

بررسی فراوانی ژنوتیپ‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژن مقاوم به چند دارو با استفاده از ژن‌های سیدروفوری *iucA* *iucB* *iucC* و *iucD*

ریحانه آب‌روشن^۱، مرجان شاه‌ایلی^{۱*}

(۱) گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ارسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ارسنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۳

چکیده

مقدمه: عفونت مجاری ادراری یکی از رایج‌ترین عفونت‌های باکتریایی در انسان است و مهم‌ترین عامل آن باکتری اشریشیاکلی است؛ از این رو، پژوهش حاضر به منظور ارزیابی تنوع ژنوتیپ‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک بر اساس ژن‌های *iucA* *iucB* *iucC* و *iucD* انجام شده است.
مواد و روش‌ها: در این پژوهش، از ۴ مرکز درمانی شهر شیراز، ۱۳۰ نمونه از پلیت‌های حاوی کشت مثبت عفونت‌های ادراری اشریشیاکلی جمع‌آوری گردید و پس از تعیین هویت فنوتیپی و ژنوتیپی، ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی یوروپاتوژن جدا شد. استخراج ژنوم باکتری‌ها با استفاده از کیت صورت گرفت و پس از تأیید ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از *tRNA* ۱۶S، مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای ۱۰ آنتی‌بیوتیک از ۹ کلاس با روش دیسک دیفیوژن بر اساس استاندارد CLSI انجام شد. بررسی فراوانی فاکتورهای ویروالانس (*iuc*) با استفاده از روش مولکولی PCR و پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت.

یافته‌های پژوهش: میزان شیوع برای ژن‌های *iucA* ۹۵ درصد، *iucB* ۶۰ درصد، *iucC* ۷۲ درصد و *iucD* ۹۲ درصد به دست آمد. میزان مقاومت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک آزیترومايسين، آمپی‌سیلین، سفوتاکسیم، نالیدیکسیک اسید، تتراسیکلین، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول، سفپیم، آزترونام، جنتامایسین و نیتروفورانتوئین به ترتیب ۹۵ درصد، ۸۶ درصد، ۶۸ درصد، ۶۶ درصد، ۶۵ درصد، ۶۴ درصد، ۵۱ درصد، ۴۶ درصد، ۴۴ درصد و ۱۴ درصد ارزیابی شد؛ همچنین ۹۸ درصد نمونه‌ها مقاومت چنددارویی داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر نشان داد که شیوع بالای ژن‌های *iuc* در میان سویه‌های اشریشیاکلی، بیانگر اهمیت این ژن در ایجاد بیماری و تنوع ژنتیکی باکتری است.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی یوروپاتوژن، سیدروفور، ژن‌های *iuc* MDR

* نویسنده مسئول: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ارسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ارسنجان، ایران

Email: Shaheli87@yahoo.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

باکتری اشریشیاکلی یک باسیل گرم منفی متحرک از خانواده انتروباکتریاسه است و به‌عنوان یک باکتری بی‌هوازی اختیاری شناخته شده است (۱). بعضی از نژادهای باکتری *E.coli* خطرناکند و می‌توانند سبب ایجاد بیماری‌های گوناگونی از جمله عفونت ادراری با استفاده از فاکتورهای ویروالانس خود شوند. سویه‌های مولد عفونت ادراری، اشریشیاکلی‌های یوروپاتوژن (UPEC) نام دارند (۲). اشریشیاکلی‌های یوروپاتوژن چندین عامل بیماری‌زا دارند که سبب استقرار و کلونیزه شدن باکتری در اپیتلیوم مخاطی میزبان می‌شود و به بافت‌های میزبان آسیب می‌رساند. اتصال باکتری به سلول‌های یوروپیتلیال، مرحله ضروری برای شروع و گسترش عفونت مجاری ادراری است. این فرایند به باکتری اجازه می‌دهد تا در برابر عملکرد شستشوی ادرار، تخلیه مثانه و فعال شدن مسیرهای انتقال پیام در میزبان مقاومت کند (۳). شدت عفونت ادراری به عواملی مانند حساسیت میزبان و وجود عوامل بیماری‌زایی در سویه‌های مولد عفونت بستگی دارد (۴). آهن ماده‌ای غذایی ضروری برای رشد باکتری‌ها است و به‌عنوان کوفاکتوری برای بسیاری از آنزیم‌ها به‌کار می‌رود؛ به همین سبب، کسب آهن برای باکتری *E.coli* اهمیت فراوان دارد. باکتری‌هایی که در بدن انسان کلونی تشکیل می‌دهند، برای تأمین آهن موردنیاز خود با مشکلی جدی روبه‌رو هستند و آن، داخل سلولی بودن بیش از ۹۹/۹ درصد آهن بدن انسان است که از دسترس باکتری خارج است. علاوه بر این، آهن خارج سلولی که در پلاسما و مایع لنفاوی یافت می‌شود، به‌شدت در اتصال با ترانسفرین‌ها است (۵). باکتری‌ها از سیدروفورها برای کسب آهن، به‌منظور رشد و تکثیر خود استفاده می‌کنند. این موضوع در محدودیت آهن در مجاری ادراری اهمیت فراوانی دارد؛ زیرا غلظت آهن در عفونت‌های خارج روده‌ای به علت عوامل میزبانی محدود می‌شود و بنابراین، کسب آهن برای رشد باکتری در چنین فضایی بسیار ضروری است (۶).

از ویژگی‌های دیگر اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک

برای ایجاد عفونت مجاری ادراری، سیستم اکتساب آهن است که باکتری با کمک سیدروفورها، آهن را از محیط جذب می‌کند. ژن *aer* سیدروفور آنروباکتین را کد می‌کند. از سیدروفورهایی که عامل بیماری‌زایی باکتری اشریشیاکلی هستند، می‌توان به آنروباکتین و آنروباکتین اشاره کرد که سیدروفور آنروباکتین توسط محصولات ژن‌های *iucA*, *iucB*, *iucC*, *iucD* تولید می‌شود (۷). بیوسنتز سیدروفور آنروباکتین به‌وسیله آنزیم‌های تولیدشده از ژن‌های *iucA*, *iucB*, *iucC*, *iucD* صورت می‌گیرد و گیرنده غشای خارجی ویژه‌ای جذب این سیدروفور را تسهیل می‌کند (۸). سیدروفور آنروباکتین خود از دو قسمت تشکیل شده است. محصولات ژن‌های *iucB*, *iucD* پس از تشکیل شدن توسط محصول ژن *iucA* که یک پروتئین ۶۳ کیلو دالتونی است، کاتالیز می‌شوند و سپس محصول ژن *iucC* که یک پروتئین ۶۲ کیلو دالتونی است، با اتصال به محصولات سنتز شده توسط ژن‌های دیگر، آنروباکتین نهایی را تولید می‌کنند. ژن *iutA* یک پروتئین ۷۴ کیلو دالتونی در غشای خارجی را مشخص می‌کند که به‌عنوان گیرنده کمپلکس آهن و آنروباکتین عمل می‌کند (۹). آنروباکتین به پروتئین غشای خارجی به نام *FepA* متصل شده است و به‌وسیله آن، در فضای پری‌پلاسمیک آزاد می‌گردد. پروتئین ۶۹ کیلو دالتونی *Iha* و کدشونده توسط ژن *iha* مستقر در جزیره‌ی پاتوژنیسیته (PAI-II)، نوعی عامل ویروالانس با دو عملکرد است که هم به‌عنوان گیرنده سیدروفور و هم در پروتئین‌های غشای خارجی (*Omp*) به‌عنوان ادهسین عمل می‌کند (۱۰). با توجه به شیوع عفونت ادراری در جامعه، ضرورت انجام غربالگری بر اساس ژنوتیپ‌های خاص هر منطقه، تشخیص و درمان به‌موقع بیماران اهمیت بالایی دارد. با سهل‌انگاری در درمان این عفونت، مشکلات جبران‌ناپذیری در آینده برای بیمار رخ خواهد داد؛ بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی ژن‌های سیدروفوری *iucA*, *iucB*, *iucC* و *iucD* و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشریشیاکلی یوروپاتوژن صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی سویه‌ها: در این پژوهش مقطعی توصیفی، در مجموع ۱۳۰ نمونه در طی ۴ ماه از بهمن ۹۷ تا اردیبهشت ۹۸، از آزمایشگاه دکتر تقی‌زادگان، آزمایشگاه درمانگاه فرهنگیان، آزمایشگاه درمانگاه فرزندانگان و آزمایشگاه بیمارستان شهید دوران جمع‌آوری شد. نمونه‌ها مربوط به بیماران مبتلا یا مشکوک به عفونت ادراری بود که طی این چهار ماه، به این مراکز مراجعه کرده بودند. سویه‌های جداسازی شده با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد از قبیل TSI، Urea، Citrate، MR-VP، SIM، OD و LD (مرک، آلمان) برای تأیید فنوتیپی بررسی گردیدند.

استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (یاخته صبا آرنا، ایران)، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. پس از استخراج پرایمرهای مدنظر از مقالات معتبر و Blast نمودن آن در سایت NCBI، پرایمرها برای ساخت به شرکت سیناژن سفارش داده شد و بر اساس دستورالعمل آماده‌سازی پرایمر، یک محلول ذخیره و یک محلول کاری برای هریک از پرایمرهای

رفت و برگشت تهیه گردید. بدین منظور، محلول ذخیره با غلظت نهایی ۱۰۰ pM و بر اساس حجم ارائه شده توسط شرکت سازنده تهیه گردید. با افزودن ۱۰ میکرولیتر از محلول ذخیره به ۹۰ میکرولیتر آب مقطر استریل رقیق و غلظت کاری ۱۰ پیکومول فراهم شد. هریک از ویال‌ها تا زمان مصرف در فریزر ۲۰- (پریمیور، انگلیس) درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

آزمون PCR: واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Mastermix ۲x (یاخته صبا آرنا، ایران)، ۲/۵ میکرولیتر ۱۰ pM Primer، ۴ میکرولیتر DNA و ۶ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد.

پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی، به روش مولکولی PCR و با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن S rRNA^{۱۶S}، جنس نمونه‌های اشریشیاکلی ارزیابی گردید (جدول شماره ۱). شرایط مناسب برای انجام واکنش PCR جهت تکثیر ژن‌های مدنظر در دستگاه ترمال سایکلر (بیو رد، آمریکا) بهینه شد. برای کنترل مثبت از سویه PTCC ۱۳۳۸ و برای دیدن باندها از دستگاه ژل داگ (ATP-SUV، ایران) استفاده گردید.

جدول شماره ۱. توالی و مشخصات ژن ۱۶S rRNA

| منبع | توالی | طول | موقعیت | اندازه محصول | پرایمر |
|------|-------------------------------|-----|-----------|--------------|------------|
| (۱۱) | 5'GGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTC3' | ۲۵ | ۴۷۶-۴۵۲ | ۵۸۰ | ۱۶S rRNA_F |
| | 5'TTCCCGAAGGCACATTCT3' | ۱۸ | ۱۰۱۸-۱۰۳۵ | ۵۸۰ | ۱۶S rRNA_R |
| | 5'TTCCCGAAGGCACCAATC3' | ۱۸ | ۱۰۱۸-۱۰۳۵ | ۵۸۰ | ۱۶S rRNA_R |

سفوتاکسیم (۳۰ μg)، سفپیوم (۳۰ μg)، آزترونام (۳۰ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، آزیترومایسین (۱۵ μg)، تتراسایکلین (۳۰ μg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ μg)، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول (۱/۲۵ μg، ۲۳/۷۵ μg) و نیتروفورانئوئین (۱۰ μg)، (پادتن طب، ایران) بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماری: در این مطالعه، نتایج به دست آمده پس از جمع‌آوری، با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.20 تجزیه و تحلیل گردیدند. از روش‌های تحلیلی شامل Chi-square و T-test برای تعیین روابط معنادار در سطح $P \leq 0.05$ در تحقیق حاضر استفاده شد.

در ادامه، واکنش PCR برای بررسی فراوانی ژن‌های iucA, iucB, iucC, iucD با استفاده از پرایمرهای مربوطه (سیناژن، ایران) بر روی نمونه‌ها انجام شد (جدول شماره ۲).

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی: حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، به روش انتشار دیسک (کربی بائر) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) و بر اساس دستورالعمل‌های CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) صورت پذیرفت.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های جداسازی شده با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰ μg)،

جدول شماره ۲. توالی و مشخصات پرایمرهای ژن های iuc

| منبع | دمای اتصال (°C) | طول محصول (nt) | توالی | جهت‌گیری | هدف |
|------|-----------------|----------------|---------------------------|----------|------|
| iucA | ۵۷ | ۷۶۸ | 5'CATCAGGCAGTTATCCTGTC3' | F | |
| | | | 5'AGTCGTCCTCCTGCATTAC3' | R | |
| iucB | ۵۶ | ۵۰۱ | 5'TTCACAGCGGATATGGAC3' | F | (۱۲) |
| | | | 5'CACTTTGCTCCAGAAAATAC3' | R | |
| iucC | ۵۷ | ۷۲۱ | 5'AGACTGGGATTTGGTCAAC3' | F | |
| | | | 5'AGACACCATCCTGCCTTC3' | R | |
| iucD | ۵۶ | ۷۷۱ | 5'ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC3' | F | (۱۳) |
| | | | 5'CCTGATCCAGATGATGCTC3' | R | |

یافته‌های پژوهش

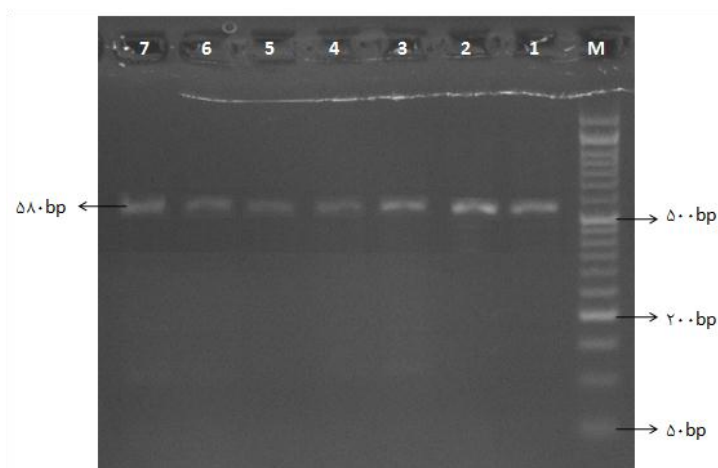
شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها: از میان ۱۳۰ نمونه جداشده از بیماران مشکوک یا مبتلا به عفونت ادراری، تعداد ۱۱۸ نمونه با بررسی آزمون‌های بیوشیمیایی به‌عنوان باکتری اشریشیاکلی تأیید شد.

شناسایی ژنوتیپی جدایه‌ها: پس از انجام PCR بر روی ژن rRNA ۱۶S و الکتروفورز در ژل ۲ درصد، ۱۰۰ نمونه بر اساس شکل شماره ۱، واجد باندهای ۵۸۰ جفت بازی بودند. با توجه به تست‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، اشریشیاکلی بودن این ۱۰۰ نمونه تأیید گردید. پس از بررسی ژنوتیپی سویه‌ها با استفاده از ژن S rRNA ۱۶، آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای ژن‌های iuc برای تشخیص حضور و فراوانی این ژن‌ها انجام شد.

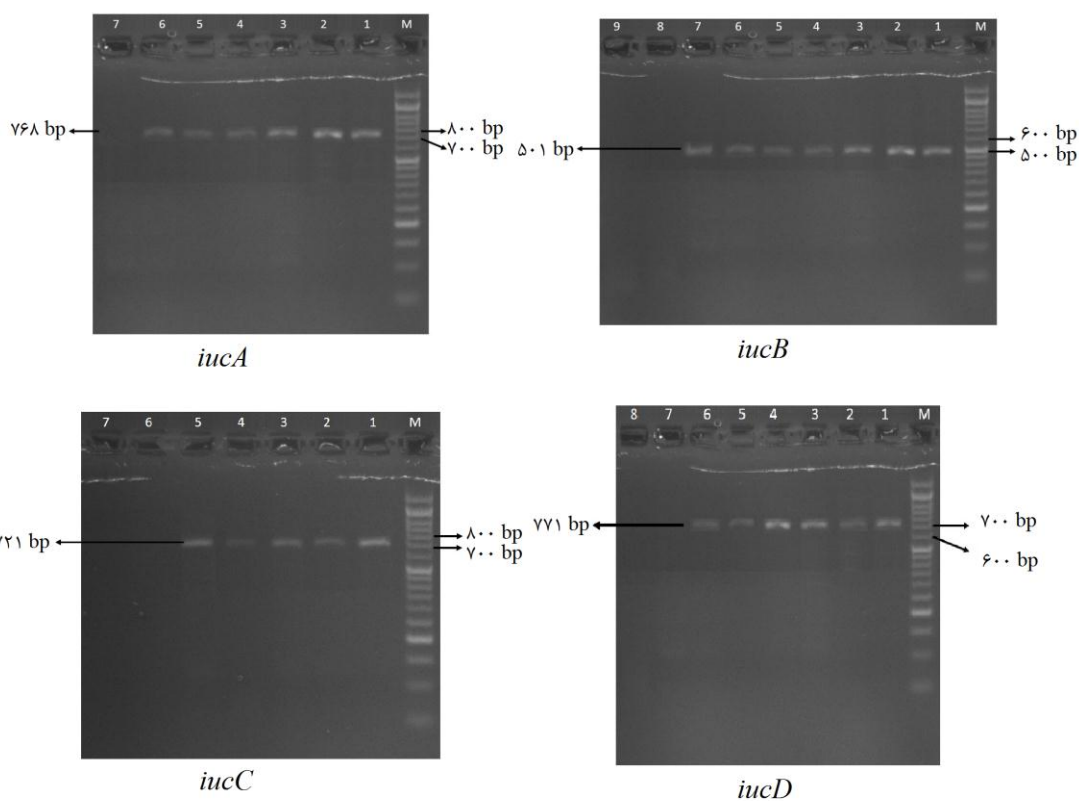
انجام واکنش زنجیره‌ای PCR برای ژن‌های سیدروفوری iuc: نتایج آزمون مولکولی PCR ژن‌ها (بر اساس شکل شماره ۲) نشان داد که از تعداد ۱۰۰ نمونه اشریشیاکلی یوروپاتوژن، ۹۵ نمونه ژن iucA، تعداد ۶۰ نمونه ژن iucB، تعداد ۷۲ نمونه ژن iucC و تعداد ۹۲ نمونه ژن iucD داشتند. این پراکندگی ژنی را می‌توان در شکل شماره ۳ مشاهده کرد. شکل شماره ۴ تفاوت میانگین فراوانی ژن‌های مطالعه‌شده را به‌صورت ستونی نشان می‌دهد. بر اساس این نمودار، میان حضور هم‌زمان ژن iucA، iucC و iucA، iucC و iucD رابطه معناداری شکل گرفته است.

حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی: برای ارزیابی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی از ده آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، سفوتاکسیم، سف‌پیپیم، آزترونام، جنتامایسین، آزیترومایسین، تتراسایکلین، نالیدیکسیک اسید، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول و نیتروفورانتوئین استفاده گردید که میزان مقاومت آن‌ها به ترتیب ۹۵ درصد، ۸۶ درصد، ۶۸ درصد، ۶۶ درصد، ۶۵ درصد، ۶۴ درصد، ۵۱ درصد، ۴۶ درصد، ۴۴ درصد به‌دست آمد؛ همچنین آنالیز آماری نشان داد ۹۸ درصد سویه‌ها مقاومت چنددارویی (MDR) دارند. شکل شماره ۵ فراوانی مقاومت و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های استفاده‌شده را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، جدایه‌های مطالعه‌شده به ۷۰ درصد از آنتی‌بیوتیک‌ها بیش از ۵۰ درصد مقاومت نشان داده‌اند. در جدول شماره ۳، درصد و تعداد ژنوتیپ‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژن بر اساس ژن‌های فامیل iuc به تفکیک نشان داده‌شده است. حضور هم‌زمان ژن‌ها در ردیف اول قابل‌مشاهده است و ۴۴ درصد از اشریشیاکلی یوروپاتوژن ایران کامل ژن iuc را دارند.

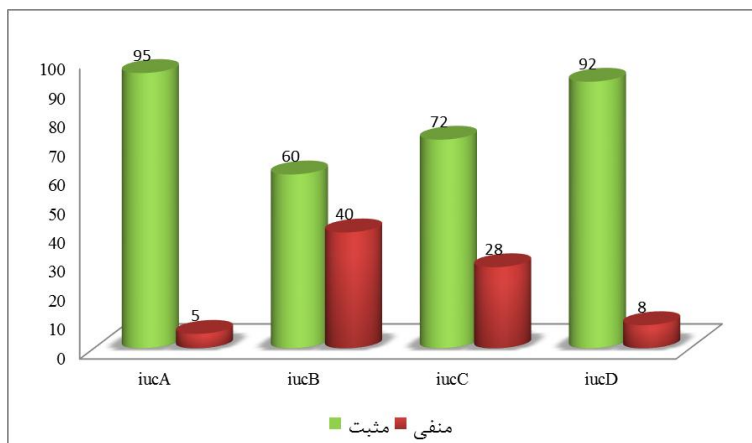
در جدول شماره ۴ مشاهده می‌شود که حضور داشتن یا نداشتن اپران‌های مطالعه‌شده، ارتباط ویژه‌ای با بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی ندارد و ارتباط مستقیمی میان این دو دیده نشد.



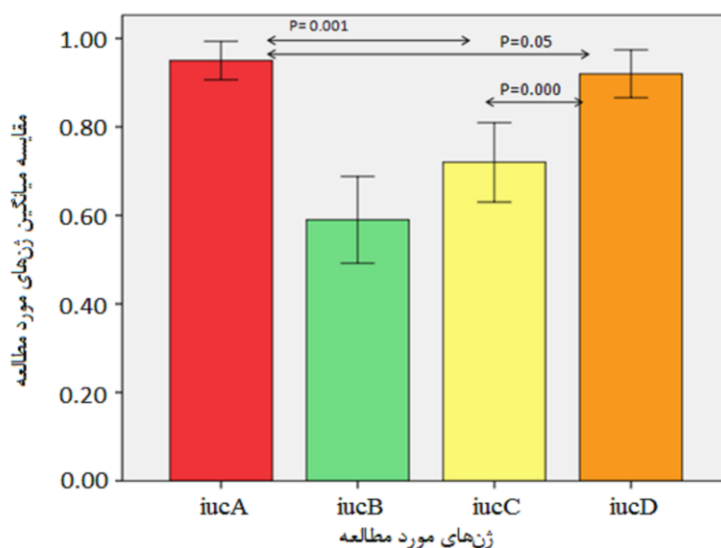
شکل شماره ۱. ژل الکتروفورز محصول PCR ژن rRNA ۱۶S (M: مارکر ۵۰ bp ladder، ۱: کنترل مثبت، ۲ تا ۷: نمونه مثبت)



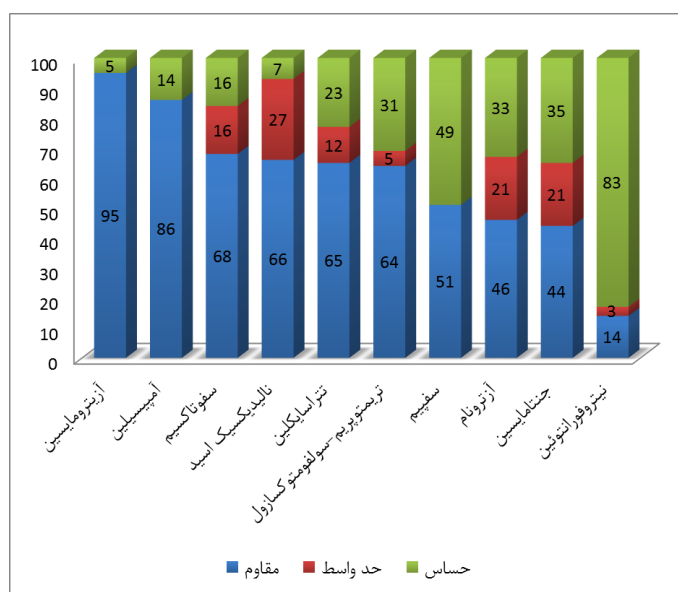
شکل شماره ۲. ژل الکتروفورز محصول PCR ژنهای *iucA*، *iucB*، *iucC* و *iucD* که M مارکر ۵۰ bp ladder و ۱ کنترل مثبت است. در *iucA* نمونه مثبت ۲-۶ و نمونه منفی ۷، در *iucB* نمونه مثبت ۲-۷ و نمونه منفی ۸ و ۹، در *iucC* نمونه مثبت ۲-۵ و نمونه منفی ۶ و ۷ و در *iucD* نمونه مثبت ۲-۶ و نمونه منفی ۷ و ۸ است.



شکل شماره ۳. نمودار درصد فراوانی ژن‌های مطالعه‌شده فامیل iuc (نمودار افقی اسامی ژن‌ها و نمودار عمودی درصد فراوانی ژن‌ها را نشان می‌دهد.)



شکل شماره ۴. مقایسه میانگین و ارتباط معنادار حضور هم‌زمان ژن‌های مطالعه‌شده



شکل شماره ۵. فراوانی مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی

جدول شماره ۳. تعیین ژنوتیپ جدایه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژن بر اساس ژن iuc

| ژن‌های فامیل iuc | تعداد ژن | تعداد ایزوله‌های دارای ژن‌های فامیل iuc | درصد ایزوله‌های دارای ژن‌های فامیل iuc |
|------------------------|----------|---|--|
| iucA, iucB, iucC, iucD | ۴ | ۴۴ | درصد ۴۴ |
| iucA, iucB, iucD | ۳ | ۱۰ | درصد ۳۷ |
| iucA, iucC, iucD | | ۲۷ | |
| iucA, iucB | ۲ | ۳ | درصد ۱۳ |
| iucA, iucC | | ۱ | |
| iucA, iucD | | ۸ | |
| iucB, iucD | | ۱ | |
| iucA | ۱ | ۲ | درصد ۵ |
| iucB | | ۱ | |
| iucD | | ۲ | |
| None | ۰ | ۱ | درصد ۱ |

جدول شماره ۴. مقایسه حضور داشتن یا نداشتن هم‌زمان ژن‌های iuc(A,B,C,D) با بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های مطالعه‌شده

| iuc(A,B,C,D) هم‌زمانی ژن‌های | | حضور هم‌زمان ژن‌های iuc(A,B,C,D) | | |
|------------------------------|------------|----------------------------------|------------|-----------------------------|
| حساسیت | مقاومت | حساسیت | مقاومت | |
| درصد ۱۴/۲۹ | درصد ۸۵/۷۱ | درصد ۱۳/۶۴ | درصد ۸۶/۳۶ | آمی‌سیلین |
| درصد ۱۴/۲۹ | درصد ۸۵/۷۱ | درصد ۱۸/۱۹ | درصد ۸۱/۸۱ | سفتوآکسیم |
| درصد ۴۸/۲۱ | درصد ۵۱/۷۹ | درصد ۵۰ | درصد ۵۰ | سقفیم |
| درصد ۳۳/۹۳ | درصد ۶۶/۰۷ | درصد ۳۱/۸۲ | درصد ۶۸/۱۸ | آزترونام |
| درصد ۳۷/۵ | درصد ۶۲/۵ | درصد ۳۱/۸۲ | درصد ۶۸/۱۸ | جنتامایسین |
| درصد ۵/۳۶ | درصد ۹۴/۶۴ | درصد ۴/۵۵ | درصد ۹۵/۴۵ | آزیترومایسین |
| درصد ۱۹/۶۴ | درصد ۸۰/۳۶ | درصد ۲۷/۲۸ | درصد ۷۲/۷۲ | تتراسایکلین |
| درصد ۷/۱۴ | درصد ۹۲/۸۶ | درصد ۶/۸۲ | درصد ۹۳/۱۸ | نالیدیکسیک اسید |
| درصد ۳۰/۳۶ | درصد ۶۹/۶۴ | درصد ۳۱/۸۲ | درصد ۶۸/۱۸ | تری‌متوپریم-سولفامتو کسازول |
| درصد ۸۰/۳۶ | درصد ۱۹/۶۴ | درصد ۸۴/۰۹ | درصد ۱۵/۹۱ | نیتروفورانتوئین |
| تعداد ۵۶ ایزوله | | تعداد ۴۴ ایزوله | | |

بحث و نتیجه‌گیری

میزان مقاومت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک آزیترومایسین، آمپی‌سیلین، سفوتاکسیم، نالیدیکسیک اسید، تتراسیکلین، تری‌متوپریم-سولفامتو کسازول، سفپیم، آزترونام، جنتامایسین و نیتروفورانتوئین به ترتیب ۹۵ درصد، ۸۶ درصد، ۶۸ درصد، ۶۶ درصد، ۶۵ درصد، ۶۴ درصد، ۵۱ درصد، ۴۶ درصد، ۴۴ درصد و ۱۴ درصد به دست آمد.

محمودی و همکارانش در سال ۲۰۱۹، با انجام مطالعاتی بر روی ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی در همدان، فراوانی ژن iucA را ۸۶ درصد گزارش کردند (۱۴). لینگ و همکارانش در سال ۲۰۱۳، طی مطالعاتی بر روی سویه‌ای از باکتری اشریشیاکلی، میزان شیوع ژن iucC را ۲۳ درصد اعلام نمودند (۱۵). در پژوهشی که در سال ۲۰۱۳، یزدانی و همکاران در سمنان بر روی اشریشیاکلی یوروپاتوژن انجام دادند، فراوانی ژن iucD

اشریشیاکلی مهم‌ترین عامل ایجادکننده عفونت مجاری ادراری است. این باکتری برای بقا در مجاری ادراری و ایجاد عفونت، به سیدروفورهای جاذب آهن نیاز دارد. در این پژوهش، با مطالعه فنوتیپی و ژنوتیپی بر روی ۱۳۰ نمونه عفونت مجاری ادراری، فراوانی ژن‌های سیدروفوری iuc در میان سویه‌های مقاوم به چند دارو بررسی شد.

در مطالعه حاضر، ۴۴ درصد از جدایه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژن هر چهار ژن مطالعه‌شده را به‌طور هم‌زمان داشته‌اند؛ همچنین فراوانی ژن‌های iucA، iucB، iucC و iucD به ترتیب ۹۵ درصد، ۶۰ درصد، ۷۲ درصد و ۹۲ درصد بود. این نتایج نشان می‌دهد سویه‌های جداسازی‌شده دارای عوامل لازم برای استقرار و کلونیزاسیون در مجاری ادراری را دارند که بیانگر حدت این جدایه‌ها است.

۹۶ درصد گزارش شد. این گزارش با پژوهش حاضر همخوانی دارد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که درصد بالای شیوع این ژن در این باکتری، نقش بسزایی در ایجاد عفونت ادراری دارد (۱۶). طی مطالعات نیک‌پیران و همکاران در سال ۲۰۱۸، در تبریز که بر روی ۱۱۷ نمونه صورت گرفت، درصد شیوع ژن *iucD* را ۴۵/۹ درصد گزارش کردند (۱۷). مون و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در ژاپن، با بررسی بیوسنتز آئروباکتین، درصد شیوع ژن‌های *iuc* را به ترتیب ۳۷ درصد *iucA*، ۴۳ درصد *iucB*، ۴۶ درصد *iucC* و ۵۰ درصد *iucD* اعلام نمودند (۱۸). درصد شیوع ژن‌های *iuc* حاصل از پژوهش یادشده، کمتر از درصد‌های به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر است. مقایسه نتایج پژوهش حاضر با مقالات یادشده نشان می‌دهد که درصد بیشتری از سویه‌ها واجد یک یا چند ژن *iuc* بوده‌اند. این موضوع می‌تواند به علت انتشار و گسترش این ژنوتیپ‌ها در مناطق جغرافیایی گوناگون صورت گرفته باشد.

طی تحقیقاتی که محققان در کشورهای مختلف، در سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۶ انجام داده‌اند، مقاومت به آمپی‌سیلین ۸۵/۷۱ درصد (۱۹)، نالیدیکسیک اسید ۶۳ درصد (۲۰)، تتراسایکلین ۲۶/۵۳ درصد (۲۱)، جنتامایسین ۴۳/۳ درصد (۲۲) و نیتروفورانتوئین ۱۸/۹ درصد بوده است (۲۳)؛ همچنین مطالعات ژانگ و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داد که ۸۷/۶ درصد از نمونه‌ها MDR بودند (۱۹). مقایسه نتایج مطالعات بالا با یافته‌های این پژوهش بیانگر آن است که آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، نالیدیکسیک اسید، تتراسایکلین، جنتامایسین و نیتروفورانتوئین به ترتیب مقاومت‌های ۸۶ درصد، ۶۶ درصد، ۶۵ درصد، ۴۴

درصد و ۱۴ درصد پیدا کرده‌اند که به غیر از نیتروفورانتوئین، سایر موارد با اندکی افزایش همراه است. از سوی دیگر، جدایه‌های مطالعه‌شده به ۷۰ درصد آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی، بیش از ۵۰ درصد مقاومت نشان داده‌اند. گفتنی است که برخلاف پژوهش ژانگ، در این تحقیق میزان MDR ۹۸ درصد به دست آمد. این روند روبه‌افزایش مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی، از کارایی نداشتن آنتی‌بیوتیک‌ها در فرایند درمان نشان دارد و همین مسئله درمان عفونت مجاری ادراری و کلیه را با مشکل مواجه می‌کند (۲۴). با توجه به اینکه ۹۵ درصد از جدایه‌ها ژن *iucA*، ۶۰ درصد ژن *iucB*، ۷۲ درصد ژن *iucC* و ۹۲ درصد ژن *iucD* داشتند، می‌توان چنین نتیجه گرفت که تغییرات ژنتیکی در میان باکتری‌ها بسیار زیاد است و این تغییرات هر از چندی عامل شکل‌گیری سویه‌ای مهاجم‌تر نسبت به سویه‌های پیشین می‌شود.

با توجه به تنوع ژنتیکی به‌دست‌آمده در این پژوهش پیشنهاد می‌گردد این سویه‌ها از لحاظ دیگر عوامل ویروالانس بررسی گردند تا بتوان مقایسه جامع‌تری درباره عوامل بیماری‌زای سویه‌های اشریشیاکلی عامل عفونت‌های ادراری به‌دست آورد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان مقاله از همکاری دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان که مراحل عملی این تحقیق در آزمایشگاه این دانشگاه انجام شده است، تشکر و قدردانی می‌کنند. مقاله ارسالی بر اساس پایان‌نامه با شماره ثبت ۱۶۰۲۹۲۲۹۵۵۳۳۲۰۹۵۱۳۹۷۱۱۹۶۹۹ در تاریخ ۹۸/۱۰/۱۰ در سامانه پژوهشیار نوشته شده است.

References

- Momtaz H, Karimian A, Madani M, Dehkordi FS, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013;12:8. doi.10.1186/1476-0711-12-8.
- Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:207. doi.10.1038/nrmicro2298.
- Antao EM, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *E. coli*. *Gut Path* 2009;1:22. doi.10.1186/1757-4749-1-22.
- Tarchouna M, Ferjani A, Benselma W, Boukadida J. Distribution of uropathogenic virulence genes in *E. coli* isolated from patients with urinary tract infection. *IJID* 2013; 17:450-3.
- Baghal L, Mehdi S, Mousavi Gargari SL, Rasooli I. Antibody production against enterobacteriaceae using recombinant Ferric Enterobactin protein. *Pathobiol Res* 2009; 12:83-92.
- Grigoryan L, Trautner BW, Gupta K. Diagnosis and management of urinary tract infections in the outpatient setting a review. *JAMA* 2014; 312:1677-84. doi.10.1001/jama.2014.12842.
- Ejrnæs K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *E. coli*. *Dan Med Bull* 2011; 58:4187.
- Santo E, Macedo C, Marin JM. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* from a University hospital in Ribeirao Preto Sao Paulo Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 48:185-8. doi.10.1590/S0036-46652006000400002.
- Ling J, Pan H, Gao Q, Xiong L, Zhou Y, Zhang D, et al. Aerobactin synthesis genes *iucA* and *iucC* contribute to the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* O2 strain E058. *Plos One* 2013; 8:57794. doi.10.1371/journal.pone.0057794.
- Pourzare M, Derakhshan S, Roshani D. Distribution of uropathogenic virulence genes in *E. Coli* isolated from children with urinary tract infection in Sanandaj Iran. *Arch Pediatr Infect Dis* 2017; 5:41995. doi.10.5812/pedinfect.41995
- Tsen H, Lin C, Chi W. Development and use of 16S rRNA gene targeted PCR primers for the identification of *Escherichia coli* cells in water. *J Appl Microbiol* 1998; 85:554-60.
- Palka M, Cleven BE, Eichinger L, Kronke M, Krut O. Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. *BMC Microbiol* 2009; 9:1. doi.10.1186/1471-2180-9-1.
- Janben T, Schwarz C, Preikschat P, Voss M, Philipp HC, Wieler LH. Virulence associated genes in avian pathogenic *E. coli* isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int J Med Microbiol* 2001; 291:371-8. doi.10.1078/1438-4221-00143.
- Mahmoudi H, Hossainpour H, Moradi M, Alikhani MY. Distribution of genes encoding iron uptake systems among the *E. coli* isolates from foodstuffs compared to *E. coli* isolated from clinical specimens. *Infect Disord Drug Targets* 2019; 18:18. doi. 10.2174/1871526519666190119112542 .
- Ling J, Pan H, Gao Q, Xiong L, Zhou Y, Zhang D, et al. Aerobactin synthesis genes *iucA* and *iucC* contribute to the pathogenicity of avian pathogenic *E. coli* O2 strain E058. *Plos One* 2013; 8:57794. doi.10.1371/journal.pone.0057794.
- Yazdani A, Peighambari SM, Bidoki SK, Hosseini H. [Phenotypic and genotypic detection of aerobactin system among *Escherichia coli* isolates from cases of poultry colibacillosis]. *J Vet Lab Res* 2013; 5:77-84. (Persian)
- Nikpiran H, Peighambari S, Abdi Khasvan A. Frequency of *iucD*, *tsh*, and *iss* genes among *Escherichia coli* isolates in broilers infected with colibacillosis. *IJVR* 2019, 14: 106-14. doi.10.22055/IVJ.2017.57760.1771.
- Moon YH, Tanabe T, Funahashi T, Shiuchi Ki, Nakao H, Yamamoto S. Identification and characterization of two contiguous operons required for aerobactin transport and biosynthesis in *Vibrio mimicus*. *J Microbiol Immunol* 2004; 48:389-98. doi.10.1111/j.1348-0421.2004.tb03528.x.

- 19.Zhang H, Rehman MU, Li K, Luo H, Lan Y, Nabi F, et al. Antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from Tibetan piglets suffering from white score diarrhea. Pak Vet J 2017; 37:43-6.
- 20.Heidarisoureshjani E, Heidari M, Doosti A. [Epidemiology of urinary tract infection and antibiotic resistance pattern of E. coli in patients referred to Imam Ali hospital in Farokhshahr Chaharmahal va Bakhtiari Iran]. J Shahrekord Uni Med Sci 2013;15. (Persian)
- 21.Rava M. Trend of antibiotic resistance of E. coli strains isolated from urinary tract infections in outpatient patients from Zahedan. J Paramed Sci Rehabil 2017; 6:73-8.
doi.10.22038/JPSR.2017.21755.1556.
- 22.Ramazanzadeh R, Moradi G, Zandi S, Mohammadi S, Rouhi S, Pourzare M, et al. [A survey of contamination rate and antibiotic resistant of gram negative bacteria isolated from patients in various wards of Toohid and Besat hospitals of Sanandaj city during 2013-14 years]. Pajouhan Sci J2016; 14:11-9. (Persian)
- 23.Madani SH, Khazaei S, Kanani M, Shahi M. Antibiotic resistance pattern of E. coli isolated from urine culture in Imam Reza hospital Kermanshah 2006-8. J Kermanshah Uni Med Sci2008; 3:287-95. (Persian)
- 24.Lorente JG, Placer JS, Salvado MC, Segura CA, Gelabert A. Antibiotic resistance transformation in community acquired urinary infections. Rev Clin Espanol 2005; 205:259-64.
doi.10.1157/13076148 .

Evaluation of the Frequency of the Uropathogenic Escherichia coli Genotypes Resistant to Multidrug using the iucA, iucB, iucC, and iucD Siderophore Genes

Abroshan R¹, Shaheli M^{1*}

(Received: August 4, 2020

Accepted: February 1, 2021)

Abstract

Introduction: Urinary tract infection is one of the most common bacterial infections in humans, and Escherichia coli is one of the most important factors. Therefore, the present study aimed to evaluate the diversity of Uropathogenic E. coli genotypes based on iucA, iucB, iucC, and iucD genes.

Materials & Methods: In this study, plates containing a positive culture of urinary tract infection of E. coli were collected from four treatment centers in Shiraz, Iran. After determining phenotypic and genotypic identity, 100 isolates of E. coli were isolated. The bacterial genome was extracted using a kit. After genetic confirmation of the isolates using 16S rRNA, antibiotic resistance and susceptibility were performed for 10 antibiotics out of 9 classes using the disk diffusion method according to the CLSI standard. Frequency investigation of the virulence factors (iuc gene) was performed

through the PCR molecular method and specific primers.

Findings: The prevalence rates of iucA, iucB, iucC, and iucD genes were estimated at 95%, 60%, 72%, and 92%, respectively. The amount of resistance of 10 antibiotics of azithromycin, ampicillin, cefotaxime, nalidixic acid, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, cefepime, aztreonam, gentamicin, and nitrofurantoin were also determined at 95%, 86%, 68%, 66%, 65%, 64%, 51%, 46%, 44%, and 14%. In addition, 98% of the isolates had multidrug resistance.

Discussions & Conclusions: The present study showed that the high prevalence of the iuc gene among E. coli strains indicated the importance of this gene in the pathogenesis and genetic diversity of this bacterium.

Keywords: iuc genes, MDR, Uropathogenic Escherichia coli, Siderophore

1. Dept of Biology, Arsanjan Branch, Islamic Azad University, Arsanjan, Iran

* Corresponding author Email: Shaheli87@yahoo.com