دستگاه ادراری بیماران مراجعه کننده به مرکز قلب تهران جمع‌آوری شد. جدایه‌های اشریشیا کلی با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل چگونگی تخمیر قندها در محیط TSI آگار (Triple Sugar Iron Agar)، تولید اندول و حرکت در

محیط SIM (Motility, Indole, SH_2)، واکنش در محیط VP (Vogus Proskeur) و MR (Methyl Red) و عدم رشد در محیط سیمون سیترات (Simmon Citrate) و در نهایت بررسی نتایج با استفاده از جداول استاندارد، تعیین هویت شدند. در تمام آزمایش‌های باکتری‌شناسی از سویه استاندارد اشریشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲ آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس به‌عنوان سویه کنترل استفاده شد. در نهایت از تمامی جدایه‌ها در محیط تریپتیک سوی براث TSB (Tryptic Soy Broth) تهیه شده از شرکت Merck (آلمان) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول کشت ذخیره تهیه شد و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۵].

تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

برای تعیین الگوی مقاومت جدایه‌ها، حساسیت آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین (Gentamicin، ۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (Amikacin، ۳۰ میکروگرم)، نتیل‌میسین (Netilmicin، ۳۰ میکروگرم)، توبرامایسین (Tobramycin، ۱۰ میکروگرم) و کانامایسین (Kanamycin، ۳۰ میکروگرم) به روش انتشار از دیسک کربی- بائر (Kirby Bauer Disk Diffusion Method) با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (Mast، آمریکا) و تفسیر نتایج حاصل مطابق با استانداردهای CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام شد. برای کنترل کیفی دیسک‌ها از سویه‌های استاندارد اشریشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲، استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳ (موجود در آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران) استفاده شد [٦].

شناسایی پیلی تیپ I و P

پس از جداسازی و شناسایی جدایه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید، شناسایی پیلی تیپ I یا پیلی حساس به مانوز با آگلوتیناسیون (Agglutination) گلبول قرمز انسان برای جدایه‌های مقاوم صورت گرفت [۷]. به‌منظور بررسی قدرت آگلوتیناسیون و تعیین حساسیت به مانوز جدایه‌های یوروپاتوژنیک اشریشیا کلی (Uropathogenic *Escherichia coli*: UPEC)، از خون تازه سیتراته گروه A انسان (HRBC) استفاده شد. خون سیتراته سه بار با PBS شستشو داده شد، سپس سوسپانسیون ۳ درصد از خون شسته شده تهیه شد و ۱۰ میکرولیتر از گلبول قرمز انسانی و هم حجم آن از سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند باکتری روی اسلاید قرار داده شد. پس از گذشت ۲ دقیقه نتایج آگلوتیناسیون روی اسلاید بررسی شد. نتایج براساس سرعت واکنش از – تا ۳+ رتبه‌بندی شدند [۸].

بررسی حساسیت مانوزی

برای بررسی حساسیت نسبت به قند مانوز، از PBS حاوی ۲۵ میلی‌گرم قند دی- مانوز در هر میلی‌لیتر آن استفاده شد. سپس آزمون هماگلوتیناسیون (Hemagglutination) تکرار شد [۸].

بررسی تولید همولیزین

پس از جداسازی و شناسایی جدایه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید شناسایی پیلی تیپ I یا پیلی حساس به مانوز با آگلوتیناسیون گلبول قرمز انسان یا برای جدایه‌های مقاوم تعین شد و برای بررسی قدرت تولید همولیزین، جدایه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید به‌طور مجزا در محیط بلاد آگار حاوی خون گوسفند و انسان کشت داده شد و ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه (گرماگذاری) شدند. نتایج براساس مشاهده هاله شفاف همولیزین در اطراف کلونی‌ها گزارش شد و براساس مقدار تولید همولیزین از – تا ۳+ رتبه‌بندی شدند [۹].

استخراج DNA

برای استخراج و خالص‌سازی DNA از جدایه‌های

اشریشیا کلی و سویه‌های استاندارد، به‌منظور انجام واکنش‌های PCR از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) استفاده شد. تک کلونی از جدایه‌ها در محیط مایع LB کشت و به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) به‌مدت ۲ دقیقه، رسوب حاصل برای استخراج DNA استفاده شد. غلظت DNA از طریق اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۲٦۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Labsystems، فنلاند) اندازه‌گیری شد. الکتروفورز DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام شد. الکتروفورز به‌صورت افقی و با استفاده از بافر TAE و ولتاژ ۸۰ ولت انجام شد. ژل آگارز پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با دستگاه ژل داک (Biometra، آلمان) بررسی شد.

واکنش PCR

برای تکثیر ژن *ant(2")-Ia* از یک جفت آغازگر (Primer) اختصاصی که توسط ماینارد (Maynard) و همکاران [۱۰] معرفی شده است، استفاده شد.

توالی پیشرونده 5′ TCCAGAACCTTGACCGAAC 3′، توالی برگشتی 5′ GCAAGACCTCAACCTTTTCC 3′ برای ژن هدف است.

مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۲/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۲ میکرولیتر dNTPs، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱/۵ واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase (سیناژن، ایران) بود که حجم نهایی با آب دیونیزه استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler gradient از شرکت Eppendorf آلمان) انجام شد. اتصال آغازگرها در ٦۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه انجام گرفت. در واکنش‌های PCR از DNA الگوی سویه استاندارد اشریشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲ به‌عنوان کنترل منفی و از سویه استاندارد اشریشیا کلی ۸۵۰۸۵ (*ant(2")-Ia+*) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محصولات PCR توسط الکتروفورز روی ژل ۱ درصد آگارز از یکدیگر جدا شد. برای تعیین اندازه محصولات PCR از یک نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas، لیتوانی) استفاده شد.

جدول ۱ حجم و غلظت نهایی مواد تشکیل دهنده واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر

ترکیبات واکنش	حجم (میکرولیتر)	غلظت
بافر ۱۰X PCR	۲/۵	۱X
$MgCl_2$	۰/۷۵	۱/۵ میلی‌مول
dNTPs	۰/۵	۰/۲ میلی‌مول
آغازگر پیشرونده	۱	۰/۱ میکرومول
آغازگر برگشتی	۱	۰/۱ میکرومول
آب مقطر استریل (D.W.)	۱٦/۲۵	–
DNA الگو	۲	–
Taq DNA polymerase	۱	۱/۵ واحد
حجم نهایی	۲۵	–

نتایج

کلیه جدایه‌ها از نظر تخمیر گلوکز و لاکتوز، حرکت، آزمایش MR و تولید اندول مثبت بودند و از نظر استفاده از سیترات، آزمایش VP، اکسیداز و تولید اوره‌آز منفی ثبت شدند. نتایج مقاومت جدایه‌های مورد مطالعه در برابر آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزید نشان داد که از میان ۲۷٦ جدایه بررسی شده، ۷۱ جدایه حداقل نسبت به یکی از آمینوگلیکوزیدهای مورد آزمایش در روش انتشار از دیسک مقاومت نشان دادند. مقاومت آن‌ها به پنج صورت تک مقاومتی، دو مقاومتی، سه مقاومتی، چهار مقاومتی و پنج مقاومتی ظاهر شد. ٤ جدایه (۵/٦۳ درصد) به هر پنج آمینوگلیکوزید توبرامایسین، کانامایسین، نتیل‌میسین، آمیکاسین و جنتامیسین مقاومت نشان دادند. ۱۹ جدایه (۲٦/۷٦ درصد) به چهار آمینوگلیکوزید مقاومت نشان دادند که این نوع مقاومت به دو شکل توبرامایسین، جنتامیسین، کانامایسین، نتیل‌میسین (۱۳ جدایه)، آمیکاسین، توبرامایسین، جنتامیسین، کانامایسین (٦ جدایه) مشاهده شد.

۲۸ جدایه (۳۹/۴۳ درصد) به سه آنتی‌بیوتیک توبرامایسین، جنتامیسین، کانامایسین مقاومت نشان دادند. ۱۷ جدایه (۲۳/۹۴ درصد) به دو آمینوگلیکوزید مقاومت نشان دادند که این نوع مقاومت به دو شکل توبرامایسین، جنتامیسین (٤ جدایه)، توبرامایسین، کانامایسین (۱۳ جدایه) مشاهده شد. در نهایت ۳ جدایه (٤/۲۲ درصد)، دارای مقاومت تکی به آمینوگلیکوزیدها بودند. نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها به تفکیک در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲ نتایج حاصل از آزمون انتشار از دیسک برای آمینوگلیکوزیدها در ۲۷٦ جدایه بالینی اشریشیا کلی جدا شده از ادرار

نوع اثر آنتی بیوتیک	حساس		نیمه حساس		مقاوم	
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد
توبرامایسین	۷۵/۳٦	۲۰۸	۰	۰	۲٤/٦۳	٦۸
کانامایسین	۷٦/۸۰	۲۱۰	۰/۷۲	۲	۲۳/۱۸	٦٤
جنتامیسین	۷۷/۵۳	۲۱٤	۱/٤٤	٤	۲۱/۰۱	۵۸
نتیل‌میسین	۹۱/۳	۲۵۲	۲/۵۳	۷	٦/۱۵	۱۷
آمیکاسین	۹۳/۸٤	۲۵۹	۲/۵۳	۷	۳/٦۲	۱۰

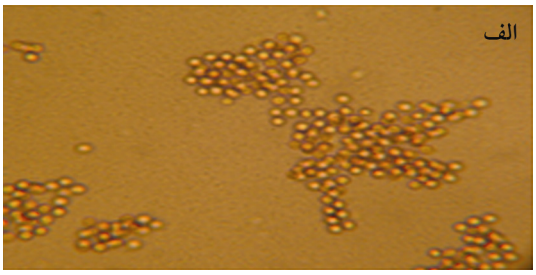
نتایج بررسی تولید همولیزین نشان می‌دهد که ۳۸ درصد از جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، قدرت تولید همولیزین در محیط بلاد آگار حاوی خون انسان را دارند. علاوه بر این ۳۰ درصد از جدایه‌های مقاوم به‌طور همزمان قدرت تولید همولیزین را در دو محیط بلاد آگار حاوی خون گوسفند و انسان نشان دادند (نتایج الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تولید همولیزین در جدایه‌های مقاوم در جدول ۳ نشان داده شده است).

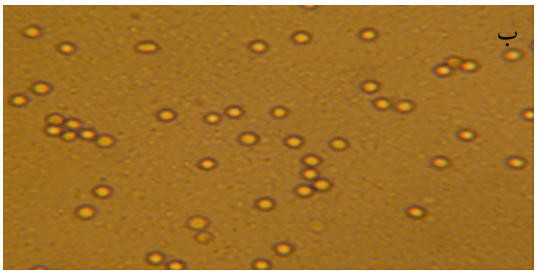
جدول ۳ الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تولید همولیزین در جدایه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید اشریشیا کلی جدا شده از ادرار

شماره جدایه	تولید همولیزین (Human blood)	تولید همولیزین (Sheep blood)	فنوتیپ مقاومت آنتی‌بیوتیکی	
			I	R
۲	+	+	K	GM, TN
۱۳	+	−	−	GM, TN, K
۱٦	+	−	NT	GM, TN, K
۲۱	+++	+++	−	GM, NT, TN, K
۳٦	+	+	−	GM, TN
٤۹	+++	+++	−	GM, TN
٦۰	+++	+++	−	GM, TN
٦۸	+++	+++	TN	GM, NT, K
۷۹	+	_	−	GM, NT, K
۸۸	+	+	TN	TN, K
۹۵	+	+	−	GM, TN
۱۰٤	+	+	K	GM, TN
۱٤٤	+	+	−	TN, K
۱۹٦	+++	+++	K	GM, TN
۱۹۷	+	+	−	GM, AK, NT, TN, K
۲۰٤	+	_	−	GM, TN, K
۲۰۹	+	+	−	GM, NT, TN, K
۲۱۷	+++	+++	−	GM, TN, K
۲۳۳	+++	+++	−	GM, TN, K

R: مقاوم؛ I: متوسط؛ GM: جنتامیسین؛ AK: آمیکاسین؛ NT: نتیل میسین؛ TN: توبرامایسین؛ K: کانامایسین

در شکل ۱ تصویر ب جدایه‌های UPEC دارای پیلی تیپ I و حساس به مانوز، با قند مانوز واکنش داده و قادر به آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز انسانی نیست، در تصویر الف جدایه‌های UPEC دارای پیلی P مقاوم به این قند است، بنابراین پیلی موجب تجمع اریتروسیت‌ها شده است (شکل ۱).





شکل ۱ بررسی حساسیت به مانوز جدایه های اشریشیا کلی؛ تصویر الف جدایه مقاوم به مانوز و تصویر ب جدایه حساس به مانوز (بزرگنمایی ×۶۰۰)

جدول ٤ الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حساسیت و مقاومت به مانوز در جدایه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید اشریشیا کلی جدا شده از ادرار

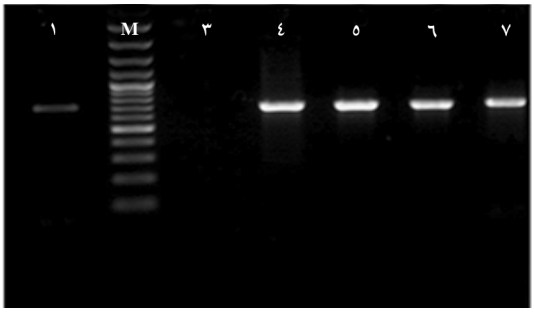
فنوتیپ مقاومت آنتی‌بیوتیکی		MSHA	MRHA	شماره جدایه
R	I			
GM, NT, K	TN	-	+	٦٨
GM, TN	K	-	+	١٠٤، ١٩٣، ٢١٩
GM, TN, K	-	-	+	٢١٧، ٢٢٢
GM, TN	-	-	+	٢٣٠

R: مقاوم؛ I: متوسط؛ GM: جنتامیسین؛ AK: آمیکاسین؛ NT: نتیل میسین؛ TN: توبرامایسین؛ K: کانامایسین؛ MSHA: هماگلوتیناسیون حساس به مانوط؛ MRHA: هماگلوتیناسیون مقاوم به مانوز

نتایج حاصل از آزمایش حساسیت به مانوز در جدایه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید اشریشیا کلی جدا شده از ادرار نشان داد که ١٤ درصد از جدایه‌ها نسبت به حضور مانوز در هنگام آگلوتیناسیون حساسیت نشان دادند. همچنین تنها ٦ درصد از جدایه‌های حساس به مانوز، به‌طور همزمان قادر به تولید همولیزین در هر دو محیط بلاد آگار حاوی خون انسان و گوسفند بودند (جدول ٤).

بررسی حضور ژن ant(2″)-Ia در جدایه‌ها

نتایج PCR جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد که ٤٧/٨٨ درصد دارای ژن *ant(2″)-Ia* بودند و ژن مذکور در جدایه‌های حساس از نظر فنوتیپی وجود نداشت (شکل ۲).



شکل ۲ چاهک ۱) سویه کنترل مثبت، چاهک M) نشانگر مثبت ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۳) چاهک کنترل منفی، ستون‌های ٤-٥-٦-۷) جدایه‌های بالینی جدا شده از ادرار دارای ژن *ant(2″)-Ia*

بین حضور ژن *ant(2″)Ia* و مقاومت به توبرامایسین و

جنتامیسین و کانامایسین ارتباط تقریباً کاملی وجود دارد، به بیان دیگر این ژن در اکثر جدایه‌هایی که در روش‌های انتشار از دیسک نسبت به توبرامایسین و جنتامیسین و کانامایسین مقاوم بودند حضور دارد. از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین حضور ژن *ant(2")Ia* و مقاومت به توبرامایسین و جنتامیسین و کانامایسین مشاهده شد. در جدول ۵ ارتباط بین حضور ژن‌های آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزید و فنوتیپ‌های مختلف مقاومت آمینوگلیکوزیدی در جدایه‌های بالینی اشریشیا کلی مشاهده می‌شود.

جدول ۵ ارتباط بین حضور ژن‌های AME و فنوتیپ‌های مختلف مقاومت آمینوگلیکوزیدی در جدایه‌های بالینی اشریشیا کلی مقاوم به آمینوگلیکوزید

فنوتیپ مقاومت	ant(2")Ia
GM, AK, N, TN, K	+
GM, N, TN, K	+
GM, TN	+
TN, K	+
GM, TN, K	+
TN	+
K	+
N	-
GM	+
AK	-

GM: جنتامیسین؛ AK: آمیکاسین؛ N: نتیل میسین؛ TN: توبرامایسین؛ K: کانامایسین؛ +: مثبت؛ -: منفی

بحث

مجاری ادراری شایع‌ترین جایگاه کلونیزاسیون و عفونت های باکتریایی در افراد جامعه و بیماران بستری در بیمارستان ها است. UPEC به‌عنوان شایع ترین عامل UTI عفونت مجاری ادراری است. به‌نظر می‌رسد جدایه‌های اشریشیا کلی که دارای قابلیت عفونت‌زایی ادراری هستند ویژگی‌های ویرولانس مختلفی را از خود نشان می‌دهند که در کلونیزاسیون سطوح مخاطی میزبان و مهار دفاع میزبانی نقش دارند. بدین ترتیب می‌توانند به باکتری فرصت تهاجم به مجاری ادراری را بدهند که در حالت طبیعی استریل هستند. نشان داده شده است که توانایی اتصال به سطوح اپی‌تلیال نقش پیش شرط و لازم را در کلونیزاسیون مجاری ادراری دارد که می‌تواند در غیاب ناهنجاری‌های اورولوژیک منجر به UTI شود. جدایه‌های UPEC دارای عوامل بیماری‌زایی تخصص یافته‌ای هستند که به آن‌ها توان تهاجم به سلول، اختلال در مکانیسم های سلولی، آسیب به بافت‌ها یا تحریک یک پاسخ التهابی مضر در میزبان را می‌دهد [۱۱-۱۵]. از آن‌جا که باکتری اشریشیا کلی یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های مجاری ادراری است، بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن همزمان با حضور عوامل بیماری‌رزایی دارای اهمیت است.

در این تحقیق شیوع ژن مقاومت *ant(2")Ia* در میان ۷۱ جدایه مقاوم به آمینوگلیکوزیدی از ۲۷۶ جدایه اشریشیا کلی عفونت دستگاه ادراری بیماران مراجعه کننده به مرکز قلب تهران با استفاده از روش PCR بررسی شد. وانگ هوف (Vanhoof) و همکاران در سال ۱۹۹۹ با بررسی ۸۹۷ جدایه انتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae) جدا شده از خون، مشاهده کردند ۵/۹ درصد جدایه ها نسبت به جنتامیسین، ۷/۷ درصد نسبت به توبرامایسین، ۷/۵ درصد به نتیل‌میسین و ۲/۸ درصد به آمیکاسین مقاومت دارند [۱۶]. در مطالعه کونگ (Kong) و همکاران در سال ۲۰۰۶ روی ٤٤ جدایه بالینی اشریشیا کلی، ۱۸/۱۸ درصد مقاومت نسبت به آمیکاسین، ۵٦/۸۲ درصد به جنتامیسین، ٦۳ درصد به توبرامایسین را نشان دادند [۱۷]. طی مطالعه هو (Ho) و همکاران درسال ۲۰۱۰ روی ۲٤۹ جدایه اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های بالینی انسان، ۸۳/۳ درصد از جدایه ها نسبت به جنتامیسین مقاوم گزارش شدند [۱۸].

در مطالعه حاضر مقاومت نسبت به سه آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیدی، توبرامایسین، کانامایسین و جنتامیسین به‌ترتیب با ۲٤/٦۳، ۲۳/۱۸ و ۲۱/۰۱ درصد مشاهده شد. این مقاومت از اهمیت زیادی برخوردار است زیرا این دسته از آنتی بیوتیک ها از جمله داروهایی است که در درمان عفونت‌های ناشی از UPEC دارای اهمیت بالینی و درمانی است. همچنین در این بررسی مقاومت سطح پایین‌تری در مقابل دو آنتی‌بیوتیک آمیکاسین و

نتیل میسین به‌ترتیب با ۳/٦۲ و ٦/۱۵ درصد مشاهده شد که این موضوع کم کاربرد بودن این داروها را در درمان عفونت‌های ناشی از UPEC و حضور ژن *ant* را در ایجاد مقاومت متذکر می‌شود. به‌علاوه ۷۱ جدایه حداقل نسبت به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مورد مطالعه مقاومت نشان دادند. مقایسه بین نتایج مطالعات مختلف مشاهده می‌شود که با گذشت زمان میزان مقاومت اشریشیا کلی 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.

معمول‌ترین مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در اشریشیا کلی، تغییر آن‌ها توسط آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها است، به‌صورتی که این آنتی‌بیوتیک‌ها دیگر قادر به اتصال به ریبوزوم سلول نیستند [۱۹]. ژن‌های رمز کننده این آنزیم‌ها توسط پلاسمید یا کروموزوم حمل شده و اغلب توسط عناصر ژنتیک قابل انتقال نظیر ترانسپوزون‌ها (Transposons) انتقال می‌یابند [۲۰]. نتایج حاصل از PCR نشان داد که ژن مقاومت *ant(2)-Ia* در ۸۸ /٤۷ درصد از جدایه‌ها وجود دارد. بین نتایج به‌دست آمده از مطالعه اخیر و سایر مطالعات هماهنگی وجود دارد، به‌گونه‌ای که مطالعات ماینارد و همکاران در سال ۲۰۰٤ نشان داد که ۱۷ درصد از جدایه‌های حیوانی و ۳۳ درصد از جدایه‌های انسانی دارای ژن مقاومت *aac(3)-IIa* بودند؛ با این وجود ژن *ant(2)-Ia* در این بررسی مشاهده نشد [۱۰]. در سال ۲۰۰۷ جاکوبسن (Jakobsen) و همکاران، ۱۲۰ جدایه اشریشیا کلی که یکی از ژن‌های مقاومت به جنتامیسین *aac(3)-II*، *aac(3)-IV* و *ant(2'')-I* را داشتند از نظر حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامیسین با روش رقیق‌سازی در آگار بررسی کردند. بررسی‌ها نمایانگر این مطلب بود که جدایه‌هایی که از نظر یکی از ژن‌های *aac(3)-IV* یا *ant(2'')-I* مثبت بودند، MIC در حدود ۸ تا ٦٤ میلی‌گرم در لیتر را داشتند، این در حالی است که جدایه‌هایی که دارای ژن *aac(3)-II* بودند، MIC در حدود ۳۲ تا ۵۱۲ میلی‌گرم در لیتر را داشتند که ارتباط بین میزان MIC و مکانیسم اختصاصی ژنتیکی مقاومت نسبت به جنتامیسین را نشان می‌دهد [۲۱]، اما در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که از ۷٦ جدایه مقاوم به جنتامیسین اشریشیا کلی، ٦۳/۱۵ درصد جدایه‌ها ژن *aac(3)-IIa* را حمل می‌کردند ولی در پژوهش آن‌ها ژن *ant(2)-Ia* بررسی نشد [۲۲].

اشریشیا کلی همچنین همولیزین آلفا که نوعی اگزوتوکسین (Exotoxin) خارج سلولی است را تولید می‌کند که موجب متلاشی شدن گلبول‌های قرمز می‌شود [۲۳، ۲٤]. همولیزین آلفا (HLY) با آسیب به سلول‌های میزبان باعث پایداری باکتری‌ها در مجاری ادراری می‌شود [۲۵]. نتایج بررسی تولید همولیزین نشان می‌دهد که ۳۸ درصد از جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، قدرت تولید همولیزین در محیط بلاد آگار حاوی خون انسان را دارند. علاوه بر این ۳۰ درصد از جدایه‌های مقاوم به‌طور همزمان قدرت تولید همولیزین را در دو محیط بلاد آگار حاوی خون گوسفند و انسان نشان دادند.

در این مطالعه اکثر جدایه‌های تولید کننده همولیزین حداقل نسبت به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت نشان دادند. علاوه بر این بین حساسیت به قند مانوز و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نیز ارتباط معنی‌داری ملاحظه شد. جدایه‌های مقاوم به مانوز (Mannose Resistant Hemagglutination: MRHA) دست کم نسبت به یک آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. این مطلب می‌تواند نشانگر آن باشد که شاید ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی و ژن‌های کد کننده پیلی نوع p و همولیزین در جایگاه نزدیک به هم قرار گرفته‌اند و انتقال می‌یابند که برای اثبات این موضوع نیاز به بررسی‌های مولکولی بیشتری است.

با توجه به مقاومت بالای اشریشیا کلی که در پژوهش حاضر و پژوهش‌های مشابه گزارش شده است و فراگیر بودن آن در محیط‌های بیمارستانی، برای پیشگیری از انتشار جدایه‌های مقاوم باید روش‌های کنترل مؤثرتر در ضد عفونی محیط بیمارستان از یک طرف و کاهش مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف

از طرف دیگر در نظر گرفته شود. به علت افزایش شیوع مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، تشخیص سریع و به موقع جدایه‌های مقاوم به‌منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این نگارش به روح پر فتوح استاد فرزانه جناب آقای دکتر مرتضی ستاری و استاد گرانمایه مرحوم دکتر سعید سپهری سرشت تقدیم می‌شود.

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] Wagenlehner FME, Naber KG. Antibiotics and Resistance of Uropathogens. EAU Update 2004; 2(3): 125-35.

[3] Johnson JR, Owens K, Gajewski A, Kuskowski MA. Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. J Clin Microbiol 2005; 43(12): 6064-72.

[4] Nys S, Terporten PH, Hoogkamp-Korstanje JA, Stobberingh EE; Susceptibility Surveillance Study Group. Trends in antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from urology services in The Netherlands (1998-2005). J Antimicrob Chemother 2008; 62(1): 126-32.

[5] Margesin R, Palma N, Knauseder F, Schinner F. Proteases of Psychrotrophic bacteria isolated from glaciers. J Basic Microbiol 1991; 5(31): 377-83.

[6] Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighth informational supplement M100-58, vol.18, No.1, 1998, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania, USA; Available at: www.CLSI.org.

[7] Evans DJ Jr, Evans DG, Höhne C, Noble MA, Haldane EV, Lior H, Young LS. Hemolysin and K antigens in relation to serotype and hemagglutination type of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. J Clin Microbiol 1981; 13(1): 171-8.

[8] Hagberg L, Jodal U, Korhonen TK, Lidin-Janson G, Lindberg U, Svanborg Edén C. Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. Infect Immun 1981; 31(2): 564-70.

[9] Suttorp N, Flöer B, Schnittler H, Seeger W, Bhakdi S. Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. Infect Immun 1990; 58(11): 3796-801.

[10] 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.

[11] Kausar Y, Chunchanur SK, Nadagir SD, Halesh LH, Chandrasekhar MR. Virulence

factors, serotypes and antimicrobial suspectibility pattern of *Escherichia coli* in urinary tract infections. Al Ameen J Med Sci 2009; 2(1): 47-51.

[12] Zhao L, Chen X, Zhu X, Yang W, Dong L, Xu X, Gao S, Liu X. Prevalence of virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu province (China). Urology 2009; 74(3): 702-7.

[13] Goñi FM, Ostolaza H. *E. coli* alpha-hemolysin: a membrane-active protein toxin. Braz J Med Biol Res 1998; 31(8): 1019-34.

[14] Elliott SJ, Srinivas S, Albert MJ, Alam K, Robins-Browne RM, Gunzburg ST, Mee BJ, Chang BJ. Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. Infect Immun 1998; 66(5): 2040-51.

[15] Lomberg H, Hellström M, Jodal U, Leffler H, Lincoln K, Svanborg Edén C. Virulence-associated traits in *Escherichia coli* causing first and recurrent episodes of urinary tract infection in children with or without vesicoureteral reflux. J Infect Dis 1984; 150(4): 561-9.

[16] Vanhoof R, Nyssen HJ, Van Bossuyt E, Hannecart-Pokorni E; Aminoglycoside Resistance Study Group. Aminoglycoside resistance in Gram-negative blood isolates from various hospitals in Belgium and the Grand Duchy of Luxembourg. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (JAC) 1999; 44: 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] 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: 211-7.

[20] 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.

[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.

[23] Skals M, Jorgensen NR, Leipziger J, Praetorius HA. Alpha-hemolysin from Escherichia coli uses endogenous amplification through P2X receptor activation to induce hemolysis. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(10): 4030-5.

[24] Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Exp Mol Pathol 2008; 85(1): 11-9.

[25] Costa MM, Drescher G, Maboni F, Weber SS, Botton S, Vainstein MH, Schrank IS, Vargas AC. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in southern of Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 2008; 39(4): 741-3.