مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها در میان سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در اصفهان در سال ۱۳۹۶

مهسا سرائیان[۱]، فاتح رحیمی[۲]*، علی قاسمی[۳]

۱- دانشجوی کارشناس ارشد میکروبیولوژی-میکروبیهای بیماریزا، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۲- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۳- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان

*نشانی برای مکاتبه: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، بخش میکروبیولوژی
f.rahimi@sci.ui.ac.ir

دریافت مقاله: **مرداد چهارصد** پذیرش برای چاپ: **مهر چهارصد**

چکیده

سابقه و هدف: *عفونتهای دستگاه ادراری به عنوان یک چالش جدی در سراسر جهان شناخته می شوند، که عمدتا ناشی از میزان بالای عود عفونت به واسطه توانایی سویه ها در تشکیل بیوفیلم است که منجر به مقاومت باکتریها نسبت به آنتی بیوتیکهای خط مقدم درمان از قبیل آمینوگلیکوزیدها می شود. آمینوگلیکوزیدها آنتی بیوتیکهای وسیع الطیفی هستند که از فعالیت ضد میکروبی مناسبی علیه اغلب باکتریهای گرم منفی مانند اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک برخوردار می باشند. این مطالعه با هدف تعیین الگوهای مقاومتی در میان سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در شهر اصفهان انجام گرفته است.*

روش کار: *در سال ۱۳۹۶ در مجموع ۱۶۶ جدایه اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک از آزمایشگاه یک بیمارستان مرجع در شهر اصفهان جمع آوری شدند. جدایه ها پس از کشت بر روی محیطهای ژلوز مک کانکی و ژلوز ائوزین متیلن بلو با استفاده از آزمون PCR مورد شناسایی قرار گرفتند. جهت تعیین توانایی تولید بیوفیلم در میان جدایه ها از آزمون کمی میکروتیتر پلیت استفاده شد و مقاومت سویه های مولد بیوفیلم نسبت به آنتی بیوتیکهای آمیکاسین، استرپتومایسین، توبرامایسین، جنتامایسین و کانامایسین به روش انتشار از دیسک و بر اساس دستورالعمل CLSI تعیین گردید.*

یافته‌ها: *تمامی جدایه ها با استفاده از آزمونهای فنوتیپی و PCR به عنوان اشرشیا کلای مورد تأیید قرار گرفتند و در مجموع ۳۹ سویه (۲۳ درصد) قادر به تشکیل بیوفیلم بودند که به ترتیب ۱۸، ۲۴ و ۵۶ درصد سویه ها مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند. همچنین، ۲۸ درصد سویه ها نسبت به تمامی آنتی بیوتیکهای مورد بررسی حساسیت نشان دادند و ۷۲ درصد سویه ها نیز نسبت به استرپتومایسین مقاوم بودند. همچنین، مقاومت نسبت به کانامایسین و آمیکاسین نیز به ترتیب ۳۶ و ۱۰ درصد بود. در مجموع ۷ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه ها تعیین گردید که الگوی شماره ۱ (مقاومت نسبت به استرپتومایسین) به عنوان الگوی غالب در این مطالعه انتخاب شد.*

نتیجه گیری: *نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده حضور و دوام سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم و مقاوم به آمینوگلیکوزیدها در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در بیمارستان مورد مطالعه در شهر اصفهان است. همچنین، آنتی بیوتیکهای توبرامایسین و جنتامایسین به عنوان مؤثرترین آنتی بیوتیکها بر علیه سویه های مولد بیوفیلم در این تحقیق انتخاب شدند.*

واژگان کلیدی: اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک، عفونت ادراری، آمینوگلیکوزیدها، بیوفیلم، آزمون میکروتیتر پلیت، توبرامایسین، جنتامایسین

مقدمه

عفونت دستگاه ادراری از رایجترین بیماریهای عفونی محسوب می شود که سالانه ۱۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان به آن مبتلا می شوند(۱). زنان ۳۰ برابر بیشتر از مردان به عفونت دستگاه ادراری مبتلا می شوند به طوریکه حدود نیمی از زنان حداقل یک بار در طول عمر آن را تجربه می کنند(۲). عفونت دستگاه ادراری توسط طیف وسیعی از عوامل بیماریزا شامل باکتریهای گرم مثبت، باکتریهای گرم منفی و همچنین برخی قارچها و گاهی توسط ویروسها ایجاد می شود(۱). در میان عوامل باکتریایی دخیل در ایجاد این عفونت، باکتری *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک یکی از شایعترین عوامل ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری است که در ۹۵ درصد از عفونتهای اکتسابی از جامعه و ۵۰ درصد از عفونتهای ادراری بیمارستانی دخالت دارد(۳). *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک به واسطه عوامل‌حدت متعدد خود در مجاری ادراری کلنیزه می شود و ممکن است به قسمتهای بالاتر دستگاه ادراری صعود کرده و باعث بروز سیستیت، پیلونفریت و نارسایی حاد کلیه شود(۴). سیستیت عفونت محدود به مثانه است که باعث تکرر ادرار، خروج ادرار همراه با سوزش و اضطرار در دفع ادرار می شود؛ همچنین، از علائم پیلونفریت نیز می توان به تب، حالت تهوع، استفراغ، بی حالی، درد در ناحیه پهلو و شکم و همچنین احتمال بروز باکتریمی اشاره کرد(۵). سابقه عفونت ادراری قبلی، فعالیت جنسی، چاقی، حساسیت ژنتیکی و عفونت واژینال از عوامل خطر مرتبط با سیستیت در زنان به شمار می روند(۶).

یکی از ویژگیهای مهم عفونتهای ادراری، عود عفونت است که این حالت بیشتر در کودکان و زنان رخ می دهد و معمولا عفونت مکرر در بیش از ۲۰ درصد زنان جوان مبتلا به سیستیت حاد ظاهر می شود. یکی از دلایل اصلی عود عفونت ادراری، توانایی تولید بیوفیلم توسط جدایه های *اشرشیا کلای* است. بیوفیلم ایجاد شده توسط این باکتری به عنوان عامل اصلی مقاومت باکتری در مجاری ادراری-تناسلی شناخته می شود. در مرحله اول تشکیل بیوفیلم، باکتریهای پلانکتونیک با واسطه فلاژل به سطوح میزبانی متصل می شوند که البته سایر ضمائم سطحی از جمله کورلای و فیمبریه نوع ۱ نیز به این اتصال کمک می کنند. همزمان با تکثیر سلولهای باکتریایی بیوفیلم، ماتریکس خارج سلولی از جنس پلی ساکاریدهای سلولز، پلی گلوکزآمین و اسید کلانیک توسط این سلولها تولید می شوند که در نهایت منجر به تشکیل بیوفیلمی بالغ با ساختار ماکروکلنی خواهند شد. تشکیل بیوفیلم به علت محدودیت نفوذ آنتی بیوتیکها به داخل ماتریکس، مقاومت باکتری را نسبت به عوامل ضد میکروبی و آنتی بیوتیکها افزایش می دهد(۷, ۸).

شیوع عفونتهای ادراری ناشی از جدایه های *اشرشیا کلای* که به طیف وسیعی از عوامل ضد میکروبی مقاوم هستند مدیریت بالینی عفونتهای دستگاه ادراری را پیچیده و مشکل کرده است. افزایش میزان مقاومت در میان عوامل بیماریزا در ادرار باعث افزایش نگرانی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه شده است. با این حال، الگوهای مقاومت در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت هستند و شناخت این الگوها در جوامع مختلف برای تشخیص الگوهای غیرمعمول یا جدید بسیار حیاتی و حائز اهمیت می باشد(۹). آمینوگلیکوزیدها به عنوان آنتی بیوتیکهای وسیع الطیف در برابر بسیاری از باکتریهای گرم منفی از جمله *اسینتوباکتر*، *پروتئوس*، *کلبسیلا*، *اشرشیا کلای*، *سیتروباکتر*، *سالمونلا*، *سودوموناس*، *پرووویدنسیا* و *شیگلا* و همچنین باکتریهای گرم مثبت حائز اهمیت از نظر بالینی مانند گونه های *استافیلوکوکوس* و همچنین *مایکوباکتریوم توبرکلوزیز* از فعالیت ضد باکتریایی بالایی برخوردار می باشند(۱۰).

آمینوگلیکوزیدها اغلب همراه با آنتی بیوتیکهای بتالاکتام (اثر هم افزایی) جهت درمان عفونتهای ناشی از *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مورد استفاده قرار می گیرند که با اتصال به زیر واحد 30s ریبوزوم باعث مهار پروتئین سازی در باکتری شده و منجر به مرگ باکتری می شوند(۱۱). جذب آمینوگلیکوزیدها از طریق دستگاه گوارش پایین است، بنابراین این آنتی بیوتیکها از طریق داخل وریدی و عضلانی تزریق می شوند و تقریبا به طورکامل از طریق مسیر کلیه ها دفع می شوند که این امر آنها را به یک گزینه مناسب برای درمان عفونت ادراری تبدیل می کند (۱۲). ظهور سویه های *اشرشیا کلای* مقاوم به آمینوگلیکوزیدها از اهمیت بالینی فراوانی برخوردار است. سازوکارهای مختلف مقاومت به آمینوگلیکوزیدها مشتمل بر حضور آنزیمهای تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز (AAC) ،آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفراز (ANT) و آمینوگلیکوزید فسفوریل ترانسفراز (APH))، پمپ افلاکس، کاهش نفوذ پذیری غشاء خارجی و جایگزینی اسیدهای آمینه در پروتئینهای ریبوزومی می باشند(۱۳). این مطالعه با هدف تعیین مقاومت نسبت به خانواده آمینوگلیکوزیدها در میان سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به یک بیمارستان مرجع در شهر اصفهان در طی سال ۱۳۹۶ به انجام رسیده است.

روش کار

در طی سال ۱۳۹۶ در مجموع ۱۶۶ جدایه *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک به صورت هفتگی از آزمایشگاه یک بیمارستان مرجع در شهر اصفهان جمع آوری گردید و با رعایت شرایط استاندارد به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان منتقل شد. تمامی این جدایه ها از بیماران بستری و سرپایی مبتلا به عفونت ادراری جداسازی شده بودند. به منظور شناسایی و تأیید این جدایه ها در ابتدا هر جدایه بر روی محیط ژلوز مک کانکی (Merck, Germany) کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، کلنیهای صورتی رنگ بر روی محیط

ژلوز ائوزین متیلن بلو (Merck, Germany) کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت کلنیهای ارغوانی تیره که واجد جلای سبز فلزی بودند به عنوان جدایه های *اشرشیا کلای* مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند. در نهایت، به منظور شناسایی قطعی و تأیید نهایی این جدایه ها از آزمون PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *tuf*A استفاده گردید.

جهت استخراج DNA از جدایه هایی که به عنوان *اشرشیا کلای* مورد شناسایی اولیه قرار گرفته بودند از روش جوشاندن و بر اساس دستورالعمل قاسمی و همکاران استفاده گردید (۱۴). بر این اساس، یک کلنی از هر جدایه باکتریایی در یک میکروتیوب استریل حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد و به خوبی ورتکس گردید و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. سپس میکروتیوبها به مدت ۱۵ دقیقه در g × ۱۲۵۰۰ سانتریفیوژ شدند و در نهایت ۲ میکرولیتر از مایع رویی به عنوان الگوی DNA جهت انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور شناسایی قطعی جدایه هایی که واجد کلنیهای صورتی رنگ بر روی محیط ژلوز مک کانکی و ارغوانی تیره بر روی محیط ژلوز ائوزین متیلن بلو بودند از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *tuf*A استفاده گردید. چرخه حرارتی و ترکیب مواد مختلف بر اساس دستورالعمل پیشین Vareille و همکاران بود(۱۵).

جهت سنجش توانایی تولید بیوفیلم در میان سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری از آزمون کمی میکروتیتر پلیت و بر اساس دستورالعمل قاسمی و همکاران استفاده گردید (۱۴). برای این منظور پس از کشت سه گانه هر سویه باکتریایی در چاهکهای میکروپلیت ۹۶ خانه، جذب نوری هر چاهک (ODs و ODnc) در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا (Stat Fax 2100) مورد سنجش و محاسبه قرار گرفت. در نهایت اگر 4ODnc<ODs، 2ODnc<ODs<4ODnc و ODnc<ODs<2ODnc و ODs<ODnc بود سویه ها به ترتیب به عنوان مولد بیوفیلم قوی، بیوفیلم متوسط، بیوفیلم ضعفی و بیوفیلم منفی طبقه‌بندی شدند.

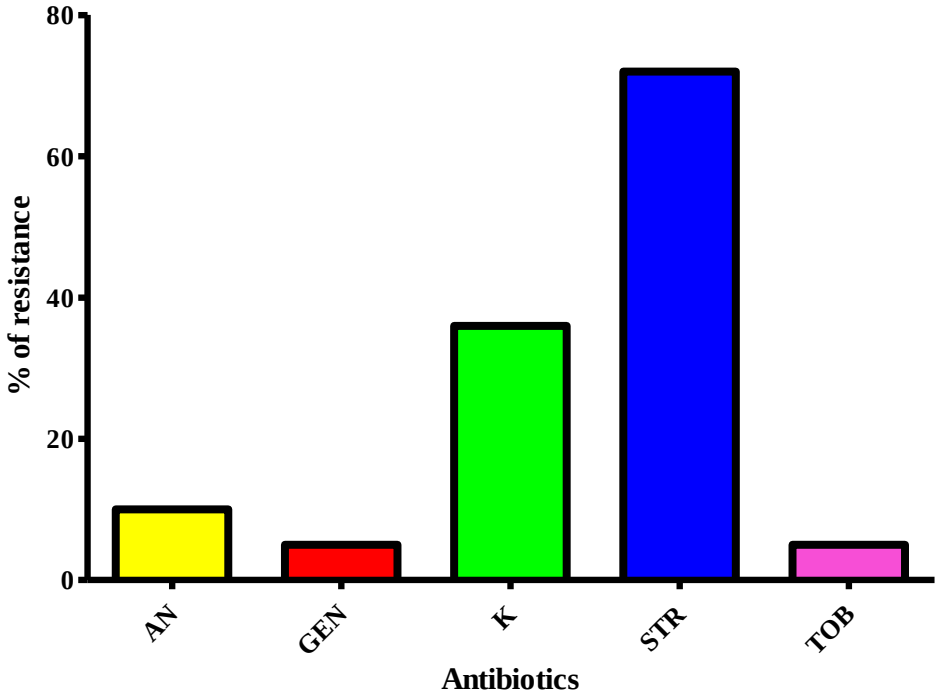
برای تعیین مقاومت سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم نسبت به آنتی بیوتیکهای آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم) و کانامایسین (۳۰ میکروگرم) از روش انتشار از دیسک و بر اساس توصیه های Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) استفاده گردید(۱۶). دیسکهای آنتی بیوتیکی انتخاب شده جهت این مطالعه از شرکت پادتن طب تهیه شدند و صحت عملکرد این دیسکها به صورت تصادفی با دیسکهای آنتی بیوتیکی شرکت Mast (UK) مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها

در این مطالعه تمامی ۱۶۶ جدایه *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک جمع آوری شده از آزمایشگاه بیمارستان مرجع مورد مطالعه در شهر اصفهان بر روی محیط ژلوز مک کانکی و ژلوز ائوزین متیلن بلو به ترتیب واجد کلنیهای صورتی و ارغوانی تیره همراه با جلای سبز فلزی بودند و در آزمون PCR نیز واجد باند ۲۰۰ جفت بازی بودند و به عنوان سویه های *اشرشیا کلای* مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند. بنابراین نتایج حاصل از آزمون PCR و کشت بر روی محیطهای اختصاصی کاملا بر هم منطبق بودند.

از مجموع ۱۶۶ سویه *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک جمع آوری شده، ۳۹ سویه (۲۳ درصد) قادر به تشکیل بیوفیلم (قوی، متوسط و ضعیف) بودند و ۱۲۷ سویه (۷۷ درصد) نیز بیوفیلم منفی بودند (ODs>ODnc). همچنین، ۷ سویه (۱۸ درصد) مولد بیوفیلم قوی، ۱۰ سویه (۲۶ درصد) مولد بیوفیلم متوسط و ۲۲ سویه (۵۶ درصد) مولد بیوفیلم ضعیف بودند.

بیشترین میزان مقاومت نسبت به استرپتومایسین مشاهده شد و ۲۸ سویه (۷۲ درصد) نسبت به این آنتی بیوتیک مقاوم بودند و پس از آن مقاومت نسبت به کانامایسین (۳۶ درصد) و آمیکاسین (۱۰ درصد) در مراتب بعدی قرار داشتند(شکل ۱). همچنین، ۱۱ سویه (۲۸ درصد) نسبت به تمامی آنتی بیوتیکهای حساسیت نشان دادند. علاوه بر این، ۵ درصد سویه ها نیز (۲ سویه) نسبت به جنتامایسین و توبرامایسین مقاوم بودند.



نمودار ۱- توزیع سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران در اصفهان براساس مقاومت به آمینوگلیکوزیدها. ۱۳۹۶
اختصارات عبارتند از: AN: آمیکاسین، GEN: جنتامایسین، K: کانامایسین، STR: استرپتومایسین، TOB: توبرامایسین.

در مجموع ۷ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه ها شناسایی گردید(جدول ۱). بر این اساس مشخص گردید که ۱۳ سویه (۳۳ درصد) تنها نسبت به آنتی بیوتیک استرپتومایسین مقاوم بودند و ۲ سویه (۶ درصد) نیز نسبت به ۴ آنتی بیوتیک (الگوهای مقاومتی ۶ و ۷) مقاومت نشان دادند. همچنین، ۱۰ سویه (۲۶ درصد) و ۳ سویه (۸ درصد) نیز به ترتیب نسبت به ۲ (الگوهای مقاومتی ۲ و۳) و ۳ (الگوهای مقاومتی ۴ و ۵) آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند. بنابراین، الگوی شماره ۱ (مقاومت نسبت به استرپتومایسین) به عنوان الگوی غالب در این مطالعه تعیین گردید.

جدول ۱. الگوی مقاومت به آمینوگلیکوزید ها در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران در اصفهان.۱۳۹۶

الگوی مقاومت	تعداد آنتی بیوتیک	نام آنتی بیوتیک	تعداد جدایه (درصد)
۱	۱	STR	۱۳ (۳۳)
۲	۲	STR, K	۹ (۲۳)
۳		STR, AN	۱ (۳)
۴	۳	STR, AN, K	۲ (۵)
۵		STR, K, GEN	۱ (۳)
۶	۴	STR, K, GEN, TOB	۱ (۳)
۷		STR, AN, K, TOB	۱ (۳)

اختصارات عبارتند از: AN: آمیکاسین، GEN: جنتامایسین، K: کانامایسین، STR: استرپتومایسین، TOB: توبرامایسین.

بحث

اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک از مهم ترین عوامل باکتریایی ایجاد عفونت دستگاه ادراری محسوب می شود. مطالعات اخیر نشان داده است که تولید بیوفیلم در اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک یک فاکتور حدت مهم است که به واسطه بیان همزمان کورلای و سلولز در این باکتری و احاطه شدن ارگانیسمها با یک ماتریکس خارج سلولی آبگریز، باعث بقاء طولانی مدت آن در دستگاه ادراری می شود که در عود عفونت و افزایش مقاومت در برابر آنتی بیوتیکها نقش بسیار مهمی ایفا می نماید (۱۷). در حال حاضر ظهور و انتشار سریع باکتریهای بیماریزای مقاوم به آنتی بیوتیکها، یکی از مهمترین تهدیدات برای سلامتی انسان محسوب می شوند. طی سالیان اخیر به علت استفاده گسترده از آنتی بیوتیکها، ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی تحت فشار انتخابی محیط تکامل یافته اند و به میزان بالایی در گروه های میکروبی مختلف گسترده شده اند. ویژگیهای ساختاری بیوفیلم از جمله کاهش انتشار و نفوذ دارو از طریق ماتریکس پلی ساکاریدی، افزایش انتقال ژنهای مقاومت، بیان بیشتر پمپهای افلاکس و کاهش میزان رشد و فعالیت متابولیکی سلولهای بیوفیلم در مجموع باعث افزایش میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در بیوفیلمهای باکتریایی شده است (۸).

آمینوگلیکوزیدها آنتی بیوتیکهای وسیع الطیفی هستند که نخستین بار در دهه ۱۹۴۰ (استرپتومایسین) معرفی شدند و نقش مهمی در درمان عفونتهای ناشی ازباکتریهای گرم منفی ایفا می نمایند و در طی چند دهه گذشته فعالیت بالینی بسیار خوبی را در برابر بیشتر عوامل بیماریزا از جمله انتروباکتریاسه های (به خصوص اشرشیا کلای) مقاوم به آنتی بیوتیکها نشان داده اند (۱۸). با این حال مقاومت آنتی بیوتیکی یک مسئله قابل توجه و رو به رشد در سراسر جهان است. لذا بررسی مقاومت به آنتی بیوتیکها ابزاری موثر در مدیریت و پیشگیری از بیماریهای باکتریایی محسوب می شود. بر این اساس مطالعات مختلفی در ایران و جهان جهت تعیین مقاومت جدایه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم صورت گرفته است. در مطالعه پورسینا و همکاران در اصفهان مشخص گردید که ۲۹، ۳۴ و ۱۷ درصد از جدایه های اشرشیا کلای جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری به ترتیب قادر به تشکیل بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند و همچنین مقاومت به آمیکاسین و جنتامایسین نیز در آن مطالعه به ترتیب ۱۱ و ۲۰ درصد گزارش شد (۱۹). Raya و همکاران در نپال نشان دادند که مقاومت به آنتی بیوتیک آمیکاسین در میان جدایه های اشرشیا کلای مولد بیوفیلم و فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم به ترتیب ۱۲/۳ و ۱۱ درصد بود که تا حدودی منطبق بر یافته های مطالعه حاضر بود (۲۰). در مطالعه نویی اسکویی و همکاران در تبریز، از میان ۱۲۰ جدایه اشرشیا کلای که توانایی تشکیل بیوفیلم در آنها با روش میکروتیتر پلیت مورد ارزیابی قرار گرفته بود، مشخص شد که ۱۵ درصد جدایه ها قادر به تشکیل بیوفیلم قوی بودند و ۱۱/۷ و ۵۸/۳ درصد جدایه ها نیز بیوفیلم متوسط و ضعیف تشکیل دادند. همچنین، مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای جنتامایسین، توبرامایسین و آمیکاسین نیز به ترتیب ۳۴/۲، ۱۹/۲ و ۰/۸ درصد گزارش گردید (۲۱). شهبازی و همکاران در تهران با استفاده از روش میکروتیتر پلیت توانایی تشکیل بیوفیلم در میان جدایه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که ۱۵/۸، ۲۲/۵ و ۳۸/۴ درصد جدایه ها به ترتیب قادر به تشکیل بیوفیلم قوی، بیوفیلم متوسط و بیوفیلم ضعیف بودند. همچنین، ۲۳/۳ درصد جدایه ها نیز فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم بودند.علاوه بر این، حساسیت نسبت به کانامایسین، آمیکاسین و جنتامایسین نیز به ترتیب ۲۸/۳، ۱۰۰ و ۷۷/۵ درصد گزارش گردید (۲۲). در مطالعه Tewawong و همکاران در تایلند مشخص گردید که ۳۸ درصد از جدایه های اشرشیا کلای مولد بیوفیلم نسبت به جنتامایسین مقاوم بودند و تمامی جدایه ها نسبت به آمیکاسین حساسیت نشان دادند (۲۳). در مطالعه سلیمانی و همکاران در سال ۲۰۱۶ در تهران، مقاومت نسبت به توبرامایسین، کانامایسین، جنتامایسین، نتیل مایسین و آمیکاسین در میان جدایه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک به ترتیب ۲۴/۶، ۲۳/۱، ۲۱، ۶/۱ و ۳/۶ درصد گزارش گردید (۱۱). همتی و همکاران در ایلام با مطالعه ۲۷۰ جدایه اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک جداسازی شده از ادرار بیماران سرپایی مبتلا به عفونت ادراری نشان دادند که ۵۶، ۳۹/۶۴، ۳/۹ و ۱۰/۰۴ درصد از جدایه ها به ترتیب نسبت به نالیدیکسیک اسید، سپروفلوکساسین، آمیکاسین و جنتامایسین مقاوم بودند (۲۴). دهبانی پور و همکاران در سال ۲۰۱۶ در اصفهان مقاومت نسبت به آمیکاسین و جنتامایسین را در میان جدایه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک به ترتیب ۲/۲ و ۱۶/۵ درصد گزارش کردند (۲۵). در مطالعه دیگری که در ایران توسط تاج بخش و همکاران انجام گرفت، میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای جنتامایسین و آمیکاسین در میان ۱۳۰ جدایه اشرشیا کلای جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری به ترتیب ۱۸/۷۵ و ۳۸/۷۵ درصد تعیین گردید. همچنین، در آن مطالعه ۱۸/۷۵ درصد جدایه ها قادر به تشکیل بیوفیلم قوی بودند و ۲۵ و ۵۶/۲۵ درصد جدایه ها نیز به ترتیب بیوفیلم متوسط و بیوفیلم ضعیف تشکیل دادند (۲۶).Ponnusamy و همکاران در هند مقاومت به آنتی بیوتیکهای آمیکاسین، جنتامایسین و توبرامایسین را در بین جدایه های اشرشیا کلای مولد بیوفیلم به ترتیب ۷۰، ۸۶ و ۶۶ درصد گزارش کردند (۲۷). به طور کلی دلیل تفاوت در نتایج حاصل از فراوانی جدایه های مولد بیوفیلم و همچنین تفاوت در مقاومت به آنتی بیوتیکهای مختلف را می توان ناشی از تفاوت در پراکندگی کلون تایپهای متفاوت از جدایه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک در شهرها و کشورهای مختلف، تفاوت در سطح بهداشت در نقاط مختلف کشور، تفاوت در سیاستهای کنترل عفونت در بیمارستانها و همچنین روشهای مختلف بررسی در مطالعات

انجام گرفته دانست. همچنین، روش میکروتیتر پلیت یک روش اختصاصی و حساس و جهت توانایی سنجش تولید بیوفیلم در میان جدایه های باکتریایی (گرم مثبت و گرم منفی) می باشد که در مقایسه با روش ژلوز قرمز کنگو از خساسیت و اختصاصیت بالاتری برخوردار می باشد. بنابراین توصیه می گردد که از روش کیفی ژلوز قرمز کنگو جهت غربالگری تولید کورلای و سلولز و از روش کمی میکروتیتر پلیت جهت سنجش تولید بیوفیلم استفاده گردد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده حضور و دوام سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم و مقاوم به آمینوگلیکوزیدها در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در بیمارستان مورد مطالعه در شهر اصفهان است. با توجه به افزایش مقاومت نسبت به این خانواده آنتی بیوتیکی، تشخیص سریع و صحیح سویه های مقاوم در جلوگیری از گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی کاملا ضروری می باشد. از این رو، شناسایی عوامل حدت، بررسی توانایی تولید بیوفیلم، شناخت الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری و همچنین آگاهی از روابط فیلوژنی و بررسیهای همه گیرشناسی در بین جدایه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک در انتخاب راهکار درمانی مناسب توسط پزشکان و جلوگیری از گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی در جوامع از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. بنابراین، به منظور پیشگیری از گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی و مصرف نابجای آنتی بیوتیکها توصیه می گردد که حتما تجویز دارو بر اساس نتایج آزمون بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی ارائه شده توسط آزمایشگاه باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان به انجام رسیده است.

REFERENCE

1. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature Reviews Microbiology. 2015;13(5):269-84.
2. Tan CW, Chlebicki MP. Urinary tract infections in adults. Singapore Medical Journal. 2016;57(9):485-90.
3. Kot B. Antibiotic resistance among uropathogenic *Escherichia coli*. Polish Journal of Microbiology. 2019;68(4):403-15.
4. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. International Journal of Nephrology. 2012;2012:681473.
5. Rasko DA, Phillips JA, Li X, Mobley HLT. Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: probes specific for uropathogenic populations. Journal of Infectious Diseases. 2001;184(8):1041-9.
6. Khan MI, Xu S, Ali MM, Ali R, Kazmi A, Akhtar N, et al. Assessment of multidrug resistance in bacterial isolates from urinary tract-infected patients. Journal of Radiation Research and Applied Sciences. 2020;13(1):267-75.
7. Soto SM. Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. Advances in Biology. 2014;2014:1-13.

8. González MJ, Robino L, Iribarnegaray V, Zunino P, Scavone P. Effect of different antibiotics on biofilm produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection. Pathogens and Disease. 2017;75(4):1-9.
9. Farshad S, Anvarinejad M, Mehrabi A, Japoni A, Hoseini M, Shahidi M. Molecular epidemiology of *E. coli* strains isolated from urinary tract infections in children. Pars Journal of Medical Sciences. 2009;7(1 and 2):15-27.
10. Takahashi Y, Igarashi M. Destination of aminoglycoside antibiotics in the 'post-antibiotic era'. Journal of Antibiotics. 2018;71(1):4-14.
11. Soleimani N, Aganj M, Ali L, Shokoohizadeh L, Sakinc T. Frequency distribution of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes in uropathogenic *E. coli* isolated from Iranian hospital. BMC Research Notes. 2014;7:842.
12. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: an overview. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2016;6(6):a027029.
13. Sadeghi M, Sedigh Ebrahim-Saraie H, Mojtahedi A, Nikokar I, Atrkar Roushan Z. Genetic diversity and prevalence of aminoglycoside modifying enzymes among *Escherichia coli* strains isolated from inpatients with urinary tract infections. Gene Reports. 2020;21:100957.
14. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Biofilm formation and frequency of fimbrial genes among *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection in Zahedan during 2017. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2021;25(91):1-14.
15. Vareille M, de Sablet T, Hindré T, Martin C, Gobert AP. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007;104(24):10199-204.
16. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2018.
17. Kudinha T. The pathogenesis of *Escherichia coli* urinary tract infection. *Escherichia coli* - Recent advances on physiology, pathogenesis and biotechnological applications: Amidou Samie, IntechOpen; 2017. p. 45-68.
18. Goodlet KJ, Benhalima FZ, Nailor MD. A Systematic review of single-dose aminoglycoside therapy for urinary tract infection: Is it time to resurrect an old strategy? Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2018;63(1):1-9.
19. Poursina F, Sepehrpour S, Mobasherizadeh S. Biofilm formation in nonmultidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection in Isfahan, Iran. Advanced Biomedical Research. 2018;7:40.
20. Raya S, Belbase A, Dhakal L, Govinda Prajapati K, Baidya R, kishor Bimali N. In-Vitro biofilm formation and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in diabetic and nondiabetic patients. BioMed Research International. 2019;2019:1474578.
21. Noie Oskouie A, Hasani A, Ahangarzadeh Rezaee M, Soroush Bar Haghi MH, Hasani A, Soltani E. A relationship between O-serotype, antibiotic susceptibility and biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*. Microbial Drug Resistance. 2019;25(6):951-8.
22. Shahbazi S, Asadi Karam MR, Habibi M, Talebi A, Bouzari S. Distribution of extended-spectrum β-lactam, quinolone and carbapenem resistance genes, and genetic diversity among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Tehran, Iran. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2018;14:118-25.
23. Tewawong N, Kowaboot S, Pimainog Y, Watanagul N, Thongmee T, Poovorawan Y. Distribution of phylogenetic groups, adhesin genes, biofilm formation, and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients in Thailand. PeerJ. 2020;8:e10453.
24. Hemati S, Shams M, Rahmatian A, Nourmohammadi H, Abdoli A, Maleki F, et al. The patterns of aminoglycoside and fluoroquinolones resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates. Journal of Basic Research in Medical Science. 2020;7(2):7-12

25. Dehbanipour R, Rastaghi S, Sedighi M, Maleki N, Faghri J. High prevalence of multidrug-resistance uropathogenic *Escherichia coli* strains, Isfahan, Iran. Journal of Natural Science, Biology and Medicine. 2016;7(1):22-6.
26. Tajbakhsh E, Ahmadi P, Abedpour-Dehkordi E, Arbab-Soleimani N, Khamesipour F. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. Antimicrobial Resistance and Infection Control. 2016;5:11.
27. Ponnusamy P, Natarajan V, Sevanan M. In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2012;5(3):210-3.