

بررسی فاکتورهای ویرو لانس، تعیین سروگروپ ها و مقاومت پادزیستی سویه های اشریشیا کلی یورپاتوزن جدا شده از کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه

بنفشه درمنش^۱، رضا میرنژاد^۲، ابراهیم خداوردی داریان^۳، حسن ممتاز^۴، عماد یاحقی^۵، فرهاد صفرپور دهکردی^{۶*}، مطهره پیله ورزاده^۷

۱. دپارتمان نفرولوژی، فوق تخصص بیماری های کلیه در کودکان، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، کرج، ایران
۴. گروه میکروبی شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۵. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران
۶. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۷. دانشگاه علوم پزشکی جیرفت، جیرفت، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: سروگروپ ها و فاکتور های حدت /اشریشیا کلی نقش مهمی را در بروز علائم عفونت ادراری کودکان بازی می کنند. هدف از بررسی حاضر تعیین همزمان فراوانی فاکتور های حدت، سروگروپ ها و خصوصیات مقاومت پادزیستی باکتری /اشریشیا کلی یورپاتوزنیک جداسازی شده از کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه که در طی سال های ۹۲-۱۳۹۱ انجام گرفت، ۱۲۱ سویه /اشریشیا کلی از نمونه های ادرار افراد مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه، بستری شده در بیمارستان بقیه ا... (عج) تهران، جمع آوری شد. مقاومت پادزیستی سویه ها علیه ۱۰ پادزیست رایج با استفاده از روش دیسک گذاری ساده ارزیابی شد. در نهایت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی فاکتور های حدت، سروگروپ ها و ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی، ارزیابی شدند.

یافته ها: در جامعه نمونه ها، ۴۵/۰۹٪ پسران و ۵۵/۷۱٪ دختران بودند. بیشترین فراوانی باکتری در پسران زیر ۱ سال (۷۱/۴۲٪) و دختران ۱۲-۵ ساله (۷۵٪) دیده شد. فراوانی /اشریشیا کلی در کودکان مبتلا به ترتیب ۵۵/۵۵ و ۴۴/۸۹٪ بود. سروگروپ های اصلی ردیابی شده در کودکان مبتلا به پیلونفریت، O1، O2، O4، O7 و O25 و سروگروپ های اصلی ردیابی شده در کودکان مبتلا به التهاب مثانه، O16، O18، O75 و O22 بودند.

فاکتور های حدت در موارد پیلونفریت، *pap* (۱۰۰٪)، *afa* (۹۷/۵٪)، *sfa* (۹۵٪)، *hly* (۹۵٪) و *cnf-1* (۹۲/۵٪) و در موارد التهاب مثانه، *fim* (۱۰۰٪)، *pap* (۷۲/۷٪)، *afa* (۶۳/۶٪) و *hly* (۴۵/۴٪) بودند. ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی علیه جنتامایسین (۹۶/۷٪)، بتا لاکتام ها (به ترتیب ۹۰/۳ و ۸۸/۷٪) و تتراسیکلین (۸۲/۲٪)، بیشترین فراوانی را در جدایه های باکتری داشتند. جدایه های /اشریشیا کلی بیشترین مقاومت پادزیستی را علیه پادزیست جنتامایسین (۹۵/۱٪) و آمپی سیلین (۹۱/۹٪) داشتند.

نتیجه گیری: در بررسی حاضر تنها ۶/۴٪ از جدایه ها به پادزیست ایمی پنم مقاوم بودند. در نتیجه این پادزیست می تواند انتخاب مناسبی برای درمان موارد مبتلا به عفونت های ادراری ناشی از /اشریشیا کلی باشد.

کلمات کلیدی: اشریشیا کلی یورپاتوزنیک، مقاومت آنتی بیوتیکی، عفونت های ادراری

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۲/۰۱/۱۰

پذیرش: ۱۳۹۲/۰۴/۱۰

انتشار آنلاین: ۱۳۹۲/۱۲/۱۵

IJMM 1392; 7(2): P 27-39

نویسنده مسئول:

فرهاد صفرپور دهکردی

باشگاه پژوهشگران جوان و

نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی

واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

تلفن: ۰۹۳۶۵۸۱۹۴۹۱

پست الکترونیک:

Dr.farhads@yahoo.com

اقتصادی بیشتری را به بار می آورند (۵). ژن های کد کننده مقاومت به پادزیست آمپی سیلین (*SHV* و *TEM*)، سولفانامید ها (*int1* و *sul2*، *sul1*)، استرپتومایسین (*strB*، *str*)، تتراسیکلین (*tetG* و *tetA-tetE*)، تری متوپریم (*dfr7*، *dfrA13*، *dfrA1*) و *dfr17*) و کلرامفنیکل (*catI-catIII*)، نقش اصلی را در بروز مقاومت های پادزیستی در این باکتری بر عهده دارند (۶). اولین پادزیست های مورد استفاده در درمان عفونت های ادراری کینولون ها و فلورکینولون ها بودند (۷) اما بررسی های اخیر در سراسر ایالات متحده و اروپا نشان داده که فراوانی سوش های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک مقاوم به فلورکینولون ها هر ساله رو به افزایش است (۷). با این وجود بررسی الگوی مقاومت پادزیستی باکتری *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک به نظر ضروری می رسد. بررسی های پراکنده ای در ایران بر روی عفونت های ادراری ناشی از سویه های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک انجام پذیرفته است. Serailo و همکاران (۲۰۱۲) (۸) میزان شیوع *اشریشیا کلی* های یوروپاتوژن را در نمونه های ادرار جمع آوری شده از بیمارستان های شهر تهران، ۸۴/۸۵٪ گزارش کردند. میزان شیوع ژن های حدت یوروپاتوژنیک در بررسی Serailo و همکاران (۲۰۱۲) (۸) دامنه حدود ۳۰ تا ۷۵٪ داشت. Farshad و همکاران (۲۰۱۲) (۹) نشان دادند که بیش از ۴۰٪ موارد پیلونفریت و التهاب مثانه در کودکان شهرستان جهرم در اثر فعالیت سویه های مقاوم *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک ایجاد شده است. میزان شیوع ژن های *hly* و *cnf-1*، *sfa*، *pap* در سویه های جدا شده از کودکان شهرستان جهرم دامنه ای حدود ۱۴ تا ۸۶٪ داشته است (۹). تا کنون بیشترین شیوع مقاومت پادزیستی سویه های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک جداسازی شده از بیمارستان های ایران علیه پادزیست های آمپی سیلین (۸۰/۲٪)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۷۶٪)، تتراسیکلین (۷۰/۸٪)، نالیدیکسیک اسید (۲۴/۵٪) و جنتامایسین (۱۵/۴٪) بوده است (۹).

با توجه به کافی نبودن مطالعات انجام پذیرفته در ایران بر روی فراوانی ژن های ویروالانس، سروگروپ ها و خصوصیات مقاومت پادزیستی *اشریشیا کلی* های یوروپاتوژنیک، لذا بررسی حاضر را به منظور تعیین فراوانی ژن های حدت، سروگروپ ها، ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی و الگوی مقاومت پادزیستی

عفونت های دستگاه ادراری یکی از رایج ترین عفونت های باکتری در کودکان هستند که اغلب توسط سویه های *اشریشیا کلی* های یوروپاتوژنیک ایجاد می شوند (۲،۱). عفونت های دستگاه ادراری ایجاد شده در اثر این باکتری شامل طیف وسیعی از اختلالات از جمله التهاب مثانه (عفونت مثانه)، التهاب و عفونت میزانی و پیلونفریت (عفونت کلیه) هستند (۲،۱). این عفونت ها در ۱٪ پسران و ۳-۸٪ از دختران تشخیص داده شده اند (۳). *اشریشیا کلی* های یوروپاتوژنیک مسئول ۷۰-۹۰٪ از عفونت های ادراری در افراد هستند (۲،۱).

اشریشیا کلی ها شامل هر دو کلنی از سویه های بیماری زا و کومنسال هستند که به طور معمول توسط سروتایپینگ آنتی ژن های سطحی خود از قبیل آنتی ژن O (لیپو پلی ساکارد)، آنتی ژن H (فلاژله) و در برخی موارد آنتی ژن K (کپسول) شناسایی می شوند (۴). از بین ۱۷۴ سروگروپ O که از باکتری *اشریشیا کلی* شناسایی شده است، سروگروپ های O1، O2، O4، O6، O7، O8، O15، O16، O18، O21، O22، O25، O75 و O83 ترجیحاً در ارتباط با سویه های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک هستند (۵). علاوه بر سروگروپ های ادراری باکتری *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک، حضور یکسری فاکتور های ویروالانس را با بروز پیلونفریت و تورم مثانه و میزانی در کودکان مبتلا به عفونت های ادراری، مرتبط دانسته اند (۵-۱). از بین تمام فاکتورهای ویروالانس در باکتری، فیمبریه P باکتری (*pap*)، فیمبریه S (*sfa*)، فیمبریه مربوط به اتصال باکتری (*afa*)، همولیزین باکتری (*hly*)، فاکتور نکروز دهنده سایتوتوکسیک (*cnf-1*)، آنروباکتین باکتری (*ea*)، فاکتور *fim* و فاکتور های حدت *astA*، *set-1*، *iroN*، *usp* و *iha* و *iutA* نقش اصلی را در بروز عفونت های دستگاه ادراری دارند (۵). حضور ژن های ویروالانس ذکر شده سبب چسبندگی و تهاجم باکتری *اشریشیا کلی* به سلول های اپی تلیوم مجاری ادراری و همچنین تولید سایتوکین و سایر فاکتور های التهابی، آپوپتوزیس سلول های دفاعی و جلوگیری از فاگوسیتوز، می شود (۵-۱).

متأسفانه با وجود درمان های پادزیستی وسیعی که انجام می شود. عفونت های دستگاه ادراری ناشی از این باکتری نه تنها بهبودی نمی یابند؛ بلکه مقاومت های پادزیستی ایجاد شده در سویه های مختلف *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک هر ساله خسارات

باکتری / شریشیا کلی یوروپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان مبتلا به عفونت های ادراری، انجام دادیم.

مواد و روش ها:

در طی ساله ای ۹۲-۱۳۹۱، ۱۲۱ سویه / شریشیا کلی جدا شده از کودکان مبتلا به علائم عفونت ادراری متعلق به هر دو جنس و در سنین مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. سویه هایی که پس از غنی سازی در محیط آب پپتونه قلیایی (مرک، آلمان)، در محیط کشت مک کانکی آگار (مرک، آلمان) کلنی های ارغوانی رنگ داشتند، به محیط کشت EMB agar (مرک، آلمان) انتقال داده شدند. کلنی هایی که در این محیط رنگ سبز با جلای فلزی داشتند به عنوان باکتری تیپیک در نظر گرفته شدند و با آزمون های بیوشیمیایی اندول، متیل رد، سیترات، تولید هیدروژن سولفید در محیط TSI و تست اوره آز، مورد ارزیابی قرار گرفتند. سویه هایی که به عنوان / شریشیا کلی تیپیک مورد تأیید قرار گرفتند جهت انجام بررسی های مولکولی به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی و بیماری های عفونی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، با رعایت شرایط سترون، منتقل شدند.

تعیین الگوی مقاومت پادزیستی

به منظور تعیین الگوی مقاومت پادزیستی در سویه های / شریشیا کلی جدا شده از عفونت های دستگاه ادراری کودکان، از روش دیسک گذاری ساده (Kirby-Bauer) طبق دستورالعمل (2012) CLSI استفاده شد (۱۰). در این مرحله سویه های میکروبی جدا شده در محیط جامد مولر هینتون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در حضور انواع دیسک های پادزیستی (پادتن طب، ایران) شامل تتراسیکلین (30 µg/disk)، جنتامایسین (10 µg/disk)، سیپروفلوکساسین (5 µg/disk)، نیتروفوران توئین (30 µg/disk)، آمیکاسین (30 µg/disk)، سفوتاکسیم (30 µg/disk)، ایمپنم (30 µg/disk)، افلوکسازین (5 µg/disk)، مزلوسیلین (30 µg/disk) و آمپی سیلین (10 µg/disk) کشت داده شدند و با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد حساسیت یا مقاومت باکتری به هر پادزیست تعیین گردید. در این مرحله از سویه استاندارد / شریشیا کلی ATCC 25922 به عنوان نمونه کنترل در آزمایش آنتی بیوگرام استفاده شد.

استخراج DNA و بررسی فراوانی سرورگروپ ها، فاکتور های حدت و ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی

باکتری های جداسازی شده به مدت ۲۴ ساعت در محیط مایع لوریا برتانی (Leuria Bertani) (مرک، آلمان) کشت داده شدند و DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شد. نمونه های DNA استخراج شده تا زمان انجام واکنش PCR در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس، نگهداری شدند.

فراوانی هر یک از سرورگروپ ها، ژن های حدت و ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی باکتری / شریشیا کلی یوروپاتوژنیک با استفاده از چندین واکنش زنجیره ای پلیمرز مورد ارزیابی قرار گرفت. در تمام واکنش های PCR از دستگاه PCR ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf آلمان (Eppendorf Mastercycler-Nethel-Hinz GmbH, Hamburg, Germany)، استفاده شد. لیست پرایمر های مورد استفاده (سیناژن، ایران) برای تشخیص سرورگروپ ها، ژن های حدت و ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی باکتری / شریشیا کلی یوروپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان مبتلا به عفونت های ادراری در جدول ۱ آمده است. هر یک از سویه های دریافت شده در آزمایشگاه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن 16SrRNA باکتری / شریشیا کلی تأیید شدند. دقت، حساسیت، ویژگی بالا و در دسترس بودن پرایمر های مربوط به ژن هدف 16S rRNA باکتری / شریشیا کلی، دلیل انتخاب این ژن برای تأیید سویه های باکتری بود. اجزا هر یک از واکنش های PCR ساده و چندهایی، حجم واکنش و برنامه حرارتی در جدول ۲ آمده است.

الکتروفورز محصولات PCR

برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱٪ و رنگ آمیزی DNA با رنگ سایبر گرین انجام شد. ژل ها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند.

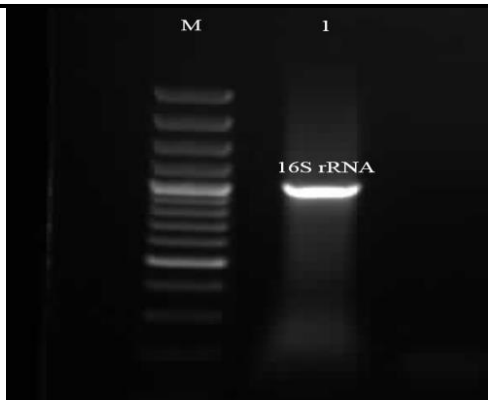
جدول ۱: لیست پرایمر های مورد استفاده برای ردیابی ژن های حدت، سروگروپ ها و ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی در اشریشیا کلی های یوروپاتوژنیک جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت های ادراری

منابع	اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر (5'-3')	ژن هدف
1	1098	GTGAGCAAAAGTGAATAAGGAACG CGCTGATACGAATACCATCCTAC	O1
1	783	GGATGACGATGTGATTTTGGCTAAC TCTGGGTTTGTGTATGAGGC	O6
1	610	CTATCAAATACTCTGCTGGAATC TGGCTTCGAGATTAACCTATTCCT	O7
1	448	CCAGAGGCATAATCAGAAATAACAG GCAGAGTTAGTCAACAAAAGGTCAG	O8
1	302	GGTTTCAATCTCACAGCAACTCAG GTAGAGGGATAATAGCCAAGCGG	O16
1	209	CTGCTGATGTCGCTATTATTGCTG TGAAAAAAGGGAAACAGAAGGCC	O21
1	511	GAGATATACATGGGGAGGTAGGCT ACCCGATAATCATATTTCCCAAC	O75
1	770	AGTGAGTTACTTTTACGATGGAC AGTTTAGTATGCCCTGACTTGAA	O2
1	664	TTGTTGCGATAATGTGCATGTTCC AATAATTGCTATACCCACACCTC	O4
1	183	TCTTGTAGAGTCATTGGTGTATCG ATAAACGAGCAAGCACCACACC	O15
1	551	GTTCCGGTGGTTGATTACAGTTAG CTACTATCATCCTCACTGACCACG	O18
1	468	TTCATTGTCGCCACTACTTCCG GAAACAGCCATGACATTACTACG	O22
1	230	AGAGATCCGTCTTTTATTGTTCCG GTCTGGATACCTAACGCAATACCC	O25
1	362	GTACACCAGGCAAACTCGAAAG TTCTGTAAGCTAATGAATAGGCACC	O83
1	919	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CCGCAATTCTTTGAGTTT	<i>E. coli</i> 16S rRNA
۱۱	147	GTGAACCTGCTGCCGATATC ATTTGTGGATAAAAAATGACG	<i>set-1</i>
۱۱	110	ATGCCATCAACACAGTATAT GCGAGTGACGGCTTTGTAGT	<i>astA</i>
۱۲	336	GCAACAGCAACGCTGGTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	<i>Pap</i>
۱۲	498	AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG TGGAGTTTCCTATGCAGGAG	<i>Cnf-1</i>
۱۲	1177	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	<i>hlyA</i>
۱۳	410	CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAACCTGGCA	<i>Afa</i>
۱۳	750	GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC CATCAAGCTGTTGTTGCTCCGCGG	<i>Sfa</i>
۱۴	559	GAGAAGAGTTTGTATTTAACTTATTG AGAGCCGCTGTAGAAGTGGG	<i>Fim</i>
۱۵	827	CTGGCGAGGCTCTGAGATCA TCCTTAAGCTCCCGGGCTGA	<i>Iha</i>
۱۵	665	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG GACGCCGACATTAAGACGCAG	<i>Iron</i>
۱۶	440	ACATTCACGGCAAGCCTCAG AGCGAGTTCCTGGTGAAGC	<i>usp</i>
۱۷	286	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	<i>aac(3)-IV</i>
۱۷	822	TTCGGCATTCTGAATCTCAC ATGATCTAACCTCGGTCTC	<i>sulI</i>
۱۷	768	TCGCTGTGTATTATCTCC CGCAGATAAATCACCACAATG	<i>blaSHV</i>
۱۷	462	TGGCCAGAAGTACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	<i>CITM</i>
۱۸	577	GGTTCACTCGAACGACGTCA CTGTCCGACAAGTTGCATGA	<i>tet(A)</i>
۱۸	634	CCTCAGCTTCTCAACGCGTG GCACCTTGCTGATGACTCTT	<i>tet(B)</i>
۱۹	367	GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC GAGGCGAAGTCTGGGTAAAAAC	<i>dfrA1</i>
۲۰	670	GGGTATGGATATTATTGATAAAG CTAATCCGGCAGCACTATTTA	<i>qnr</i>

جدول ۲: حجم، فرایند دمایی و تعداد سیکل واکنش های زنجیره‌ای پلیمرز (در هر ردیف از جدول با توجه به حجم و سیکل های واکنش PCR، ژن های هدف طی واکنش PCR چندهابی (Multiplex) و در مورد ژن های تکی طی واکنش PCR ساده، ردیابی شدند)

ژن های هدف	برنامه PCR	حجم واکنش (۵۰ میکرولیتر)
<i>E. coli</i> 16S rRNA	1 cycle: 95 °C ----- 6 min. 31 cycle: 95 °C ----- 45 s 59 °C ----- 60 s 72 °C ----- 60 s 1 cycle: 72 °C ----- 5 min	5 µL PCR buffer 10X 2 mM MgCl ₂ 200 µM dNTP (Fermentas) 1 µM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2.5 µL DNA template
O1, O6, O7, O8, O16, O21, O75	1 cycle: 95 °C ----- 5 min. 30 cycle: 95 °C ----- 30 s 55 °C ----- 60 s 72 °C ----- 60 s 1 cycle: 72 °C ----- 5 min	5 µL PCR buffer 10X 2.5 mM MgCl ₂ 300 µM dNTP (Fermentas) 0.4 µM of each primers F & R 2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template
O2, O4, O15, O18, O22, O25, O83	1 cycle: 95 °C ----- 5 min. 30 cycle: 94 °C ----- 60 s 56 °C ----- 60 s 72 °C ----- 90 s 1 cycle: 72 °C ----- 8 min	5 µL PCR buffer 10X 2.5 mM MgCl ₂ 300 µM dNTP (Fermentas) 0.6 µM of each primers F & R 1.5 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template 5 µL DMSO
<i>tetA, tetB, dfrA1, qnr, aac(3)-IV, sulI, blaSHV, CITM</i>	1 cycle: 94 °C ----- 8 min. 32 cycle: 95 °C ----- 60 s 55 °C ----- 70 s 72 °C ----- 2 min 1 cycle: 72 °C ----- 8 min	5 µL PCR buffer 10X 2.5 mM MgCl ₂ 200 µM dNTP (Fermentas) 0.5 µM of each primers F & R 2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template
<i>usp</i>	1 cycle: 94 °C ----- 2 min. 30 cycle: 94 °C ----- 30 s 58 °C ----- 30 s 73 °C ----- 30 s 1 cycle: 72 °C ----- 10 min	5 µL PCR buffer 10X 2 mM MgCl ₂ 200 µM dNTP (Fermentas) 0.4 µM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template
<i>iha, iron</i>	1 cycle: 94 °C ----- 6 min. 30 cycle: 94 °C ----- 45 s 58 °C ----- 60 s 72 °C ----- 75 s 1 cycle: 72 °C ----- 8 min	5 µL PCR buffer 10X 1.25 mM MgCl ₂ 150 µM dNTP (Fermentas) 1 µM of each primers F & R 1.2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template
<i>fim</i>	1 cycle: 94 °C ----- 3 min. 40 cycle: 94 °C ----- 60 s 58 °C ----- 70 s 72 °C ----- 70 s 1 cycle: 72 °C ----- 6 min	5 µL PCR buffer 10X 1.25 mM MgCl ₂ 125 µM dNTP (Fermentas) 0.5 µM of each primers F & R 1.2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template
<i>set1, astA</i>	1 cycle: 94 °C ----- 3 min. 30 cycle: 94 °C ----- 30 s 55 °C ----- 60 s 72 °C ----- 60 s 1 cycle: 72 °C ----- 5 min	5 µL PCR buffer 10X 2 mM MgCl ₂ 150 µM dNTP (Fermentas) 0.5 µM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template
<i>pap, sfa, afa, hlyA, cnfI</i>	1 cycle: 94 °C ----- 1 min. 30 cycle: 94 °C ----- 60 s 63 °C ----- 30 s 72 °C ----- 90 s 1 cycle: 72 °C ----- 5 min	5 µL PCR buffer 10X 1.5 mM MgCl ₂ 200 µM dNTP (Fermentas) 0.4 µM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 4 µL DNA template

تجزیه و تحلیل آماری



شکل ۱: واکنش PCR برای ردیابی ژن 16S rRNA باکتری اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک در نمونه‌های ادرار کودکان مبتلا به عفونت های ادراری. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی و شماره ۱ نمونه مثبت.

فراوانی سرگروپ های یوروپاتوژنیک در اشریشیا کلی های جداسازی شده از کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه در جدول ۴ نشان داده شده‌اند. در کل سرگروپ های O1, O2, O4 و O16 به ترتیب فراوان ترین گروه‌های تشخیص داده شده در کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه بودند. سرگروپ های O1, O2, O4, O7 و O25 گروه‌های اصلی ردیابی شده در کودکان مبتلا به پیلونفریت و سرگروپ های O16, O18, O75 و O22 گروه‌های اصلی ردیابی شده در کودکان مبتلا به التهاب مثانه بودند (شکل ۲).

فاکتور های حدت *pap*, *afa*, *sfa*, *hly* و *cnf-1* به ترتیب با فراوانی ۱۰۰٪، ۹۷/۵٪، ۹۵٪، ۹۵٪ و ۹۲/۵٪ بیشترین حضور را موارد پیلونفریت و همچنین فاکتور های حدت *pap*, *fim* و *afa* با *hly* به ترتیب با فراوانی ۱۰۰٪، ۷۲/۷٪، ۶۳/۶٪ و ۴۵/۴٪ بیشترین حضور را در موارد التهاب مثانه، داشتند (جدول ۵ و شکل ۳).

داده‌های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (شماره ۱۶) و آزمون های آماری مربع کای و فیشر تجزیه و تحلیل گردید و اختلافات آماری بین حضور و فراوانی انواع فاکتور های حدت و ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی و سرگروپ های مختلف در سویه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک جدا شده از کودکان با عفونت های ادراری بر پایه ضریب اطمینان ۹۵٪ ($P_{value} < 0.05$) مورد بررسی قرار گرفت.

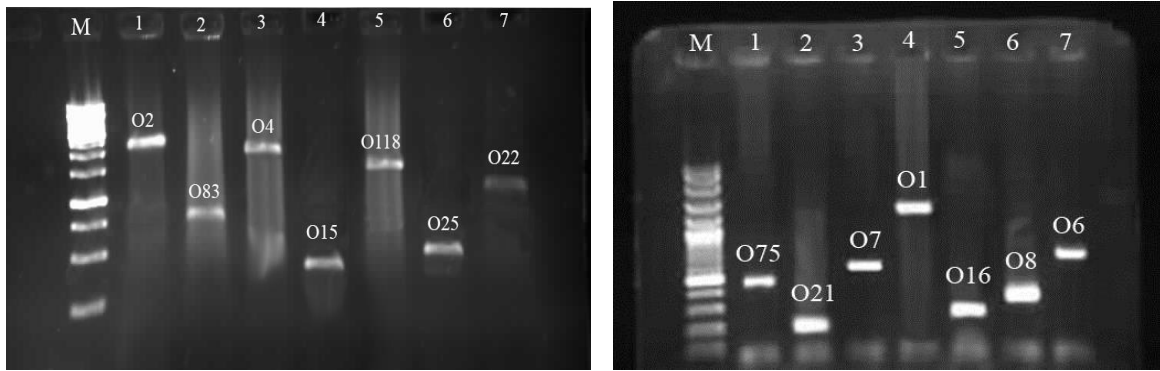
یافته‌ها

فراوانی باکتری اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت های ادراری در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که ۴۵/۰۹٪ از پسران و ۵۵/۷۱٪ از دختران مبتلا به عفونت هادی ادراری، از نظر باکتری اشریشیا کلی، مثبت بودند. پسران زیر ۱ سال (۷۱/۴۲٪) و دختران ۱۲-۵ ساله (۷۵٪)، بیشترین فراوانی آلودگی با اشریشیا کلی را داشتند.

جدول ۳: فراوانی باکتری اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت های ادراری

گروه‌های سنی (سال)	تعداد اخذ شده	تعداد نمونه مثبت (%)
پسر	<1	۱۰ (۷۱/۴۲)
	۵-1	۷ (۴۱/۱۷)
	۱۲-۵	۶ (۳۰)
دختر	کل	۲۳ (۴۵/۰۹)
	<1	۷ (۳۵)
	۵-1	۱۴ (۵۳/۸۴)
کل	۱۲-۵	۱۸ (۷۵)
	کل	۲۹ (۵۵/۷۱)
	<1	۱۷ (۵۰)
کل	۵-1	۲۱ (۴۸/۸۳)
	۱۲-۵	۲۴ (۵۴/۵۴)
	کل	۶۲ (۵۱/۲۳)

از کل ۷۲ نمونه‌ای که از کودکان مبتلا به پیلونفریت و همچنین از کل ۴۹ نمونه‌ای که از کودکان مبتلا به التهاب مثانه اخذ شد، به ترتیب در ۴۰ نمونه (۵۵/۵۵٪) و ۲۲ نمونه (۴۴/۸۹٪) باکتری اشریشیا کلی جداسازی شد (جدول ۴). در کل ۴۸/۳۸٪ و ۴۰٪ از پسران و ۶۰/۹۷٪ و ۴۸/۲۷٪ از دختران بررسی حاضر به ترتیب مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه ناشی از اشریشیا کلی بودند (شکل ۱).



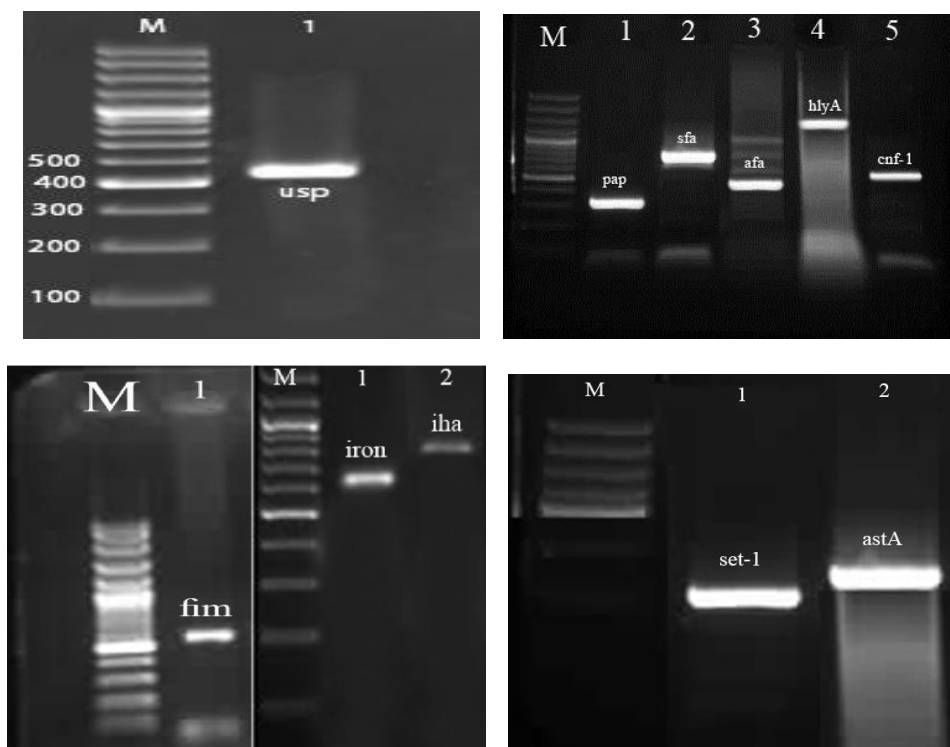
شکل ۲: واکنش PCR برای ردیابی سرگروپ های اشیرشیا کلی های یورپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان دارای عفونت های ادراری. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی و شماره های ۱-۷ نمونه های مثبت برای سرگروپ های ادراری.

جدول ۴: فراوانی سرگروپ های باکتری اشیرشیا کلی یورپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه

		فراوانی سرگروپ ها (%)												یافته های بالینی (تعداد مثبت)		
سایر سرگروپ ها		O83	O75	O25	O22	O21	O18	O16	O15	O8	O7	O6	O4	O2	O1	
	۱ (۶/۶)	-	-	۱ (۶)	-	-	-	۱ (۶/۶)	-	-	۲ (۱۳/۳)	-	۲ (۱۳/۳)	۳ (۲۰)	۵ (۲۳/۳)	پیلونفریت (۱۵)
پسر	-	-	-	-	-	-	۱ (۱۳/۵)	۲ (۸)	-	-	۱ (۱۳/۵)	-	۱ (۱۳/۵)	۱ (۱۳/۵)	۲ (۲۵)	التهاب مثانه (۸)
	۱ (۴/۳)	-	-	۱ (۴/۳)	-	-	۱ (۴/۳)	۳ (۱۳)	-	-	۳ (۱۳)	-	۳ (۱۳)	۴ (۱۷/۳)	۷ (۳۰/۴)	کل (۲۳)
	۲ (۸)	-	-	۱ (۴)	-	-	۱ (۴)	-	-	۲ (۸)	۱ (۴)	۴ (۱۶)	۵ (۲۰)	۹ (۳۶)		پیلونفریت (۲۵)
دختر	۱ (۷/۱)	-	۲ (۱۴/۲)	-	۱ (۷/۱)	-	۲ (۱۴/۲)	۲ (۱۴/۲)	-	-	۱ (۷/۱)	۲ (۱۴/۲)	۱ (۷/۱)	۲ (۱۴/۲)	۲ (۱۴/۲)	التهاب مثانه (۱۴)
	۳ (۷/۶)	-	۲ (۷/۶)	۱ (۲/۵)	۱ (۲/۵)	-	۲ (۵/۱)	۳ (۷/۶)	-	-	۲ (۵/۱)	۲ (۵/۱)	۶ (۱۵/۳)	۶ (۱۵/۳)	۱۱ (۲۸/۲)	کل (۳۹)
	۲ (۷/۵)	-	-	۲ (۵)	=	=	-	۲ (۵)	-	-	۴ (۱۰)	۱ (۲/۵)	۶ (۱۵)	۸ (۲۰)	۱۴ (۳۵)	پیلونفریت (۴۰)
کل	۱ (۴/۵)	-	۲ (۹)	-	۱ (۴/۵)	=	۳ (۱۳/۶)	۵ (۲۲/۷)	-	-	۱ (۴/۵)	۱ (۴/۵)	۳ (۱۳/۶)	۲ (۹)	۴ (۱۸/۱)	التهاب مثانه (۲۲)
	۴ (۶/۴)	-	۲ (۳/۲)	۲ (۳/۲)	۱ (۱/۶)	-	۳ (۴/۸)	۷ (۱۱/۲)	-	-	۵ (۸)	۲ (۳/۲)	۹ (۱۴/۵)	۱۰ (۱۶/۱)	۱۸ (۲۹)	کل (۶۲)

جدول ۵: فراوانی فاکتور های حدت باکتری اشیرشیا کلی یورپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه

		فاکتور های حدت (%)										یافته های بالینی (تعداد مثبت)
astA		usp	iroN	iha	Set-1	Cnf-1	hly	sfa	afa	fim	pap	
	۲ (۱۳/۳)	۴ (۲۶/۶)	۲ (۱۳/۳)	۷ (۴۶/۶)	۸ (۵۳/۳)	۱۳ (۸۶/۶)	۱۳ (۸۶/۶)	۱۳ (۸۶/۶)	۱۴ (۹۳/۳)	۱۳ (۸۶/۶)	۱۵ (۱۰۰)	پیلونفریت (۱۵)
پسر	-	۱ (۱۳/۵)	۱ (۱۳/۵)	۲ (۲۵)	۲ (۲۵)	۴ (۵۰)	۵ (۶۲/۵)	۴ (۵۰)	۵ (۶۲/۵)	۸ (۱۰۰)	۵ (۶۲/۵)	التهاب مثانه (۸)
	۲ (۸/۶)	۵ (۲۱/۷)	۳ (۱۳)	۹ (۳۹/۱)	۱۰ (۴۳/۴)	۱۷ (۷۳/۹)	۱۸ (۷۸/۲)	۱۷ (۷۳/۹)	۱۹ (۸۲/۶)	۲۱ (۹۱/۳)	۲۰ (۸۶/۹)	کل (۲۳)
	۸ (۳۲)	۱۰ (۴۰)	۸ (۳۲)	۱۵ (۶۰)	۱۷ (۶۸)	۲۴ (۹۶)	۲۵ (۱۰۰)	۲۵ (۱۰۰)	۲۵ (۱۰۰)	۲۲ (۸۸)	۲۵ (۱۰۰)	پیلونفریت (۲۵)
دختر	۲ (۱۴/۲)	۱ (۷/۱)	۱ (۷/۱)	۲ (۱۴/۲)	۳ (۲۱/۴)	۴ (۲۸/۵)	۵ (۳۵/۷)	۵ (۳۵/۷)	۹ (۶۴/۲)	۱۴ (۱۰۰)	۱۱ (۷۸/۵)	التهاب مثانه (۱۴)
	۱۰ (۲۵/۶)	۱۱ (۲۸/۲)	۹ (۲۳)	۱۷ (۴۳/۵)	۲۰ (۵۱/۲)	۲۸ (۷۱/۷)	۳۰ (۷۶/۹)	۳۰ (۷۶/۹)	۳۴ (۸۷/۱)	۳۶ (۹۲/۳)	۳۶ (۹۲/۳)	کل (۳۹)
	۱۰ (۲۵)	۱۴ (۳۵)	۱۰ (۲۵)	۲۲ (۵۵)	۲۵ (۶۲/۵)	۳۷ (۹۲/۵)	۳۸ (۹۵)	۳۸ (۹۵)	۳۹ (۹۷/۵)	۳۵ (۸۷/۵)	۴۰ (۱۰۰)	پیلونفریت (۴۰)
کل	۲ (۹)	۲ (۹)	۲ (۹)	۴ (۱۸/۱)	۵ (۲۲/۷)	۸ (۳۶/۳)	۱۰ (۴۵/۴)	۹ (۴۰/۹)	۱۴ (۶۴/۶)	۲۲ (۱۰۰)	۱۶ (۷۳/۷)	التهاب مثانه (۲۲)
	۱۲ (۱۹/۳)	۱۶ (۲۵/۸)	۱۲ (۱۹/۳)	۲۶ (۴۱/۹)	۳۰ (۴۸/۳)	۴۵ (۷۲/۵)	۴۸ (۷۷/۴)	۴۷ (۷۵/۸)	۵۳ (۸۵/۴)	۵۷ (۹۱/۹)	۵۶ (۹۰/۳)	کل (۶۲)

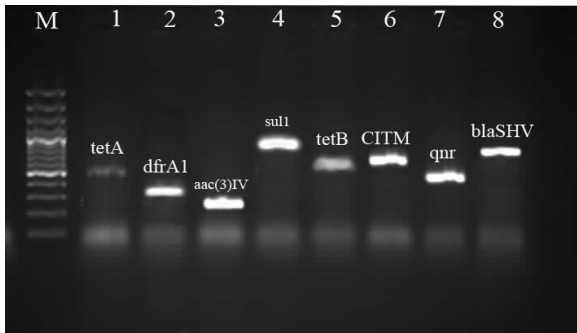


شکل ۳. واکنش PCR جهت ردیابی فاکتور های حدت در اشیریشیا کلی های یوروپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان مبتلا به عفونت های ادراری. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی و شماره ها نشان دهنده نمونه های مثبت هستند.

فراوانی ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی در باکتری اشیریشیا کلی یوروپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه در جدول ۶ نشان داده شده است. ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی بر علیه جنتامایسین (*aac(3)-IV*) (۹۶/۷٪)، بتا لاکتام ها (*blaSHV* و *CITM*) (به ترتیب ۹۰/۳ و ۸۸/۷٪) و تتراسیکلین (*tet(A)*) (۸۲/۲٪)، بیشترین فراوانی را در جدایه های باکتریایی داشتند (شکل ۴).

جدول ۶: فراوانی ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی در باکتری اشیریشیا کلی یوروپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه

ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی (٪)								یافته های بالینی
<i>qnr</i>	<i>dfrA1</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>CITM</i>	<i>blaSHV</i>	<i>sulI</i>	<i>aac(3)-IV</i>	(تعداد مثبت)
(۶۰)9	(۴۰)6	(۸۰)12	(۱۰۰)15	(۱۰۰)15	(۱۰۰)15	(۱۰۰)15	(۱۰۰)15	پیلونفریت (۱۵)
(۵۰)4	(۲۵)2	(۳۷/۵)3	(۶۲/۵)5	(۷۵)۶	(۸۷/۵)۷	(۳۷/۵)3	(۱۰۰)۸	التهاب مثانه (۸) پسر
(۵۶/۵)13	(۳۴/۷)۸	(۶۵/۲)15	(۸۶/۹)۲۰	(۹۱/۳)۲۱	(۹۵/۶)۲۲	(۷۸/۲)18	(۱۰۰)۲۳	کل (۲۳)
(۴۸)12	(۲۸)۷	(۶۴)16	(۸۰)۲۰	(۱۰۰)۲۵	(۹۶)۲۴	(۸۰)۲۰	(۱۰۰)۲۵	پیلونفریت (۲۵)
(۷۱/۴)10	(۴۲/۸)۶	(۶۴/۲)۹	(۷۸/۵)11	(۶۴/۲)۹	(۷۱/۴)10	(۷۱/۴)10	(۸۵/۷)12	التهاب مثانه (۱۴) دختر
(۵۶/۴)22	(۳۳/۳)13	(۶۴/۱)25	(۷۹/۴)31	(۸۷/۱)۳۴	(۸۷/۱)۳۴	(۷۶/۹)۳۰	(۹۴/۸)۳۷	کل (۳۹)
(۵۲/۵)۲۱	(۳۲/۵)13	(۷۰)۲۸	(۸۷/۵)۳۵	(۱۰۰)۴۰	(۹۷/۵)۳۹	(۸۷/۵)۳۵	(۱۰۰)۴۰	پیلونفریت (۴۰)
(۶۳/۶)14	(۳۶/۳)۸	(۵۴/۵)12	(۷۲/۷)16	(۶۸/۱)15	(۷۷/۲)17	(۵۹)13	(۹۰/۹)۲۰	التهاب مثانه (۲۲) کل
(۵۶/۴)35	(۳۳/۸)21	(۶۴/۵)40	(۸۲/۲)51	(۸۸/۷)55	(۹۰/۳)56	(۷۷/۴)48	(۹۶/۷)60	کل (۶۲)



شکل ۳: واکنش PCR برای ردیابی ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی و شماره های ۱-۸ نمونه های مثبت برای ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی هستند.

جدایه های اشریشیا کلی بیشترین مقاومت پادزیستی را علیه پادزیست های جنتامایسین (۰/۹۵/۱)، آمپی سیلین (۰/۹۱/۹)، آمیکاسین (۰/۸۵/۴) و سیپروفلوکسازین (۰/۸۳/۸)، داشتند. به نظر می رسد که پادزیست های ایمپنم (۰/۶/۴) و افلوکسازین (۰/۱۶/۱) به دلیل اثربخشی بالا، می توانند دارو های انتخابی مناسبی برای درمان پیلونفریت و التهاب مثانه در کودکان مبتلا به عفونت های ادراری، باشند. به منظور تأیید تشخیص، محصول PCR به دست آمده از هر کدام از نمونه های مثبت از نظر حضور باکتری، ژن های حدت، ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی و سروگروپ ها، توالی یابی شد. سپس توالی های به دست آمده با استفاده از تکنیک BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool) مورد ارزیابی قرار گرفتند و با توالی های ثبت شده در بانک ژنی، مقایسه شد. توالی های به دست آمده از نمونه های بررسی حاضر با موارد ثبت شده در بانک ژنی مشابهت داشتند.

جدول ۷: الگوی مقاومت پادزیستی باکتری اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه

فاکتور های حدت (%)										یافته های بالینی (تعداد مثبت)
OFLX5	CefTx30	F/M 300	CIP5	MEZ 30	IMP30	AMK 30	GM10	TE30	AM10	
(۱۳/۳) ۲	(۲۶/۶) ۴	(۲۰) ۳	(۷۳/۳) ۱۱	(۴۰) ۶	(۶/۶) ۱	(۱۰۰) ۱۵	(۱۰۰) ۱۵	(۹۳/۳) ۱۴	(۱۰۰) ۱۵	پسر پیلونفریت (۱۵)
(۲۵) ۲	(۲۵) ۲	(۲۵) ۲	(۱۰۰) ۸	(۱۳/۵) ۱	-	(۵۰) ۴	(۸۷/۵) ۷	(۳۷/۵) ۳	(۷۵) ۶	التهاب مثانه (۸)
(۱۷/۳) ۴	(۲۶) ۶	(۲۱/۷) ۵	(۸۲/۶) ۱۹	(۳۰/۴) ۷	(۴/۳) ۱	(۸۲/۶) ۱۹	(۹۵/۶) ۲۲	(۷۳/۹) ۱۷	(۹۱/۳) ۲۱	کل (۲۳)
(۱۲) ۳	(۲۰) ۵	(۱۶) ۴	(۹۲) ۲۳	(۲۰) ۵	(۸) ۲	(۹۶) ۲۴	(۱۰۰) ۲۵	(۸۴) ۲۱	(۹۶) ۲۴	دختر پیلونفریت (۲۵)
(۲۱/۴) ۳	(۲۱/۴) ۳	(۱۴/۲) ۲	(۷۱/۴) ۱۰	(۳۵/۷) ۵	(۷/۱) ۱	(۷۱/۴) ۱۰	(۸۵/۷) ۱۲	(۷۸/۵) ۱۱	(۸۵/۷) ۱۲	التهاب مثانه (۱۴)
(۱۵/۳) ۶	(۲۰/۵) ۸	(۱۵/۳) ۶	(۸۴/۶) ۲۳	(۲۵/۶) ۱۰	(۷/۶) ۳	(۸۷/۱) ۲۴	(۹۴/۸) ۲۷	(۸۲) ۲۲	(۹۲/۳) ۳۶	کل (۳۹)
(۱۲/۵) ۵	(۲۲/۵) ۹	(۱۷/۵) ۷	(۸۵) ۲۴	(۲۷/۵) ۱۱	(۷/۵) ۳	(۹۷/۵) ۳۹	(۱۰۰) ۴۰	(۸۷/۵) ۳۵	(۹۷/۵) ۳۹	کل پیلونفریت (۴۰)
(۲۲/۷) ۵	(۲۲/۷) ۵	(۱۸/۱) ۴	(۸۱/۸) ۱۸	(۳۷/۲) ۶	(۴/۵) ۱	(۶۳/۶) ۱۴	(۸۶/۳) ۱۹	(۶۳/۶) ۱۴	(۸۱/۸) ۱۸	التهاب مثانه (۲۲)
(۱۶/۱) ۱۰	(۲۲/۵) ۱۴	(۱۷/۷) ۱۱	(۸۳/۸) ۵۲	(۲۷/۴) ۱۷	(۶/۴) ۴	(۸۵/۴) ۵۳	(۹۵/۱) ۵۹	(۶۲/۹) ۳۹	(۹۱/۹) ۵۷	کل (۶۲)

میزان حضور اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک در پسران زیر یک سال عدم انجام جراحی ختنه در این سن است که احتمال بروز عفونت های ادراری را افزایش داده است. میزان شیوع بالای عفونت های ادراری ناشی از اشریشیا کلی های یوروپاتوژنیک در پسران ختنه نشده در بررسی های Schoen و همکاران (۲۰۰۰) (۲۱) و رابرتز (۲۰۱۱) (۲۲) نیز گزارش شده است. یکی از دلایل اصلی بالا بودن میزان حضور اشریشیا کلی های یوروپاتوژنیک در دختران در بررسی حاضر وجود میزراه پهن و کوتاه در این جنس است. فاکتور های

نتیجه گیری و بحث

بررسی حاضر نشان دهنده حضور بالای سویه های اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک مقاوم به چندین پادزیست در کودکان مبتلا به عفونت های ادراری در ایران، می باشد. بیشترین حضور باکتری اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک در پسران زیر یک سال (۰/۷۱/۴۲) و دختران ۱۲-۵ سال (۰/۷۵)، دیده شد. اختلاف آماری معنادار ($P < 0.05$) بین میزان حضور باکتری در پسران زیر یک سال و دختران ۱۲-۵ سال با سایر گروه های سنی دیده شد. احتمالاً یکی از دلایل بالا بودن

نشان دادند که میزان شیوع فاکتور های حدت pap، sfa، cnf-1 و hly ردیابی شده در *اشریشیا کلی* های یوروپاتوژنیک جدا شده از کودکان دارای عفونت های ادراری به ترتیب ۶۶/۷، ۶۲/۵، ۶۳/۶ و ۸۵/۷٪ در موارد پیلونفریت و ۳۳/۳، ۳۷/۵، ۳۶/۴ و ۱۴/۳٪ در موارد التهاب مثانه، بوده است. با این وجود Takahashi و همکاران (۲۰۰۶) (۲۷) نشان دادند که سرگروپ های O1، O2، O4، O6، O18، O22، O25 و O75 میزان شیوع تقریباً مشابهی را در موارد التهاب مثانه بفرنج و ساده و همچنین باکتریوری علامت دار و بدون علامت، دارند هرچند شیوع فاکتور های حدت pap، iha، ompT و PAI در گروه های مورد بررسی یکسان نبوده است.

Ruiz و همکاران (۲۰۰۲) (۲۶) همچنین نشان دادند که میزان شیوع ژن های حدت fim، sat و prs در موارد التهاب مثانه و شیوع ژن های حدت hly، cnf-1، aer و pap در موارد پیلونفریت، به مراتب بیشتر بوده است. بررسی حاضر نشان داد که سرگروپ های O1، O2، O4 و O16 به ترتیب با فراوانی ۲۹، ۱۶/۱، ۱۴/۱ و ۱۱/۲٪ فراوان ترین سرگروپ های ردیابی شده در *اشریشیا کلی* های یوروپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان مبتلا به عفونت های ادراری بودند. نتایج این قسمت از بررسی ما با نتایج Jadha و همکاران (۲۰۱۱) (۲۳) و Momtaz و همکاران (۲۰۱۳) (۵)، همخوانی دارد. نتایج بررسی Molina-López و همکاران (۲۰۱۱) (۲۸) نشان دهنده حضور ۴۰٪ی سرگروپ های O1، O2، O4، O6، O8، O25 و O75 در *اشریشیا کلی* های یوروپاتوژنیک جداسازی شده از عفونت های ادراری، بوده است.

بررسی ما نشان داد که ژن های حدت pap (۹۰/۳٪)، fim (۹۱/۹٪)، afa (۸۵/۴٪)، sfa (۷۵/۸٪)، hly (۷۷/۴٪) و cnf-1 (۷۲/۵٪)، فراوان ترین فاکتور های حدت ردیابی شده در کودکان مبتلا به عفونت های ادراری بودند. فراوانی ژن های حدت fim، sfa، pap، hly و cnf-1 در بررسی ممتاز و همکاران (۲۰۱۳) (۵) به ترتیب ۸۶/۱۷، ۵۳/۶۵، ۵۰/۴۰، ۵۰/۴۰ و ۵۰/۴۰٪ بیان شده است که تقریباً با نتایج ما یکسان بوده است. در بررسی حاضر سرگروپ های O1، O2، O4، O7، O25، O16، O18، O75 و O22 بیشترین میزان

میزبانی از جمله تغییر در فلور طبیعی واژن، دختران را در ریسک بالاتری برای ابتلا به عفونت های ادراری قرار می دهد. تأثیر فاکتور های ژنتیکی از جمله میزان بیان گروه های خونی لوویس (Le (a+b-) و Le (a-b-)) و فاکتور HLA-A3 را نیز باید در نظر گرفت. نتایج ما در این زمینه با نتایج Jadhav و همکاران (۲۰۱۱) (۲۳) و Chang (۲۰۰۶) (۲۴)، هم خوانی دارد. Chang (۲۴)، نشان دادند که میزان شیوع عفونت های ادراری در اولین سال تولد در پسران بیشتر بوده اما این میزان در سال های بعدی زندگی در دختران افزایش می یابد که با نتایج بررسی حاضر هم خوانی دارد.

نمونه های در بررسی حاضر از پسران و دختران مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه، اخذ شده بودند. هرچند اختلاف آماری معناداری بین میزان شیوع پیلونفریت و التهاب مثانه در پسران و دختران مشاهده نشد؛ اما میزان شیوع پیلونفریت در پسران و دختران به مراتب از التهاب مثانه، بیشتر بوده است. نتایج مشابهی نیز در بررسی های پیشین، گزارش شده است (۲۵ و ۲۶).

سرگروپ های اصلی تشخیص داده شده در کودکان مبتلا به پیلونفریت O1، O2، O4، O7 و O25 بودند در حالی که O16، O18، O75 و O22 گروه های اصلی ردیابی شده در کودکان مبتلا به التهاب مثانه بودند. اختلاف آماری معنی دار ($P < 0.05$) برای میزان حضور سرگروپ های اصلی ردیابی شده از پیلونفریت و التهاب مثانه، دیده شد. Ruiz و همکاران (۲۰۰۲) (۲۶) تفاوت بلایی را بین فراوانی سرگروپ ها و فاکتور های حدت متفاوت *اشریشیا کلی* های یوروپاتوژنیک جداسازی شده از موارد پیلونفریت و التهاب مثانه، گزارش کردند که با نتایج بررسی ما مشابهت دارد.

نتایج ما نشان دادند که فاکتور های حدت pap، sfa، afa، hly و cnf-1 بیشترین حضور را موارد پیلونفریت و فاکتور های حدت fim، pap، afa و hly بیشترین حضور را در موارد التهاب مثانه، داشتند. بررسی های آماری نشان دهنده اختلافات معنی دار ($P < 0.05$) برای میزان حضور ژن های حدت sfa، hly، cnf-1، set-1، iha و usp، ردیابی شده از پیلونفریت و التهاب مثانه، بودند. Farshad و همکاران (۹)

۳۴/۵۸٪ و در بررسی Gu'ndogdu و همکاران (۲۰)، ۷۲٪ گزارش گردید. نتایج بررسی ما نشان داد که سروگروپ های اصلی تشخیص داده شده در موارد پیلونفریت، بیشترین میزان شیوع ژن های کد کننده مقاومت به پادزیست های جنتامایسین (*aac(3)-IV*)، آمپی سیلین (*CITM*) و تری متوپریم (*dfra1*) و سروگروپ های اصلی تشخیص داده شده در موارد التهاب مثانه، بیشترین میزان شیوع ژن های کد کننده مقاومت به پادزیست های تتراسیکلین (*tetA* و *tetB*)، جنتامایسین (*aac(3)-IV*) و سولفامتوکسازول (*sul1*) را داشتند ($P < 0.05$).

بررسی حاضر یکی از فراگیرترین مطالعات انجام پذیرفته در زمینه خصوصیت یابی مولکولی و بررسی خصوصیات مقاومت پادزیستی باکتری / شریشیا کلی یوروپاتوژنیک جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت های ادراری در ایران، می باشد. به دلیل تفاوت های زیاد در میزان شیوع مقاومت های پادزیستی در سویه های / شریشیا کلی یوروپاتوژنیک جدا شده از کودکان، مشخص کردن الگوی مقاومت پادزیستی در هر منطقه و حتی بیمارستان، ضروری به نظر می رسد. تجویز صحیح پادزیست و استفاده از روش های ساده ای همچون دیسک گذاری می تواند از بروز مقاومت های پادزیستی، جلوگیری کنند. در شرایط حاضر در ایران، تجویز داروی ایمی پنم در موارد ضروری می تواند برای درمان عفونت های ادراری در کودکان، مفید باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بررسی حاضر از همکاری آقای دکتر حسینی در مرکز بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) تهران کمال تشکر و قدردانی را دارند. همچنین از کارکنان زحمتکش مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و بالأخص جناب آقای مهندس منوچهر مؤمنی کمال تشکر و قدردانی را داریم. از حمایت های بی دریغ دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران نیز قدردان و سپاس گذاریم.

شیوع ژن های حدت *pap*، *afa*، *sfa*، *hly* و *cnf-1* را داشتند. ارتباط بین سروگروپ ها و ژن های حدت در بررسی های پیشین نیز به اثبات رسیده است (۵-۲).

شیوع مقاومت پادزیستی به بیش از یک پادزیست در اکثر جدایه های / شریشیا کلی یوروپاتوژنیک جدا شده از کودکان مبتلا به التهاب مثانه و پیلونفریت در بررسی حاضر، گزارش گردید. / شریشیا کلی های یوروپاتوژنیک بررسی حاضر بیشترین مقاومت پادزیستی را به پادزیست های آمپی سیلین (۹۱/۹٪)، جنتامایسین (۹۵/۱٪)، آمیکاسین (۸۵/۴٪) و سیپروفلوکسازین (۸۳/۸٪)، داشتند؛ به عبارت دیگر تجویز پادزیست های ایمی پنم و نیتروفورانتوین به دلیل مقاومت پادزیستی کم گزارش شده در بررسی حاضر، می تواند برای درمان عفونت های ادراری در کودکان مناسب باشد. بررسی های آماری نیز اختلافات معناداری در حد $P < 0.05$ را بین مقاومت سویه های باکتری به جنتامایسین با ایمیپنم و نیتروفورانتوین و آمپی سیلین و ایمیپنم، نشان دادند.

بررسی های پیشین شیوع بالای مقاومت پادزیستی / شریشیا کلی های یوروپاتوژنیک را علیه پادزیست های آمپی سیلین، جنتامایسین، آمیکاسین و نورفلوکسازین و اثربخشی درمانی بالای داروی ایمی پنم را گزارش کرده اند (۹ و ۲۹). معمولاً حضور ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی عامل اصلی بروز مقاومت پادزیستی در سویه های باکتری است. در بررسی حاضر ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی بودند که با نتایج روش دیسک گذاری ساده، مشابهنه داشته است. اختلاف معنادار آماری در حد $P < 0.05$ بین میزان حضور ژن های *aac(3)-IV* و *dfra1* و همچنین *blaSHV* و *dfra1* مشاهده شد. همچنین فراوانی ژن *sul1* که کد کننده مقاومت پادزیستی به سولفامتوکسازول بود، ۷۷/۴٪، برآورد شد. این میزان در بررسی ممتاز و همکاران (۵)

References:

- Schalger TA. Urinary tract infections in children younger than 5 years of age. *Pediatric Drugs*. 2001 Mar;3(3):219-27.
- Riccabona M. Urinary tract infections in children. *Current Opinions in Urology*. 2003 Jan;13(1):59-62.
- World Health Organization (WHO). Urinary Tract Infections in Infants and Children in Developing

- Countries in the Context of IMCI. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 2005.
4. Li D, Liu B, Chen M, Guo D, Guo X, Liu F, Feng L, Wang L A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. *Journal of Microbiology Methods*. 2010 July;82(1):71-77.
 5. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpour Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, Souod N. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2013 Apr;12:8. PubMed PMID: 23627669.
 6. Lapierre L, Cornejo J, Borie C, Toro C, San Martín B. Genetic Characterization of Antibiotic Resistance Genes Linked to Class 1 and Class 2 Integrons in Commensal Strains of *Escherichia coli* Isolated from Poultry and Swine. *Microbial Drug Resistance*. 2008 Dec;14(4):126-129.
 7. Kawamura-Sato K, Yoshida R, Shibayama K, Ohta M. Virulence Genes, Quinolone and Fluoroquinolone Resistance, and Phylogenetic Background of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2010 Mar;63(2):113-115.
 8. Farshad S, Ranjbar R, Japoni A, Hosseini M, Anvarinejad M, Mohammadzadegan R. Microbial susceptibility, virulence factors, and plasmid profiles of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children in Jahrom, Iran. *Archives of Iranian Medicine*. 2012 May;15(5):312-6.
 9. Javad Saraylu, Jalil Fallah Mehrabadi, Abbas Ali Imani Fooladi, Aylar Sabbaghi, Hedrosha Molla Aghamirzaei, Mohsen Hasankhani. Prevalence and Evaluation of Toxin Genes among Uropathogenic *Escherichia coli* Clinical Isolates by Duplex PCR. *Journal of Medical Bacteriology*. 2012 Aug;1(1):17-22.
 10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. M100-S21. Wayne Pa: CLSI; 2012.
 11. Soto SM, Guiral E, Bosch J, Vila J. Prevalence of the set-1B and astA genes encoding enterotoxins in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates. *Microbial Pathogens*. 2009 Sep; 47(6):305-307.
 12. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1995 Oct;12(2):85-90.
 13. Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992 May;30(5):1189-93.
 14. Struve C, Krogfelt KA. In vivo detection of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and phase variation during experimental urinary tract infection. *Microbiology*. 1999 Oct;145(Pt10):2683-2690.
 15. Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary JC Jr, Stell AL. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, iha and iron (E. coli), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infection and Immunity*. 2000 May;68(5):3040-3047.
 16. Bauer RJ, Zhang L, Foxman B, Siitonen A, Jantunen ME, Saxen H, Marrs CF. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-usp, iha, and iron (E. coli). *Journal of Infectious Diseases*. 2002 May;185(10):1521-1524.
 17. Van TT, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International Journal of Food Microbiology*. 2008 Jun;124(3):217-223.
 18. Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJ, Woodward MJ. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004 Feb;53(2):208-216.
 19. Toro CS, Farfán M, Contreras I, Flores O, Navarro N, Mora GC, Prado V. Genetic analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant *Shigella* strains isolated from Chilean children. *Epidemiology and Infection*. 2005 Feb;133(1):81-86.
 20. Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli*

- in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005 Jan;49(1):71-76. PubMed PMID: 15616277.
21. Schoen EJ, Colby CJ, Ray GT. Newborn circumcision decreases incidence and costs of urinary tract infections during the first year of life. *Pediatrics*. 2000 Apr;105(4 Pt 1):789-793.
22. Roberts KB. Urinary tract infection: clinical practice guideline for the diagnosis and management of the initial UTI in febrile infants and children 2 to 24 months. *Pediatrics*. 2011 Sep;128(3):595-610.
23. Jadhav S, Hussain A, Devi S, Kumar A, Parveen S, Gandham N, Lothar H. Wieler, Christa Ewers, Niyaz Ahmed mail .Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. *PLoS One*. 2011 Mar;6(3):e18063.
24. Chang SL, Shortliffe LD. Pediatric Urinary Tract Infections. *Pediatric Clinics of North America*. 2006 Jun;53(3):379-400
25. Johnson JR. papG alleles among *Escherichia coli* strains causing urosepsis: associations with other bacterial characteristics and host compromise. *Infection and Immunity*. 1998 Sep;66(9):4568-4571.
26. Ruiz J, Simon K, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M, Roig G, Moreno-Martínez A, Martínez JA, Jiménez de Anta T, Mensa J, Vila J. Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002 Dec;40(12):4445-4449.
27. Takahashi A, Kanamaru S, Kurazono H, Kunishima Y, Tsukamoto T, Ogawa O, Yamamoto S. 2006. *Escherichia coli* isolates associated with uncomplicated and complicated cystitis and asymptomatic bacteriuria possess similar phylogenies, virulence genes, and O-serogroup profiles. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006 Dec;44(12):4589-92.
28. Molina-López J, Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM, Gavilanes-Parra S, Chávez-Berrocal ME, Hernández-Castro R, Manjarrez-Hernández HÁ. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2011 Dec;5(12):840-9
29. Ibrahim ME, Bilal NE, Hamid ME. Increased multi-drug resistant *Escherichia coli* from hospitals in Khartoum state, Sudan. *Afriacn Health Science*. 2012 Sep;12(3):368-375.
30. Gu'ndogdu A, Beverley Long Y, Leigh Vollmerhausen T, Katouli M. Antimicrobial resistance and distribution of sul genes and integron-associated intl genes among uropathogenic *Escherichia coli* in Queensland, Australia. *Journal of Medical Microbiology*. 2011 Nov;60(pt 11):1633-1642.