فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی و ژنهای رمزکننده اینتگرونها در میان سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در تهران در سال ۱۴۰۰

فاتح رحیمی[۱]*، علی قاسمی[۲]

۱- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۲- دکتری تخصصی میکروبیولوژی، استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان
*نشانی برای مکاتبه: f.rahimi@sci.ui.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: *عفونتهای دستگاه ادراری از جمله شایعترین عفونتهای شدید باکتریایی هستند که در مراکز درمانی در سراسر جهان مشاهده می شوند. اشرشیا کلای به عنوان شایعترین باکتری بیماریزای ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری شناخته می شود. مقاومت آنتی بیوتیکی منجر به افزایش هزینه های پزشکی، اقامت طولانی مدت در بیمارستان و افزایش مرگ و میر می شود. عفونتهای ادراری ناشی از سویه های اشرشیا کلای مولد آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف از چالشهای عمده درمانی و اپیدمیولوژیک محسوب می شوند. در این مطالعه شیوع سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر تهران، تعیین شد. علاوه بر این، مقاومت آنتی بیوتیکی و وجود کلاسهای مختلف اینتگرونها نیز در میان سویه ها مورد ارزیابی قرار گرفت.*

روش کار: *در طی سال ۱۴۰۰ در مجموع ۱۲۶ جدایه مشکوک به اشرشیا کلای از نمونه های ادراری بیماران مبتلا به عفونت ادراری از آزمایشگاه یک بیمارستان در شهر تهران جمع آوری شدند و با استفاده از آزمونهای فنوتایپی و PCR با پرایمر اختصاصی ژن tufA مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند. مقاومت سویه ها نسبت به ۱۷ آنتی بیوتیک به روش انتشار دیسک و بر اساس دستورالعمل CLSI تعیین گردید و سویه های مقاوم به سفتازیدیم و سفوتاکسیم جهت شناسایی سویه های مولد ESBL با استفاده از دیسکهای ترکیبی سفتازیدیم-کلاوولانیک اسید و سفوتاکسیم-کلاوولانیک اسید مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تعیین وجود اینتگرونهای کلاس I-III از آزمونهای PCR جداگانه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد.*

یافته ها: *تمامی ۱۲۶ جدایه مورد بررسی با استفاده از آزمون PCR به عنوان سویه های اشرشیا کلای مورد تأیید قرار گرفتند. همه سویه ها (۱۰۰ درصد) نسبت به آمپی سیلین مقاوم بودند و پس از آن بیشترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیکهای سفتریاکسون، سفپودوکسیم، سفتازیدیم و سفوتاکسیم مشاهده شد. همچنین، سویه های اشرشیا کلای کمترین میزان مقاومت را نیز به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیکهای مروپنم، ایمی پنم و کانامایسین نشان دادند. علاوه بر این، ۷۵ درصد سویه ها به عنوان مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف مورد شناسایی قرار گرفتند و هر ۳ کلاس اینتگرون در میان سویه ها شناسایی گردید و اینتگرون کلاس I به عنوان غالبترین کلاس تعیین گردید.*

نتیجه گیری: *نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده شیوع بالای سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک واجد کلاسهای مختلف اینتگرونها و مقاوم به آنتی بیوتیکهای خط اول درمانی در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر تهران است. ظهور و انتشار سریع باکتریهای بیماریزای مقاوم به آنتی بیوتیکها، یکی از مهمترین تهدیدات برای سلامتی انسان محسوب می شوند.*

کلمات کلیدی: عفونت ادراری، اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک، مقاومت آنتی بیوتیکی، بتالاکتاماز وسیع الطیف، اینتگرونها

مقدمه

عفونتهای دستگاه ادراری از جمله شایعترین عفونتهای شدید باکتریایی در سراسر جهان به شمار می روند و سالانه بیش از ۱۵۰ میلیون مورد ابتلا به عفونت ادراری در جهان گزارش می شود که این آمار از نظر درمانی و اقتصادی بسیار حائز اهمیت است (۱). جنسیت مؤنث، استفاده طولانی مدت از سوندهای ادراری، سرکوب سیستم ایمنی، دیابت و ناهنجاریهای دستگاه

ادراری از مهمترین عوامل خطر برای عفونت دستگاه ادراری محسوب می شوند (۲). بروز عفونتهای ادراری در دوران کودکی نیز شایع است و در سال اول زندگی در پسران و دختران به طور یکسان بروز می کند. همچنین، عفونتهای ادراری دومین عفونت باکتریایی شایع در کودکان در طول هفت سال اول زندگی محسوب می شود و میزان ابتلا در دخترها بیشتر از پسرها می باشد. باکتری *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک به عنوان مهمترین و غالبترین باکتری عامل ایجاد عفونت ادراری در جهان شناخته می شود و باعث ایجاد عفونتهای تک گیر و عود شونده در بیماران می شود (۳). علیرغم اینکه عفونتهای ادراری عموما با استفاده از آنتی بیوتیکهای معمول درمان می شوند، اما افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتریها به یک نگرانی اصلی در جهان تبدیل شده است که باعث ظهور مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک و در نهایت عود عفونت می شود (۱, ۳). مقاومت آنتی بیوتیکی منجر به اقامت طولانی مدت در بیمارستان، افزایش هزینه های درمانی و افزایش میزان مرگ و میر بیماران می شود که این امر ناشی از استفاده نامناسب و بیش از حد از آنتی بیوتیکها، ناکارآمدی روشهای پیشگیری و کنترل عفونت و ویژگیها و خصوصیات باکتریها است (۴). آنتی بیوتیکهای خانواده آمینوگلیکوزیدها و فلوروکوینولونها به عنوان خطوط اول درمان تجربی بسیاری از عفونتهای ادراری در سراسر دنیا شناخته می شوند (۵) و امروزه شیوع جدایه های *اشرشیا کلای* مقاوم به فلوروکوینولونها و آمینوگلیکوزیدها در اکثر نقاط دنیا به یک معضل بهداشتی بسیار مهم تبدیل شده است (۱, ۶). علاوه بر این، شیوع روزافزون عفونتهای ادراری ناشی از سویه های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف نیز یکی دیگر از مهمترین چالشهای بهداشتی محسوب می شود که منجر به محدود شدن قابل توجه گزینه های درمانی شده و با افزایش نرخ مرگ و میر بیماران نیز همراه می باشد (۳).

اینتگرونها از عوامل مهم گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی به ویژه در میان باکتریهای بیماریزای گرم منفی محسوب می شوند که از طریق عناصر ژنتیکی متحرک مانند ترانسپوزونها و پلاسمیدها در میان جدایه های باکتریایی منتقل می گردند (۷). اینتگرونها شامل دو گروه اصلی اینتگرونهای متحرک و سوپراینتگرونها می باشند. اینتگرونهای متحرک دارای کاستهای ژنی محدودی هستند و معمولاً ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی را رمزگذاری می کنند و تحرک آنها وابسته به ترانسپوزونها یا پلاسمیدها می باشد؛ اما سوپر اینتگرونها واجد کاستهای ژنی متعدد هستند و هیچگونه مقاومت آنتی بیوتیکی را رمزگذاری نمی کنند و بیشتر مرتبط با تکامل ژنومی هستند. تاکنون بیش از ۹ کلاس از اینتگرونها در باکتریهای گرم منفی شناسایی شده است، اما تنها ۴ کلاس اصلی مرتبط با جدایه های بالینی می باشند. در بین کلاسهای مختلف اینتگرونها، کلاسهای I، II و III از فراوانی و اهمیت بالاتری برخوردار هستند و در گسترش مقاومت حائز اهمیت می باشند (۸). بر این اساس، این مطالعه با هدف تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی کلاسهای مختلف اینتگرونها در میان سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر تهران در سال ۱۴۰۰ به انجام رسیده است.

مواد و روش‌ها

شناسایی جدایه های *اشرشیا کلای*

در این مطالعه در بازه زمانی اردیبهشت لغایت آبان سال ۱۴۰۰ در مجموع ۱۲۶ جدایه مشکوک به *اشرشیا کلای* از نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری در آزمایشگاه یک بیمارستان دانشگاهی در شهر تهران جداسازی شدند و پس از جمع آوری پلیتها به صورت هفتگی به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان منتقل شدند. تمامی بیماران با علائم سوزش و تکرر ادرار، کدورت ادرار، بعضا هماچوری و گاها تب به پزشک مراجعه کرده بودند که جهت بررسی باکتریولوژیک به آزمایشگاه ارجاع داده شده بودند. در ابتدا کشت خالص از تمامی جدایه ها بر روی محیط کشت ژلوز مک کانکی تهیه گردید و سپس جدایه های واجد کلنیهای صورتی رنگ بر روی محیط کشت ژلوز ائوزین متیلن بلو کشت داده شدند و کلنیهای ارغوانی واجد جلای فلزی به عنوان جدایه های *اشرشیا کلای* انتخاب شده و جهت بررسیهای بیشتر در محیط مغذی واجد ۲۵ درصد گلیسرول در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۳). به منظور شناسایی و تأیید نهایی جدایه ها از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید (۴).

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک نسبت به ۱۷ آنتی بیوتیک مختلف به روش انتشار دیسک و بر اساس دستورالعمل CLSI انجام گرفت (۹). آنتی بیوتیکهای مورد استفاده در این مطالعه از شرکت Cypress diagnostics (بلژیک) تهیه شدند و شامل آمپی سیلین (AM 10 µg)، آموکسی سیلین/کلاوولانیک اسید (AMC 30/10 µg)،

آمیکاسین (AK 30 µg)، افلوکساسین (OFX 5 µg)، ایمی پنم (IMP 10 µg)، پیپراسیلین/تازوباکتام (TPZ 100/10 µg)، جنتامایسین (GN 10 µg)، سفتازیدیم (CAZ 30 µg)، سفپودوکسیم (CPD 10µg)، سفتریاکسون (CRO 30 µg)، سفوتاکسیم (CTX 30 µg)، سفوکسیتین (FOX 30 µg)، سولفامتوکسازول/تری متوپریم (SXT 30/10 µg)، سیپروفلوکساسین (CIP 5 µg)، کانامایسین (KA 30 µg)، لووفلوکساسین (LEV 5 µg) و مروپنم (MEM 10 µg) بودند. همچنین پس از تعیین مقاومت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای سفتازیدیم و سفوتاکسیم جهت تعیین سویه های مولد ESBL از دیسکهای آنتی بیوتیکی ترکیبی سفتازیدیم-کلاوولانیک اسید (µg 10-30) و سفوتاکسیم-کلاوولانیک اسید (µg 10-30) استفاده گردید (۹).

آزمونهای مولکولی

استخراج DNA

استخراج DNA در این مطالعه به روش جوشاندن و بر اساس دستورالعمل پیشین قاسمی و همکاران انجام گرفت (۳). برای این منظور یک کلنی از کشت تازه باکتریایی به میکروتیوب واجد ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد و به خوبی ورتکس گردید. سپس میکروتیوبها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموبلاک با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد جوشانده شدند و پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور g × 13000 از مایع رویی به عنوان الگوی DNA جهت انجام آزمونهای مختلف PCR استفاده گردید.

شناسایی سویه های *اشرشیا کلای*

پس از انتخاب کلنیهای مشکوک به *اشرشیا کلای* بر روی محیطهای ژلوز مک کانکی و ژلوز ائوزین متیلن بلو از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *tuf*A بر اساس دستورالعمل پیشین (جدول ۱) استفاده گردید (۴).

تعیین ژنهای اینتگرونهای کلاس I، II و III

جهت تعیین حضور ژنهای اینتگرونهای کلاس I، II و III در میان سویه های *اشرشیا کلای* از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و برنامه حراتی (جدول ۱) معرفی شده توسط Su و همکاران استفاده شد (۱۰).

جدول ۱- توالی پرایمرها و برنامه حرارتی مورد استفاده در آزمونهای PCR.

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه (جفت باز)	برنامه حرارتی
	F: 5´-TGGTTGATGACGAAGAGCTG		
	R: 5´-GCTCTGGTTCCGGAATGTAA		
	F: 5´-ACGAGCGCAAGGTTTCGGT		
	R: 5´-GAAAGGTCTGGTCATACATG		
	F: 5´-GTGCAACGCATTTTGCAGG		
	R: 5´-CAACGGAGTCATGCAGATG		
	F: 5´-CATTTGTGTTGTGGACGGC		
	R: 5´-GACAGATACGTGTTTGGCAA		

نتایج

شناسایی سویه ها

بر اساس نتایج حاصل از کشت جدایه ها مشخص گردید که تمامی ۱۲۶ جدایه جمع آوری شده بر روی محیطهای ژلوز مک کانکی و ژلوز ائوزین متیلن بلو به ترتیب واجد کلنیهای صورتی رنگ و همچنین ارغوانی با جلای فلزی بودند. همچنین، ژن tufA در میان همه جدایه ها شناسایی گردید و تمامی ۱۲۶ جدایه به عنوان سویه های اشرشیا کلای مورد تأیید قرار گرفتند. بنابراین نتایج آزمونهای کشت و مولکولی در این مطالعه کاملا بر هم منطبق بودند. علاوه بر این، در این مطالعه ۷۴ سویه (۵۹ درصد) از نمونه های ادراری خانمها و ۵۲ سویه (۴۱ درصد) از نمونه های ادراری آقایان جداسازی شدند. همچنین، فراوانی سویه های اشرشیا کلای در بازه های سنی مختلف نیز در جدول ۲ نشان داده شده است. بر این اساس مشخص گردید که بیشترین تعداد سویه ها متعلق به بیماران در بازه سنی ۷۰-۶۱ سال (۲۴ سویه، ۱۹ درصد)، ۸۰-۷۱ سال (۲۱ سویه، ۱۷ درصد) و ۴۰-۳۱ سال (۲۰ سویه، ۱۶ درصد) بود. علاوه بر این، در میان خانمها و آقایان بیشترین جدایه ها به ترتیب متعلق به بیماران در بازه سنی ۸۰-۷۱ سال (۱۵ سویه، ۲۰ درصد) و ۷۰-۶۱ سال (۱۳ سویه، ۲۵ درصد) بود.

جدول ۲- فراوانی سویه های *اشرشیا کلای* در میان بیماران بر اساس جنس و سن.

بازه سنی	خانمها (درصد)	آقایان (درصد)	جمع (درصد)
۱۰-۱	۲ (۳)	۱ (۲)	۳ (۲)
۲۰-۱۱	۷ (۹)	۲ (۴)	۹ (۷)
۳۰-۲۱	۹ (۱۲)	۶ (۱۲)	۱۵ (۱۲)
۴۰-۳۱	۹ (۱۲)	۱۱ (۲۰)	۲۰ (۱۶)
۵۰-۴۱	۱۱ (۱۵)	۷ (۱۳)	۱۸ (۱۴)
۶۱-۵۰	۱۰ (۱۴)	۶ (۱۲)	۱۶ (۱۳)
۷۰-۶۱	۱۱ (۱۵)	۱۳ (۲۵)	۲۴ (۱۹)
۸۰-۷۱	۱۵ (۲۰)	۶ (۱۲)	۲۱ (۱۷)
جمع (درصد)	۷۴ (۵۹)	۵۲ (۴۱)	۱۲۶

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

نتایج حاصل آزمون تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* نشان داد (جدول ۳) که تمامی سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰ درصد) مقاوم بودند و پس از آن بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای سفتریاکسیون (۱۱۳ سویه، ۹۰ درصد)، سفپودوکسیم (۱۱۲ سویه، ۸۹ درصد)، سفتازیدیم (۱۱۱ سویه، ۸۸ درصد) و سفوتاکسیم (۱۱۱ سویه، ۸۸ درصد) مشاهده گردید. همچنین، کمترین میزان مقاومت نیز نسبت به آنتی بیوتیکهای مروپنم (۱۹ سویه، ۱۵ درصد)، ایمی پنم (۲۶ سویه، ۲۱ درصد) و کانامایسین (۳۵ سویه، ۲۸ درصد) مشاهده گردید؛ و ۶۹ درصد سویه ها (۳۹ سویه) نیز نسبت به آنتی بیوتیکهای واجد مهارکننده های آنزیم بتالاکتاماز حساسیت نشان دادند.

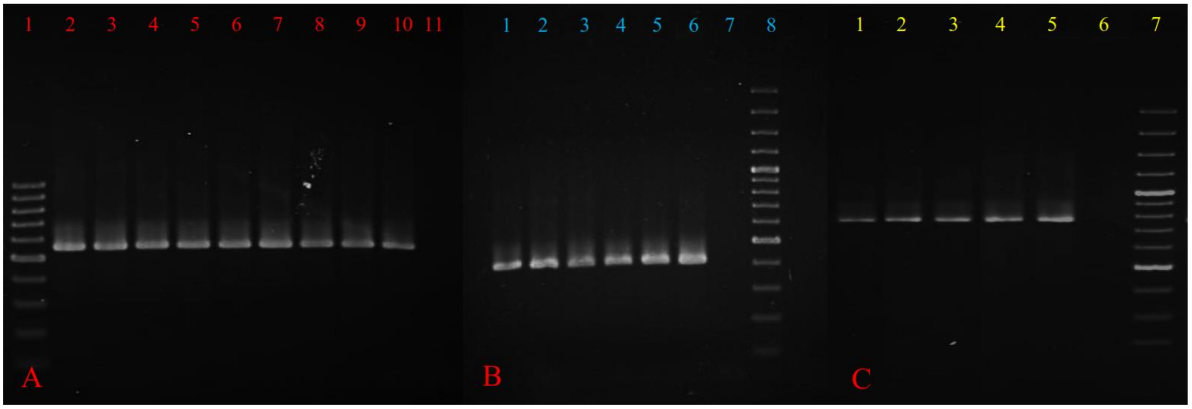
علاوه بر این، از مجموع ۱۱۱ سویه (۸۸ درصد) که نسبت به هر سه آنتی بیوتیک سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفپودوکسیم مقاوم بودند، ۸۳ سویه (۷۵ درصد) در مقابل دیسکهای ترکیبی آنتی بیوتیکهای سفوتاکسیم-کلاوولانیک اسید و سفتازیدیم-کلاوولانیک اسید واجد افزایش قطر هاله بیش از ۵ میلیمتر بودند (در مقایسه با دیسکهای منفرد سفتازیدیم و سفوتاکسیم) و به عنوان سویه های مولد ESBL در این مطالعه انتخاب شدند.

جدول ۳- فراوانی و درصد مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای*.

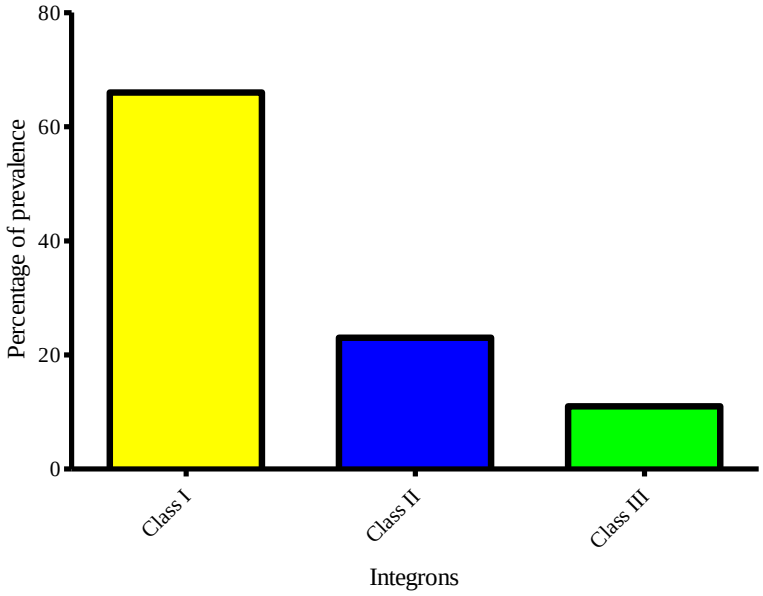
آنتی بیوتیک	فراوانی	درصد
آمپی سیلین (AM)	۱۲۶	۱۰۰
آمپی سیلین-کلاوولانیک اسید (AMC)	۳۹	۳۱
آمیکاسین (AK)	۴۴	۳۵
افلوکساسین (OFX)	۵۰	۴۰
ایمی پنم (IMP)	۲۶	۲۱
پیپراسیلین-تازوباکتام (TPZ)	۳۹	۳۱
جنتامایسین (GN)	۵۰	۴۰
سفتازیدیم (CAZ)	۱۱۱	۸۸
سفپودوکسیم (CPD)	۱۱۲	۸۹
سفتریاکسون (CRO)	۱۱۳	۹۰
سفوتاکسیم (CTX)	۱۱۱	۸۸
سفوکسیتین (FOX)	۴۷	۳۷
سولفامتوکسازول-تری متوپریم (SXT)	۷۱	۵۶
سیپروفلوکساسین (CIP)	۵۹	۴۷
کانامایسین (K)	۳۵	۲۸
لووفلوکساسین (LEV)	۵۳	۴۲
مروپنم (MEM)	۱۹	۱۵

تعیین ژنهای اینتگرونهای کلاس I، II و III

نتایج حاصل از آزمونهای PCR جداگانه (شکل ۱) جهت شناسایی ژنهای مربوط به کلاسهای مختلف اینتگرونها نشان داد که هر ۳ کلاس اینتگرون در میان سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک شناسایی شدند (شکل ۲). بر این اساس مشخص گردید که ۸۳ سویه (۶۶ درصد) واجد اینتگرون کلاس I بودند. همچنین، ۲۳ درصد (۲۹ سویه) و ۱۱ درصد (۱۴ سویه) سویه ها نیز به ترتیب واجد اینتگرونهای کلاس II و III بودند.



شکل ۱- آزمون PCR جهت شناسایی ژنهای اینتگرونهای کلاس I-III در میان سویه های *اشرشیا کلای*. A: اینتگرون کلاس I (۵۶۵ جفت باز): ۱: مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی، ۱۰-۲: سویه های *اشرشیا کلای* ادراری، ۱۱: کنترل منفی. B: اینتگرون کلاس II (۴۰۳ جفت باز): ۱-۶: سویه های *اشرشیا کلای* ادراری، ۷: کنترل منفی، ۸: مارکر ۳۰۰۰ جفت بازی. C: اینتگرون کلاس III (۷۱۷ جفت باز): ۱-۶: سویه های *اشرشیا کلای* ادراری، ۷: مارکر ۳۰۰۰ جفت بازی،



شکل ۲- فراوانی کلاسهای مختلف اینتگرونها در میان سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک.

بحث

باکتری *اشرشیا کلای* یکی از شایعترین عوامل باکتریایی ایجاد عفونت دستگاه ادراری محسوب می شود که واجد طیف وسیعی از عوامل حدت می باشد. این باکتری به دلیلی توانایی بالا در اتصال به سلولهای اپیتلیال دستگاه ادراری و قدرت بالای تشکیل بیوفیلم نسبت به بسیاری از عوامل ضدمیکروبی از جمله آنتی بیوتیکها مقاومت نشان می دهد و منجر به ایجاد عفونتهای عود شونده می شود. مطالعات اخیر نشان می دهند که تولید بیوفیلم در جدایه های *اشرشیا کلای* ناشی از بیان همزمان کورلای و سلولز و احاطه شدن ارگانیسم با یک ماتریکس خارج سلولی آبگریز است که منجر به بقاء طولانی مدت آنها در دستگاه ادراری می شود (۴). میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها و عوامل ضدمیکروبی در باکتریهای مولد بیوفیلم، ۵۰۰ تا ۵۰۰۰ برابر بیشتر از حالت پلانکتونی آنها می باشد (۱۱). افزایش مقاومت ضد میکروبی در طی چندین دهه گذشته، از مهمترین خطرات تهدید کننده سلامت جهانی توسط سازمان بهداشت جهانی معرفی شده است. مقاومت آنتی بیوتیکی درصد فراوانی از مرگ و میرهای سالانه بیمارستانی را به خود اختصاص می دهد و به طور آشکاری باعث کاهش اثرات درمانی و افزایش هزینه های درمان می شود (۱۲).

اساس درمان مناسب در عفونتهای ادراری، انتخاب یک آنتی بیوتیک مناسب با کارآیی و اثربخشی بالا می باشد. با توجه به افزایش روزافزون مصرف آنتی بیوتیک و متعاقب آن افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی و متفاوت بودن حساسیت سویه های *اشرشیا کلای* جدا شده در هر منطقه، مطالعه بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری ضروری است. با توجه به شیوع بالای عفونتهای مجاری ادراری و افزایش بروز مقاومت در این جدایه ها، بررسی دوره ای و مداوم میزان مقاومت، سازوکار ایجاد مقاومت و همچنین بررسی ژنهای بیماریزا در این باکتریها می تواند در انتخاب مناسبترین گزینه درمانی مؤثر باشد. در این مطالعه سویه های *اشرشیا کلای* مقاومت قابل ملاحظه ای به اغلب آنتی بیوتیکها داشتند، به طوریکه تمامی سویه ها در برابر حداقل یکی از آنتی بیوتیکهای مورد بررسی مقاوم بودند. همچنین، بر اساس مقاومت به حداقل ۳ کلاس آنتی بیوتیکی مختلف؛ ۵۰ سویه *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک (۴۰ درصد) به عنوان سویه های با مقاومت چندگانه در نظر گرفته شدند. آمینوگلیکوزیدها و فلوروکوینولونها از جمله آنتی بیوتیکهای خطوط اول درمان عفونتهای ادراری محسوب می شوند که مقاومت روزافزون نسبت به آنتی بیوتیکهای این دو خانواده به یک مخاطره و چالش جهانی تبدیل شده است. در مطالعه حاضر ۴۷، ۴۲ و ۴۰ درصد سویه های *اشرشیا کلای* مورد بررسی به ترتیب نسبت به سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و افلوکساسین مقاوم بودند و همچنین مقاومت نسبت به جنتامایسین، آمیکاسین و کانامایسین نیز به ترتیب ۴۰، ۳۵ و ۲۸ درصد بود. تاکنون آمار متفاوتی از میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای خانواده آمینوگلیکوزیدها و کوینولونها منتشر شده است. بر اساس مطالعه ابراهیمیان و همکاران در اصفهان مقاومت جدایه های *اشرشیا کلای* نسبت به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین به ترتیب ۳۲/۳ و ۳۱/۳ درصد گزارش گردید (۱۳). در مطالعه صدیقی و همکاران در همدان نیز ۱۵ و ۱۷ درصد سویه های *اشرشیا کلای* به ترتیب نسبت به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین مقاوم بودند (۱۴). رضا زاده و همکاران در قزوین و زنجان میزان مقاومت جدایه های *اشرشیا کلای* نسبت به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین را ۵۶ درصد گزارش کردند (۱۵). در مطالعه سلیمانی و همکاران در سال ۲۰۰۹ در تهران، ۹۰، ۸۲ و ۸ درصد سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیکهای کانامایسین، جنتامایسین و آمیکاسین مقاوم بودند (۱۶). همچنین، سلیمانی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه دیگری در تهران مقاومت سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک را نسبت به کانامایسین، جنتامایسین و آمیکاسین به ترتیب ۲۳/۱، ۲۱ و ۳/۶ درصد گزارش کردند (۱۷). در مطاله مومنی مفرد و همکاران در سال ۲۰۱۰ در لرستان، ۳۹، ۲۶ و ۱ درصد سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیکهای جنتامایسین، کانامایسین و آمیکاسین مقاوم بودند (۱۸). در مطالعه کیخا و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی سویه های *اشرشیا کلای* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر زاهدان مشخص گردید که ۱۹/۵ درصد و ۱۳/۷ درصد سویه های به ترتیب نسبت به آمیکاسین و جنتامایسین مقاوم بودند (۱۹). علاوه بر این، در هندوستان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای جنتامایسین و آمیکاسین به ترتیب ۷۳/۴ و ۸/۱۶ درصد گزارش گردید (۲۰). در لهستان در سال ۲۰۱۳ نیز ۵۹ و ۱۱/۴ درصد سویه های *اشرشیا کلای* مقاوم به جنتامایسین و آمیکاسین بودند (۲۱). در چین نیز مقاومت سویه های *اشرشیا کلای* نسبت به جنتامایسین، کانامایسین و آمیکاسین به ترتیب ۹۵/۱، ۴۵/۴ و ۱۱/۷ درصد گزارش گردید (۲۲).

همچنین، در مطالعه حاضر ۷۵ درصد جدایه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد ESBL بودند. تاکنون آمار متفاوتی از شیوع سویه های مولد ESBL در ایران (۲۹-۸۹ درصد) و سایر کشورها (۹-۹۰ درصد) ارائه شده است (۳, ۳۱-۲۳). به طور کلی تفاوت در نتایج حاصل از مطالعات مختلف می تواند ناشی از اختلاف در وضعیت بهداشتی و اقلیمی منطقه جغرافیایی، سطح فرهنگی و خصوصیات جامعه مورد مطالعه، سیاستهای کنترل عفونت، زمان و منبع نمونه گیری، روش تشخیصی استفاده شده و همچنین تاریخچه و مدت زمان بیماری و سن و جنس بیمار باشد. اگرچه درمان ضدمیکروبی تجربی، به طور معمول در درمان عفونتهای ادراری مورد استفاده قرار می گیرد، اما آگاهی از داده های اپیدمیولوژیک و میزان شیوع مقاومت ضدمیکروبی در هر منطقه، به منظور درمان تجربی مؤثر و مفید و همچنین ارزیابی دستورالعملهای موجود ضروری است. سویه های *اشرشیا کلای* ادراری انواع مختلفی از پلاسمیدهای مقاومت و کلاسهای مختلف اینتگرونها و سایر عوامل ژنتیکی متحرک را حمل می کنند و تمایل بالایی در کسب فنوتیپ با مقاومت دارویی چندگانه دارندگسترش و شیوع سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد آنزیمهای بتالاکتامازی و انتقال افقی ژنهای مقاومت از نگرانیهای مهم در مدیریت درمان عفونتهای ادراری محسوب می شود. تشکیل بیوفیلم در *اشرشیا کلای* ارتباط تنگاتنگی با تولید آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف، مقاومت ضدمیکروبی و همچنین پایداری و عود عفونتهای ادراری دارد. شیوع بالای سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف، مقاومت ضدمیکروبی چندگانه بالا و حضور کلاسهای مختلف اینتگرونها از یافته های اصلی این مطالعه بود. همچنین ارتباط قابل توجهی بین مقاومت به آنتی بیوتیکها و حضور کلاسهای مختلف اینتگرونها مشاهده شد که یکی از نگرانیهای مهم در بهداشت عمومی است و نیاز به توجه بیشتری دارد. در کنار حساسیت بالای سویه های *اشرشیا کلای* به کارباپنمها؛ در این مطالعه آمینوگلیکوزیدها به عنوان مؤثرترین داروهای خط اول درمانی بودند.

در این پژهش هر سه کلاس اینتگرون مورد مطالعه در میان سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مورد شناسایی قرار گرفت و اینتگرون کلاس I (۶۶ درصد) به عنوان کلاس غالب در این مطالعه انتخاب گردید. این یافته ها منطبق بر سایر مطالعات انجام گرفته در ایران و سایر کشورها می باشد. در مطالعه رنجبران و همکاران که در ۲۰۱۳ سال در اراک با هدف بررسی اینتگرونها در بین سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک صورت گرفت، میزان فراوانی اینتگرونهای کلاس I و II به ترتیب ۸۶ و ۸ درصد بود اما اینتگرون کلاس ۳ شناسایی نگردید. همچنین ارتباط معنی داری بین حضور اینتگرونها و مقاومت به جنتامایسین مشاهده گردید (۳۲). در مطالعه حبیبی و همکاران که در سال ۲۰۱۸ در تهران با هدف بررسی حضور اینتگرونها و ارتباط آن با مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های *اشرشیا کلای* ادراری صورت گرفت ۲۲/۷ درصد سویه ها واجد اینتگرون کلاس I بودند و رابطه معنی داری بین حضور اینتگرون و مقاومت دارویی چندگانه وجود داشت. همچنین، در آن مطالعه مقاومت به آنتی بیوتیکهای جنتامایسین و آمیکاسین به ترتیب ۱۹/۳ و ۲ درصد بود (۳۳). Gündogdu و همکاران در سال ۲۰۰۶ در استرالیا شیوع اینتگرونها را در بین سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مورد بررسی قرار دادند و مشخص گردید که ۳۴/۳ درصد سویه ها واجد اینتگرون کلاس I و ۵/۱ درصد واجد اینتگرون کلاس II بودند. در آن مطالعه مشخص گردید فراوانی اینتگرونها در بین سویه های با مقاومت دارویی چندگانه بیشتر می باشد و مقاومت به جنتامایسین در میان سویه های حامل ژن *int*I شایعتر بود (۳۴). در مطالعه ضیغمی و همکاران که در زنجان در سال ۲۰۱۵ بر روی سویه های *اشرشیا کلای* صورت گرفت، فراوانی اینتگرون کلاس I (۸۷ درصد) و اینتگرون کلاس II (۷ درصد) بود و اینتگرون کلاس III مشاهده نگردید (۳۵). در مطالعه ابراهیم سرایی و همکاران در سال ۲۰۱۶ در شیراز شیوع اینتگرونهای کلاس I و II در میان سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک به ترتیب ۵۹/۵ و ۷/۴ درصد گزارش گردید. اما اینتگرون کلاس III شناسایی نشد (۳۶). یکانی و همکاران در سال ۲۰۱۶ در آذربایجان موفق به شناسایی اینتگرونهای کلاس I (۶۳/۶ درصد) و کلاس II (۴/۵ درصد) در میان سویه های *اشرشیا کلای* شدند و همچنین نشان دادند که هیچکدام از سویه ها واجد اینتگرون کلاس III نبودند (۳۷). اینتگرونها از جمله عناصر ژنتیک متحرک در باکتریها محسوب می شوند که مقاومت به آنتی بیوتیکهای مختلف را رمز می کنند. به عنوان مثال، اینتگرونهای کلاس I انواعی از کاستهای ژنی مرتبط با مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتامها، تری متوپریم و سولفونامیدها را حمل می کنند و انتهای ´۳ در ساختار اینتگرونهای کلاس I دارای یک ناحیه حفاظت شده است که ژنهای مقاومت به ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی و سولفونامیدها را رمز می کند. همچنین،

اینتگرونهای کلاس II، کاستهای ژنی شامل دی هیدروفولات ردوکتاز، استرپتوتریسین استیل ترانسفراز و آمینوگلیکوزید آدنیل ترانسفراز را رمز می کنند که به ترتیب با مقاومت در برابر تری متوپریم، استرپتوتریسین و استرپتومایسین-اسپکتینومایسین مرتبط می باشند و ژن اریترومایسین استراز نیز در این کلاس شناسایی شده است. علاوه بر این، اینتگرونهای کلاس III نیز حامل کاست ژنی bla_{IMP-1} است که آنزیمهای متالوبتالاکتاماز را رمزگذاری می کند و باعث مقاومت نسبت به کارباپنمها می شود و همچنین با دارا بودن کاست ژنی aacA4 سبب مقاومت به توبرامایسین می شود (۳۸). بنابراین، اینتگرونها با دریافت و جابجایی کاستهای حاوی ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی می توانند در گسترش مقاومت به آنتی بیوتیکها از جمله خانواده بتا-لاکتام، آمینوگلیکوزیدها و سولفونامیدها نقش بسیار مهمی داشته باشند؛ و به نظر می رسد که حضور اینتگرونها با سویه های دارای مقاومت چند دارویی از جمله سویه های مقاوم به استرپتومایسین و کانامایسین مرتبط می باشند (۳۹). لذا شناسایی اینتگرونها در جهت برنامه های کنترل عفونت و ممانعت از انتشار سویه های مقاوم از اهمیت بالینی برخوردار می باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده شیوع بالای سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک واجد کلاسهای مختلف اینتگرونها و مقاوم به آنتی بیوتیکهای خطوط اول درمانی در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر تهران است. 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. بنابراین تعیین کلونالیتی این سویه ها و همچنین تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های مولد عفونتهای ادراری پیش از تجویز آنتی بیوتیک جهت ریشه کنی و حذف کامل این سویه ها و جلوگیری از ظهور سویه های با مقاومت چندگانه و طبیعتا ممانعت از ایجاد عفونتهای عودشونده کاملا ضروری به نظر می رسد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه اصفهان به انجام رسیده است.

REFERENCE

1. Hasan SM, Ibrahim KS. Molecular characterization of extended spectrum β-lactamase (ESBL) and virulence gene-factors in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in children in Duhok City, Kurdistan Region, Iraq. Antibiotics. 2022;11(9):1246.

2. Halaji M, Shahidi S, Atapour A, Ataei B, Feizi A, Havaei SA. Characterization of extended-spectrum β-lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* among Iranian kidney transplant patients. Infection and Drug Resistance. 2020;13:1429-37.

3. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Clonal groups of extended-spectrum β-lactamase and biofilm producing uropathogenic *Escherichia coli* in Iran. Pathogens and Global Health. 2022;116(8):485-97.

4. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Genetic diversity and virulence characteristics of biofilm-producing uropathogenic *Escherichia coli*. International Microbiology. 2022;25(2):297-307.

5. Stapleton AE, Wagenlehner FM, Mulgirigama A, Twynholm M. *Escherichia coli* resistance to fluoroquinolones in community-acquired uncomplicated urinary tract infection in women: a systematic review. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2020;64(10):e00862-20.

6. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6(6):a027029.

7. Gillings MR. Integrons: past, present, and future. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2014;78(2):257-77.

8. Celejewski-Marciniak P, Wolinowska R, Wróblewska M. Molecular characterization of class 1, 2 and 3 integrons in *Serratia* spp. clinical isolates in Poland-isolation of a new plasmid and identification of a gene for a novel fusion protein. Infection and Drug Resistance. 2021;14:4601.

9. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 30th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2020.

10. Su J, Shi L, Yang L, Xiao Z, Li X, Yamasaki S. Analysis of integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* in China during the last six years. FEMS Microbiology Letters. 2006;254(1):75-80.

11. El-Shekh NA, Ayoub A, El-Hendawy HH, Abada EA, Khalifa SY. In vitro activity of some antimicrobial agents against intact and disrupted biofilms of staphylococci in the indwelling vascular catheter patients. World Applied Sciences Journal. 2010;10(1):108-20.

12. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings, 2006. American Journal of Infection Control. 2007;35:165-93.

13. Ebrahimian M, Mohammadi-Sichani M. The Frequency of plasmid *qnr* genes in quinolone-resistant Isolates of *Escherichia coli* causing urinary tract infection. Journal of Isfahan Medical School. 2018;36(499):1213-8.

14. Sedighi I, Arabestani MR, Rahimbakhsh A, Karimitabar Z, Alikhani MY. Dissemination of extended-spectrum β-lactamases and quinolone resistance genes among clinical isolates of uropathogenic *Escherichia coli* in children. Jundishapur Journal of Microbiology. 2015;8(7):e19184.

15. Rezazadeh M, Baghchesaraei H, Peymani A. Plasmid-mediated quinolone-resistance (*qnr*) genes in clinical isolates of *Escherichia coli* collected from several hospitals of Qazvin and Zanjan provinces, Iran. Osong Public Health and Research Perspectives. 2016;7(5):307-12.

16. Soleimani N, Sattari M, Broumand MA, Sepehri Seresh S. A molecular study of *aac* (3)–IIa *(aac*C2) gene in aminoglycoside resistant *Escherichia coli* isolated from urine. Pathobiology Research. 2010;13(3):23-30.

17. 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(1):1-5.

18. Mofrad SM, Goudarzi G, Shakib P, Nowroozi J. Prevalence of *aac(3)-IIa* gene among clinical isolates of uropathogenic *Escherichia coli* in Delfan, Lorestan. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2013;7(2):20-6.

19. Keikha M, Rava M. Trend of antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in outpatient patients from Zahedan. Journal of Paramedical Sciences & Rehabilitation. 2017;6(4):73-8.

20. Mir AR, Bashir Y, Dar FA, Sekhar M. Identification of genes coding aminoglycoside modifying enzymes in *E. coli* of UTI patients in India. Scientific World Journal. 2016;2016:1-5.

21. Ojdana D, Sieńko A, Sacha P, Majewski P, Wieczorek P, Wieczorek A, et al. Genetic basis of enzymatic resistance of *E. coli* to aminoglycosides. Advances in Medical Sciences. 2018;63(1):9-13.

22. Xiao Y, Hu Y. The major aminoglycoside-modifying enzyme AAC(3)-II found in *Escherichia coli* determines a significant disparity in its resistance to gentamicin and amikacin in China. Microbial Drug Resistance. 2012;18(1):42-6.

23. Abrar S, Hussain S, Khan RA, Ul Ain N, Haider H, Riaz S. Prevalence of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: first systematic meta-analysis report from Pakistan. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2018;7(1):1-11.

24. Padmavathy K, Padma K, Rajasekaran S. Extended-spectrum β-lactamase/AmpC-producing uropathogenic *Escherichia coli* from HIV patients: do they have a low virulence score? Journal of Medical Microbiology. 2013;62(3):345-51.

25. Eltai NO, Al Thani AA, Al-Ansari K, Deshmukh AS, Wehedy E, Al-Hadidi SH, et al. Molecular characterization of extended spectrum β-lactamases enterobacteriaceae causing lower urinary tract infection among pediatric population. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2018;7(1):1-9.

26. Soltan DM, Sabbaghi A, Molla AH, Rastegar LA, Eshraghian M, Fallah MJ, et al. Prevalence of ampc and shv α-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* from Tehran hospitals. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(2):176-80.

27. Nabti LZ, Sahli F, Radji N, Mezaghcha W, Semara L, Aberkane S, et al. High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* in urine samples from inpatients and outpatients at a tertiary care hospital in Setif, Algeria. Microbial Drug Resistance. 2019;25(3):386-93.

28. Zhu FH, Rodado MP, Asmar BI, Salimnia H, Thomas R, Abdel-Haq N. Risk factors for community acquired urinary tract infections caused by extended spectrum β-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* in children: a case control study. Infectious Diseases. 2019;6(2):523-24.

29. Hashemizadeh Z, Kalantar-Neyestanaki D, Mansouri S. Clonal relationships, antimicrobial susceptibilities, and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections and fecal samples in Southeast Iran. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2018;51(1):44-51.

30. Shahbazi S, Karam MRA, 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.

31. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Characterization of biofilm formation and production of extended spectrum beta lactamase enzymes in *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary infection in Zahedan during 2017. ranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. In Press.

32. Ranjbaran M, Zolfaghari M, Japoni-Nejad A, Amouzandeh-Nobaveh A, Abtahi H, Nejad M, et al. Molecular investigation of integrons in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2013;23(105):20-7.

33. Habibi M, Asadi Karam MR, Mohammadzadeh A. A survey of integrons and their relationships with antibiotic resistance among the *Escherichia coli* isolates collected from urinary tract infection of patients referred to the hospitals in Tehran, Iran. Horizon of Medical Sciences. 2018;24(4):277-85.

34. Gündoğdu A, Long YB, Vollmerhausen TL, Katouli M. Antimicrobial resistance and distribution of *sul* genes and integron-associated *intI* genes among uropathogenic *Escherichia coli* in Queensland, Australia. Journal of Medical Microbiology. 2011;60(11):1633-42.

35. Zeighami H, Haghi F, Masumian N, Hemmati F, Samei A, Naderi G .Distribution of integrons and gene cassettes among uropathogenic and diarrheagenic *Escherichia coli* isolates in Iran. Microbial Drug Resistance. 2015;21(4):435-40.

36. Ebrahim-Saraie HS, Nezhad NZ, Heidari H, Motamedifar A, Motamedifar M. Detection of antimicrobial susceptibility and integrons among extended-spectrum β-lactamase producing uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Southwestern Iran. Oman Medical Journal. 2018;33(3):218-23.

37. Yekani M, Memar MY, Baghi HB, Sefidan FY, Alizadeh N, Ghotaslou R. Association of integrons with multidrug-resistant isolates among phylogenic groups of uropathogenic *Escherichia coli*. Microbiology Research. 2018;9(1):7484.

38. Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy M-C. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. Frontiers in Microbiology. 2012;3:119.

39. Rijavec M, Erjavec MS, Avguštin JA, Reissbrodt R, Fruth A, Križan-Hergouth V, et al. High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. Current Microbiology. 2006;53(2):158-62.