مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۲ – تابستان ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی فاکتورهای ویرولانس، تعیین سروگروپ ها و مقاومت پادزیستی سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن جداشده 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 میکرب‌شناسی، 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

اطلاعات مقاله

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

چکیده

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

مواد و روش کار: در این مطالعه که در طی سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ انجام گرفت، ۱۲۱ سویه *اشریشیا کلی* از نمونه‌های ادرار افراد مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه، بستری‌شده در بیمارستان بقیه ا... (عج) تهران، جمع‌آوری شد. مقاومت پادزیستی سویه‌ها 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.

یافته‌ها: در جامعه نمونه‌ها، ٤٥/٠٩٪ پسران و ٥٥/٧١٪ دختران بودند. بیش‌ترین فراوانی باکتری در پسران زیر ۱ سال (٧١/٤٢ ٪) و دختران ۱۲-۵ ساله (۷۵٪) دیده شد. فراوانی *اشریشیا کلی* در کودکان مبتلا به ترتیب ٥٥/٥٥ و ٤٤/٨٩٪، 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* (٦٣/٦٪) و *hly* (٤٥/٤٪)، بودند. ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی علیه جنتامایسین (٩٦/٧٪)، 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 آمپی‌سیلین (۹۱/۹٪)، داشتند.

نتیجه‌گیری: در بررسی حاضر تنها ٦/٤٪ از جدایه ها به پادزیست ایمی پنم مقاوم بودند. در نتیجه این پادزیست می‌تواند انتخاب مناسبی برای درمان موارد مبتلا به عفونت های ادراری ناشی از *اشریشیا کلی* باشد.

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

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

مقدمه

عفونت های دستگاه ادراری یکی از رایج‌ترین عفونت های باکتری در کودکان هستند که اغلب توسط سویه‌های *اشریشیا کلی* های یوروپاتوژنیک ایجاد می‌شوند (۲،۱). عفونت های دستگاه ادراری ایجادشده در اثر این باکتری شامل طیف وسیعی از اختلالات از جمله التهاب مثانه (عفونت مثانه)، التهاب و عفونت میزنای و پیلونفریت (عفونت کلیه) هستند (۲،۱). این عفونت‌ها در ۱٪ پسران و ۸-۳٪ از دختران تشخیص داده‌شده‌اند (۳). اشریشیا *کلی* های یوروپاتوژنیک مسئول ۹۰-۷۰٪ از عفونت های ادراری در افراد هستند (۲،۱)

اشریشیا کلی ها شامل هر دو کلنی از سویه‌های بیماری‌زا و کومنسال هستند که به طور معمول توسط سروتایپینگ آنتی ژن های سطحی خود از قبیل آنتی ژن O (لیپو پلی ساکارید)، آنتی ژن H (فلاژله) و در برخی موارد آنتی ژن K (کپسول) شناسایی می‌شوند (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 سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک هستند (۵). علاوه بر سروگروپ های ادراری باکتری *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک، حضور یکسری فاکتور های ویرولانس را با بروز پیلونفریت و تورم مثانه و میزنای در کودکان مبتلا به عفونت های ادراری، مرتبط دانسته‌اند (۵-۱). از بین تمام فاکتورهای ویرولانس در باکتری، فیمبریه P باکتری (*pap*)، فیمبریه S (*sfa*)، فیمبریه مربوط به اتصال باکتری (*afa*)، همولیزین باکتری (*hly*)، فاکتور نکروز دهنده سایتوتوکسیک (*cnf-1*)، آئروباکتین باکتری (*eae*)، فاکتور *fim* و فاکتور های حدت *usp*، *iroN*، *set-1*، *astA*، *iha* و *iutA*، نقش اصلی را در بروز عفونت های دستگاه ادراری دارند (۵). حضور ژن های ویرولانس ذکرشده 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، می‌شود (۵-۱).

متأسفانه با وجود درمان های پادزیستی وسیعی که انجام می‌شود. عفونت های دستگاه ادراری ناشی از این باکتری نه تنها بهبودی نمی‌یابند؛ بلکه مقاومت های پادزیستی ایجادشده در سویه‌های مختلف *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک هر ساله خسارات اقتصادی بیشتری را به بار می آورند (۵). ژن های کد کننده مقاومت به پادزیست آمپی سیلین (*SHV* و *TEM*)، سولفانامید ها (*sul1*، *sul2* و *int1*)، استرپتومایسین (*str* ، *strB*)، تتراسیکلین (*tetA-tetE* و *tetG*)، تری متوپریم (*dfrA1*، *dfrA13*، *dfr7* 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 می‌رسد. بررسی های پراکنده ای در ایران بر روی عفونت های ادراری ناشی از سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک انجام پذیرفته است. Serailo و همکاران (۲۰۱۲) (۸) میزان شیوع *اشریشیا کلی* های یوروپاتوژن را در نمونه‌های 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 سویه‌های مقاوم *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک ایجادشده است. میزان شیوع ژن های *pap*، *sfa*، *cnf-1* و *hly* در سویه‌های جداشده از کودکان شهرستان جهرم دامنه ای حدود ۱۴ تا ۸۶٪ داشته است (۹). تا کنون بیش‌ترین شیوع مقاومت پادزیستی سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک جداسازی شده از بیمارستان های ایران علیه پادزیست های آمپی‌سیلین (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 ویرولانس، 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

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

مواد و روش‌ها:

در طی ساله‌ای ۹۲-۱۳۹۱، ۱۲۱ سویه *اشریشیا کلی* جداشده از کودکان مبتلا به علائم عفونت ادراری متعلق به هر دو جنس و در سنین مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. سویه‌هایی که پس از غنی‌سازی 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. کلنی‌هایی 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. سویه‌هایی که به عنوان *اشریشیا کلی* تیپیک مورد تأیید قرار گرفتند جهت انجام بررسی های مولکولی به مرکز تحقیقات میکرب‌شناسی 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 سویه‌های *اشریشیا کلی* جداشده از عفونت های دستگاه ادراری کودکان، از روش دیسک گذاری ساده (Kirby-Bouer) طبق دستورالعمل CLSI (2012) استفاده شد (۱۰). در این مرحله سویه‌های میکروبی جداشده در محیط جامد مولرهینتون 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)، نیتروفورانتوئین (30 µg/disk)، آمیکاسین (30 µg/disk)، سفوتاکسیم (30 µg/disk)، ایمیپنم (30 µg/disk)، افلوکسازین (5 µg/disk)، مزلوسیلین (30 µg/disk) و آمپی‌سیلین (10 µg/disk) کشت داده شدند و با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد حساسیت یا مقاومت باکتری به هر پادزیست تعیین گردید. در این مرحله از سویه استاندارد اشریشیا *کلی* ATCC 25922 به عنوان نمونه کنترل در آزمایش آنتی بیوگرام استفاده شد.

استخراج DNA و بررسی فراوانی سروگروپ 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. نمونه‌های DNA استخراج‌شده تا زمان انجام واکنش PCR در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس، نگه‌داری شدند.

فراوانی هر یک از سروگروپ ها، ژن های حدت و ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی باکتری *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک با استفاده از چندین واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 سروگروپ ها، ژن های حدت و ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی باکتری *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان مبتلا به عفونت های ادراری در جدول ۱ آمده است. هر یک از سویه‌های دریافت شده در آزمایشگاه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن16SrRNA باکتری *اشریشیا کلی* تأیید شدند. دقت، حساسیت، ویژگی بالا و در دسترس بودن پرایمر های مربوط به ژن هدف 16S rRNA باکتری *اشریشیا کلی*، دلیل انتخاب این ژن برای تأیید سویه‌های 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 رنگ‌آمیزی DNA با رنگ سایبر گرین انجام شد. ژل‌ها 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 جداشده از کودکان مبتلا به عفونت های ادراری

ژن هدف	توالی پرایمر (3'-5')	اندازه محصول (bp)	منابع
O1	GTGAGCAAAAGTGAAATAAGGAACG CGCTGATACGAATACCATCCTAC	1098	1
O6	GGATGACGATGTGATTTTGGCTAAC TCTGGGTTTGCTGTGTATGAGGC	783	1
O7	CTATCAAAATACCTCTGCTGGAATC TGGCTTCGAGATTAAACCTATTCCT	610	1
O8	CCAGAGGCATAATCAGAAATAACAG GCAGAGTTAGTCAACAAAAGGTCAG	448	1
O16	GGTTTCAATCTCACAGCAACTCAG GTTAGAGGGATAATAGCCAAGCGG	302	1
O21	CTGCTGATGTCGCTATTATTGCTG TGAAAAAAAGGGAAACAGAAGAGCC	209	1
O75	GAGATATACATGGGGAGGTAGGCT ACCCGATAATCATATTCTTCCCAAC	511	1
O2	AGTGAGTTACTTTTTAGCGATGGAC AGTTTAGTATGCCCCTGACTTTGAA	770	1
O4	TTGTTGCGATAATGTGCATGTTCC AATAATTTGCTATACCCACACCCTC	664	1
O15	TCTTGTTAGAGTCATTGGTGTATCG ATAAAACGAGCAAGCACCACACC	183	1
O18	GTTCGGTGGTTGGATTACAGTTAG CTACTATCATCCTCACTGACCACG	551	1
O22	TTCATTGTCGCCACTACTTTCCG GAAACAGCCCATGACATTACTACG	468	1
O25	AGAGATCCGTCTTTTATTTGTTCGC GTTCTGGATACCTAACGCAATACCC	230	1
O83	GTACACCAGGCAAACCTCGAAAG TTCTGTAAGCTAATGAATAGGCACC	362	1
***E. coli* 16S rRNA**	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CCGTCAATTCATTTGAGTTT	919	1
set-1	GTGAACCTGCTGCCGATATC ATTTGTGGATAAAAATGACG	147	۱۱
astA	ATGCCATCAACACAGTATAT GCGAGTGACGGCTTTGTAGT	110	۱۱
Pap	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336	۱۲
Cnf-1	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG TGGAGTTTCCTATGCAGGAG	498	۱۲
hlyA	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177	۱۲
Afa	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	۱۳
Sfa	GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750	۱۳
Fim	GAGAAGAGGTTTGATTTAACTTATTG AGAGCCGCTGTAGAACTGAGG	559	۱۴
Iha	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA	827	۱۵
Iron	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG GACGCCGACATTAAGACGCAG	665	۱۵
usp	ACATTCACGGCAAGCCTCAG AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC	440	۱۶
aac(3)-IV	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	286	۱۷
sul1	TTCGGCATTCTGAATCTCAC ATGATCTAACCCTCGGTCTC	822	۱۷
blaSHV	TCGCCTGTGTATTATCTCCC CGCAGATAAATCACCACAATG	768	۱۷
CITM	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462	۱۷
tet(A)	GGTTCACTCGAACGACGTCA CTGTCCGACAAGTTGCATGA	577	۱۸
tet(B)	CCTCAGCTTCTCAACGCGTG GCACCTTGCTGATGACTCTT	634	۱۸
dfrA1	GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC	367	۱۹
qnr	GGGTATGGATATTATTGATAAAG CTAATCCGGCAGCACTATTTA	670	۲۰

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

ژن های هدف	برنامه PCR	حجم واکنش (۵۰ میکرولیتر)
***E. coli* 16S rRNA**	1 cycle: 95 ^{0C} ---------- 6 min. 31 cycle: 95 ^{0C} ---------- 45 s 59 ^{0C} ---------- 60 s 72 ^{0C} ---------- 60 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 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 ^{0C} ---------- 5 min. 30 cycle: 95 ^{0C} ---------- 30 s 55 ^{0C} ---------- 60 s 72 ^{0C} ---------- 60 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 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 ^{0C} ---------- 5 min. 30 cycle: 94 ^{0C} ---------- 60 s 56 ^{0C} ---------- 60 s 72 ^{0C} ---------- 90 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 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
tetA, tetB, dfrA1, qnr, aac(3)-IV, sul1, bla*SHV, *CITM	1 cycle: 94 ^{0C} ---------- 8 min. 32 cycle: 95 ^{0C} ---------- 60 s 55 ^{0C} ---------- 70 s 72 ^{0C} ---------- 2 min 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 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
usp	1 cycle: 94 ^{0C} ---------- 2 min. 30 cycle: 94 ^{0C} ---------- 30 s 58 ^{0C} ---------- 30 s 73 ^{0C} ---------- 30 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 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
iha, iron	1 cycle: 94 ^{0C} ---------- 6 min. 30 cycle: 94 ^{0C} ---------- 45 s 58 ^{0C} ---------- 60 s 72 ^{0C} ---------- 75 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 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
fim	1 cycle: 94 ^{0C} ---------- 3 min. 40 cycle: 94 ^{0C} ---------- 60 s 58 ^{0C} ---------- 70 s 72 ^{0C} ---------- 70 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 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
set1, astA	1 cycle: 94 ^{0C} ---------- 3 min. 30 cycle: 94 ^{0C} ---------- 30 s 55 ^{0C} ---------- 60 s 72 ^{0C} ---------- 60 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 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
pap, sfa, afa, hlyA, cnf1	1 cycle: 94 ^{0C} ---------- 1 min. 30 cycle: 94 ^{0C} ---------- 60 s 63 ^{0C} ---------- 30 s 72 ^{0C} ---------- 90 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 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

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 سروگروپ های مختلف در سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک جداشده از کودکان با عفونت های ادراری بر پایه ضریب اطمینان ۹۵٪ (P_{value}<۰/۰۵) مورد بررسی قرار گرفت.

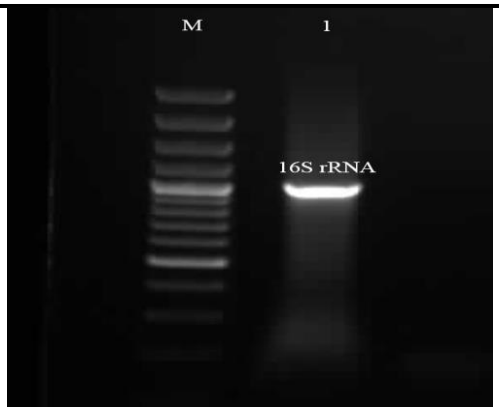
یافته‌ها

فراوانی باکتری *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک جداشده 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 جداشده از کودکان مبتلا به عفونت های ادراری

گروه‌های سنی (سال)		تعداد نمونه اخذشده	تعداد نمونه مثبت (٪)
پسر	<۱	۱۴	۱۰ (۷۱/۴۲)
	۵-۱	۱۷	۷ (۴۱/۱۷)
	۱۲-۵	۲۰	۶ (۳۰)
	کل	۵۱	۲۳ (۴۵/۰۹)
دختر	<۱	۲۰	۷ (۳۵)
	۵-۱	۲۶	۱۴ (۵۳/۸۴)
	۱۲-۵	۲۴	۱۸ (۷۵)
	کل	۷۰	۳۹ (۵۵/۷۱)
کل	<۱	۳۴	۱۷ (۵۰)
	۵-۱	۴۳	۲۱ (۴۸/۸۳)
	۱۲-۵	۴۴	۲۴ (۵۴/۵۴)
	کل	۱۲۱	۶۲ (۵۱/۲۳)

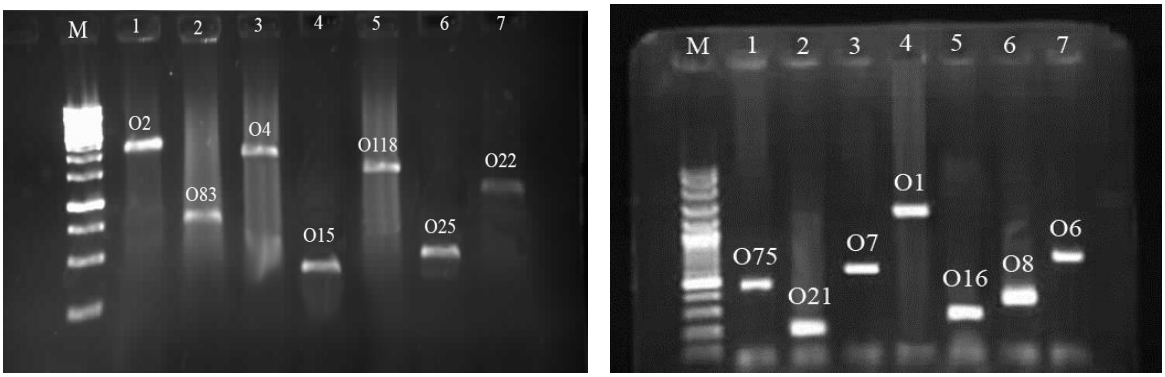
از کل ۷۲ نمونه‌ای که از کودکان مبتلا به پیلونفریت و همچنین از کل ۴۹ نمونه‌ای که از کودکان مبتلا به التهاب مثانه اخذ شد، به ترتیب در ۴۰ نمونه (۵۵/۵۵٪) و ۲۲ نمونه (۴۴/۸۹٪) باکتری *اشریشیا کلی* جداسازی شد (جدول ۴). در کل ۴۸/۳۸٪ و ۴۰٪ از پسران و ۶۰/۹۷٪ و ۴۸/۲۷٪ از دختران بررسی حاضر به ترتیب مبتلا به پیلونفریت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



شکل 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 سروگروپ های یوروپاتوژنیک در *اشریشیا کلی* های جداسازی شده از کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه در جدول ۴ نشان داده شده‌اند. در کل سروگروپ های O1، O2، O4 و O16 به ترتیب فراوان‌ترین گروه‌های تشخیص داده‌شده در کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه بودند. سروگروپ های O1، O2، O4، O7 و O25 گروه‌های اصلی ردیابی شده در کودکان مبتلا به پیلونفریت و سروگروپ 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 *fim*، *pap*، *afa* و *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).



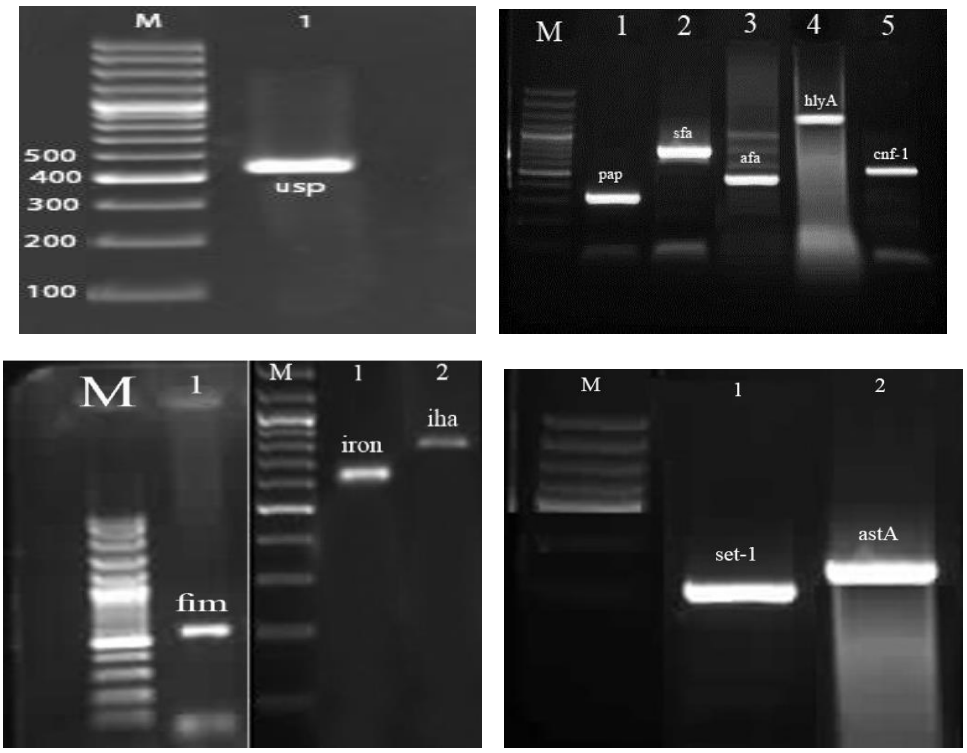
شکل ۲: واکنش PCR برای ردیابی سروگروپ های اشریشیا کلی های یوروپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان دارای عفونت های ادراری. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی و شماره‌های ۷-۱ نمونه‌های مثبت برای سروگروپ های ادراری.

جدول ۴: فراوانی سروگروپ های باکتری اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه

یافته‌های بالینی (تعداد مثبت)		فراوانی سروگروپ ها (٪)												
		O1	O2	O4	O6	O7	O8	O15	O16	O18	O21	O22	O25	O75	O83	سایر سروگروپ ها
پسر	پیلونفریت (۱۵)	۵ (۳۳/۳)	۳ (۲۰)	۲ (۱۳/۳)	-	۲ (۱۳/۳)	-	-	۱ (۶/۶)	-	-		۱ (۶/۶)	-	-	۱ (۶/۶)
	التهاب مثانه (۸)	۲ (۲۵)	۱ (۱۲/۵)	۱ (۱۲/۵)	-	۱ (۱۲/۵)	-	-	۲ (۸)	۱ (۱۲/۵)	-	-	-	-	-	-
	کل (۲۳)	۷ (۳۰/۴)	۴ (۱۷/۳)	۳ (۱۳)	-	۳ (۱۳)	-	-	۳ (۱۳)	۱ (۴/۳)	-	-	۱ (۴/۳)	-	-	۱ (۴/۳)
دختر	پیلونفریت (۲۵)	۹ (۳۶)	۵ (۲۰)	۴ (۱۶)	۱ (۴)	۲ (۸)	-	-	۱ (۴)	-	-	-	۱ (۴)	-	-	۲ (۸)
	التهاب مثانه (۱۴)	۲ (۱۴/۲)	۱ (۷/۱)	۲ ۱۴/۲	۱ (۷/۱)	-	-	-	۲ (۱۴/۲)	۲ (۱۴/۲)	-	۱ (۷/۱)	-	۲ (۱۴/۲)	-	۱ (۷/۱)
	کل (۳۹)	۱۱ (۲۸/۲)	۶ (۱۵/۳)	۶ (۱۵/۳)	۲ (۵/۱)	۲ (۵/۱)	-	-	۳ (۷/۶)	۲ (۵/۱)	-	۱ (۲/۵)	۱ (۲/۵)	۲ (۷/۶)	-	۳ (۷/۶)
کل	پیلونفریت (۴۰)	۱۴ (۳۵)	۸ (۲۰)	۶ (۱۵)	۱ (۲/۵)	۴ (۱۰)	-	-	۲ (۵)	-	=	=	۲ (۵)	-	-	۳ (۷/۵)
	التهاب مثانه (۲۲)	۴ (۱۸/۱)	۲ (۹)	۳ (۱۳/۶)	۱ (۴/۵)	۱ (۴/۵)	-	-	۵ (۲۲/۷)	۳ (۱۳/۶)	=	۱ (۴/۵)	-	۲ (۹)	-	۱ (۴/۵)
	کل (۶۲)	۱۸ (۲۹)	۱۰ (۱۶/۱)	۹ (۱۴/۵)	۲ (۳/۲)	۵ (۸)	-	-	۷ (۱۱/۲)	۳ (۴/۸)	-	۱ (۱/۶)	۲ (۳/۲)	۲ (۳/۲)	-	۴ (۶/۴)

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

یافته های بالینی (تعداد مثبت)		فاکتور های حدت (٪)										
		pap	fim	afa	sfa	hly	Cnf-1	Set-1	iha	ironN	usp	astA
پسر	پیلونفریت (۱۵)	۱۵ (۱۰۰)	۱۳ (۸۶/۶)	۱۴ (۹۳/۳)	۱۳ (۸۶/۶)	۱۳ (۸۶/۶)	۱۳ (۸۶/۶)	۸ (۵۳/۳)	۷ (۴۶/۶)	۲ (۱۳/۳)	۴ (۲۶/۶)	۲ (۱۳/۳)
	التهاب مثانه (۸)	۵ (۶۲/۵)	۸ (۱۰۰)	۵ (۶۲/۵)	۴ (۵۰)	۵ (۶۲/۵)	۴ (۵۰)	۲ (۲۵)	۲ (۲۵)	۱ (۱۲/۵)	۱ (۱۲/۵)	-
	کل (۲۳)	۲۰ (۸۶/۹)	۲۱ (۹۱/۳)	۱۹ (۸۲/۶)	۱۷ (۷۳/۹)	۱۸ (۷۸/۲)	۱۷ (۷۳/۹)	۱۰ (۴۳/۴)	۹ (۳۹/۱)	۳ (۱۳)	۵ (۲۱/۷)	۲ (۸/۶)
دختر	پیلونفریت (۲۵)	۲۵ (۱۰۰)	۲۲ (۸۸)	۲۵ (۱۰۰)	۲۵ (۱۰۰)	۲۵ (۱۰۰)	۲۴ (۹۶)	۱۷ (۶۸)	۱۵ (۶۰)	۸ (۳۲)	۱۰ (۴۰)	۸ (۳۲)
	التهاب مثانه (۱۴)	۱۱ (۷۸/۵)	۱۴ (۱۰۰)	۹ (۶۴/۲)	۵ (۳۵/۷)	۵ (۳۵/۷)	۴ (۲۸/۵)	۳ (۲۱/۴)	۲ (۱۴/۲)	۱ (۷/۱)	۱ (۷/۱)	۲ (۱۴/۲)
	کل (۳۹)	۳۶ (۹۲/۳)	۳۶ (۹۲/۳)	۳۴ (۸۷/۱)	۳۰ (۷۶/۹)	۳۰ (۷۶/۹)	۲۸ (۷۱/۷)	۲۰ (۵۱/۲)	۱۷ (۴۳/۵)	۹ (۲۳)	۱۱ (۲۸/۲)	۱۰ (۲۵/۶)
کل	پیلونفریت (۴۰)	۴۰ (۱۰۰)	۳۵ (۸۷/۵)	۳۹ (۹۷/۵)	۳۸ (۹۵)	۳۸ (۹۵)	۳۷ (۹۲/۵)	۲۵ (۶۲/۵)	۲۲ (۵۵)	۱۰ (۲۵)	۱۴ (۳۵)	۱۰ (۲۵)
	التهاب مثانه (۲۲)	۱۶ (۷۲/۷)	۲۲ (۱۰۰)	۱۴ (۶۳/۶)	۹ (۴۰/۹)	۱۰ (۴۵/۴)	۸ (۳۶/۳)	۵ (۲۲/۷)	۴ (۱۸/۱)	۲ (۹)	۲ (۹)	۲ (۹)
	کل (۶۲)	۵۶ (۹۰/۳)	۵۷ (۹۱/۹)	۵۳ (۸۵/۴)	۴۷ (۷۵/۸)	۴۸ (۷۷/۴)	۴۵ (۷۲/۵)	۳۰ (۴۸/۳)	۲۶ (۴۱/۹)	۱۲ (۱۹/۳)	۱۶ (۲۵/۸)	۱۲ (۱۹/۳)



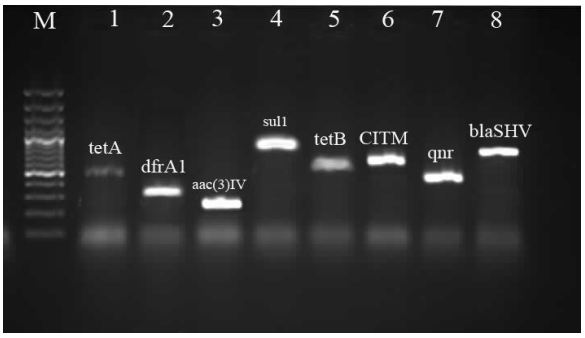
شکل ۳. واکنش PCR جهت ردیابی فاکتور های حدت در اشریشیا کلی های یوروپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان مبتلا به عفونت های ادراری. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی و شماره ها نشان دهنده نمونه‌های مثبت هستند.

فراوانی ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی در باکتری *اشریشیا 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 اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک جداسازی شده از کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه

یافته های بالینی		ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی (٪)							
	(تعداد مثبت)	*aac(3)-IV*	*sul1*	*blaSHV*	*CITM*	*tet(A)*	*tet(B)*	*dfrA1*	*qnr*
پسر	پیلونفریت (۱۵)	۱۵ (۱۰۰)	۱۵ (۱۰۰)	۱۵ (۱۰۰)	۱۵ (۱۰۰)	۱۵ (۱۰۰)	12 (۸۰)	6 (۴۰)	9 (۶۰)
	التهاب مثانه (۸)	۸ (۱۰۰)	3 (۳۷/۵)	۷ (۸۷/۵)	۶ (۷۵)	5 (۶۲/۵)	3 (۳۷/۵)	2 (۲۵)	4 (۵۰)
	کل (۲۳)	۲۳ (۱۰۰)	18 (۷۸/۲)	۲۲ (۹۵/۶)	۲۱ (۹۱/۳)	۲۰ (۸۶/۹)	۱۵ (۶۵/۲)	۸ (۳۴/۷)	۱۳ (۵۶/۵)
دختر	پیلونفریت (۲۵)	۲۵ (۱۰۰)	۲۰ (۸۰)	۲۴ (۹۶)	۲۵ (۱۰۰)	۲۰ (۸۰)	۱۶ (۶۴)	۷ (۲۸)	۱۲ (۴۸)
	التهاب مثانه (۱۴)	۱۲ (۸۵/۷)	۱۰ (۷۱/۴)	۱۰ (۷۱/۴)	۹ (۶۴/۲)	۱۱ (۷۸/۵)	۹ (۶۴/۲)	۶ (۴۲/۸)	۱۰ (۷۱/۴)
	کل (۳۹)	۳۷ (۹۴/۸)	۳۰ (۷۶/۹)	۳۴ (۸۷/۱)	۳۴ (۸۷/۱)	31 (۷۹/۴)	25 (۶۴/۱)	13 (۳۳/۳)	22 (۵۶/۴)
کل	پیلونفریت (۴۰)	۴۰ (۱۰۰)	۳۵ (۸۷/۵)	۳۹ (۹۷/۵)	۴۰ (۱۰۰)	۳۵ (۸۷/۵)	۲۸ (۷۰)	۱۳ (۳۲/۵)	۲۱ (۵۲/۵)
	التهاب مثانه (۲۲)	۲۰ (۹۰/۹)	۱۳ (۵۹)	۱۷ (۷۷/۲)	۱۵ (۶۸/۱)	۱۶ (۷۲/۷)	۱۲ (۵۴/۵)	۸ (۳۶/۳)	۱۴ (۶۳/۶)
	کل (۶۲)	60 (۹۶/۷)	48 (۷۷/۴)	56 (۹۰/۳)	55 (۸۸/۷)	51 (۸۲/۲)	40 (۶۴/۵)	21 (۳۳/۸)	35 (۵۶/۴)

جدایه های *اشریشیا کلی* بیش‌ترین مقاومت پادزیستی را علیه پادزیست های جنتامایسین (۹۵/۱٪)، آمپی‌سیلین (۹۱/۹٪)، آمیکاسین (۸۵/۴٪) و سیپروفلوکسازین (۸۳/۸٪)، داشتند. به نظر می‌رسد که پادزیست های ایمیپنم (۶/۴٪) و افلوکسازین (۱۶/۱٪) به دلیل اثربخشی بالا، می‌توانند 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 نمونه‌های 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 ثبت‌شده در بانک ژنی، مقایسه شد. توالی های به دست آمده از نمونه‌های بررسی حاضر با موارد ثبت‌شده در بانک ژنی مشابهت داشتند.



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

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

یافته‌های بالینی (تعداد مثبت)		*فاکتور های حدت (٪)*								
		AM10	*TE30*	*GM10*	*AMK 30*	*IMP30*	*MEZ 30*	*CIP5*	*F/M 300*	*CefTx30*	*OFLX5*
پسر	پیلونفریت (۱۵)	۱۵ (۱۰۰)	۱۴ (۹۳/۳)	۱۵ (۱۰۰)	۱۵ (۱۰۰)	۱ (۶/۶)	۶ (۴۰)	۱۱ (۷۳/۳)	۳ (۲۰)	۴ (۲۶/۶)	۲ (۱۳/۳)
	التهاب مثانه (۸)	۶ (۷۵)	۳ (۳۷/۵)	۷ (۸۷/۵)	۴ (۵۰)	-	۱ (۱۲/۵)	۸ (۱۰۰)	۲ (۲۵)	۲ (۲۵)	۲ (۲۵)
	کل (۲۳)	۲۱ (۹۱/۳)	۱۷ (۷۳/۹)	۲۲ (۹۵/۶)	۱۹ (۸۲/۶)	۱ (۴/۳)	۷ (۳۰/۴)	۱۹ (۸۲/۶)	۵ (۲۱/۷)	۶ (۲۶)	۴ (۱۷/۳)
دختر	پیلونفریت (۲۵)	۲۴ (۹۶)	۲۱ (۸۴)	۲۵ (۱۰۰)	۲۴ (۹۶)	۲ (۸)	۵ (۲۰)	۲۳ (۹۲)	۴ (۱۶)	۵ (۲۰)	۳ (۱۲)
	التهاب مثانه (۱۴)	۱۲ (۸۵/۷)	۱۱ (۷۸/۵)	۱۲ (۸۵/۷)	۱۰ (۷۱/۴)	۱ (۷/۱)	۵ (۳۵/۷)	۱۰ (۷۱/۴)	۲ (۱۴/۲)	۳ (۲۱/۴)	۳ (۲۱/۴)
	کل (۳۹)	۳۶ (۹۲/۳)	۳۲ (۸۲)	۳۷ (۹۴/۸)	۳۴ (۸۷/۱)	۳ (۷/۶)	۱۰ (۲۵/۶)	۳۳ (۸۴/۶)	۶ (۱۵/۳)	۸ (۲۰/۵)	۶ (۱۵/۳)
کل	پیلونفریت (۴۰)	۳۹ (۹۷/۵)	۳۵ (۸۷/۵)	۴۰ (۱۰۰)	۳۹ (۹۷/۵)	۳ (۷/۵)	۱۱ (۲۷/۵)	۳۴ (۸۵)	۷ (۱۷/۵)	۹ (۲۲/۵)	۵ (۱۲/۵)
	التهاب مثانه (۲۲)	۱۸ (۸۱/۸)	۱۴ (۶۳/۶)	۱۹ (۸۶/۳)	۱۴ (۶۳/۶)	۱ (۴/۵)	۶ (۲۷/۲)	۱۸ (۸۱/۸)	۴ (۱۸/۱)	۵ (۲۲/۷)	۵ (۲۲/۷)
	کل (۶۲)	۵۷ (۹۱/۹)	۳۹ (۶۲/۹)	۵۹ (۹۵/۱)	۵۳ (۸۵/۴)	۴ (۶/۴)	۱۷ (۲۷/۴)	۵۲ (۸۳/۸)	۱۱ (۱۷/۷)	۱۴ (۲۲/۵)	۱۰ (۱۶/۱)

نتیجه‌گیری و بحث

بررسی حاضر نشان‌دهنده حضور بالای سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک مقاوم به چندین پادزیست در کودکان مبتلا به عفونت های ادراری در ایران، می‌باشد. بیش‌ترین حضور باکتری *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک در پسران زیر یک سال (۷۱/۴۲٪) و دختران ۱۲-۵ سال (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 گروه‌های سنی دیده شد. احتمالاً یکی از دلایل بالا بودن 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 Schoenو 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

میزبانی از جمله تغییر در فلور طبیعی واژن، دختران را در ریسک بالاتری برای ابتلا به عفونت های ادراری قرار می‌دهد. تأثیر فاکتور های ژنتیکی از جمله میزان بیان گروه‌های 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.

نمونه‌های در بررسی حاضر از پسران و دختران مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه، اخذشده 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**).

سروگروپ های اصلی تشخیص داده‌شده در کودان مبتلا به پیلونفریت O1، O2، O4، O7 وO25 بودند درحالی‌که O16، O18، O75 و O22 گروه‌های اصلی ردیابی شده در کودکان مبتلا به التهاب مثانه بودند. اختلاف آماری معنی دار ($P<0.05$) برای میزان حضور سروگروپ های اصلی ردیابی شده از پیلونفریت و التهاب مثانه، دیده شد. Ruiz و همکاران (۲۰۰۲) (**۲۶**) تفاوت بالایی را بین فراوانی سروگروپ 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، afa، sfa، 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 نشان‌دهنده 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**) نشان دادند که میزان شیوع فاکتور های حدت pap، sfa، cnf-1 و hly ردیابی شده در *اشریشیا کلی* های یوروپاتوژنیک جداشده 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 سروگروپ های O1، O2، O4، O6، O18، O22، O25 و O75 میزان شیوع تقریباً مشابهی را در موارد التهاب مثانه بغرنج و ساده و همچنین باکتریوری علامت‌دار و بدون علامت، دارند هرچند شیوع فاکتور های حدت pap، iha، ompT و PAI در گروه‌های 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 سروگروپ های O1، O2، O4 و O16 به ترتیب با فراوانی ۲۹، ۱۶/۱، ۱۴/۱ و ۱۱/۲٪ فراوان‌ترین سروگروپ 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**) نشان‌دهنده حضور ۴۰٪ی سروگروپ 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٪)، فراوان‌ترین 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 سروگروپ های O1، O2، O4، O7، O25، O16، O18، O75 و O22 بیش‌ترین میزان

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 *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک جداشده از کودکان مبتلا به التهاب مثانه و پیلونفریت در بررسی حاضر، گزارش گردید. *اشریشیا کلی* های یوروپاتوژنیک بررسی حاضر بیش‌ترین مقاومت پادزیستی را به پادزیست های آمپی‌سیلین (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، می‌تواند برای درمان عفونت های ادراری در کودکان مناسب باشد. بررسی های آماری نیز اختلافات معناداری در حد $P<0.05$ را بین مقاومت سویه‌های باکتری به جنتامایسین با ایمیپنم و نیتروفورانتوین و آمپی‌سیلین و ایمیپنم، نشان دادند.

بررسی های پیشین شیوع بالای مقاومت پادزیستی *اشریشیا کلی* های یوروپاتوژنیک را علیه پادزیست های آمپی‌سیلین، جنتامایسین، آمیکاسین و نورفلوکسازین و اثربخشی درمانی بالای داروی ایمی پنم را گزارش کرده‌اند (**۹ و ۲۹**). معمولاً حضور ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی عامل اصلی بروز مقاومت پادزیستی در سویه‌های باکتری است. در بررسی حاضر ژن های *aac(3) IV*، *blaSHV*، *CITM* و *tet(A)*، فراوان‌ترین ژن های کد کننده مقاومت پادزیستی بودند که با نتایج روش دیسک گذاری ساده، مشابهت 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**) ۳۶/۵۸٪ و در بررسی Gu¨ndogduو همکاران (**۳۰**)، ۷۲٪ گزارش گردید. نتایج بررسی ما نشان داد که سروگروپ های اصلی تشخیص داده‌شده در موارد پیلونفریت، بیش‌ترین میزان شیوع ژن های کد کننده مقاومت به پادزیست های جنتامایسین (*aac(3)-IV*)، آمپی‌سیلین (*CITM*) و تری متوپریم (*dfrA1*) و سروگروپ های اصلی تشخیص داده‌شده 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 *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک جداشده از کودکان مبتلا به عفونت های ادراری در ایران، می‌باشد. به دلیل تفاوت های زیاد در میزان شیوع مقاومت های پادزیستی در سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک جداشده از کودکان، مشخص کردن الگوی مقاومت پادزیستی در هر منطقه و حتی بیمارستان، ضروری به نظر می‌رسد. تجویز صحیح پادزیست و استفاده از روش های ساده‌ای همچون دیسک گذاری می‌توانند از بروز مقاومت های پادزیستی، جلوگیری کنند. در شرایط حاضر در ایران، تجویز داروی ایمی پنم در موارد ضروری می‌تواند 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 بی‌دریغ دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران نیز قدردان و سپاس گذاریم.

References:

1. Schalger TA. Urinary tract infections in children younger than 5 years of age. Pediatric Drugs. 2001 Mar;3(3):219-27.
2. Riccabona M. Urinary tract infections in children. Current Opinions in Urology. 2003 Jan;13(1):59-62.
3. 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, Safarpoor 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 GenesLinked to Class 1 and Class 2 Integrons in Commensal Strains of *Escherichia coli* Isolated from Poultry and Swine. Microbial Drug Resitance. 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. Japanes 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 intI genes among uropathogenic Escherichia coli in Queensland, Australia. Journal of Medical Microbiology. 2011 Nov;60(pt 11):1633–1642.