الگوی مقاومت به تتراسیکلین درسویه های *اشرشیاکلی* یوروپاتوژنیک جداشده از بیماران بستری در گنبد کاووس. ۹۷-۱۳۹۶

لیلا فزونی[۱]*، سونا سرکاری[۲]، شادمان شکروی[۳]

۱. استادیار میکروبیولوژی ،گروه زیست شناسی ، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی ، کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی ، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
۳. دانشیار بیولوژی ،گروه زیست شناسی ، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

***نشانی برای مکاتبه: : lili_kia@yahoo.com**

دریافت مقاله: **: بهمن نود و هشت** پذیرش برای چاپ: اردیبهشت نود و نه

چکیده

سابقه و هدف: *اشریشیاکلی شایع ترین عامل عفونت مجاری ادراری شناخته شده است. متاسفانه استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک ها منجر به انتشار پاتوژن های مقاوم وافزایش ژن های مقاومت در آن ها گردیده است هدف از این مطالعه ارزیابی مولکولی مقاومت به تتراسایکلین در سویه های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک جداشده از بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان های شهر گنبد وحومه بود.*

روش کار: *در این مطالعه ۳۱۰ نمونه ادرار از بیماران بستری جمع آوری شد. پس از انجام تست های تشخیصی، آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن (روش کربی بائر) و میکرودایلوشن براث صورت گرفت. سپس با روش PCR و پرایمرهای اختصاصی ژن های مقاومت tetA و tetB شناسایی گردیدند.*

یافته ها: *از ۱۹۳ ایزوله ای.کولای شناسایی شده ۳۳,۲ درصد جدایه ها به تتراسایکلین مقاومت نشان دادند و بیشترین میزان حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک سفپیم (۸۱٪) مشاهده شد. تعیین حداقل غلظت مهاری تتراسایکلین بیانگر این بود که ۴۸٪ سویه ها MIC برابر یا کمتر از ۴ میکروگرم برمیلی لیتر را نشان دادند و بیشترین تغییرات رشد در MIC برابر ۲ میکروگرم برمیلی لیتر دیده شد. از بین ۶۴ جدایه ای.کولای مقاوم به تتراسایکلین، ۲۸ جدایه(۴۳٪) دارای ژن tetA و ۳۱ جدایه(۴۸٪) دارای ژن tetB بودند در حالیکه صرفا ۱ جدایه (۱٪) هر دو ژن را به طور مشترک داشت.*

نتیجه گیری: *نتایج نشان داد مقاومت به تتراسایکلین در جدایه های ای. کولای با منشا بیمارستانی نسبی است لیکن فراوانی ژن های مقاومت tetA و tetB با نسبت تقریبا یکسان رو به افزایش است.*

واژگان کلیدی: اشرشیاکلی، یوروپاتوژنیک، تتراسایکلین، PCR

مقدمه

در میان انواع عفونت های غیر روده ای ایجاد شده توسط *اشریشیا کولی*، عفونت ادراری بسیار مهم است. *اشریشیاکلی* متعلق به خانواده ی انتروباکتریاسه بوده و شامل باکتری هایی است که توانایی رشد هوازی و بی هوازی را دارند. هنگامی که اشرشیاکلی وارد دستگاه ادراری می شود، می تواند بیماری های مختلفی از یک اورتریت ساده تا سیستیت و پیلونفریت و حتی باکتریمی ایجاد نماید(۲و۱). گزارش های اخیر نشان داده اند که نرخ مقاومت به آنتی بیوتیک در میان سویه های *ای.کولای* به سرعت در حال افزایش است *که* یک نگرانی شدید در کشورهای توسعه یافته و درحال توسعه می باشد، چراکه درمان عفونت ها را دشوار می کند. افزایش مصرف عوامل ضد میکروبی و مصرف نامناسب آن ها فاکتورهایی

هستند که به این پدیده سرعت می بخشند. علاوه بر این، مهاجرت های مداوم بین کشور ها همچنین توریسم بین المللی و شغل هایی که باید سفر کرد مهمترین نقش را در کسب و انتشار سویه های مقاوم چند دارویی دارند لذا شناسایی مقاومت های آنتی بیوتیکی در جامعه از اهمیت خاصی برخوردار است و می تواند در جلوگیری از شکست درمان مفید باشد(۳).

تتراسایکلین یک آنتی بیوتیک باکتریواستاتیک می باشد که مقاومت نسبت به آن اولین بار در سال ۱۹۵۳ گزارش شد. عملکرد تتراسایکلین اتصال به ریبوزوم و ممانعت از مرحله طویل شدن سنتز پروتئین می باشد. مقاومت نسبت به تتراسایکلین اغلب به وسیله یکسری از ژن ها ایجاد می شود که مکانیسم پمپ یونی افلاکس با پروتئین های حفاظت کننده ریبوزومی را فعال می کنند. شمار محدودی از باکتری ها مقاومت نسبت به تتراسایکلین را از طریق موتاسیون در ژن های مرتبط با مکانیسم پمپ یونی افلاکس کسب می کنند که این ژن ها پروتئین های مرتبط با غشا را کد می کنند و تتراسایکلین را از درون سلول باکتری به خارج انتقال داده و منجر به کاهش غلظت تتراسایکلین در درون باکتری شده و به این طریق ریبوزوم باکتریایی در برابر تتراسایکلین حفاظت می شود. در باکتری های گرم منفی ژن های در ارتباط با پمپ یونی افلاکس شامل *tetA*، *tetB*، *tetC*، *tetD* و *tetG* می باشند. ژن های *tetA* و *tetB* با واسطه کد کردن پمپ افلاکس طی یک روند وابسته به انرژی باعث کاهش تجمع آنتی بیوتیک درون باکتری می شود (۵و۴).

هدف از انجام این مطالعه، بررسی مولکولی الگوی مقاومت به تتراسایکلین در جدایه های بالینی *ای.کولای* یوروپاتوژنیک در شرایط آزمایشگاهی بود چون بررسی و کنترل چنین عفونت هایی می تواند دستورالعمل های جدیدی در پزشکی ارائه کند.

روش بررسی

این پژوهش ضمن رعایت تمام نکات اخلاقی و رضایت کامل بیماران برروی ۳۱۰ نمونه ادرار صبحگاهی انجام گرفت . جامعه مورد مطالعه شامل کلیه بیماران مبتلا با و بدون علامت عفونت ادراری بستری در بخش مختلف (مراقبت های ویژه ، زنان، اورولوژی و داخلی) چهار بیمارستان در گنبد و حومه در طی مرداد۱۳۹۶تا اردیبهشت ۱۳۹۷ بود . معیار تشخیص عفونت ادراری بر اساس کشت ادرار مثبت یعنی وجود10^5 کولونی میکروب در بیماران بدون علامت و10^4کولونی میکروب در بیماران علامت دار بود(۳). برای تهیه نمونه های ادرار بیماران بستری جهت انجام کشت و آنتی بیوگرام از ادرار صبح گاهی استفاده شد. به منظورکشت نمونه های ادراری از محیط های بلاد آگار ، ائوزین متیلن بلو و مک گانگی آگار استفاده گردید. نمونه های کشت شده به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. سویه های *ای.کولای* براساس روشهای میکروبیولوژیک از جمله رنگ آمیزی گرم و انجام تست های بیوشیمیایی تخمیر گلوکز، لاکتوز ، تولید گاز ، تولید اندول از تریپتوفان ، واکنش وگس پروسکوئر-متیل رد ، رشد بر روی محیط های تریپل شوگر آیرون آگار (TSI) و Sulfid Indole Motility تشخیص داده شده و تایید شدند.

به منظور تعیین حساسیت دارویی به روش انتشار دیسک دیفیوژن آگار (روش کربی- بائر)، از کشت ۲۴ ساعته جدایه های *ای.کولای* سوسپانسیونی با کدورت ۰/۵ مک فارلند در سرم فیزیولوژی تهیه گردید سپس با استفاده از سواپ استریل از سوسپانسیون باکتری به صورت یکنواخت در مولر هینتون اگار(مرک، المان) کشت و دیسک گذاری برای آنتی بیوتیک های های تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم) ، سفپیم (۵ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، نیتروفورانتوئین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰میکروگرم) و لووفلوکساسین (۵ میکروگرم) خریداری شده از شرکت پادتن طب ایران انجام شد و پس از۲۴-۱۸ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شد وبا دستورالعمل استاندارد CLSI M100-S22 (Clinical and laboratory standards Institute) مطابقت داده شد (۶) ونتایج به عنوان مقاوم، نیمه حساس و حساس اعلام گردید.

به منظورتعیین حداقل غلظت مهاری(MIC) باکتری ها نسبت به تتراسایکلین مقادیر لازم از پودر آنتی بیوتیک تتراسایکلین (سیگما- الدریچ، امریکا) به حلال آب اضافه گردید تا غلظتی معادل۳۲ میکروگرم برمیلی لیتر حاصل گردد. غلظت اولیه آنتی بیوتیک به میکروپلیت ۹۶ خانه ای ال ایزا حاوی محیط کشت مولر هینتون براث (مرک ، المان) تلقیح شد. عمل رقت سازی استوک های دارویی از چاهک شمارۀ ۲ تا چاهک شمارۀ ۱۱ ادامه یافت تا رقت های۰،۰۶- ۳۲ میکروگرم برمیلی لیتر حاصل شود .چاهک شمارۀ ۱و ۱۲ به ترتیب به عنوان کنترل منفی(حاوی استوک دارو به همراه محیط کشت مولر هینتون براث) و کنترل مثبت(حاوی محیط

کشت مولر هینتون براث به همراه سوسپانسیون باکتری) در نظر گرفته شدند. در ادامه به چاهک های ۱۲-۲، سوسپانسیون باکتری با غلظت 1.5×10^8 واحد تشکیل دهنده کلنی (غلظت نیم مک فارلند) اضافه گردید و میکروپلیت به مدت ۲۴-۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. جهت گزارش MIC نتایج با جداول استاندارد CLSI M100-S22تطبیق داده شد (۶). طبق دستورالعمل این کمیته سویه هایی با میکروگرم برمیلی لیتر $MIC \leq 4$ حساس، میکروگرم برمیلی لیتر $MIC= 8$ نیمه حساس و میکروگرم برمیلی لیتر$MIC\geq 16$ مقاوم به تتراسایکلین در نظر گرفته شدند. در این مطالعه از سویه استاندارد *Escherichia.coli ATCC25922* جهت کنترل آزمایشات تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی استفاده شد.

برای بررسی کمی DNA استخراج شده از روش جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر استفاده شد. در این روش مقدار ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده در دستگاه نانودراپ (Thermo, 2000) قرار داده شد و جذب طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت بین این دو طول موج بررسی شد. برای ارزیابی کیفی DNA استخراج شده، ۴ میکرولیتر از DNA استخراج شده را به همراه ۲ میکرولیتر Loading Buffer مخلوط کرده و روی ژل آگارز ۱/۵ درصد به کمک رنگ آمیزی فلورسنس مخصوص DNA برده شد. نمونه های واجد باند مشخص و فاقد هرگونه شکست و اسمیر برای آنالیز های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. پس از استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNAخریداری شده از شرکت سیناژن با شماره کاتالوگDN 8115C ، واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای پیش رونده و پس رونده، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز (۵ U/µL) و ۱۸/۰۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه انجام شد . مشخصات پرایمرها ی اختصاصی در(جدول ۱) آمده است.

جدول۱- مشخصات عمومی پرایمرهای اختصاصی *tetA* و *tetB*

	(5'->3') تـو الـی	طول	Tm	GC%
پرایمر پیش رونده	TTTCGGGTTCGGGATGGT	۱۸	۵۸.۵۱	۵۵,۵۶
پرایمر پس رونده	CAGGCAGAGCAAGTAGAGGG	۲۰	۵۹.۸۲	۶۰,۰۰
پرایمر پیش رونده	GCCCAGTGCTGTTGTTGTC	۱۹	۵۹.۶۴	۵۷,۸۹
پرایمر پس رونده	TGGTCGTCATCTACCTGC	۱۸	۵۶.۰۳	۵۵,۵۶

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر ساخت کشور امریکا با شرایط واسرشت شدن ابتدایی و اصلی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و ۱ دقیقه با ۱ چرخه کامل،اتصال در دمای ۶۳ درجه سلسیوس به مدت ا دقیقه و طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه با ۳۵ سیکل، گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه با ۱ سیکل کامل انجام گرفت. محصولات PCR به نسبت ۵ به ۱ با بافر نمونه گذاری مخلوط شده و هر مخلوط به یک چاهک بر روی ژل آگارز 2 درصد منتقل و الکتروفورز گردیدند .به منظور مشاهده اندازه باندها از دستگاه Gel Documentation استفاده شد.

داده‌ها با استفاده از آزمون تجزیه واریانس، تجزیه و تحلیل شدند. همچنین مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۵٪ صورت گرفت. تمامی سنجش‌ها به صورت میانگین ± اشتباه معیار گزارش شد. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 23 و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

یافته ها

پس از انجام آزمایشات تشخیصی بر روی نمونه های ادرار، ۱۹۳ ایزوله (۶۲,۳٪) به عنوان *ای.کولای* تایید و شناسایی شدند. بیشترین تعداد جدایه ها در مردان (۵۱٪/۵) با میانگین سنی ۱۲± ۳۱ گزارش شد. بیشترین میزان فراوانی ایزوله های *ای.کولای* جدا شده از بخش های مختلف بیمارستان به ترتیب در بخش های اورولوژی(۳۴٪/۸) ICU

(۳۰٪)، CCU (۱۸٪/۲)، داخلی (۱۵٪/۲)، و زنان (۱٪/۵) مشاهده شد. در تست تعیین حساسیت میکروبی به روش کربی -بائر، نرخ مقاومت به تتراسایکلین۳۳/۲٪ گزارش شد میزان مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها به ترتیب: مرو پنم(۳۱٪/۶) ،جنتامایسین(۲۶٪/۴)، لووفلوکساسین(۲۰٪/۲)، نیتروفورانتوئین (۱۹٪/.) و سفپیم (۱۷٪/۱) دیده شد. دربررسی میزان مقاومت به تتراسایکلین با پارامتر نوع بخش بیشترین مقاومت از جدایه های حاصل از بخش مراقبت های ویژه دیده شد ولی رابطه معنی داری (P > ۰/۰۵)دیده نشد(جدول۲)

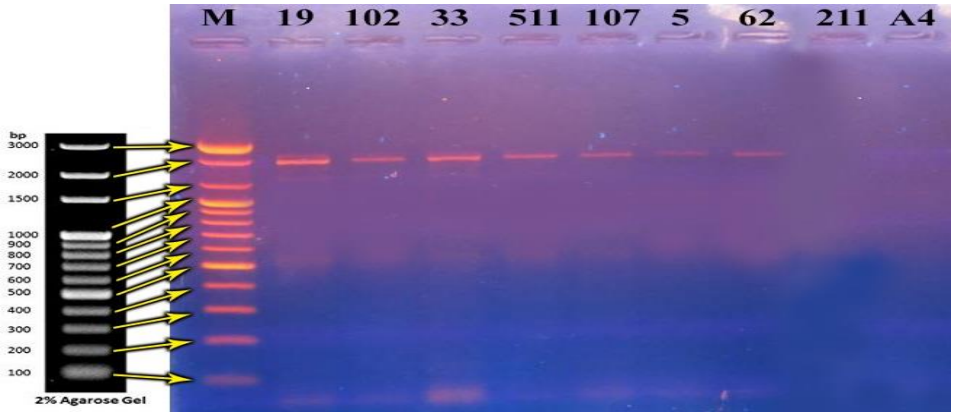
.

جدول۲- فراوانی مقاومت و حساسیت به تتراسایکلین در دو گروه بستری در بخش مراقبت های ویژه و سایر بخش ها

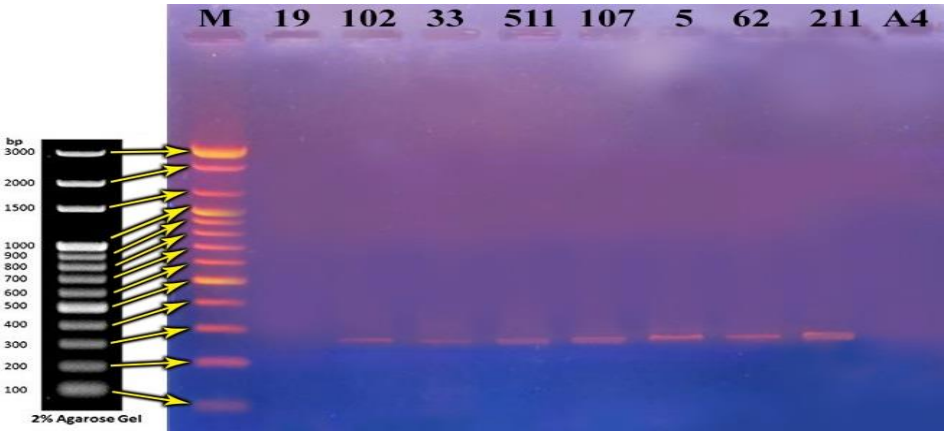
آنتی بیوتیک		بستری در بخش مراقبت های ویژه (n=91)	بستری در سایر بخش ها (n=102)	p-value
تتراسایکلین	مقاوم	۳۹ (٪۶۰,۹)	۲۵ (٪۳۹,۱)	>۰/۰۵
	حساس	۲۱ (٪۳۲,۸)	۳۷ (٪۵۷,۸)	
	نیمه حساس	٤ (٪٦,۳)	۲ (٪۳,۱)	

بررسی اثرات غلظت مختلف داروی تتراسایکلین درمحدوده۰/۰۶-۳۲ میکروگرم برمیلی لیتر بر رشد جدایه های *ای.کولای* نشان داد که۴۸٪ سویه ها دارای MIC برابر یا بیش از ۴ میکروگرم برمیلی لیتر قرار داشتند و بیشترین تغییرات رشد در غلظت های ۱ و ۲ میکروگرم بر میلی لیتر دیده شد به طوریکه ۳۴٪ سویه ها MIC برابر یا بیش از ۱۶ میکروگرم برمیلی لیتر را نشان دادند .

پس از پایان واکنش تکثیر ژن، محصول PCR روی ژل آگارز 2٪ لود شد و پس از اتمام ران شدن، ژل درون دستگاه ترانسلومیناتور قرار داده شد تا با تاباندن اشعه uv باندها در محدوده bp ۲۴۳۵ برای ژن *tetA* و در محدوده bp ۲۷۹ برای ژن *tetB* ظاهر شوند . از بین ۶۴ جدایه *ای.کولای* مقاوم به تتراسایکلین، ۲۸ جدایه(۴۳٪/۸) دارای ژن *tetA* و ۳۱ جدایه(۴۸٪/۴) دارای ژن *tetB* بودند (شکل۱و۲) در حالیکه صرفا ۱ جدایه (۱٪/۶) هر دو ژن را به طور مشترک داشت.



شکل۱-واکنش PCR برای ردیابی ژن *tetA* باکتری *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک. به ترتیب از چپ به راست: مارکر bp ۱۰۰، 102,19,33,511,107,5,62 نمونه های *اشریشیاکلی* دارای ژن *tetA*، A4 کنترل منفی



شکل۲- واکنش PCR برای ردیابی ژن *tetB* باکتری *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک به ترتیب از چپ به راست: مارکر bp ۱۰۰، ۱۰۲،۳۳،۵۱۱،۱۰۷،۵،۶۲ نمونه های *اشریشیاکلی* دارای ژن *tetB*، A4 کنترل منفی

بحث

اشریشیاکلی عامل مهم UTI در تمامی رده های سنی است. بیشتر سویه های جدا شده از موارد عفونت های ادراری ناشی از *ای.کولای* ، واجد ژن های ویرولانس 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 در زمینه کشف و شناسایی این عوامل ویرولانس صورت می گیرد(۷).

در مطالعه حاضر از ۱۹۳ نمونه ای که وجود *ای.کولای* درآن ها تایید شد بیشترین تعداد جدایه ها مربوط به مردان (۵۱,۵٪) بود همچنین بیشترین میزان فراوانی ایزوله های *ای.کولای* جدا شده از بخش های مختلف بیمارستان در رده های سنی ۶۰< (۳۶,۴٪) مشاهده شد.

در مطالعه ای در ایران محققین نشان دادندکه از میان ۱۵۰ ایزوله *ای.کولای* جدا شده، ۳۹ مورد (۲۶٪) مربوط به جنس مذکر بود که بیشترین فراوانی آن در گروه سنی بالاتر از ۶۵ سال (۸/۶۶٪) و در زنان در گروه سنی ۵۰-۳۰ سال (۱۷٪/۳۳) گزارش شد (۸). که از لحاظ متغیر سن هم راستای مطالعات ما در این زمینه بود و این بدان معناست که افراد مسن بیشتر از هر سن دیگری در معرض عفونت ادراری قرار دارند (۱۰و۹). گرچه در مطالعه حاضر ۴۸,۵٪ جدایه ها از بخش مراقبت های ویژه جدا شدند که انتظار میرود در این بخش بیشتر افراد مسن بستری باشند.

در مطالعات دیگر در ایران ۶۶,۵٪ نمونه های کشت مثبت *ای.کولای* مربوط به زنان بود (۱۱). که مغایر با مطالعات ما بود. به دلیل کوتاه تر بودن پیشاب راه زنان نسبت به مردان و نزدیکی آن به مقعد، دسترسی میکروارگانیسم ها به مثانه آسان تر بوده و امکان بروز عفونت ادراری در زنان بیشتر است. اما در مردان بویژه در سنین بالا، بزرگی پروستات و انسداد مجاری ادراری می تواند منجر به عفونت شود (۹). بهرحال علت مغایرت نتایج حاصل با نتایج سایر محققان می تواند در نتیجه منشأ نمونه ، اختلافات جغرافیایی و سطح بهداشت مناطق مختلف مرتبط باشد.

در مطالعه حاضر بیشترین و کمترین میزان فراوانی ایزوله های اشرشیاکلی جدا شده از بخش های مختلف بیمارستان به ترتیب در بخش های اورولوژی (٪۳۴,۸)، ICU (۳۰,۳٪) ، CCU (۱۸,۲٪)، داخلی (۱۵,۲٪) و زنان (۱,۵٪) مشاهده شد در مطالعه ای در سال ۲۰۱۷ در ایران فراوانی باکتری *ای.کولای* یوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری در بخش ICU (٪۴,۷) و در بخش اورولوژی (۲٪) ذکر شد که بسیار کمتر از مطالعات ما بود (۸).

امروزه یکی از مشکلات مطرح و قابل توجه بهداشت جهانی، افزایش شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی پاتوژن ها در جمعیت های مختلف انسانی و حیوانی است. عامل اصلی افزایش مقاومت باکتری های پاتوژنیک، استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک ها است و این امر منجر به پیدایش و انتشار پاتوژن های مقاوم و ژن های مقاومت در آنها می شود(۷).

در مطالعه حاضر نرخ مقاومت به تتراسایکلین۳۳,۲٪ گزارش شد سایر آنتی بیوتیک ها: مروپنم (۳۱,۶٪)، جنتامایسین

(٪۲۶,۴) ، لووفلوکساسین (٪۲۰,۲) ، نیتروفورانتوئین (٪۱۹) و سفپیم (٪۱۷,۱) به ترتیب در رتبه های بعدی مقاومت قرار گرفتند.

در سال ۲۰۱۲ محققین در آمریکا در بازه زمانی ۲۰۰۲-۱۹۵۰ یک روند رو به افزایش مقاومت را نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین و تتراسایکلین گزارش نمودند (۱۲). در همین سال در ایران در بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی *ای.کولای* به این نتیجه رسیدند که در درمان اولیه عفونت های ادراری جنتامایسن کمتر استفاده شود (۱۳).

در مطالعه حاضر مناسب ترین آنتی بیوتیک سفپیم شناخته شد که مشابه مطالعه انجام شده در سال۲۰۱۴بود (۱۴).

محققین در بررسی الگوی مقاومت دارویی در سویه *ای.کولای* جدا شده از بیماران به این نتیجه رسیدند که مقاومت *ای.کولای* نسبت به ایمی پنم در مقایسه با سایر مطالعات رو به افزایش می باشد (۱۵) که مشابه مطالعات ما در زمینه میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک مروپنم (٪ ۳۱,۶) می باشد.

در مطالعات پیشین در ایران میزان حساسیت *ای.کولای* نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین ٪۱۰(۱۶) و ٪۵۸,۴ (۱۷) کمتر و بیشتر از نتایج پژوهش حاضر گزارش گردید.

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)، فاصله جغرافیایی، عدم نظارت صحیح در مصرف آنتی بیوتیک در پزشکی، نوع رژیم دارویی در مناطق مختلف و مطابق با الگوی مقاومتی آن منطقه و سال اجرای مطالعه باشد.

در بین انتروباکتریاسه های مقاوم به آنتی بیوتیک ها، سویه های مقاوم به تتراسایکلین از فراوانی بالایی برخوردار هستند. این آنتی بیوتیک به دلیل قیمت پایین و کم بودن اثرات جانبی آن کاربرد وسیعی در درمان عفونت های دامی و انسانی دارد(۱۸) شیوع مقاومت به تتراسایکلین، نشانگر مناسبی برای ارزیابی ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک است و ارزیابی اپیدمیولوژی مولکولی سویه های مقاوم به دارو می تواند موجب دقت در تجویز داروهای مناسب و جلوگیری از شیوع سویه های مقاوم شود. وجود ژن های مقاوم در باکتری ها با کسب ژن *tet* همراه است (۱۹).

فراوانی کم ژن های مقاومت به تتراسایکلین می تواند به علت جهش در ناحیه اتصال پرایمر باشد که می تواند منجر به نتیجه منفی کاذب شود. هم چنین مقاومت به تتراسایکلین می تواند به علت ژن های مقاومت دیگری باشد که تاکنون در *ای. کولای* شناسایی نشده اند (۲۰).

در مطالعه حاضر از بین ۶۴ جدایه *ای.کولای* مقاوم به تتراسایکلین، ۲۸ جدایه (٪۴۳,۸) دارای ژن *tetA* و ۳۱ جدایه (٪۴۸,۴) دارای ژن *tetB* بودند در حالیکه صرفا ۱ جدایه (٪۱,۶) هر دو ژن را به طور مشترک داشت .

در مطالعات صورت گرفته در ایران در سال های ۱۳۹۳ (۲۱) و ۱۳۹۵ (۲۲) فراوانی ژن های *tetA* و *tetB*، به ترتیب حدود ۸۰ درصد و ۲۰ درصدگزارش گردیدند که در مقایسه با یکدیگر و مطالعه حاضر مغایرت زیادی دارد.

محققین در سال ۲۰۰۳، نشان دادند که ژن *tetB* غالبترین ژن مقاوم به تتراسایکلین در بین جدایه ها می باشد (۲۳). در حالی که در مطالعه حاضر میزان فراوانی ژن *tetA* و *tetB* تقریبا یکسان بود. علت اختلاف بین شیوع ژن های *tetA* و *tetB* در مطالعه پیش رو در مقایسه با سایر مطالعات می تواند به دلیل اختلاف جغرافیایی و سال انجام مطالعه باشد.

در مطالعه حاضر نتایج حاصل از PCR ژن های *tet* نشان داد که همه سویه هایی که نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین مقاوم بوده اند ژن های *tet* مورد بررسی را حمل می کردند. که مشابه نتایج به دست آمده دو مطالعه در سال ۲۰۰۴، (۲۵و۲۴) می باشدکه نشان دادند ژن های *tetA* و *tetB* با درصد متفاوتی در تمامی سویه های *ای. کولای* که به صورت فنوتیپی به تتراسایکلین مقاومت دارند، وجود دارد.

نتیجه گیری

شیوع نسبتا بالای مقاومت آنتی بیوتیکی *ای. کولای* یوروپاتوژنیک و همچنین درصد بالای ژن های مقاومت به تتراسایکلین در بیماران مبتلا به عفونت های ادراری در این مطالعه، می تواند نشان دهنده مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها باشد. نتایج نشان داد مقاومت به تتراسایکلین در جدایه های *ای. کولای* با منشا بیمارستانی نسبی است لیکن فراوانی ژن های مقاومت*tetA* و*tetB* با نسبت تقریبا یکسان رو به افزایش است.

تشکر و قدردانی: این پژوهش برگرفته از پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد است و نمونه های مورد بررسی با رضایت کامل اخذ شده اند. نویسندگان این مقاله مراتب تشکر خود را از تمام کسانی که در این پژوهش یاری کردند و همچنین پرسنل آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد گرگان اعلام می دارند.

REFERENCES

1.Wagenlehner FM, Hoyme U, Kaase M, Funfstuck R, Naber KG, Schmiemann G. Uncomplicated urinary tract infections. Dtsch. Arztebl. Int. 2011; 108(24): 415–23.

2.Balode A, Punda-Polic V, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility of gram-negative and gram-positive bacteria collected from countries in eastern Europe: Results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) 2004–2010. Int Journal Antimicrob Agent. 2013; 41(6):527–35.

3.Manuselis M. Text book of Diagnostic Microbiology :5th Edition. SAUNDERS, 2015

4.Leflon – Gibout v, Jurad C, Bonacorsi S, Espinasse F, Guelfi MC, et al. Emergence and spread of three clonally Related virulent Isolates of CTx-M-15-producing Escherichia edi with variable Resistance to Aminoglycosides and Tetracycline in a French Geriatric Hospital. Antimicrob Agents Cheomother. 2004; 48(10): 3736 – 42.

5.Markley JL and Wencewicz TA. Tetracyclines- Inactivating Enzymes. Front Microbiol .2018; 9:1058.

6.Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 22n Information Supplement, M100-S22, CLSI,Wayne,Pa, USA, 2012.

7.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. Antimicrob Agents Cheomother. 2012; 56(4): 2181-3.

8.Goudarzi V, Mirzaee M, Ranjbar R. O-serogrouping of Escherichia coli strains isolated from patients with Urinary tract infection by using PCR method. Iran J Med Microbiol. 2017; 10(6): 01-08.[Persian]

9.Agarwal J, Srivastava S, Singh M. Pathogenomics of uropathogenic Escherichia coli. Indian J Med Microbiol. 2012; 30(2):141-9.

10. Sharma AR, Bhatta DR, Shrestha J, Banjara MR. Antimicrobial susceptibility pattern of Escherichia coli isolated from uninary tract infected patients attending Bir hospital. Nepal J Sci Technol. 2013;14(1):177-84.

11.Farajnia S, Alikhani MY, Ghotaslou R, Naghili B, Nakhlband A. Causative agents and antimicrobial susceptibilities of urinary tract infections in the northwest of Iran. Int J Infect Dis. 2009; 13(2):140-4. [Persian]

12.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(5): 741–9.

13.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. [Persian]

14.Hosseini SMJ, Saberi M, Hosseini Doust SR, Yaribeigi H. Evaluation of antibiotic resistance in bacteria isolated from patients hospitalized in ImamKhomeini and burn hospitals in Ahvaz City, Iran.Qom Univ Med Sci J. 2014; 7(6): 21-6. [Persian]

15.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. [Persian]

16. Asgharian A . Investigation of antibiotic susceptibility pattern of *E.coli* isolated from urinary culture related to patients in the west of the Mazandaran province, during from September 2010 to September 2011. Experimental Animal Biol. 2014; 2(3): 25-32. [Persian]

17.Karami P, Aslani MM, Najafi Mosleh M, Alikhani MY. Determination pattern of antibiotic resistance in Entropathogenic Escherichia coli strains isolated from children with diarrhea. Avicenna J of clin Med. 2012; 19(1):27-31. [Persian]

18.Garcia PG, Silva VL, Diniz C.G. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic Escherichia coli in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. Journal Microbiol .2011; 49(1): 46-52.

19.Dancer SJ, Shears P, Platt DJ. Isolation and characterization of coliforms from glacial ice and water in Canada's high arctic. Journal Appl Microbiol. 1997; 85(2):597-609.

20.Blake D, Humphry R, Scott K, Hillman K, Fenlon D, Low J. Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal Escherichia coli populations. J Appl Microbiol. 2003; 94(6):1087-97.

21.Heidary M, Momtaz H, Madani M. Characterization of diarrheagenic antimicrobial resistant Escherichia coli isolated from pediatric patients in Tehran, Iran. Iran Red Crescent Med J .2014; 16(4):e12329.

22.Valizadeh E, Amini K. Survey and Identification of the Tetracycline Resistance Genes Instrains Enteropathogenic Escherichia coli Isolated from Diarrheal Children by Multiplex PCR and Determine Antibiotic Resistance. JIUMS. 2016; 24(2): 101-9. [Persian]

23.Hartman AB, Essiet II, Isenbarger DW, Lidler LE. Epidemiology of tetracycline resistance determinants in Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli: characterization and dissemination of tet(A)-1. JCM. 2003; 41(3):1023–32.

24.Bryan A, Shapir N, Sadowsky MJ. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical Escherichia coli strains isolated from diverse human and animal sources. Appl Environ Microbiol. 2004; 70(4):2503-7.

25.Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant Escherichia coli strains of human, animal, and food origins. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(10):3996-01.