ORIGINAL ARTICLE

Evaluation Spread of Ant (2'')-Ia Gene in Aminoglycoside Resistant Escherichia Coli Isolated from Urine by PCR

Neda Soleimani[1],
Morteza Sattari[2],
Mohamad Ali Brumand[3],
Ashraf Mohabati Mobarez[2]

[1] Bacteriology PhD Student, Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[2] Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[3] Department of pathology, Faculty of Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

(Received August 11, 2011 ; Accepted January 30, 2012)

Abstract

Background and purpose: *Escherichia coli* is the most prevalent etiologic agent of urinary tract infection. Enzymatic inactivation of aminoglycosides by aminoglycoside-modifying enzymes is the main mechanism of resistance to these antibiotics in *E. coli*. The aim of this study was detecting the *ant(2'')-Ia* gene among aminoglycoside resistant clinical isolates of *E. coli* using PCR method.

Materials and methods: 276 clinical isolates of *E. coli* were collected and their antibiotic susceptibility patterns were determined by disk diffusion method for gentamicin, amikacin, tobramycin, kanamycin and netilmicin paper disks considering CLSI principles. Chromosomal DNA of the isolates was also extracted using DNA extraction kits and PCR method was used to detect the ant (2″)-Ia gene

Results: Results of disk diffusion showed that 24.63%, 23.18%, 21.01%, 6.15% and 3.62% of *E. coli* isolates were resistant to tobramycin, kanamycin, gentamicin, netilmicin and amikacin, respectively. *ant (2'')-Ia* gene was found in 47.88% of *E. coli* isolates

Conclusion: Tracing the transfer routs among different bacteria very important as there is a high prevalence of resistance toward aminoglycoside antibiotics due to its transfer among bacteria by transferable elements such as transposons and plasmids.

Key words: Aminoglycoside Resistance, *Escherichia coli*, *ant(2'')-Ia* gene, Urinary tract infection

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(Supple 1): 175-182 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و یکم ویژه نامه ۱ اسفند سال ۱۳۹۰ (۱۸۲-۱۷۵)

بررسی انتشار ژن *ant(2'')-Ia* در اشریشیا کلی‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید جدا شده از ادرار به روش PCR

ندا سلیمانی[۱]
مرتضی ستاری[۲]
محمدعلی برومند[۳]
اشرف محبتی مبارز[۲]

چکیده

سابقه و هدف: اشریشیاکلی از شایع‌ترین عوامل اتیولوژیک عفونت مجاری ادراری است. غیرفعال‌سازی آنزیماتیک آمینوگلیکوزید توسط آنزیم‌های تغییردهنده‌ی آمینوگلیکوزیدها(AMEs) اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در اشریشیاکلی می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی شیوع ژن مقاومتی *ant(2'')-Ia* در میان نمونه‌های بالینی اشریشیاکلی جدا شده از ادرار با روش PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در ۲۷۶ نمونه اشریشیاکلی جدا شده از ادرار، الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین، توبرامایسین، کانامایسین، آمیکاسین و نتیل‌میسین (MAST, UK) با روش انتشار دیسک با رعایت اصول CLSI تعیین شد. DNA نمونه‌ها استخراج و جهت تشخیص ژن مقاومتی *ant(2'')-Ia* از روش PCR استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد ۲۴/۶۳ درصد از جدایه‌های اشریشیاکلی به توبرامایسین، ۲۳/۱۸ درصد به کانامایسین، ۲۱/۰۱ درصد به جنتامیسین، ۶/۱۵ درصد به نتیل‌میسین و ۳/۶۲ درصد به آمیکاسین مقاوم بودند. در ۴۷/۸۸ درصد از نمونه‌های اشریشیا کلی ژن *ant(2'')-Ia* شناسایی شد.

استنتاج: از آن‌جایی‌که شیوع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی به دلیل انتقال مقاومت در میان باکتری‌ها توسط عناصر قابل انتقال نظیر ترانسپوزون‌ها و پلاسمیدها بالاست، لذا ردیابی مسیرهای انتقال مقاومت در بین باکتری‌های مختلف بسیار مهم است.

واژه‌های کلیدی: مقاومت به آمینوگلیکوزید، اشریشیا کلی، ژن *ant(2'')-Ia* ، عفونت ادراری

مقدمه

عفونت سیستم ادراری (Urinary Tract Infection: UTI)، یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در انسان محسوب می‌شود که تحت تأثیر جنسیت و سن قرار دارد. این عفونت در بین زنان جوان بسیار شایع است. به طوری که ۲۰ تا ۳۰ درصد زنان به‌طور مکرر به عفونت ادراری مبتلا می شوند(۱، ۲). باکتری‌های یوروپاتوژن اغلب از فلور مدفوعی و نواحی پرینه منشأ می‌گیرند و چنانچه میکروارگانیسم بتواند بر مکانیزم های دفاعی طبیعی میزبان غلبه نماید، قادر خواهد بود تا در نواحی تحتانی مجرای ادراری کلونیزه شود که این رخداد به عوامل

مولف مسئول: اشرف محبتی مبارز– تهران: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری شناسی پزشکی E-mail: mmmobarez@modares.ac.ir
۱. دانشجوی دکترا، گروه باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲. گروه باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۳. گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تاریخ دریافت : ۹۰/۴/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۹۰/۹/۲۰ تاریخ تصویب : ۹۰/۱۱/۱۰

بیماری‌زایی باکتری و مستعد بودن میزبان برای ابتلاء به عفونت بستگی دارد(۳، ۴). گاه بیماری در قسمت انتهای دستگاه ادراری و به صورت سیستیت و گاه در کلیه‌ها به صورت پیلونفریت است(۵). امروز جدایه‌های *E. coli* مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به برخی از آنتی بیوتیک‌ها ازجمله آمینوگلیکوزیدها نشان می‌دهند. اهمیت بالینی آمینوگلیکوزیدها از آن جهت است که بر علیه طیف وسیعی از باکتری‌های هوازی خصوصاً باکتری‌های گرم منفی، بسیاری از استافیلوکوک‌ها و برخی استرپتوکوک‌ها مؤثر می‌باشند و بیشترین کاربرد را در درمان عفونت‌های ناشی از باسیل‌های گرم منفی هوازی و بی‌هوازی اختیاری نشان می‌دهند. جنتامیسین دارای فعالیت نسبتاً بیشتری علیه اشریشیا کلی و گونه‌های سراشیا می‌باشد(۶). ترکیب یک آمینوگلیکوزید با یک عامل ضد دیواره مانند بتالاکتام و یا گلیکوپپتیدها ایجاد اثر سینرژیستی روی جدایه‌های حساس نموده و می‌تواند در درمان عفونت‌ها مؤثر باشد. مقاومت اکتسابی به آمینوگلیکوزیدها هم در باکتری‌های گرم منفی و هم در باکتری‌های گرم مثبت گزارش شده است. سه مکانیسم مقاومت شامل تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، کاهش در نفوذپذیری دارو و غیرفعال‌سازی آنزیماتیک دارو، مسئول مقاومت به آمینوگلیکوزیدها می‌باشند(۷). از این بین غیرفعال‌سازی آنزیماتیک آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم‌های تغییردهنده‌ی آن‌ها، اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. سویه‌های مقاوم توانایی تغییر در ساختار بیوشیمیایی آمینوگلیکوزیدها را توسط آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (Aminoglycosides Modifying Enzymes: AMEs) را دارا هستند. سویه‌های تولیدکننده AMEs اثر سینرژیستی بین آمینوگلیکوزیدها و عوامل ضد دیواره‌ای گوناگون را از بین می‌برند(۸). ژن مقاومت *ant(2'')-Ia* از جمله ژن‌های تغییر دهنده‌ی آمینوگلیکوزیدها می‌باشد. آنزیم رمز شده توسط ژن مذکور باعث مقاومت به کانامایسین، جنتامیسین و توبرامایسین می‌شود. گزارش‌های بسیاری از آمینوگلیکوزیدهای گوناگون در سراسر دنیا وجود دارد. توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی خصوصاً مقاومت به آمینوگلیکوزیدهایی که با واسطه پلاسمید عمل می‌کنند سریعاً باعث انتقال ژن مقاومت به سایر باکتری‌ها از جمله باکتری‌های گرم منفی گردیده، ارگانیزم‌ها را نسبت به درمان مقاوم می‌کند(۹،۱۰). با توجه به اهمیت مقاومت آمینوگلیکوزیدی و نیز دخالت ژن *ant(2'')-Ia* و نقش احتمالی پلاسمیدها در بروز این پدیده در پژوهش حاضر، بررسی حضور ژن مقاومت *ant(2'')-Ia* در بین جدایه‌های بالینی اشریشیا کلی مقاوم به آمینوگلیکوزید جدا شده از ادرار به روش PCR مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری و تشخیص باکتری‌ها

تعداد ۲۷۶ جدایه اشریشیا کلی از عفونت‌های دستگاه ادراری بیماران مراجعه کننده به مرکز قلب تهران جمع‌آوری شد. جدایه‌های اشریشیاکلی با انجام تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل چگونگی تخمیر قندها در محیط TSI (Triple Sugar Iron Agar)، تولید اندول و حرکت در محیط SIM، واکنش در محیط MR(Methyl Red) و VP(Voges-Proskauer) و عدم رشد در محیط سیمون سیترات و در نهایت مقایسه نتایج با جداول استاندارد، تایید هویت گردیدند. در نهایت تمامی جدایه‌ها در محیط تریپتیک سوی براث (Tryptic Soy Broth: TSB) (از شرکت Merck آلمان) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول استوک (Glycerol stock) کشت داده شد و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

برای تعیین الگوی حساسیت جدایه‌های

اشریشیاکلی از روش انتشار از دیسک کربی بائر (Kirby Bauer disk diffusion method) با به‌کارگیری دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (از شرکت Mast انگلستان) استفاده شد و تفسیر نتایج حاصل مطابق با استانداردهای CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) انجام شد. حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌یوتیک‌های جنتامیسین (10µg)، آمیکاسین (30µg)، نتیل‌میسین (30µg)، توبرامایسین (10µg) و کانامایسین (30µg) مورد بررسی قرار گرفت. جهت کنترل کیفی دیسک‌ها از سویه‌های استاندارد اشریشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲، استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳ موجود در آزمایشگاه تربیت مدرس و از کلبسیلا پنومونیه ۲۳۸۲۳ (*aac(3)-IIa*+) و اشریشیا کلی ۸۵۰۸۵ (*ant(2")-Ia*+) تهیه شده از Statens Serum Institute of Denmark برای کنترل مقاومت به آمینوگلیکوزیدها استفاده شد.

استخراج DNA

برای استخراج و خالص‌سازی DNA از جدایه‌های اشریشیاکلی و سویه‌های استاندارد، به منظور انجام واکنش‌های PCR از کیت استخراج DNA (سیناژن) استفاده شد. تک کلنی از جدایه‌ها در محیط مایع LB کشت داده، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و پس از سانتریفیوژ rpm ۳۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه، رسوب حاصل برای استخراج DNA استفاده شد. غلظت DNA از طریق اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (شرکت Labsystems فنلاند) اندازه‌گیری گردید.

الکتروفورز DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام شد. الکتروفورز به صورت افقی و با استفاده از بافر TAE و ولتاژ ۸۰ ولت انجام شد. ژل آگارز پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با دستگاه ژل داک (شرکت Biometra آلمان) بررسی گردید.

واکنش PCR

برای تکثیر ژن *ant(2")-Ia* از دو جفت آغازگر (primer) اختصاصی که توسط ماینارد و همکاران(۱۱) معرفی شده، استفاده گردید (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: توالی آغازگر مورد استفاده به همراه اندازه قطعات محصول PCR

ژن	توالی	تعداد نوکلئوتید	طول قطعه محصول (جفت باز)	مرجع
ant(2")-Ia	پیشرونده 5/ TCC AGA ACC TTG ACC GAA C 3/	۱۹	۷۰۰	۱۱
	برگشتی 5/ GCA AGA CCT CAA CCT TTT CC/	۲۰		

مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۱ میکرومول از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۲/۵ میلی مول $MgCl_2$، ۰/۲ میلی مول dNTPs، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (از شرکت سیناژن). حجم نهایی با آب دیونیزه استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler gradient از شرکت Eppendorf آلمان) نیز به این صورت تنظیم شد: واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، بعد از آن ۳۰ چرخه شامل واسرشتگی در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه. پس از اتمام ۳۰ چرخه، تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. در واکنش‌های PCR از DNA الگو سویه استاندارد اشریشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان کنترل منفی و از سویه استاندارد اشریشیا کلی ۸۵۰۸۵ (*ant(2")-Ia*+) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محصولات PCR توسط الکتروفورز بر روی ژل ۱ درصد آگارز از یکدیگر جدا شدند. برای تعیین سایز محصولات PCR از یک مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (شرکت Fermentas لیتوانی) استفاده شد. ژل آگارز حاصل پس از رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید با

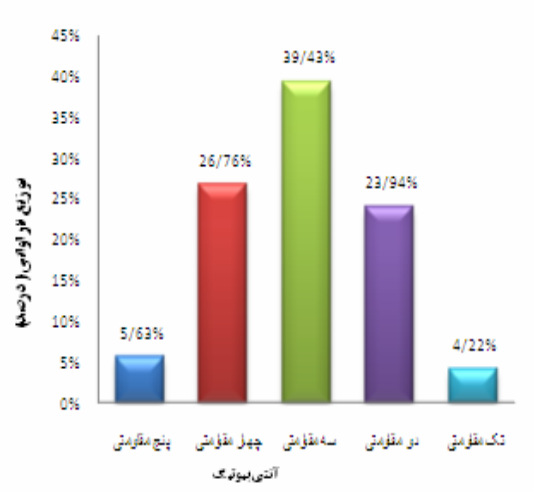
استفاده از ترانس لومیناتور و ژل داک مجهز به دوربین دیجیتال عکس‌برداری شد و باندهای ایجاد شده با کنترل‌های مثبت و منفی مقایسه گردید.

یافته‌ها

نتایج فنوتیپی مقاومت به آمینوگلیکوزیدها

جدایه‌های جمع‌آوری شده ازبیماران مراجعه‌کننده به مرکز قلب تهران با روش‌های مرسوم آزمایشگاهی تأیید هویت شدند. کلیه جدایه‌ها از نظر تخمیر گلوکز و لاکتوز، حرکت، آزمایش MR و تولید اندول مثبت بودند و از نظر استفاده از سیترات، آزمایش VP، تولید اکسیداز و تولید اوره‌آز منفی ثبت شدند. در خصوص مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی از میان کل جدایه‌های بررسی شده، ۷۱ جدایه حداقل نسبت به یکی از آمینوگلیکوزیدهای مورد آزمایش در روش انتشار از دیسک مقاومت نشان دادند. بیشترین میزان مقاومت نسبت به توبرامایسین و کمترین میزان مقاومت نیز نسبت به آمیکاسین مشاهده شد.

نتایج مقاومت جدایه‌های مورد مطالعه در برابر آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزید نشان داد که از میان ۲۷۶ جدایه بررسی شده، ۷۱ جدایه حداقل نسبت به یکی از آمینوگلیکوزیدهای مورد آزمایش در روش انتشار از دیسک مقاومت نشان دادند که مقاومت آن‌ها به پنج صورت تک مقاومتی، دو مقاومتی، سه مقاومتی، چهار مقاومتی و پنج مقاومتی ظاهر شدند که در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. ۴ جدایه (۵/۶۳ درصد) به هر پنج آمینوگلیکوزید توبرامایسین، کانامایسین، نتیل‌میسین، آمیکاسین و جنتامیسین مقاومت نشان دادند. ۱۹ جدایه (۲۶/۷۶ درصد) به چهار آمینوگلیکوزید مقاومت نشان دادند، که این نوع مقاومت به دو شکل توبرامایسین، جنتامیسین، کانامایسین، نتیل‌میسین (۱۳ جدایه)، آمیکاسین، توبرامایسین، جنتامیسین، کانامایسین (۶ جدایه) مشاهده شد. ۲۸ جدایه (۳۹/۴۳ درصد) به سه آنتی‌بیوتیک توبرامایسین، جنتامیسین، کانامایسین مقاومت نشان دادند. ۱۷ جدایه (۲۳/۹۴ درصد) به دو آمینوگلیکوزید مقاومت نشان داده، که این نوع مقاومت به دو شکل توبرامایسین، جنتامیسین (۴ جدایه)، توبرامایسین، کانامایسین (۱۳ جدایه) مشاهده شد. در نهایت ۳ جدایه (۴/۲۲ درصد) دارای مقاومت تکی به آمینوگلیکوزیدها بودند (جدول شماره ۲).



نمودار شماره ۱: فراوانی مقاومت‌های پنج‌گانه، چهارگانه، سه گانه، دوگانه و تکی نسبت به آمینوگلیکوزیدها در جدایه‌های بالینی جداشده از ادرار

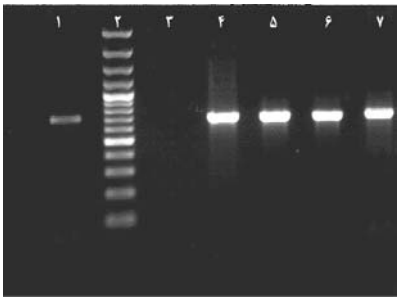
جدول شماره ۲: نتایج حاصل از آزمون انتشار از دیسک برای آمینوگلیکوزیدها در ۲۷۶ جدایه بالینی اشریشیا کلی جدا شده از ادرار

نوع اثر آنتی بیوتیک	حساس	نیمه حساس	مقاوم
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
توبرامایسین	۲۰۸ (۷۵/۳۶)	۰ (۰)	۶۸ (۲۴/۶۳)
کانامایسین	۲۱۰ (۷۶/۸)	۲ (۰/۷۲)	۶۴ (۲۳/۱۸)
جنتامیسین	۲۱۴ (۷۷/۵۳)	۴ (۱/۴۴)	۵۸ (۲۱/۰۱)
نتیل‌میسین	۲۵۲ (۹۱/۳)	۷ (۲/۵۳)	۱۷ (۶/۱۵)
آمیکاسین	۲۵۹ (۹۳/۸۴)	۷ (۲/۵۳)	۱۰ (۳/۶۲)

نتایج PCR

نتایج PCR (تصویر شماره ۱) جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد که ۴۷/۸۸ درصد دارای ژن *ant(2")-Ia* بودند و ژن مذکور در ایزوله‌های حساس از نظر فنوتیپی وجود نداشت.

بین حضور ژن *ant(2'')Ia* و مقاومت به توبرامایسین و جنتامیسین و کانامایسین ارتباط تقریباً کاملی وجود دارد، به بیان دیگر این ژن در اکثر جدایه‌هایی که در روش‌های انتشار از دیسک نسبت به توبرامایسین و جنتامیسین و کانامایسین مقاوم بودند، حضور دارد. از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین حضور ژن *ant(2'')Ia* و مقاومت به توبرامایسین و جنتامیسین و کانامایسین مشاهده شد. در جدول شماره ۳ ارتباط بین حضور ژن آنزیم تغییردهنده آمینوگلیکوزید *ant(2'')Ia* و فنوتیپ‌های مختلف مقاومت آمینوگلیکوزیدی در جدایه‌های بالینی اشریشیا کلی مشاهده می‌شود.



تصویر شماره ۱: چاهک ۱: سویه کنترل مثبت، چاهک M: مارکر 100 bp Plus، چاهک ۳: چاهک کنترل منفی، ستون‌های ۴-۵-۶-۷ جدایه‌های بالینی جدا شده از ادرار دارای ژن *ant(2'')-Ia*، اندازه محصول PCR، ۷۰۰ bp

جدول شماره ۳: ارتباط بین حضور ژن‌های AME و فنوتیپ‌های مختلف مقاومت آمینوگلیکوزیدی در جدایه‌های بالینی اشریشیا کلی مقاوم به آمینوگلیکوزید

فنوتیپ مقاومت*	*ant(2'')Ia*
GM, AK, N, TN, K	+
GM, AK, N, TN, K	+
GM, N, TN, K	+
GM, TN	+
TN, K	+
GM, TN, K	+
TN	+
K	+
N	–
GM	+
AK	

* GM, gentamicin; AK, amikacin; N, netilmicin; TN, tobramycin; K, kanamycin; +, present; -, absent

بحث

آمینوگلیکوزیدها با وجود داشتن عوارض جانبی و مشکلاتی که در ارتباط با افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به این داروها دارند، همچنان در درمان عفونت‌های باکتریایی با ارزش هستند. معمول‌ترین مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در اشریشیا کلی، تغییر آن‌ها توسط آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها است، به‌صورتی که این آنتی‌بیوتیک‌ها دیگر قادر به اتصال به ریبوزوم سلول نیستند(۱۲). ژن‌های رمز کننده این آنزیم‌ها توسط پلاسمید یا کروموزوم حمل شده و اغلب توسط عناصر ژنتیک قابل انتقال نظیر ترانسپوزون‌ها انتقال می‌یابند(۱۳). ژنوم باکتری کاملاً تغییرپذیر است. علاوه بر اضافه شدن و حذف ژن‌های موجود در کروموزوم، فنوتیپ باکتری با از دست دادن یا کسب پلاسمیدها تغییر می‌یابد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌ها از طریق پلاسمیدهای R منتقل می‌شود(۱۴). شیوع یک خصوصیت از طریق انتقال پلاسمیدها (انتقال افقی) بهتر از انتقال یک کلون باکتریایی خاص اتفاق می‌افتد و موجب بروز پدیده مقاومت در باکتری‌های دارنده این پلاسمیدها می‌گردد(۱۵). مقاومت به جنتامیسین، کانامایسین، سیزومایسین و توبرامایسین در اشریشیا کلی توسط یکی از آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدی به نام ANT(2'')-I که به وسیله‌ی ژن *ant(2'')-Ia* کد می‌شود واسطه‌گری می‌شود. این ژن اغلب بر روی پلاسمیدهای کوچک حمل می‌شود که این پلاسمیدها با واسطه پلاسمیدهای کانژوگاتیوی به کروموزوم باکتری الحاق می‌شوند.

در این تحقیق شیوع ژن مقاومت *ant(2'')Ia* در میان ۷۱ جدایه مقاوم به آمینوگلیکوزیدی از ۲۷۶ جدایه اشریشیاکلی عفونت دستگاه ادراری بیماران مراجعه کننده به مرکز قلب تهران با استفاده از روش PCR بررسی گردید. در مطالعه حاضر مشخص شد که

۲۴/۶۳ درصد از جدایه‌ها به توبرامایسین مقاوم بودند و پس از آن بیشترین میزان مقاومت به ترتیب در برابر کانامایسین (۲۳/۱۸ درصد)، جنتامیسین (۲۱/۰۱ درصد)، نتیل‌میسین (۶/۱۵ درصد)، آمیکاسین (۳/۶۲ درصد) مشاهده شد. Vanhoof و همکاران در سال ۱۹۹۹ با بررسی ۸۹۷ جدایه انتروباکتریاسه جدا شده از خون، مشاهده کردند ۵/۹ درصد جدایه‌ها نسبت به جنتامیسین، ۷/۷ درصد نسبت به توبرامایسین، ۷/۵ درصد به نتیل-میسین و ۲/۸ درصد آمیکاسین مقاومت دارند(۱۶). در مطالعه Kong و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی ۴۴ جدایه بالینی اشریشیا کلی، ۱۸/۱۸ درصد مقاومت نسبت به آمیکاسین، ۵۶/۸۲ درصد جنتامیسین، ۶۳/۳۶ درصد توبرامایسین را نشان دادند(۱۷). طی مطالعه Ho و همکاران درسال ۲۰۱۰ بر روی ۲۴۹ جدایه اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های بالینی انسان، ۸۳/۳ درصد از جدایه‌ها نسبت به جنتامیسین مقاوم گزارش شدند(۱۸) در مقایسه بین نتایج مطالعات مختلف مشاهده می‌شود که با گذشت زمان میزان مقاومت اشریشیا کلی به آمینوگلیکوزیدها رو به افزایش است، اما تفاوتی که در نتایج به دست آمده از سایر مطالعات و مطالعه حاضر مشاهده می‌شود می‌تواند به دلیل تفاوت در منطقه جغرافیایی یا تفاوت در تعداد جدایه‌های مورد آزمایش باشد که نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. از سوی دیگر برای اثبات افزایش شیوع مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، لازم است مطالعه حاضر به صورت سالیانه مجددا در همین مرکز درمانی تکرار شود. نتایج حاصل از PCR نشان داد که ۵۴/۸۳ درصد از جدایه‌ها ژن مقاومت *aac(3) -IIa* را دارا می‌باشند. بین نتایج به‌دست آمده از مطالعه اخیر و سایر مطالعات هماهنگی وجود دارد، به گونه‌ای که مطالعات Maynard و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که ۱۷ درصد ازجدایه‌ای حیوانی و ۳۳ درصد از جدایه‌های انسانی دارای ژن مقاومت *aac(3) -IIa* بودند، با این وجود ژن *ant(2)-Ia* در این بررسی مشاهده نشد(۱۱). در سال ۲۰۰۷ Jakobsen و همکاران، ۱۲۰ جدایه اشریشیاکلی که یکی از ژن‌های مقاومت به جنتامیسین *aac(3)-IV* , *aac(3)-II* و *ant(2'')-I* را داشتند از نظر حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک جنتامیسین با روش رقیق‌سازی در آگار مورد بررسی قرار دادند. بررسی‌ها نمایان‌گر این مطلب بود که، جدایه‌هایی که از نظر یکی از ژن‌های *aac(3)-IV* یا *ant(2'')-I* مثبت بودند، MIC در حدود ۸ تا ۶۴ میلی‌گرم در لیتر را داشتند، این در حالی است که جدایه‌هایی که دارای ژن *aac(3)-II* بودند، MIC در حدود ۳۲ تا ۵۱۲ میلی گرم در لیتر را داشتند، که یک ارتباط بین میزان MIC و مکانیسم اختصاصی ژنتیکی مقاومت نسبت به جنتامیسین را نشان می‌دهد(۱۹)، اما در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که از ۷۶ جدایه مقاوم به جنتامیسین *E. coli*، ۶۳/۱۵ درصد جدایه‌ها ژن *aac(3) -IIa* را حمل می‌کردند ولی این پژوهش ژن *ant(2)-Ia* بررسی نشد(۲۰). همان‌گونه که به وضوح از مطالعه Jakobsen و همکاران استدلال می‌شود، با گذشت زمان میزان شیوع ژن مقاومت به آمینوگلیکوزیدی افزایش یافته که این امر نیز لزوم بررسی سالیانه مطالعه اخیر را بیان می‌کند و تفاوت مشاهده شده به علت تفاوت در مولکولی اپیدمیولوژی خواهد بود. با توجه به مقاومت بالای اشریشیا کلی که در پژوهش حاضر و پژوهش‌های مشابه گزارش شده است(۱۴، ۱۸-۱۶) و فراگیر بودن آن در محیط‌های بیمارستانی، جهت پیشگیری از انتشار سویه‌های مقاوم، روش‌های کنترل مؤثرتر در ضد عفونی محیط بیمارستان از یک طرف و کاهش مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف از طرف دیگر باید در نظر گرفته شود. نیز به علت افزایش شیوع مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، تشخیص سریع و به موقع سویه‌های مقاوم به منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حمایت های دانشگاه تربیت مدرس و نیز پرسنل آزمایشگاه و مرکز تحقیقات مرکز قلب تهران جهت همکاری در تهیه جدایه های اشریشیاکلی تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Von Baum H, Marre R. Antimicrobial resistance of Escherichia coli and therapeutic implications. Int J Med Microbiol 2005; 295 (6-7): 503-511.
2. Santo E, Mendonca Salvador M, Moacir Marin J. Multidrug-resistant urinary tract isolates of Escherichia coli from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Braz J Infect Dis 2007; 11(6): 575-578.
3. Krachmer LB, Grianetta ET, Strain BA, Farr BM. A randomized crossover study of silver-coated urinary catheters in hospital patients. Arch Intern Med 2000; 160(21): 3294-3298.
4. Robin RH, Contran RS, Tolkoff-Robin NE. Urinary tract infection, pyelonephritis and reflux nephropathy. In: Brenner BM, Rector FC. Brenner and Rector's the Kidney. 5th ed. Michigan: Saunders Elsevier; 1997. p. 1597-1654.
5. Esmaili M. Study of antibiotics effects on bacteria causing urinary infections in children. Iran J Ped 2005; 15(2): 165-173 (Persian).
6. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev 2003; 16(3): 430-445.
7. Leclercq MPM, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob Agent Chemother 1999; 43(4): 727-737.
8. Murray BE. Diversity among multidrug resistant Enterococci. Emerg Infect Dis 1998; 4(1): 37-47.
9. Nicas TI, Iglewski HB. Isolation and characterization of transposon-induced mutants of Pseudomonas aeruginosa deficient in exoenzyme S. Infect Immun 1984; 45(2): 470-486.
10. Vasil M, Ochsner UA. The response of Pseudomonas aeruginosa to iron: genetics. Mol Microbiol 1999; 34(3): 399-413.
11. Maynard C, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque R, Brousseau R, Masson L, Lariviere S, Harel J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profile of extra intestinal Escherichia coli isolates of animal and human origin. J Clin Microbiol 2004; 42(12): 5444-5452.
12. Bellaaj A, Bollet C, Ben-Mahrez K. Characterization of the 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene aac(3)-IIa of a clinical isolate of Escherichia coli. Annal Microbiol 2003; 53: 211-217.
13. Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, et al. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among Staphylococcus species. J Korean Med Sci 2003; 18(5): 631-636.
14. Shahid M, Malik A. Resistance due to aminoglycoside modifying enzymes in Pseudomonas aeruginosa isolates from burns patients. Indian J Med Res 2005; 122(4): 324-329.
15. Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology:

Focus on infection. Am J Epidemiol 2001; 153(12): 1135-1141.

16. Vanhoof R, J. Nyssen H, Van Bossuyt E, Hannecart-Pokorni E and the Aminoglycoside resistance study group. aminoglycoside resistance in Gram-negative blood isolates from various hospitals in Belgium and the Grand Duchy of Luxembourg. J Antimicrob Chemother 1999; 44(4): 483-488.
17. Kong HS, Li XF, Wang JF, Wu MJ, Chen X, Yang Q. Evaluation of aminoglycoside resistance phenotypes and genotyping of acetyltransferase in Escherichia coli. Zheijang J 2006; 35(1): 83-86.
18. Ho PL, Wong RC, Lo SW, Chow KH, Wong SS, Que TL. Genetic identity of aminoglycoside resistance genes in Escherichia coli isolates from human and animal sources. J Med Microbiol 2010; 59(Pt 6): 702-707.
19. Jakobsen L, Sandvang D, Jensen VF, Seyfarth AM, Frimodt-Møller N, Hammerum AM. Gentamicin susceptibility in Escherichia coli related to the genetic background: problems with breakpoints. Clin Microbiol Infect 2007: 13(8): 816-842.
20. Jakobsen L, Sandvang D, Hansen LH, Bagger-Skjøt L, Westh H, Jørgensen C, et al. Characterization, dissemination and persistence of gentamicin resistant Escherichia coli from a Danish university hospital to the waste water environment. Environ Int Microbiol 2008; 34(1): 108-115.