Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 5 (November - December)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Molecular Identification and Serotyping of Isolates of Verotoxin Producing *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infection in Samples of Patients Referred to Health Centers in Khoy

Mahsa Abdolalizadeh, Changiz Ahmadizadeh*

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2018/08/07
Accepted: 2018/11/27
Available online: 2018/12/22

Article Subject:
Molecular Microbiology

IJMM 2018; 12(5): 319-328

Corresponding author:

Changiz Ahmadizadeh
Assistant porfessor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science,Islamic Azad University, Ahar Branch, Ahar,Iran

Email:
ch-ahmadizadeh@iau-ahar.ac.ir

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Urinary tract infections are among the most common infectious diseases. The bacterium of *Escherichia coli*, which produces verotoxin venom, is one of the most common causes of urinary tract infections. The aim of this study was to identify the molecular and serotyping of the isolates of *E. coli* producing verotoxin from the urinary tract infection in patients referred to the health centers in Khoy.

Materials and Methods: 200 urine samples of people suspected to urinary tract infection were identified by using standard culture and biochemical methods of *E. coli*. The bacterium was isolated in term of the susceptibility pattern to antibiotics and was studied using disc diffusion method. To do Serotyping, strains with polyvalent antisera were tested. DNA was isolated from bacteria after extraction. The Verotoxin producing isolates were identified by Multiplex PCR.

Results: 78 urine samples were identified as *E. coli*. *E. coli* isolates had the most antibiotic resistance to ampicillin and had the highest susceptibility to Norfloxacin. In serotyping, Group 3 had the most common strains of *E. coli*. Among the samples that were studied using Multiplex PCR and specific primers, *stx1* genes were observed in 3 isolated isolates and *stx2* genes were observed in 16 isolated isolates and both *stx1* and *stx2* were seen in 9 isolates.

Conclusions: Serotypes of O25, O78, O103, O118, O124, O145, O157 and O164 were the most frequent infection-specific serotypes. The frequency of *E. coli* strains with *stx2* gene producing verotoxin was more than *stx1*. High resistance to ampicilin is probably due to the excessive consumption of these antibiotics. Norfloxacin can be an appropriate choice for the treatment.

Keywords: Urinary tract infections, *Escherichia coli*, Verotoxin, Serotyping

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Abdolalizadeh M, Khojaseh E. Molecular Identification and Serotyping of Isolates of Verotoxin Producing Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infection in Samples of Patients Referred to Health Centers in Khoy. Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (5) :319-328

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ ـ شماره ۵ ـ آذر ـ دی ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

شناسایی مولکولی و سروتایپینگ ایزوله‌های *اشریشیاکلی* مولد وروتوکسین جداشده از عفونت ادراری بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی شهرستان خوی

مهسا عبدالعلی‌زاده، چنگیز احمدی زاده*

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، اهر، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۱۶

پذیرش:۱۳۹۷/۰۹/۰۶

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۰/۰۱

موضوع:

میکروب شناسی مولکولی

IJMM1397;12(5): 319-328

نویسندهٔ مسئول:

چنگیز احمدی زاده

استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، اهر، ایران

پست الکترونیک:

ch-ahmadizadeh@iau-ahar.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های ادراری به‌عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود. باکتری *اشریشیاکلی* مولد سم وروتوکسین، به‌عنوان مهم‌ترین عامل بیماری‌های عفونت‌های ادراری مطرح است. هدف این مطالعه، شناسایی مولکولی و سروتایپینگ ایزوله‌های *اشریشیاکلی* مولد وروتوکسین جداشده از عفونت ادراری بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی شهرستان خوی است.

مواد و روش کار: تعداد ۲۰۰ نمونه ادرار افراد مشکوک به عفونت ادراری، از طریق روش‌های کشت و بیوشیمیایی استاندارد *اشریشیاکلی* شناسایی شد. باکتری‌های جداشده از نظر الگوی حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بررسی شدند. برای سروتایپینگ، ایزوله‌ها با آنتی‌سرم پلی‌والان مورد آزمون قرار گرفتند. پس از استخراج DNA ایزوله‌های مولد وروتوکسین با Multiplex PCR شناسایی شدند.

یافته‌ها: از کل نمونه‌های ادراری، ۷۸نمونه به‌عنوان *اشریشیاکلی* تعیین هویت شدند. ایزوله‌های *اشریشیاکلی* بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به آمپی‌سیلین و بیشترین حساسیت را به نورفلوکساسین داشتند. در سروتایپینگ، گروه ۳ دارای فراوان‌ترین ایزوله‌های *اشریشیاکلی* بود. در نمونه‌های بررسی‌شده با استفاده از روش Multipex PCR و پرایمرهای اختصاصی، در ۳ ایزولهٔ جداسازی‌شده ژن‌های *stx1*، در۱۶ ایزولهٔ جداسازی‌شده ژن‌های stx2، در۹ ایزوله هر دو باند مزبور به ژن‌های *stx1* و *stx2* مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: سروتایپ‌های O25، O78، O103، O118، O124، O145، O157، O164 از فراوان‌ترین سروتایپ‌های خاص نشانگر عفونت بودند. فراوانی *اشریشیاکلی*‌های دارای ژن stx2 مولد وروتوکسین بیشتر از stx1 است. مقاومت بالا به آمپی‌سیلین احتمالا به‌دلیل مصرف بی‌رویهٔ این آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد شده است. نورفلوکساسین می‌تواند انتخاب مناسب برای درمان موارد مبتلا باشد.

کلمات کلیدی: عفونت‌های ادراری، *اشریشیاکلی*، وروتوکسین، سروتایپینگ

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفادهٔ علمی از این مقاله برای مجلهٔ میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

عفونت مجاری ادراری UTI (Urinary Tract Infection) نوعی پاسخ التهابی مجرا نسبت به تهاجم عوامل عفونی از جمله باکتری‌ها است (۱). عفونت دستگاه ادراری یکی از مهم‌ترین عفونت‌های انسان محسوب می‌شود و از نظر فراوانی بعد از عفونت تنفسی قرار دارد و یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها بین بیماران بستری در بیمارستان و مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌ها است. عامل این عفونت در اغلب موارد *اشریشیاکلی* است که در تمام گروه‌های سنی و در هر دو جنس دیده می‌شود؛ اما احتمال ابتلا به عفونت ادراری میان خانم‌های جوان بیشتر است (۲). شایع‌ترین پاتوژن مسبب عفونت ادراری *اشریشیاکلی* است که به‌طور کلی ۸۰درصد از موارد عفونت و بیش از ۹۰درصد از عفونت‌های اولیه را در بیماران سرپایی شامل می‌شود. میزان شیوع عفونت مجرای ادراری در زنان بیشتر از مردان است به‌طوری که تقریبا نیمی از خانم‌ها در طول زندگی خود حداقل یک بار عفونت دستگاه ادراری را تجربه می‌کنند. *اشریشیاکلی* مولد وروتوکسین یا شیگا توکسین از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای شناخته‌شده در سطح جهان است که

بیماری‌های خطرناکی مثل سندروم همولیتیک اورمیک و کولیت هموراژیک را موجب می‌شود (۳). در سندروم همولیتیک اورمیک، تداوم بیماری و اهمیت ندادن به درمان سریع و دقیق می‌تواند عوارضی مثل نارسایی کلیه‌ها، دیالیز دائم یا حتی نیاز به پیوند کلیه را داشته باشد. عبور باکتری از دیوارهٔ روده‌ها در بیماری کولیت هموراژیک می‌تواند به عفونت صفاق و دیگر قسمت‌های داخلی حفرهٔ شکمی منجر شود. خانوادهٔ *اشریشیاکلی* مولد وروتوکسین شامل سروتایپ‌های وسیعی از آنتی‌ژن‌های O هستند؛ ولی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* عامل عفونت‌های ادراری، به تعداد محدودی از سروتیپ‌های حاوی آنتی‌ژن‌های O:H تعلق دارند و کمتر بررسی شده‌اند (۴). *اشریشیاکلی*‌ها شامل هر دو کلنی از ایزوله‌های بیماری‌زا و کومنسال هستند و به‌طور معمولی از طریق سروگروپ‌های آنتی‌ژن‌های سطحی این باکتری‌ها، مانند آنتی‌ژن O لیپوپلی ساکارید، آنتی‌ژن H (فلاژله) و در برخی موارد آنتی‌ژن K (کپسول) شناسایی می‌شوند که از بین آنتی‌ژن سوماتیک O اهمیت بیشتری نسبت به سایرین دارد. آنتی‌ژن O قسمتی از لیپوپلی ساکارید موجود در آنتی‌ژن خارجی باکتری‌های گرم منفی است که روی سطح سلول نقش آنتی‌ژن اصلی را ایفا کرده و عامل اصلی برای تحریک سیستم ایمنی میزبان است (۵). وروتوکسین‌های vtx1 و vtx2 (verocytotoxin genes) توسط سه فاژ کدکنندهٔ توکسین (H19B ,J933 ,H30) در باکتری *اشریشیاکلی* بیان می‌شوند. مکانیسم عمل توکسین‌های vtx1 و vtx2 مشابه هم است؛ ولی سمیت نوع vtx2، ۴۰۰ برابر بیشتر از نوع vtx1 است (۶). هر دو توکسین اگزوتوکسین‌های عملکردی و ساختاری هستند. بخش b از هر توکسین، با تمایل و ویژگی بالا، عامل اتصال به گیرندهٔ اختصاصی گلیکولیپیدی به نام Gb3 در سلول هدف است که در غشای سلول‌های پستانداران به میزان متفاوت حضور دارد. در نتیجهٔ اتصال، یک‌سری واکنش‌های مولکولی رخ می‌دهد و از عملکرد فاکتور طویل‌شدن که از فاکتورهای مهم در رونویسی ژن است، جلوگیری می‌کند و پروتئین‌سازی دچار اختلال می‌شود (۷). یک ایزولهٔ *اشریشیاکلی* مولد وروتوکسین ممکن است vtx1، vtx2 و یا هر دو را تولید کند. گزارش‌های مختلف دربارهٔ شیوع سروتایپ‌های O مولد وروتوکسین در سایر کشورها نشان می‌دهد که عامل غالب عفونت‌ها ایزوله O157:H7 اشریشیاکلی بوده است (۸). با این حال الگوی شیوع سروتایپ‌های O ایزوله‌های اشریشیاکلی مولد وروتوکسین در کشورهای مختلف، متفاوت است و هر جامعه‌ای با توجه به شرایط بهداشتی افراد باید اقدام به جمع‌آوری اطلاعات در این زمینه کند (۹). با توجه به اهمیت پیشگیری و درمان به‌موقع، به‌ویژه در بیماران مؤنث که به سهولت امکان مهاجرت رکتال ژنیتال باکتری در آنها فراهم است، بهتر است مطالعات دقیق‌تر و کامل‌تری از میزان شیوع سروتایپ‌های هر جامعه در اختیار پزشکان و محققان قرار گیرد. در این بررسی سروتایپ‌های O شایع در عفونت‌های ادراری را مشخص کرده و ایزوله‌های شایع از نظر حضور ژن‌های (*stx2,stx1*) از طریق PCR (Polymerase chain reaction) بررسی خواهند شد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۰۰ نمونه ادرار از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری از مراکز بهداشتی ـ درمانی شهرستان خوی به‌مدت ۶ ماه (از فروردین تا شهریور سال ۹۵) جمع‌آوری شد.

کشت و جداسازی باکتری *اشریشیاکلی*

نمونه ادرار به روش نمونه وسط ادرار گرفته شده و ابتدا در محیط اگار خون‌دار و محیط سوربیتول مکانکی آگار کشت داده و بعد رنگ‌آمیزی گرم انجام شد (۳) و برای شناسایی باکتری‌های گرم منفی از ۳ محیط کشت اختصاصی SIM، سیمون سیترات و کلیگرآیرون آگار (مرک، آلمان) استفاده شد و باکتری *اشیریشیاکلی* به روش فنوتیپی تعیین هویت شد. برای بررسی مقاومت دارویی از روش استاندارد دیسک دیفیوژن Kirby Baur استفاده شد (۱۰) ابتدا باکتری‌های ایزوله‌شده در محیط بلاد آگار روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) تجدید کشت و بعد از ۲۴ ساعت برای آنتی‌بیوگرام آماده شد.

انجام تست آنتی‌بیوگرام

برای انجام آنتی‌بیوگرام از سوسپانسیون میکروبی با غلظت معادل استاندارد نیم مک فارلند تهیه و روی محیط کشت مولرهینتون آگار کشت داده شد. نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون قطر هالهٔ عدم رشد به‌وسیلهٔ خط‌کش اندازه گرفته شد و با استفاده از استاندارد جهانی CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (۱۱) به‌صورت حساس (S)، نیمه‌حساس (I) و مقاوم (R) تفسیر و ثبت شد (۱۰). از Zone Size interpretive Chart به‌عنوان کنترل دیسک‌ها (پادتن طب، ایران) استفاده شد. طبق دستورالعمل انستیتوی استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی CLSI و با استفاده از دیسک‌های کوتریموکسازول، سیپروفلوکساسین، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید، نیتروفورانتوین نورفلوکساسین، تهیه‌شده از پادتن طب ایران انجام گرفت (۱۲).

سروتایپینگ ایزوله‌های *اشریشیاکلی*

به‌منظور سروتایپینگ نمونه‌ها، مقداری از تودۀ باکتری رشدیافته در محیط کشت را با یک قطره (۲۵لاندا) از آنتی‌سرم (فن طب سیوان، ایران) مخلوط کردیم و در مقابل نور و سطح تیره اسلاید را تکان دادیم. به‌عنوان کنترل منفی از یک میکرولیتر سرم فیزیولوژی استفاده شد. نتایج مثبت به‌محض افزودن به آنتی‌سرم ایجاد شد. در نتایج منفی سوسپانسیون باکتری و آنتی‌سرم به‌صورت نیمه‌شفاف باقی ماند و نتایج آگلوتیناسیون به‌دست‌آمده پس از ۲۰ بار حرکت به‌عنوان نتیجۀ منفی قلمداد شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

استخراج DNA با استفاده از روش کلروفورم ایزوامیل الکل انجام شد. برای استخراج یک کلنی خالص از کشت تازۀ باکتری، دمای ۵۵ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوباسیون شد. سپس نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع شفاف بالایی را به تیوب جدید انتقال داده و روی آن ایزوپروپانل سرد به مقدار یک سی‌سی اضافه شد و به‌مدت یک ساعت در فریز قرار داده شد. سپس نمونه‌ها سانتریفوژ و مایع رویی به بیرون ریخته شد و بعد با دو بار تکرار مقدار ۵۰۰ میکرولیتر الکل اتانول ۸۵درصد ریخته و دوباره سانتریفوژ شدند و در آخر مایع رویی رسوب DNA بیرون ریخته و در دمای اتاق به‌مدت نیم‌ساعت خشک شدند. مقدار ۵۰ میکرولیتر آب دیونایز اضافه شد و پس از قرارگرفتن در دمای اتاق به‌مدت نیم‌ساعت برای تعیین کیفیت و کمیت DNA الکتروفورز و همچنین با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شدند (۱۳). بعد از اینکه از تمامی نمونه‌ها DNA استخراج شد، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر DNA ها انجام شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، به‌مقدار ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر به DNA نیاز وجود دارد و برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراجی با استفاده از دستگاه نانو دراپ کمیت و کیفیت DNA ارزیابی شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، به‌صورت مولتی‌پلکس برای ژن‌های stx1 و stx2 انجام گرفت و از باکتری *اشیریشیاکلی* O157:H7 ATCC43895 (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مشخصات پرایمرهای اختصاصی (تکاپوزیست، ایران) به‌کاررفته، در جدول ۱ آمده است (۸). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵میکرولیتر، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد و واکنش زنجیرۀ پلی‌مرازی با چرخه‌های واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجۀ سلسیوس به‌مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه با مرحلۀ واسرشته‌سازی در ۹۴ درجۀ سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه، مرحلۀ اتصال آغازگر در دمای ۶۲ درجۀ سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه و بیست ثانیه، بسط در ۷۲ درجۀ سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه و درنهایت یک چرخۀ بسط نهایی در ۷۲ درجۀ سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام و برای تفکیک محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از ژل آگارز ۲/۵درصد استفاده شد. بدین‌ترتیب که نمونه‌های تکثیریافته به نسبت ۶ به ۱ با بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک‌های ژل بارگذاری شدند. رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر، به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت. ژل مدنظر بعد از رنگ‌آمیزی و نوارهای تکثیریافتۀ DNA در نمونه‌ها به‌صورت تک‌نوار روی دستگاه UV (Ultraviolet) منتقل و عکس‌برداری شد.

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده‌شده (۸)

اندازۀ محصول PCR	دمای اتصال در مولتی‌پلکس PCR	توالی پرایمر	پرایمر مورداستفاده
180(bp)	62 ℃	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	STX1 forward
		AGAACGCCCACTGAGATCATC	STX1 reverse
255 (bp)		GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	STX2 forward
		TCGCCAGTTATCGCATTCTG	STX2 reverse

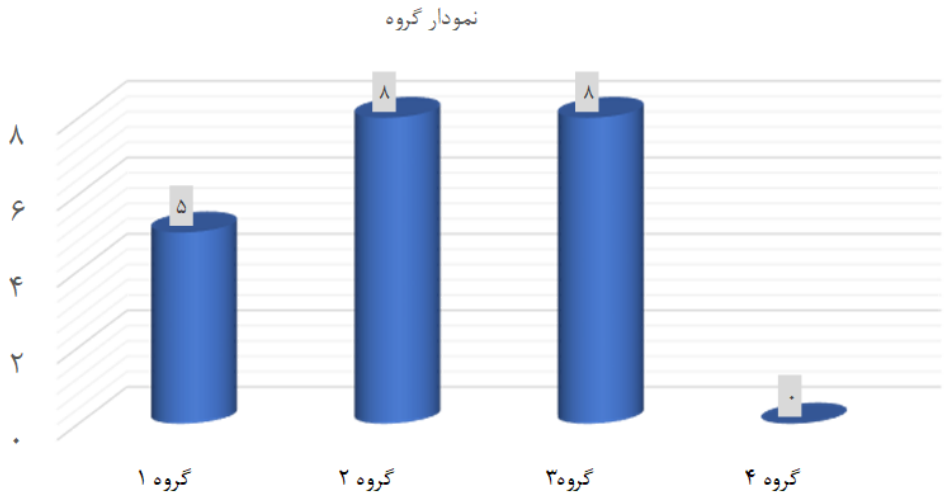
یافته‌ها

در مطالعۀ حاضر *اشریشیاکلی* که شایع‌ترین عامل عفونت ادراری بود و نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام نشان داد، بیشترین میزان حساسیت مربوط به نورفلوکساسین (۶۹/۲۳درصد) و بیشترین میزان مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین (۸۷/۱۸درصد) (پادتن طب، ایران) است (جدول ۲).

با توجه به نمودار ۱، بیشترین فراوانی در گروه‌های سروتایپینگ مربوط به گروه ۲ و ۳ و کمترین فراوانی مربوط به گروه ۴ است.

جدول۲. فراوانی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جداشده از عفونت‌های ادراری شهرستان خوی

نام آنتی‌بیوتیک	علامت اختصاری	مقاوم		حساس		نیمه‌حساس	
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
کوتریموکسازول	STX	۳۶	۴۶/۱۵	۳۹	۵۰	۳	۳/۸۵
سیپروفلوکساسین	CP	۱۹	۲۴/۳۵	۵۱	۶۵/۴۰	۸	۱۰/۲۵
آمپی‌سیلین	AM	۶۸	۸۷/۱۸	۴	۵/۱۲	۶	۷/۷۰
جنتامایسین	GM	۱۰	۱۲/۸۲	۴۲	۵۳/۸۴	۲۶	۳۳/۳۳
نالیدیکسیک اسید	NA	۴۰	۵۱/۳۰	۱۴	۱۷/۹۴	۲۴	۳۰/۷۶
نورفلوکساسین	NOR	۱۷	۲۱/۸۰	۵۴	۶۹/۲۳	۷	۸/۹۷
نیتروفورانتوین	FM	۴۶	۵۸/۹۸	۸	۱۰/۲۵	۲۴	۳۰/۷۷



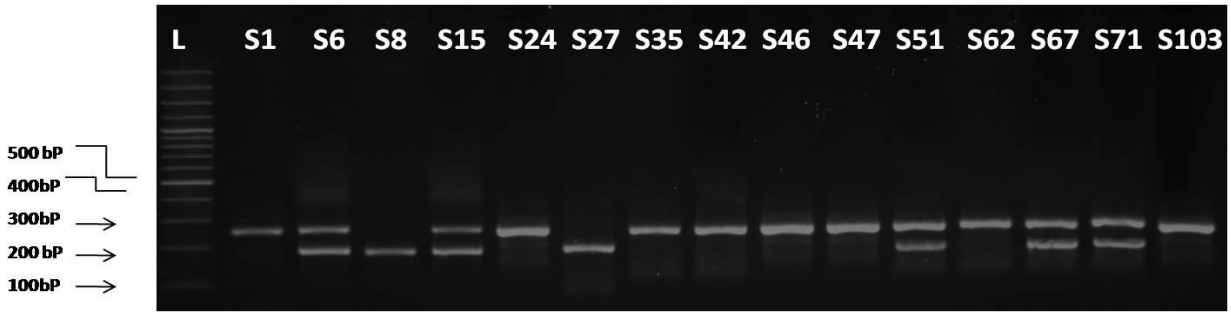
نمودار۱. گروه‌بندی *اشریشیاکلی* که با آنتی‌سرم پلی والان صورت گرفته است.

جدول ۳. نتایج سروتایپینگ گروه‌های موردمطالعه

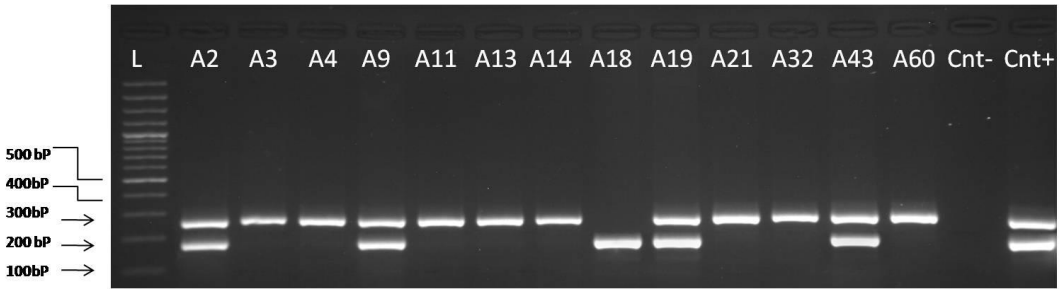
Anti Coli I	O26:K60, O44:K74, O114:K90, O125:K70, O142:K86, O158:K
Anti Coli II	O55:K59, O86:K61, O91:K, O111:K69, O119:K69, O126:K71, O127:K63, O128:K67
Anti Coli III	O25:K11, O78:K80, O103:K, O118:K, O124:K72, O145:K, O157:K, O164:K

نتایج PCR

DNA بیشترین جذب را در طول موج ۲۶۰nm دارد و بیشترین طول موج جذب RNA و پروتئین به‌ترتیب ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر است وهمِ نمونه‌های DNA استخراجی از کمیت و کیفیت بسیاری برخوردار بوده و بالاترین پیک جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، انتظار بر آن بود که پس از انجام مولتی PCR قطعهٔ تکثیری برای ژن‌های stx1 با اندازهٔ ۱۸۰ جفت باز و باندهای به‌دست‌آمده برای ژن stx2، به اندازهٔ ۲۵۵ جفت باز باشند (شکل۱). لدر به‌کاررفته ۱۰۰bp لدر (فرمنتاز، فرانسه) بود. در جدول حاصل از نتایج دستگاه نانودراپ نشان داده شده است. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نشان داد که از نمونه‌های جداشده (از نظر ژن *stx2*, *stx1*) ۱۶ نمونه از نظر *stx2* مثبت، ۳ نمونه از نظر *stx1* مثبت و ۹ مورد هم واجد هر دو ژن بودند (شکل۲).



شکل ۱. الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای نمونه‌های باکتریایی جداسازی‌شدهٔ گروه S.
نمونه‌های S1, S24, S35, S42, S46 ,S47, S62, S103 دارای باند مربوط به ژن *stx2* هستند. نمونهٔ S8, S27 باند مربوط به *stx1* دارد و نمونه‌های S6, S15, 151, S67, S71 دارای هر دو باند مربوط به ژن‌های *stx1* و *stx2* هستند. لدر استفاده‌شده 100bP (فرمنتاز، فرانسه) است.



شکل ۲. الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای نمونه‌های باکتریایی‌های جداسازی‌شدهٔ گروه S.
نمونه‌های A3,A4,A11,A13,A14,A21,A32,A60 دارای باند مربوط به ژن *stx2* هستند. نمونهٔ A18 دارای باند مربوط به *stx1* و نمونه‌های A2, A9,A19,A43 دارای هر دو باند مربوط به ژن‌های *stx1* و *stx2* هستند. لدر استفاده‌شده bp ۱۰۰ (فرمنتاز، فرانسه) است.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده از مراکز بهداشتی ـ درمانی در شهرستان خوی نشان داد که حدود ۷۸ نمونه از نظر آلودگی به *اشریشیاکلی* مثبت بودند. در این مطالعه مشخص شد که باکتری‌های خانوادهٔ *انتروباکتریاسه* فراوان‌ترین عوامل ایجادکنندهٔ عفونت ادراری هستند که از میان آنها گونهٔ *اشریشیاکلی* شاخص‌ترین است. Isvand و همکاران، در مطالعه‌ای در دزفول نشان دادند که *اشریشیاکلی* شایع‌ترین عامل عفونت دستگاه ادراری بوده و مقاومت آن نسبت به آمپی‌سیلین زیاد است که از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شایع‌ترین عامل با مطالعهٔ حاضر هم‌خوانی دارد (۴). در مطالعهٔ Khotayi و همکاران، نشان داده شد *اشریشیاکلی* شایع‌ترین عامل عفونت ادراری است (۶۲/۷درصد) ۶۴درصد؛ پس از آن *کلبسیلا پنومونیه* (۱۲/۷درصد) ۱۳درصد، سپس *انتروکوک* (۸/۸درصد) ۹درصد و سایر میکروارگانیسم‌ها قرار داشتند (۱۴). این مطالب و نتایج حاصله، نشان می‌دهد که توجه اصلی ما در زمینهٔ تشخیص و درمان، به‌ویژه در درمان تجربی و اولیه، بیشتر باید روی *اشریشیاکلی* متمرکز باشد. در مطالعهٔ حاضر و مطالعه Eghbalian و Esmaeili ، *اشریشیاکلی* شایع‌ترین عامل عفونت ادراری بود (۱۶،۱۵). در درمان آنتی‌بیوتیکی باید به موضوع مقاومت روبه‌افزایش آنتی‌بیوتیک‌ها نیز توجه شود. مطالعات اخیر، نشان‌دهندهٔ سیر روبه‌افزایش مقاومت در آنتی‌بیوتیک‌ها در کشورهای در حال توسعه و نیز توسعه‌یافته است. در مطالعهٔ Ahmed و همکاران (۲۰۰۰) تحت‌عنوان مقاومت ضدمیکروبی در جدایه‌های باکتری بیماران مبتلا به اسهال و عفونت ادراری در سودان نشان دادند که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ارگانیسم‌های دخیل در عفونت دستگاه ادراری در سودان نسبت به مطالعهٔ ۱۵ سال پیش (۱۹۸۵) افزایش یافته است و در این مطالعه *اشریشیاکلی* مقاومت بالایی به آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، کوتریموکسازول، تتراسایکلین، سولفونامید، تریدمتوریم، استرپتومایسین و کاربنیسیلین نشان داد که از نظر مقاومت به آمپی‌سیلین با مطالعهٔ حاضر همخوانی دارد (۱۷). با توجه به اینکه هدف اصلی از این مطالعه، کمک به انتخاب نوع درمان تجربی عفونت دستگاه ادراری براساس حساس‌ترین آنتی‌بیوتیک است، حساسیت میکروب‌های دخیل در عفونت دستگاه ادراری ارزیابی

شد. در مطالعهٔ حاضر *اشریشیاکلی* که شایع‌ترین عامل عفونت ادراری بود، بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیاکلی* به کوتریموکسازول، نیتروفورانتوئین، سیپروفلوکساسین، نوروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید و بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به جنتامایسین، آمپی‌سیلین، است. Abdullahi و Mehr Azamma در یک مطالعه با عنوان ارزیابی الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی عفونت‌های ادراری به این نتیجه رسیدند که عوامل عفونت ادراری، بیشترین مقاومت را به فلوروکینولون‌ها وکوتریموکسازول و بیشترین حساسیت را به نیتروفورانتوئین و ایمی‌پنم داشته‌اند؛ بنابراین در مواردی که به نتیجهٔ کشت ادراری دسترسی نباشد، این آنتی‌بیوتیک‌ها بهترین انتخاب برای شروع درمان هستند که با مطالعهٔ حاضر از نظر کوتریموکسازول همخوانی ندارد (۳). در تحقیقی در فلوریدا که از سوی Loughlin و همکاران صورت گرفت، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در برابر کوتریموکسازول گزارش کرده و بر نقش فاکتورهای اپیدمیولوژیکی، ویژگی‌های جمعیتی و زمان موردمطالعه در ایجاد گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی تأکید داشته است. این تحقیق مهم‌ترین ریسک فاکتور را پیشینهٔ مصرف اخیر آنتی‌بیوتیکی می‌داند که با مطالعهٔ حاضر همخوانی ندارد (۱۸). در تحقیقی که Obi.Cl و همکاران در دپارتمان میکروبیولوژی زیمبابوه طی سال‌های ۱۹۹۶-۱۹۹۵ انجام دادند، بیشترین میزان مقاومت باکتری *اشریشیاکلی* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های متداول آن کشور یعنی کوتریموکسازول و آمپی‌سیلین و تتراسایکلین دانسته‌اند. در این مطالعه بیشترین میزان حساسیت نسبت به سیپروفلوکساسین و داروی انتخابی در خط اول معرفی شده است که از نظر بیشترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین همخوانی دارد (۱۹). Rahimi و همکاران، طی مطالعه‌ای به این نتیجه رسیدند که بیماران زنی که عفونت ادراری داشتند از سطح بالای مقاومت دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شایع برخوردارند (۲۰). Daneshyar و همکاران در یک مطالعه به این نتیجه رسیدند چنانچه از ۳۷۷ زن باردار معاینه‌شده، باکتریوری بدون علامت به استناد پیوری بررسی شود، ۲۶/۳درصد از نمونه‌های عفونت از دست خواهند رفت (۲۱). در مطالعهٔ Eghbalian و Yousefi Mashouf، *اشریشیاکلی* بیشترین حساسیت را به نیترفورانتوئین، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین و همچنین بیشترین مقاومت را به آمپی‌سیلین و تتراسایکلین داشت که با مطالعهٔ حاضر کاملا همخوانی دارد (۱۶). در مطالعهٔ Esmaeili، بیشترین حساسیت *اشریشیاکلی* به سفالوتین، سفوتاکسیم و آمیکاسین و کمترین حساسیت به کوتریموکسازول گزارش شد که با مطالعهٔ حاضر همخوانی ندارد (۱۵). در مطالعهٔ Marefati و Ghazi saeidi ، حساسیت بالای ۹۰درصد به نیتروفورانتوئین، نالیدیکسیک اسید و جنتامایسین و بیشترین مقاومت به آمپی‌سیلین و کوتریموکسازول عنوان شد که از نظر مقاومت در برابر آمپی‌سیلین با مطالعهٔ حاضر همخوانی دارد (۲۲). در مطالعهٔ Kalantar و همکاران، بیشترین مقاومت به کوتریموکسازول، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین بود که از نظر مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین با مطالعهٔ حاضر همخوانی دارد (۲۳). Mantadakis و همکاران (۲۰۱۱) در یک مطالعه به‌عنوان حساسیت ضدمیکروبی از پاتوژن‌های ادراری کودکان ترکیه نشان داد میزان مقاومت *اشرشیاکلی* به آمپی‌سیلین ۵درصد و به کوتریموکسازول ۵/۲۰درصد بود که با مطالعهٔ حاضر همخوانی ندارد (۲۴). در مطالعهٔ Younis و همکاران، بیشترین مقاومت به آمپی‌سیلین، کوتریموکسازول و سفالکسین دیده شد که از نظر مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین با مطالعهٔ ما همخوانی دارد (۲۵). در مطالعهٔ Alaei و Salehzadeh، بیشترین مقاومت به آمپی‌سیلین، کوتریموکسازول و سفالکسین دیده شد که از نظر مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین با مطالعهٔ حاضر همخوانی دارد (۲۶). از لحاظ سروتایپینگ بیشتر ایزوله‌های جداشده شامل O55, O86, O91, O111,O119, O126, O127, O128 بود. جیمزو جانسون طی پژوهشی سروگروه‌های O جداشده باکتری *اشریشیاکلی* مولد عفونت ادراری را در کشور امریکا O1 ,O2,O4 ,O15,O16 O64, O77, O87, گزارش کرد (۷). در گزارش Blanco و همکاران سرتیپ‌های O127, O126, O44, O18, O26 شامل بیش از ۴۶درصد عفونت‌های ایجادشده در احشام هستند (۹). ازاین‌رو می‌توان نتیجه گرفت *اشریشیاکلی* جداشده از عفونت ادراری در هر منطقهٔ جعرافیایی با هم از لحاظ سرو تایپینگ تفاوت دارد. خانوادهٔ *اشریشیاکلی* مولد وروتوکسین شامل سروتایپ‌های وسیعی از آنتی‌ژن‌های O هستند؛ ولی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* عامل عفونت‌های ادراری کمتر بررسی شده‌اند (۲۷). وروتوکسین‌ها متعلق به تعداد محدودی از سروتیپ‌های حاوی آنتی‌ژن‌های O:H هستند و vtx1 و vtx2 از طریق سه فاژ کدکنندهٔ توکسین (H19B, 933J H30) در باکتری *اشریشیاکلی* بیان می‌شوند. مکانیسم عمل توکسین‌های vtx1 و vtx2 مشابه هم است؛ ولی سمیت نوع vtx2، ۴۰۰ برابر بیشتر از نوع vtx1 است (۲۸). یک ایزولهٔ *اشریشیاکلی* مولد وروتوکسین ممکن است vtx1 یا vtx2 و یا هردو را تولید کند. گزارش‌های مختلف دربارهٔ شیوع سروتایپ‌های O مولد وروتوکسین در سایر کشورها نشان می‌دهد

که عامل غالب عفونت‌ها ایزولهٔ O157:H7/*شریشیاکلی* بوده است (۲۰). در تحقیقاتی که Blanco و همکاران انجام دادند، از بین ۴۸۲ نمونه توانستند سه مورد *اشریشیاکلی* وروتوکسیژنیک را جداسازی کنند (۹). Wani طی گزارشی عنوان کرد که فقط ۱۹درصد ایزوله‌های *اشریشیاکلی* مولد شیگا توکسین واجد ژن *vtx2* است و در ۴۴/۵درصد هر دو ژن *vtx1* یا *vtx2* مشاهده می‌شود که با مطالعهٔ حاضر همخوانی داشت (۲۹). طبق گزارش‌های Blanco و همکاران ۳۴درصد کل ایزوله‌های *اشریشیاکلی* مولد شیگا توکسی واجد ژن *vtx1*، ۳۶درصد واجد ژن *vtx2* و ۳۰درصد آنها دارای هر دو ژن هستند که با مطالعهٔ حاضر همخوانی داشت (۸). Jenkins و همکاران از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز حضور ژن *vtx1* را در سروتایپ‌های O26، ژن *vtx2*در سروتایپ‌های O128 و O145 و در۶۰درصد سروتایپ‌های O111 ژن *vtx2* و ۲۸درصد آنها ژن *vtx1* را نشان دادند که با مطالعهٔ حاضر همخوانی دارد (۳۰). در این مطالعه ایزوله‌های شایع از نظر حضور ژن‌های (*stx1*, *stx2*) از طریق واکنش زنجیرهٔ پلیمراز بررسی شد. از نظر ژن *stx2*, *stx1* از بین نمونه‌های جداشده ۱۶ نمونه از نظر *stx2* مثبت بودند و ۳ نمونه از نظر *stx1* مثبت بودند و ۹ مورد هم واجد هر دو ژن بودند. با توجه به اینکه در اکثر تحقیقات انجام‌شده، فراوانی *stx2* بیشتر *از stx1* است، از این نظر با مطالعات حاضر همخوانی دارند. حداقل ۱۰۰ سروتایپ *اشریشیاکلی* قادر به تولید وروتوکسین است که می‌بایست مطالعات دقیق‌تر و کامل‌تری از میزان شیوع سروتایپ‌های هر جامعه در اختیار پزشکان و محققان قرار گیرد. بدین‌ترتیب تشخیص به‌موقع این سویه‌های باکتریایی، با توجه به میزان شیوع آنها، لزوم کاربرد روش‌های مولکولی در این زمینه را روشن می‌سازد.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد فراوانی ژن‌های ویرولانس *stx2*, *stx1* در ایزوله‌های *اشیرشیا کلی* جداشده از عفونت ادراری بالا است. ژن‌های فوق می‌توانند به‌عنوان هدف در مداخلات درمانی بررسی بیشتری شوند و همچنین نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام نشان داد *اشریشیاکلی* جداشده از عفونت ادراری بیشترین مقاومت را به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین داشت که احتمالا به‌دلیل مصرف بی‌رویهٔ این آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد شده است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر صمیمانه سپاسگزاری می‌شود. تمامی کسانی که در طول اجرای این پژوهش مرا یاری کردند تقدیر و تشکر می‌کنم. شایان ذکر است که این مقاله حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد خانم مهسا عبدالعلی‌زاده با کد پایان‌نامهٔ ۲۲۰۳۰۵۰۷۹۳۲۰۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر است.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Schaechter M, Engleberg NC, DiRita VJ, Dermody TS. Schaechter's mechanisms of microbial disease. Lippincott Williams & Wilkins. 2007.
2. Hamid farahani R, Tajik AR, Noorifard M, Keshavarz A, Taghipour N, HOSSIENI SJ. 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.
3. Abdullahi AR, Mehr Azamma M. Evaluation of Antibiotic susceptibility and resistance pattern of urinary tract infections in Imam Khomeini Hospital. TUMJ. 2009; 7 (2): 59-66
4. Isvand A, Yahyavi M, Asadi SM, Kooti W, Davoodi JZ. THE Study of Bacteriological factors and Antibiotic resistance in women with UTI Referring to the Razi Laboratory Dezful. Jjums. 2014; 22: 199 – 205
5. Sarkar S, Ulett GC, Totsika M, Phan MD, Schembri MA. Role of Capsule and O Antigen in the Virulence of Uropathogenic Escherichia coli . PLOS One. 2014 ; 9(4): e94786. DOI: : 10.1371/journal.pone.0094786

   PMID: 24722484 PMCID PMC3983267
6. Mansouri F, Shams N, Rashidian E. Prevalence of Shiga Toxin-Producing Genes in Escherichia Coli Isolated From Patients with Urinary Tract Infections in Khorramabad. Majallah-i pizishki-i Danishgah-i Ulum-i Pizishki va Khadamat-i Bihdashti-i Darmani-i Tabriz. 2015; 37(3): 50.
7. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes *of Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis. 2000; 181(1): 261-72. https://doi.org/10.1086/315217
8. Blanco JE, Alonso MP, Mora A. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin

(verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. J Clin Microbiol. 2004; 42(1): 311-19.

PMID: 14715771 PMCID: PMC321739

9. Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Alonso MP, Gonzalez EA, et al. Verotoxin-producing Escherichia coli in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. Experimental biology and medicine. 2003; 228(4): 345-51.
10. Wikler MA, Cockerill FR, Craig WA, Dudley MN, Eliopoulos GM, Hecht DW, et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth Informational Supplement. CLSI. 2007; 27(1).
11. Cockerill FR, Patel JB, Alder J, Bradford PA, Dudley MN, Eliopoulos GM, et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement, M100-S23. CLSI. 2013; 33(1): 130-6.
12. Stamdards A. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved Standards CLSI. 2010; M100-S20.
13. Mamiatis T, Fritsch EF, Sambrook J, Engel J. Molecular cloning–A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982, 545 S., 42$. Acta Biotechnologica. 1985; 5(1): 104. . https://doi.org/10.1002/abio.370050118
14. Khotayi Q, Mamishi S. Antibiotic resistance of germs isolated from urinary tract infections in Northern Iran . Iranian Journal of Pediatrics. 2002; 12(2): 28-32.
15. Esmaeili M. Antibiotics for causative microorganism of urinary tract infections.Iranian journal of pediatrics. 2005. 15(2): 165-73.
16. Eghbalian F, Yousefi Mashouf R. Determining the frequency of the bacterial agents in urinary tract infections in hospitalized patients under 18 years old in Ekbatan hospital. Journal of Army University of Medical Sciences of the I.R.Iran. 2005. 3(11): 635-9.
17. Ahmed AA, Osman H, Mansour AM, Musa HA, Ahmed AB, Karrar Z, Hassan HS. Antimicrobial agent resistance in bacterial isolates from patients with diarrhea and urinary tract infection in the Sudan. Am J Trop Med Hyg. 2000; 63(5-6): 259-63.
18. Mc Loughlin T.G, et al. Antibiotic resistance patterns of uropathogens in pediatric emergency department patients. Clinical Practice J. (2002)21(3), 431-433.
19. Obi CL, Tarupiwa A. Simango C. Scope of urinary pathogens isolated in the Public Health Bacteriology Laboratory, Harare: antibiotic susceptibility patterns of isolates and incidence of haemolytic bacteria. The Central African journal of Medicine.1996; 42(8): 244-9.
20. Rahimi M, Falsafi S, Tayebi Z, Msoumi M, Mirzaei A,Farasat pour M. Antimicrobial susceptibility pattern of human pathogenic bacteria isolated from patients with urinary tract infection. Cellular & Molecular Biology Letters. 2014; 4(15): 83-9.
21. Daneshyar E, Mousavi BS, Alikhani MY. Association Between asymptomatic bacteriuria and some emographic variables in pregnant womenr refered to health centers affilited to Hamadan university of medical sciences. jiums. 2010; 18(3): 53-60.
22. Marefati S, Ghazi saeidi M. The study of results of urine cultures and antibiograms in children with urinary tract infection referred to laboratory of Amir Kabir hospital of Arak. AMUJ. 2000; 3(12): 44-8.
23. Kalantar E, Motlagh ME, Limejad H, Reshadmanesh N. Prevalence of urinary tract pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in children at hodpitals in iran. Clin Infect Dis. 2008; 3(3): 149-53
24. Mantadakis E, Tsalkidis A, Panopoulou M, Pagkalis S, Tripsianis G, Falagas M, et al. Antimicrobial susceptibility of pediatric uropathogens in Thrace, Greece. International urology and nephrology. 2011 1; 43(2): 549-55.
25. Younis N, AL-Nader M, Jbar I, Mardeni R. Uropathogens and their antibiotic susceptibility among children with urinary tract infection treated at prince Hashem Bin AL-Hussein hospital. JRMS.2010; 17(2): 41-5.
26. Alaei V, Salehzadeh F. The clinical manifestations and antibiograms relates in children with urinary tract infections. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2008; 8 (3): 274-80.
27. Shamsi M, Roozbehani N, Kabir K.. Preventive behaviors of urinary tract infection (UTI) based on the theory of planned behavior among pregnant women in Karaj in 2013. Daneshvar. 2014; 21(108): 59-66.
28. Khalili MB, MK SY, Ebadi M, Sadeh MO. Correlation between urine analysis and urine culture in the diagnosis of urinary tract infection in Yazd central laboratory. Tehran University Medical Journal TUMS Publications. 2007; 65(9): 53-8.
29. Wani SA, Pandit F, Samanta I, Bhat MA, Buchh AS. Molecular epidemiology of Shiga toxin-

producing Escherichia coli in India. Current Science. 2004; 25: 1345-53.

30. Jenkins C, Willshaw GA, Evans J, Cheasty T, Chart H, Shaw DJ, et al. Subtyping of virulence genes in verocytotoxin-producing Escherichia coli (VTEC) other than serogroup O157 associated with disease in the United Kingdom. Journal of Medical Microbiology. 2003; 52(11): 941-7.