مولکـــولار اپیدمیولـــوژی سوشهـــای اشریشیـــاکلی جـــدا شده از عفونت هـــای ادراری در کـــودکان

نویسندگـــان :

شهره فرشاد* ، بخش میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشـکی شیراز . ایران .

مجتبی انوری نژاد ، بخش میکروب شناسی، دانشکده پزشـکی، دانشـگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج). ایران .

علی مهرابی توانا ، بخش میکروب شنـاسی، دانشکده پزشکی، دانشـگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) . ایران .

عزیز ژاپونی ، بخش میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بالینی استـاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز . ایران .

مرضیه حسینی ، بخش میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز . ایران .

مانلی شهیدی ، بخش میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز . ایران .

مجله دانشگاه علوم پزشکی جهرم ، دوره هفتم ، شماره یک ، بهار و تابستان ۸۸

چکیـــده :

مقدمـــه : عفونت هـــای ادراری از علل عمده مراجـــعه به بیمارستـــان ها و کلینیک هـــا است و درمـــان سـریع آن بـه لحـاظ ایجـــاد عوارض بسیـــار مهم است. از آن جا کـه باکتـــری اشریشیـــاکلی یـکی از مهم ترین عـــامل های ایجـــاد عفونت هـــای مجاری ادراری در کـــودکان می‌باشد، این مطـــالعه ابتدا بـه بـــررسی الگـــوی مقاومت دارویی اشریشیـــاکلی های جدا شده از مجـــاری ادراری کودکـــان می‌پردازد. از آن‌جائی که در خصوصیـــات فنوتیپی ارگـــانیسم‌هایی مانند اشریشیاکلی تغییـــرات زیادی رخ می‌دهد، در قسمت دیگری از این مطالعه با استفاده از روش ژنوتیپی پالس فـــیلد ژل الکتـروفورز اپیدمی عفونت مجاری ادراری ناشی از اشریشیاکلی در کـــودکان شهر جهرم مورد بررسی قرار گرفت .

مـــواد و روش تحقیـق : این بـــررسی توصیفی ـ مقطعی بر روی ۹۰ سوش اشریشیاکلی جـدا شده از کودکان ۱ ماهه تا ۱۴ ساله مبتلا بـه عفونت هـــای ادراری انجـــام گرفت پس از جـــداسازی ارگـــانیسم، الگوی مقـــاومت آنتی بیوتیـــکی هـر ایـزوله بـا روش دیسـک دیفیـوژن بـــررسی شد و سپس الگـوهای ژنتیـــکی بـدست آمده بـرای ایزولـــه ها بـا روش پالس فـــیلد ژل الکتـــروفورز بـــررسی و نتـایج آن با الگوهـای مقاومت دارویی مقایسه شدند.

یافته هـــا : در میـــان ۹۰ سوش اشریشیـــا کلی با آزمـــایش حساسیت آنتی بیوتیـــکی، ۴۵ الگـــو بدست آمد کـه بیش تـــرین مقاومت به تـــرتیب نسبت به آمپی سیلیـــن، کوتـــریموکسازول و تتراسا‌کـــلین دیده شد. با استفـــاده از روش پـــالس فیلد ژل الکتـــروفورز کلاً ۶۶ الگو بـــدست آمد که بیش تـــرین درصد را سوش هـای با تعداد ۱۳ و ۱۲ باند و کم تـرین درصد را سوش های با تعداد ۱۹ و ۸ باند تشکیل دادند.

نتیجه گیـــری : با توجـه بـه قدرت افتـــراق بالای روش پـــالس فیلد ژل الکتـــروفورز در مقـــایسه با آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی و الگوهای بدست آمده، مسئله اپیدمی‌در بین کودکان شهر جهرم منتفی شد.

واژه‌گـــان کلیدی : اشریشیاکلی، حساسیت، آنتی بیوتیک، پالس فیلدژل الکتروفورز .

مقدمـــه :

اشریشیـــاکلی یکی از گونه هـــای متنوع باکتـــریایی است که عمدتـــاً در دستـــگاه گوارش انســـان زندگی می‌کند. سوش هـــایی از این ارگـــانیسم که از نظر ژنـــوتیپی بـــا طبیعی روده متفـــاوت هستنـــد بـــاعث ایجـــاد بیماری های‌خـــارج روده ای مثل عفونت مجـــاری ادراری

* نویسنده مسئول ، آدرس : شیراز، بیمارستان نمازی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی پست الکترونیک: farshad@yahoo.com s

تلفن : ۶۴۷۴۲۶۴-۰۷۱۱ نمابر : ۶۴۷۴۳۰۳-۰۷۱۱

تاریخ دریافت : ۸۸/۶/۴ تاریخ پذیرش : ۸۸/۷/۱۳

درانسان می‌شوند [۱]. از داروهایی که برای درمان این دسته عفونت ها مورد استفاده قرار می گیرند می توان به کوتریموکسازول ، آمپی سیلین، کینولون، سفالوسپورین، کاربا‌پنم ها، آمینو گلیکوزیدها اشاره کرد [۲].در سال های گذشته درمان بیماران با عفونت دستگاه ادراری ناشی از سوش های اشریشیا کلی با مشکلاتی مواجه شده است که دلیل آن ، افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های اشریشیاکلی در سرتاسر جهان است . این عدم حساسیت میکروارگانیسم به عوامل ضد میکروبی نیز خود به علت درمان طولانی مدت با آنتی بیوتیک ، استفاده مکرر و غیر مناسب از آنها و درنتیجه تغییر فلور طبیعی روده و القا مقاومت آنتی بیوتیکی می‌باشد. به عنوان مثال کوتریموکسازول برای درمان عفونت مثانه بدون عوارض در بسیاری از مناطق استفاده می‌شد اما مقاومت به آن که در مطالعات گوپتا (Gupta) و گویدونی (Guidoni) به آن اشاره شده است باعث شد که از داروهای جدیدی مثل فلوروکینولون ها و سفالوسپورین ها استفاده شود. متاسفانه مقاومت به این دو عامل ضد میکروبی نیز به وسیله محققین مختلف گزارش شده است [۴و۳].

آزمایشگاه های میکروب شناسی پزشکی از آزمایش های حساسیت آنتی بیوتیکی در مورد ایزوله‌های مختلف باکتریایی برای تشخیص یک الگوی جدید یا غیر معمول مقاومت آنتی بیوتیکی استفاده می‌شود. این اطلاعات که از بیماران مختلف بدست می‌آید می‌تواند نشان دهنده تشدید یک بیماری در جامعه باشد. برای مطالعات اپیدمیولوژیکی روش های فنوتیپی مثل آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی، به دو علت استفاده محدودی دارند: علت اول به خاطر تغییرات فنوتیپی وعلت دیگر مقاومت های آنتی بیوتیکی غیر معمول است که در مورد ایزوله های باکتریایی دیده می‌شود. اما بر عکس، روش های ژنوتیپی مثل پالس فیلدژل الکتروفورز با قدرت افتراق بالا برای ارتباط بین سوش های داخل یک گونه ، کشف منشا عفونت و راه های شیوع آن به حذف و کنترل عفونت کمک می کنند. رودلف (Rudolph) و همکاران با استفاده از آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی و روش پالس فیلد ژل الکتروفورز بر روی نمونه های استرپتوکوکوس راهکارهایی برای کنترل این عفونت بیان کردند [۵و۶] . درمیان روش های ژنوتیپی از این روش به عنوان روش استاندارد طلایی نام برده می‌شود [۹و۸و۷]. اما روش مذکور به دلیل پیچیدگی و هزینه بالای دستگاه ها و مواد مورد نیاز، به طور عادی در همه آزمایشگاه ها قابل اجرا نمی‌باشد [۵] . بنابراین با توجه به مقاومت روز افزون باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها که طبعاً در هر منطقه الگوی خاص خود را دارند، شناسایی الگوی مقاومت باکتری اشریشیا کلی نسبت به آنتی بیوتیک ها در شهر جهرم ضرورتی انکار ناپذیر است. به همین منظور در قسمتی از مطالعه حاضر ، شناسایی الگوی های مقاومت اشریشیا کلی های پاتوژن ادراری در شهر جهرم انجام شد تا راهکارهای منطقی برای درمان عفونت های سیستم ادراری در این منطقه پیشنهادشود.

در این مطالعه برای افتراق سوش های جدا شده در اپیدمی‌ها، از مقایسه الگوهای حساسیت دارویی و احتمال وجود اپیدمی‌عفونت های ادراری در این شهراز روش پالس فیلدژل الکتروفورز استفاده شد .

مواد و روش تحقیق :

جداسازی و تشخیص باکتری:

در طی یک مطالعه مقطعی توصیفی، نمونه های ادرار کودکان مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان شهید مطهری جهرم در مدت زمان یک سال جمع آوری شد.مبنای تشخیص عفونت مجاری ادراری برپایه علائم کلینیکی و نتایج آزمایشگاهی بود. بیمارانی در این طرح مورد بررسی قرار گرفتند که عفونت را از طریق

جامعه کسب کرده بودند. بدین ترتیب بیمارانی که ۴۸ ساعت پس از بستری شدن در بیمارستان یا یک ماه قبل از نمونه گیری، سابقه بستری در بیمارستان را داشته و هم چنین بیمارانی که در طی ۱۵ روز قبل از آزمایش، آنتی بیوتیک مصرف کرده بودند از مطالعه حذف شدند. پس از جمع آوری، نمونه ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند و در محیط کشت مناسب کشت داده و سپس به مدت ۲۴ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. محیط کشت بعد از ۲۴ ساعت بررسی شد و در صورت رشد ارگانیسم خالص بیش از 10^5 کلنی که دال بر عفونت ادراری است جهت تعیین نوع ارگانیسم و تائید اشریشیاکلی از رنگ آمیزی گرم، آزمایش قند، آزمایش ایندل و سیترات استفاده شد.

آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی :

پس از تائید اشریشیاکلی به عنوان عامل عفونت ادراری، آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوزن بر اساس معیارهای CLSI, ۲۰۰۶ بر روی نمونه ها صورت گرفت (۱۰). آنتی بیوتیک های مورد استفاده شامل تتراسایکلین، آمپی سیلین، کوتریموکسازول، نیتروفورانتوئین، نورفلوکساسین، جنتامایسین، آمیکاسین، ایمیپنم، سفوروکسیم، سفتازیدیم، کلرآمفنیکول، نالیدیکسیک اسید، سفیکسیم و سیپروفلوکساسین بودند که از شرکت Mast انگلستان تهیه شدند.

یافته ها :

سوش های اشریشیاکلی و حساسیت آنتی بیوتیکی :

در این تحقیق ۹۰سوش اشریشیاکلی از نمونه های ادرار کودکان ۱ ماهه تا ۱۴ ساله (۶۲/۵ درصد مذکر و ۳۷/۵ درصد مونث) پالس فیلدژل الکتروفورز با استفاده از روش اجرنز (Ejrnaes) و همکارانش انجام شد (۱۱). مبتلا به عفونت ادراری کسب شده از جامعه، با میانگین سنی (۲۶/۹±۲۱/۸ماه) جدا و تائید شدند. همان طوری که در جدول (۱) مشاهده می‌شود بر اساس نتایج بدست آمده از آزمایش آنتی بیوگرام ،در میان داروهای مورد استفاده

جدول (۱) : فراوانی مقاومت های آنتی بیوتیکی سوشهای اشریشیاکلی جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت های ادراری در شهر جهرم

آنتی بیوتیک	میزان مقاومت تعداد (درصد)
آمپی سیلین	۷۷(۸۰/۲)
کوتریموکسازول	۷۳(۷۶)
تتراسایکلین	۶۸(۷۰/۸)
کلرامفنیکول	۳۴(۳۵/۴)
نالیدیکسیک اسید	۲۴(۲۵)
سفیکسیم	۱۹(۱۹/۷)
سفورکسیم	۱۸(۱۸/۷)
جنتامایسین	۱۵(۱۵/۶)
سفتازیدیم	۱۰(۱۰/۴)
سیپروفلوکساسین	۸(۸/۳)
نورفلوکساسین	۸(۸/۳)
نیتروفورانتوئین	۳(۳/۱)
آمیکاسین	۳(۳/۱)
ایمی پنم	۰(۰)

در این مطالعه آمپی سیلین، کوتریموکسازول و تتراسایکلین کم ترین اثر بر روی سوش های اشریشیاکلی را نشان داشتند. هیچ گونه مقاومتی نسبت ایمیپنم دیده نشد و بعد از آن بیش ترین اثر داروئی را آمیکاسین، نیتروفورانتوئین، نورفلوکساسین و سپروفلوکساسین بر روی نمونه ها نشان دادند. بر اساس نتایج آنتی بیوگرام، تعداد ۴۵ الگوی مقاومت در میان سوش ها تشخیص داده شد که در آن ۷۷ درصد از ایزوله ها به ۳ یا تعداد بیش تری از آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند و به عنوان سوش های با مقاومت چند داروئی شناخته شدند. تنها ۸/۳ درصد از سوش ها به طور کامل به تمام آنتی بیوتیک ها حساس بودند جدول (۲).

جدول (۲) : الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی سوش های اشریشیاکلی عامل عفونت اداری در شهر جهرم

تعداد	الگوهای مقاومت داروئی	تعداد	الگوهای مقاومت داروئی
۱	Cfm-Ap-Te-Cxm-Ts	۶	Ap
۱	Na-Ap-Gm-Te-Ts	۴	Ts
۱	Cip-Ap-Gm-Te-Ts	۱	Na
۲	Ap-C-Te-Nor-Cxm-Ts	۲	Ap-Te
۱	Ap-C-Te-Nor-Caz-Ts	۱	Cxm-Ts
۱	Na-Ap-Gm-C-Te-Ts	۱	Cfm-Ap
۱	Na-Cip-Ap-Gm-Te-Ts	۱	Ap-Gm
۱	Cfm-Ap-Te-Cxm-Caz-Ts	۱۳	Ap-Te-Ts
۱	Cfm-Ap-C-Te-Nor-Ts	۲	Ap-C-Te
۱	Cfm-Ap-Ak-Te-Cxm-Caz-Ts	۱	Ap-Gm-Ts
۱	Na-Ap-C-Te-Nor-Cxm-Ts	۱	Na-Te-Ts
۱	Na-Cip-Ap-Gm-C-Te-Ts	۱	Na-Ap-Te
۱	Na-Ap-Ge-C-Te-Nor-Cxm-Ts	۱	C-Te-Ts
۱	Na-Cfm-Cip-Ap-Gm-C-Te-Ts	۱	Ap-Gm-Te-Ts
۱	Na-Cfm-Ap-C-Te-Cxm-Caz-Ts	۱	Ap-C-Cxm-Ts
۱	Na-Cip-Ap-Ge-C-Te-Nor-Ts	۱	Ap-Ni-Te-Ts
۱	Na-Cfm-Ap-Ni-Te-Cxm-Caz-Ts	۱۲	Ap-C-Te-Ts
۱	Na-Cfm-Cip-Ap-Gm-C-Te-Cxm-Ts	۳	Cfm-Ap-Te-Ts
۱	Cfm-Ap-Ak-Gm-Te-Nor-Cxm-Caz-Ts	۱	Ap-Ak-Gm-Te-Ts
۱	Na-Cfm-Cip-Ap-Ni-C-Te-Cxm-Caz-Ts	۱	Na-Ap-C-Te-Cxm
۱	Na-Cfm-Cip-Ap-Gm-Te-Nor-Cxm-Caz-Ts۱	۲	Na-Ap-C-Te-Ts
۸	Sensitive	۲	Na-Cfm-Ap-Te-Ts
۹۶	Total	۱	Na-C-Te-Cxm-Ts

الگوی پالس فیلدژل الکتروفورز :

بر اساس پالس فیلدژل الکتروفورز و مشاهده تشابه باندهای ژنتیکی ،در میان ۹۰ سوش اشریشیاکلی ۶۶ الگوی ژنتیکی بدست آمد که از P۱ تا P۶۶

نامگذاری شدند. بر این اساس تنها الگو با بیشترین تکرار، الگوی شماره P۲ با ۱۲ باند بود که در میان ۵ سوش تکرار شده بود. طیف اندازه باندها از ۲ تا ۶۶۰ کیلو جفت باز و تعداد باندها از ۸ تا ۱۹ باند متغیر بود. فراوان ترین الگوها شامل الگوهای ۱۳ و ۱۲ باندی بودند که به ترتیب در ۲۵/۵ درصد و ۲۳/۳ درصد سوش ها مشاهده شدند. این در حالی بود که الگوهای ۱۹ و ۸ باندی ۱/۱ درصد از کل الگوها را شامل می‌شدند.

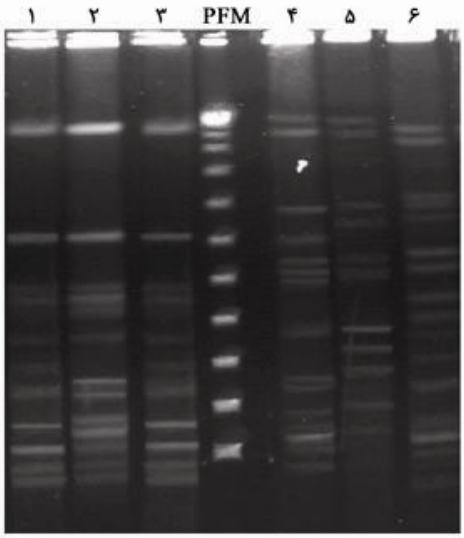
بحث و نتیجه گیری :

باکتری اشریشیاکلی فلور طبیعی روده می‌باشد و اکثر سویه های آن تا زمانی که در روده هستند هیچ خطری ندارند ولی اگر در قسمت های دیگر بدن نظیر دستگاه ادراری تناسلی، آپاندیس، کیسه صفرا وارد شوند می‌توانند به تنهایی یا به کمک سایر باکتری ها ایجاد عفونت نمایند. عفونت‌مجاری ادرار شدیداً احتیاج به درمان آنتی بیوتیکی دارد. این عوامل دارویی به منظور درمان عامل مهاجم بکار می‌روند، بنابراین ارتباط بین استفاده شدید از داروهای آنتی میکروبیال و گسترش باکتری های مقاوم موضوعی بدیهی می‌باشد [۱۶-۱۲].افزایش مقاومت به داروها باعث بروز اشکال در درمان نیز شده است. برای مثال مقاومت به کوتریموکسازول و فلوروکینون و سفالوسپورین های وسیع الطیف باعث محدودیت در مصرف این داروها در درمان بیماران مبتلا به عفونت مثانه شده است [۳]. هم چنین در دهه گذشته استفاده نامناسب از آمپی‌سیلین و کوتریموکسازول باعث افزایش مقاومت نسبت به این داروها شده است [۴]. ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی حاکی از آن است که باکتری اشریشیاکلی به عنوان شاخص مهم گسترش مقاومت در جمعیت باکتریایی می‌باشد [۱۷و۱۲]. بر این اساس با کمک بررسی ویژگی های فنوتیپی مثل الگوی مقاومت دارویی می‌توان با تشخیص یک الگوی جدید یا غیر معمول که از ایزوله های مختلف سوش های اشریشیاکلی بدست آمده به طغیان بیماری پی برد و تا حدودی به درمان بیماران کمک کرد [۵]. مطالعه ای که توسط گویدنی (Guidoni) و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی سوش های اشریشیاکلی جدا شده از کودکان ۲ ماهه تا ۱۵ ساله در برزیل صورت گرفت به ترتیب بیش ترین و کم ترین مقاومت نسبت به آمپی سیلین و آمیکاسین نشان داد [۴]. یوکسل(Yuksel) و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶ با مطالعه ای دیگر که در ترکیه انجام داده بودند بیش ترین مقاومت را نسبت به آمپی سیلین با ۷۴/۲ درصد و بعد از آن به کوتریموکسازول با ۶۱/۳ درصد و کم ترین مقاومت را نسبت به نیتروفورانتوئین با ۲/۲ درصد و بعد از آن آمیکاسین ۹/۴ درصد تعیین کرده بودند [۲۰]. در سال ۲۰۰۵ درومیگنی (Dromigny) و همکاران در سنگال بیش‌ترین و کم‌ترین مقاومت را نسبت به آمپی‌سیلین و ایمیپنم در میان سوش‌های اشریشیاکلی عامل عفونت ادراری نشان داد [۱۹]. ماتیل (Mathaie) وهمکاران در مطالعه ای نشان دادند که مقاومت بالایی نسبت به آمپی سیلین، تتراسایکلین و کوتریموکسازول در میان سوش های اوروپاتوژن اشریشیاکلی در جنوب هند وجود دارد [۱۷].

در بررسی حاضر نیز که در شهر جهرم انجام شد بیش ترین مقاومت به ترتیب نسبت به آمپی سیلین (۸۰/۲ درصد)، کوتریموکسازول (۷۶ درصد) و تتراسایکلین (۷۰/۸ درصد) مشاهده شد که البته بادستورالعملی که توسط سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۷ منتشر شد و کوتریموکسازول و آمپی سیلین را به عنوان داروی انتخابی عفونت مجاری ادراری معرفی کرده بود [۲۰] در تناقض است. در این طرح کم ترین مقاومت نسبت به ایمیپنم، آمیکاسین و نیتروفورانتوئین وجود داشت که این عدم مقاومت نسبت به ایمیپنم توسط ادوان (Adwan) و همکاران در سال ۲۰۰۴ نیز عنوان شد [۲۱]. حساسیت بالا نسبت به ایمیپنم به وسیله ماتیل و تاریک عنوان

شد [۲۲و۱۷] که به نظر می‌رسد داروی انتخابی در درمان عفونت مجاری ادراری می‌باشد. نتایج نشان می‌دهند هر چند تغییرات جغرافیایی می‌تواند در تغییر الگوی آنتی بیوگرام در مناطق مختلف تاثیر گذار باشد اما بیش ترین و کم ترین مقاومت آنتی بیوتیکی ارگانیسم ها نسبت به عوامل دارویی تفاوت چندانی ندارد. در این مطالعه فقط مقاومت نسبت به نالدیکسیک اسید و کلرآمفنیکول در مقایسه با مناطق دیگر دنیا کمتر بود [۲۳و۱۷]. در این بررسی مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، آمیکاسین و نیتروفورانتوئین نیز پایین بود که می‌توانند به عنوان درمان عفونت مجاری ادراری تجویزشوند. به ویژه داروی ارزان قیمت نیتروفورانتوئین که فعالیت خوبی بر علیه عوامل ایجاد کننده عفونت های مجاری ادراری دارد [۴]. در این طرح هم چنین حدود ۷۷ درصد از نمونه‌ها به ۳ آنتی بیوتیک یا بیش تر مقاوم بودند که به عنوان ارگانیسم های با مقاومت های چند داروئی (Multiple Drug Resistance) در نظر گرفته شدند. درصد مقاومت چند داروئی در سال ۲۰۰۰ در آمریکا ۷/۱ درصد [۲۴و۲۰] و در سال ۲۰۰۶ در اسلوونی ۴۲ درصد گزارش شده است [۲۳]. از آن جائی که بیش تر بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری به خصوص در کشورهای در حال توسعه توانایی پرداخت هزینه مشورت با پزشک و هزینه آزمایش‌های آزمایشگاهی را ندارند، به صورت تجربی درمان می‌شوند. به همین علت ممکن است دارویی مصرف کنند که در مورد بیماری آنها جواب ندهد و این تجویز مکرر، نامناسب و خودسرانه از دلایل افزایش مقاومت ارگانیسم به آنتی بیوتیک ها می‌باشد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تغییر الگوی آن در بیماری‌های عفونت مجاری ادراری در دوران کودکی هم یک مشکل رو به افزایش است [۱۸] که به وسیله تجویز کافی و به موقع آنتی بیوتیک های مناسب توسط پزشک و نیز نظارت و زمان بندی مناسب مصرف داروهای تجویز شده قابل کاهش و کنترل است. بایستی توجه داشت که هر چند به کمک روش های فنوتیپی مثل آزمایش مقاومت آنتی بیوتیکی و نظارت بر آن می‌توان تا حدودی به درمان بیماران کمک کرد، اما از آن جائی که این دسته از روش ها قدرت افتراق پایینی دارند و قادر به کشف منبع عفونت و ارتباط میان سوش های عامل بیماری زا نیستند لذا نمی‌توانند به تنهایی در مطالعات اپیدمیولوژی مفید باشند و در نتیجه در کنترل و حذف عفونت چندان کارساز نخواهند بود [۲۵و۶]. دلیل دیگری که باعث محدودیت استفاده از آزمایش مقاومت آنتی بیوتیکی در بررسی های اپیدمیولوژی شده مکانیسم های مختلفی است که در یک سوش اتفاق می‌افتد و به صورت ناگهانی آن سوش را به یک یا چند آنتی بیوتیک خاص مقاوم می‌کند. به علت این مکانیسم های ژنتیکی مختلف، سوش های گوناگون ممکن است الگوی مقاومتی مشابه ای داشته باشند و محققین را در تایپ بندی به اشتباه بیندازند [۵]. هم چنین از آن‌جائی که خصوصیات فنوتیپی دیگر نظیر الگوهای بیوشیمیایی، تعیین تیپ فاز، آنتی ژن های سطحی سلول تحت شرایط وضعیت های رشد، فاز رشد و جهش خود به خودی تمایل زیادی به تغییر دارند پس بایستی در کنار روش های فنوتیپی از روش های ژنوتیپی نظیر آنالیز DNA پلاسمیدی و کروموزومی با استفاده از پروب های DNA، پالس فیلدژل الکتروفورز و PCR که دچار تغییرات کم‌تری می‌شوند نیز استفاده نمود [۲۸و۲۷و۲۶]. از میان این روش‌ها بیش ترین و معمول ترین روش که برای تیپ بندی و مطالعه اپیدمیولوژی در مناطق مختلف کاربرد دارد روش پالس فیلدژل الکتروفورز می‌باشد [۳۰و۲۹و۲۵] که از آن به عنوان روش استاندارد طلایی نیز نام برده می‌شود [۹و۸و۷]. این روش به لحاظ قدرت تکرارپذیری و افتراق بالا برای تمام پاتوژن های انسانی نیز قابل استفاده

می‌باشد [۵]. با استفاده از این روش به کمک آنزیم Xba1 در تحقیقات مختلف به طور متوسط ۱۵ باند DNA در این ارگانیسم شناسائی گردیده است [۳۱]. در مطالعه حاضر تعداد باندهای DNA ایجاد شده توسط آنزیم Xba1 بین ۱۹-۸ باند و با وزن مولکولی ۶۶۰-۲ کیلو جفت باز بود که دلیل دیگری بر تنوع ژنتیکی بالای سوش های داخل گونه اشریشیاکلی می‌باشد. این تعداد و اندازه باند در مقایسه با سایر مطالعات کمی متفاوت است. در سال ۲۰۰۸ واتانبه (Watanbe) با استفاده از آنزیم Xba۱ در جداسازی DNA سوش های اشریشیاکلی حدود ۱۵ باند بدست آورد [۳۱]. کاوموری (Kauamori) نیز در مطالعه ای دیگر بر روی اورپاتوژن ها، ۱۹-۲۴ باند با وزن مولکولی ۵۰۰-۳۰کیلو جفت باز بدست آورد[۳۲]. اجرنز(Ejrnaes) نیز با مطالعه‌ای بر روی ۱۵۶ سوش اشریشیاکلی عامل عفونت ادراری با استفاده از آنزیم Xba۱ ۱۵-۱۰ باند با وزن مولکولی ۱۲۰۰kbp-۵۰ بدست آورد [۱۱]. علاوه بر تغییرات و تنوع ژنتیکی زیاد سوش های اشریشیاکلی در مناطق جغرافیایی مختلف از عوامل دیگری که می‌توان در پراکندگی تعداد و اندازه باندها در آزمایشگاه های مختلف بیان کرد ،اشکالات تکنیکی در حین انجام کار می‌باشد. از این دسته اشکالات می‌توان به عدم زمان کافی در جداسازی کل ژنوم ارگانیسم در دستگاه پالس فیلدژل الکتروفورز، از بین رفتن مقداری از ژنوم مورد نظر در حین مراحل آماده سازی آن، عدم فعالیت کامل آنزیم پروتئیناز K به خاطر وجود آلودگی آن با عوامل مختلف و نیز عدم تناسب بین غلظت DNA بکار رفته و غلظت آنزیم اشاره نمود. در این طرح با انجام آزمایش های مختلف تمامی این اشکالات به حد اقل رسانیده شد. در نتیجه اثر آنزیمی Xba۱ از میان ۹۰ نمونه اشریشیاکلی جدا شده از موارد عفونت ادراری، ۶۶ الگو بدست آمد که از P۱ تا P۶۶ نامگذاری شدند. در این میان تنها الگویی که درمیان نمونه ها بیش‌ترین تکرار را داشت الگوی شماره P۲ با ۱۲ باند بود که در میان ۵ سوش مشاهده شد. بیش‌ترین درصد به سوش‌های با تعداد ۱۳ و ۱۲ باند (به ترتیب۲۵/۲ درصد و ۲۳/۳ درصد) و کم ترین درصد به سوش های با تعداد ۱۹ و ۸ باند (۱/۱ درصد) مربوط می شد. با توجه به نتایج مطالعات گذشته که در آن ها الگوهای متفاوتی از سوش های یک گونه به روش پالس فیلدژل الکتروفورز بدست آمده [۳۴و۳۲و۲۹و۳] با نتایجی که از مطالعه حاضر حاصل شده ، ناشی از نمونه گیری در زمان‌ها و مناطق مختلف بوده است. هم چنین ۶۶ الگوی ژنتیکی بدست آمده در مقایسه با نتایج بدست آمده از آنتی بیوگرام که مجموعاً ۴۵ الگو بود قدرت افتراق بالا و تشخیص بیشتر سوش های داخل یک گونه توسط پالس فیلدژل الکتروفورز را نشان می‌دهد. از دیگر کاربردهای پالس فیلد، تخمین اندازه ژنوم میکروارگانیسم ها می‌باشد که در این بررسی اندازه ژنوم سوش ها بسیار متفاوت بود و نشان داد داخل یک گونه، سوش های مختلف و ناهمگونی وجود دارد و اشریشیاکلی از تنوع ژنتیکی زیادی برخوردار می‌باشد [۳۵و۳۰] شکل (۱). این تنوع یکی به خاطر آن است که هر سوش ژن های متفاوتی را حمل می‌کند .به عنوان مثال سوش‌های عامل ایجاد پیلونفریت، ژن هایی را کد می‌کنند که با ایجاد پلی اجازه چسبیدن آنها را به سلول های اپیتلیال مجاری ادراری می‌دهد [۳۶]. از علت دیگر تنوع ژنتیکی، می‌توان به حوادث ژنتیکی که در میان سوش ها روی می‌دهد اشاره کرد . جهش های نقطه ای که غالباً در ژنوم روی می‌دهد قابل تشخیص نیستند. البته اگر جهش های مذکور در منطقه رمز کننده اتفاق بیفتد باعث تغییر رفتارهای فنوتیپی ایزوله ها می‌شود و اگر این جهش ها در مکان های محدود کننده روی بدهد می‌توان از طریق روش های محدود کننده آنها را نشان داد. الحاق (Insertion) را به صورت یک باند مخصوص که بزرگ تر از بقیه باندهاست می‌توان تشخیص داد، اما در طول ژل مسافتی را طی نمی‌کند. مسافت بیش تری را



شـــکل (۱) : الگوهای پالس فیلد چند نمونـه از سوش های اشریشیا کلی جدا شده از نمونه هـای ادراری کـودکان مبتلا به UTI کسب شده از جـامعه

در طول ژل طی می‌کنـد، چون که رشته هـــای DNA از حـــالت طبیعی کوچک ترند. با توجـه به این که سوش ها با مکانیسم هـــای مختـلفی مثل جهش هـــای نقطه ای یا کسب ژن هـــای مخصوص ایجـــاد کننده‌ی مقـــاومت از طریق پلاسمید یاتراسپـــوزون می‌تواننـد به صـورت ناگهانی به آنتی بیوتیـــک خاصی مقـاوم شوند [۳۶و۵]، لذا پراکنـــدگی وزن مولـکولی ژنوم سوش هـا نشان دهنده مقاومت ناشی از insertion یـا deletion خـــواهد بود که بـــاعث شـده است قطعـــاتی از کرومـــوزوم را در منـــاطق محـــدودکننده وارد یا خـارج سازد. با توجه به بررسی هـــای انجـــام شده ، این اولین مـورد از به کار گیری روش پالس فیلد ژل الکتـروفورز برای مطالعه شیوع عفـونت مجاری ادراری در کـودکان یک منطقه در ایـــران بـوده است و در این راستا برای بـررسی اپیدمی ، تایپ بندی و ارتباط ژنتیـــکی بین سوش هـای عامل ایجـاد عفـونت مجاری ادراری در کـودکان که عفونت را از طریق جـــامعه کسب کرده بـودند استفـــاده شد. با توجـه به پراکندگی الگـــوهای مخـــتلفی که بدست آمد مسئله اپیدمی در جـــامعه منتفی شد . می‌تـوان گفت سوش ها ازکلون های مختلفی به وجـود آمده‌اند و تنوع ژنتیـــکی بسیار بـالای اشریشیاکلی مانع تشخـــیص و ارتباط بیـن سوش هـای ایجاد عفـونت مجاری ادراری در کودکان و فـرم بالینی عفونت شـد. بـه دلیـــل اهمیت موضوع پیشنهـــاد می شـود پژوهش هـــای مرتبـط دیگر در ایـن زمینـه بـه صورت وسیع تر انجـــام گرفته و ویژگی هـای باکتـــری های مقـاوم، اپیدمیـــولوژی و ارتباط آن با چـــگونگی مصرف تمام آنتی بیوتیـــک های رایـج بررسی شود. توجه ویـژه بـه ایـن امـر از آن جهت حـــائز اهمیت است که امـروزه بسیاری از آنتی بیوتیـــک های مفید ممکن است به دلیل عـدم توجه به مـــکانیزم های ایجـاد مقـاومت و بالاخص شیـــوع و انتشار آن هـــا، کارائی خـود را در درمـــان عفونت‌های باکتـــریائی از دست داده و مشـکلات بزرگ و غیر قابل حلی را ایجاد نمایند .

تقدیـــر و تشـکر :

این طـــرح در قالب پـروژه تحقیقـــاتی شماره ۲۲ - ۸۴ درمرکـــز تحقیقات میـــکروب شناسی بالینی استـــاد البـــرزی، بیمارستان نمازی شیـــرازانجام گرفته است. هم چنیـن از همـــکاری صمیمانـه آقای مهـدی کـلانی در جـــداسازی، تشخیص و خـــالص سازی مولـکولی نمونه ها نیز قدردانی می‌شود .

REFERENCES : منـــــــابع :

1) Marrs CF, Zhang L, Foxman B, et al. Escherichia coli mediated urinary tract infection: are there distinct uropathogene E.coli (UPEC) pathotypes culture media. FEMS Microbiol Lett 2005; 252: 183-19.

2) Muhldorfer I, Ziebuhr w, Hacker J. Escherichia coli in urinary tract infection, In: Sussman M. Molelcular medical microbiology, Academic press, Barcelona, 2002;2: 1531-33.

3) Li Q, Sherwood JS, Logue CM. Characterization of antimicrobial resistant Escherichia coli isolated from processed bison carcasses. J Applied Microbiology 2007; 103: 2361-69.

4) Guidoni EBM, Berezin EN, Nigro S, et al. Antibiotic resistance patterns of pediatric community Acquired urinary infection. Brazillian J Infec Disease 2008; 12(4): 321-323.

5) Arbeit RD, Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms, In: Murray PR Baron EJ, Pfaller MA, et al. Manual of clinical microbiology, 7th ed. ASM press, Washington, 1999: 127.

6) Rudolph KM, Parkinson AJ, Roberts MC. Molecular analysis by pulsed field gel electrophoresis and antibiogram of streptococous pneumonial serotype isolated from selected areas within the United States. J Clin Microbiol 1998; 36(9): 2703-2707.

7) Fitzgerald C, Helsell O, Nicholsen MA, et al. Evaluation of methods for subtyping campylobacter jejuni during an outbreak involving a food handler. J Clin Microbiol 2001; 39: 2386-2390.

8) Gerner Smith P, Kincaid J, Kubota K, et al. Molecular surveillance of shiga toxigenic Escherichia coli 0157 by Pulse Net USA. J Food Port 2005; 68: 1926-1931.

9) Healy M, Huong J, Bittner T, et al. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. J Clin Microbiol 2005; 43: 199-207.

10) Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2006; M100-S16. Wayne, PA: CLSI.

11) Ejrnaes K, Sandvang D, Lundgren B, et al. Pulsed field gel electrophoresis typing of Escherichia coli strains from sample collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community acquired urinary tract infection in women. J Clin Microbil 2006; 44: 1776-1781.

12) Ebrahimzadeh MA, Mahdavee MR, Vahedi M. Antibiotic resistance in E.coli isolated from

urine: A2-year study isolated from patient with urinary tract infection in Iran. Journal of Cell Tissue Research 2005; 5(2): 445-448.

13) White PA, Mcluer CJ, Deug YM, et al. Characterization of two new gene cassette, aad A5 and dfr A17. FEMS Microbiology Letters 2000; 182: 265-269.

14) Yu HS, Lee JC, Kang HY, et al. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among Ecoli isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. J Clini Microbiology 2003; 41: 5429-5433.

15) Riccabona M. Urinary tract infection in children. Current opinion in urology. 2003; 13: 59-62.

16) Schalger TA. Urinary tract infection in children younger than 5 years of age. Paediatric Drugs 2001; 3(3): 219-227.

17) Mathai E, Grape M, Kronval LG. Integrons and multidrug resistance among Ecoli causing community acquired urinary tract infection in Southern India. APMIS 2004; 112: 159-164.

18) Yuksi S, Ozturk B, Kavaz A, et al. Antibiotic resistance of urinary tract pathogens and evaluation of empirical treatment in Turkish children with urinary tract infection. J Antimicrobiol Agents 2006; 28: 413-416.

19) Dromigny JA, Nabeth P, Juergense Behr A, et al. Risk factors for antibiotic- resistant Escherichia coli isolated from community acquired urinary tract infection in Dakor, Senegal. J Antimicrobial Chemotherapy 2005; 33: 89-94.

20) Wolff O, Maclennan C. Evidence behind the WHO guidelines hospital care for children: what is the appropriate empiric antibiotic therapy in uncomplicated urinary tract infection in children in developing countries? Journal of Toprical Pediatrics 2007; 53:150-152.

21) Adwan K, Abu Hasan N, Adwan G, et al. Molecular epidemiology of antibiotic-resitant Escherichia coli isolated from hospitalized patient with urinary tract infection in Northen palestine. Pol J Microbiol 2004; 53: 23-26.

22) Tariq N, Jaffery T, Ayub R, et al. Frequency and antimicrobial susceptibility of aerobic bacterial vaginal isolates. J Coll Physicians Surg Pak 2006; 16: 196-199.

23) Rijavec M, Starcic Ergivec M, Ambrozic Augustin J, et al. High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic Escherichia coli of the four major phylogenetic groups. Curr Microbiol 2006; 53: 158-162.

24) Sahm DF, Thornberry C, Mayfield DC, et al. Multi drug resistant urinary tract isolates of Escherichia coli prevalence and patient demographics in the United States in 2000. Antimicorb Agent Chemother 2000; 45: 1402-1406.

25) Alfizah H, Nordiah AJ, Rozaidi WS. Using pulsed field gel electrophoresis in the molecular investigation of an outbreak of Serratia marcescnes infection in an intensive care unit. Singapore Med J 2004; 45(5): 214-218.

26) Foxman B, Riley L. Molcular epidemiology: focus on infection. Am J Epidemiol. 2001; 153(12): 1135-1141.

27) Tenover FC, Arbeit RD, Georing RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bactieral infection A review for healthcare epidemiologists. Infect Control Hosp Epidemiol 1997; 18(6): 426-439.

28) Farjadian S, Kaviani MJ, Ghaderi A. Molecular analysis of pseudomonas aeruginosa strains isolated from hospitalized patients in Shiraz. Irn J Med Sci 1996; 21(3 & 4): 118.

29) Gautom RK. Rapid Pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of Escherichia coli O157: H7 and other gram-negative organisms in 1 day. JClini Microbiol 1997; 35: 2977-2980.

30) Allardet Servent A, Bouziges N, Carles Nurit MJ, et al. Use of low frequency cleavage restriction endonucleases for DNA analysis in epidemiological in investigation of nosocomial bacterial infection. J Clin Microbiol 1989; 27: 2057-2061.

31) Watabe M, Hogg GM, Millar BC, et al. Epidemiological study of E. coli 0157: H7 isolated in northern Ireland using pulse field gel electrophoresis. Ulster Med J 2008; 77(3): 168-174.

32) Kawamori F, Hiroi M, Harada T, et al. Molecular typing of Japanese Escherichia coli 0157: H7 isolates from clinical specimens by multilocus variable number tandem repeat analysis and PFGE. J Med Microbiol 2008; 57: 58-63.

33) Bannerman TL, Honcock GA, Tenover FC, et al. Pulse Field Gel Electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 1995; 33: 551-555.

34) Nikbin VS, Abdi Ali A, Feizabadi MM, et al. Pulsed Field Gel Electrophoresis and plasmid profile of pseudomonas aeruginosa at two hospitals in Tehran, Iran. Iranian J Med Res 2007; 126: 146-151.

35) Lin WJ, Johnson EA. Genome analysis of clostridium botulinum type A by PFGE. Applied and environmental microbiol 1995; 61: 4441-4447.

36) Blackwood RA, Rode CK, Pierson CL, et al. PFGE genomic fingerprinting of hospital Escherichia coli bacteraemia isolates. J Med Microbiol 1997; 46: 506-510.

Molecular Epidemiology of E. coli strains Isolated from Urinary Tract Infections in Children.

Farshad Sh,[1] Anvarinejad M,[2] Mehrabi Tavana A,[3] Japoni A,[4] Hoseini M,[5] Shahidi M[6]

1- Dept. of Prof-Alborzi Clinical Microbiology Research Center. University of Medical Scienes. Shiraz. Iran.

2- Dept. of Medical Microbiology, Baghyatollah University of Medical Sciences. Iran.

3- Dept. of Medical Microbiology, Baghyatollah University of Medical Sciences. Iran.

4- Dept. of Prof-Alborzi Clinical Microbiology Research Center. University of Medical Scienes.Shiraz. Iran.

5- Dept. of Prof-Alborzi Clinical Microbiology Research Center. University of Medical Scienes.Shiraz. Iran.

6- Dept. of Prof-Alborzi Clinical Microbiology Research Center. University of Medical Scienes.Shiraz. Iran.

(Received 27 June, 2009 Accepted 5 Oct, 2009)

Abstract:

Introduction: Urinary tract infection is one of the most common causes of the patient's admission to hospitals and clinics. Therefore, its emergency treatment is very important. Escherichia coli is the most important agent causing urinary tract infection (UTI) in childhood. So, in this study we have evaluated the patterns of antibiotic resistance of Escherichia coli in children. As there are different variations in the phenotypic characterization of the organisms, genotyping methods like pulsed field gel electrophoresis is further used in another part of this study to monitor the epidemiology of a disease in this area.

Materials and Methods: This cross-sectional study was performed on 90 E. coli strains isolated from the urine sample of children aged from 1 month to 14 years, with urinary tract infection. Susceptibility of all the isolates to different antibiotics was determined by the disk diffusion method and then the genetic patterns of all the strain were obtained by PFGE and compared with patterns of antibiotic resistance.

Results: Frothy five patterns of drug resistance were recognized among 90 E. coli strains under the study. Ampicilin, cotimoxazol,and tetracycline have the least antimicrobial effects, respectively. Sixty six PFGE profiles were obtained from the genome of E. coli strains by this moreover, genotyping method. The most strains showed thirteen and twelve bands and the

patterns with eight or nineteen bands showed the least percentage.

Conclusion: With regard to high differentiation power of PFGE method in comparison with antibiogram and according to the obtained patterns no epidemic paterm of uropathogenic E. coli was seen among children in Jahrom.

Key Words: Escherichia coli, Antibiotic resistance, Pulsed Field Gel Electrophoresis.