مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۱، شماره۴، تیر ۱۳۹۵(شماره پی در پی۱۱۱)

فراوانی نسبی فاکتورهای همولیزین و سیتوتوکسیک نکروزان در اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های ادرار بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی شهر قزوین در سال ۹۳ـ۱۳۹۲

مریم باریک بین[۱]، امیر پیمانی[۲*]، نرگس حبیب اله پور زرشکی[۲]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد زنجان، زنجان، ایران، [۲]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۱۲/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های دستگاه ادراری شایع‌ترین نوع عفونت بیمارستانی محسوب می‌شوند. اشریشیاکلی مهم‌ترین عامل ایجاد کننده عفونت‌های دستگاه ادراری در محیط‌های بیمارستانی و جامعه است. درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها به علت فاکتورهای بیماری‌زایی متعدد و مقاومت‌های دارویی اغلب مشکل می‌باشد. فاکتورهای اتصالی، آنزیم ها و توکسین‌ها مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی هستند که در جایگیری این ارگانیسم و ایجاد بیماری نقش دارند. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی نسبی ژن‌های کد کننده فاکتورهای بیماری‌زایی همولیزین و سیتوتوکسیک نکروزان و تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های ادرار جمع‌آوری شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی شهر قزوین بود.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی ـ مقطعی در طی سال ۹۳ـ۱۳۹۲ انجام گرفت. نمونه‌های ادرار از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های آموزشی قزوین جمع‌آوری شدند. تمام ایزوله‌ها با استفاده از آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروب‌شناسی تعیین هویت شدند. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی تمامی ایزوله‌ها با استفاده از روش دیسک آگار دیفیوژن و مطابق دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاه بالینی انجام شد. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، از نظر حضور ژن‌های *hly* و *cnf* با استفاده از آزمون‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تعیین توالی بررسی شدند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در مجموع، ٤٩ (۳۸/۹ درصد) ایزوله الگوی مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند که بیشترین میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به داروهای آمیکاسین(۹۱/۳درصد) و ایمی‌پنم (۸۸/۹درصد) و بیشترین میزان مقاومت نسبت به سفوتاکسیم (۸۳/۳ درصد) و سفتازیدیم (۷۳ درصد) گزارش شد. نتایج آزمون واکنش زنجیره ای پلی مراز نشان داد که٤٠ (۳۱/۷درصد) و ٢٤ (۱۹درصد) ایزوله به ترتیب از نظر حضور ژن‌های *hly* و *cnf* مثبت بودند. ایزوله‌های باکتریایی حاوی ژن‌های مورد مطالعه اغلب از بیماران بستری در بخش‌های داخلی(۵۹/۵ درصد) و عفونی (۲۱/٤درصد) جداسازی شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه حاکی از بروز الگوی مقاومت دارویی چندگانه و حضور قابل توجه فاکتورهای ویرولانس همولیزین و سیتوکسیک نکروزان در ایزوله‌های اشریشیاکلی مولد عفونت ادراری جمع‌آوری شده از بیمارستان های شهر قزوین نشان دهنده اهمیت این فاکتورها در ایجاد عفونت‌های ادراری و گسترش آن به وسیله این ارگانیسم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی، همولیزین، فاکتور سیتوتوکسیک نکروزان، واکنش زنجیره ای پلی مراز.

[*]**نویسنده مسئول: امیر پیمانی**، قزوین ، دانشگاه علوم پزشکی قزوین ، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

Email: a.peymani@gmail.com

مقدمه

عفونت مجاری ادراری از نظر شیوع دومین نوع عفونت باکتریایی پس از عفونت مجاری تنفسی می‌باشد که میزان بروز آن در زنان بسیار بیشتر از مردان است(۱). این عفونت‌ها غالبا منجر به افزایش مرگ و میر، افزایش هزینه و طول مدت بستری بیماران در بیمارستان‌ها می‌شوند. در ایالات متحده عفونت دستگاه ادراری علت حدود هفت میلیون مراجعه به مطب، یک میلیون مراجعه به بخش اورژانس و صد هزار بار بستری شدن در بیمارستان در طی هر سال می‌باشد(۲). هرچند تعداد قابل توجهی از باکتری‌های موجود در بیمارستان می‌توانند موجب عفونت ادراری شوند، اما تقریباً در نیمی از موارد باکتری‌های گرم منفی عامل سببی این نوع عفونت هستند(۳). *اشریشیاکلی* عضو خانواده انتروباکتریاسه، شایع ترین باکتری مولد عفونت مجاری ادراری در انسان است. در شرایط زمینه‌ای میزبان مانند سن بالا و انسداد مجاری ادراری، ضعف مثانه و سوندگذاری به جایگزینی باکتری کمک کرده و نقش مهمی در ایجاد عفونت دارند(۴). در ایالات متحده *اشریشیاکلی* بیشترین فراوانی(۶۳/۳ درصد) عفونت ادراری را به خود اختصاص داده است(۵). از میان سروتایپ‌های متعدد *اشریشیاکلی* تنها تعداد کمی از سویه‌ها توانایی ایجاد عفونت مجاری ادراری را دارا می‌باشند که به نام سویه‌های یوروپاتوژن نامیده می‌شوند(۶). این سویه‌ها دارای فاکتورهای بیماری‌زایی مختلفی می‌باشند که در جایگیری ارگانیسم در سطوح مخاطی میزبان و مهار دفاع میزبان نقش دارند و به باکتری اجازه تهاجم به مجاری ادراری که در حالت طبیعی استریل هستند را می‌دهند(۷). فاکتورهای همولیزین[1] و سیتوتوکسیک نکروزان[2] باعث آسیب بافتی می‌شوند که انتشار باکتری و ترشح مواد غذایی میزبان را تسهیل می‌کنند و ممکن است باعث تغییر مسیرهای انتقال پیام در میزبان شوند. همولیزین سمی‌پروتئینی است که منجر به متلاشی کردن گلبول قرمز می‌شود و دارای توالی‌های تکراری دوتایی و پشت سرهم از اسیدهای امینه ۹ تایی است. تولید این توکسین به وسیله یک اپران ۴ ژنی صورت می‌گیرد، که hly نامیده می‌شود. ساختمان این توکسین پلی پپتیدی بوده و شامل ۱۰۲۴ اسید آمینه می‌باشد. آسیلاسیون چرب و یون‌های دو ظرفیتی کلسیم در فعال کردن آن نقش دارند(۸). فاکتور سیتوتوکسیک نکروزان پروتئینی تک رشته متشکل از ۱۰۱۴ اسید آمینه است که در سلول‌های یوکاریوت با مکانیسم تنظیمی GTP آزی با دآمیناسیون گلوتامین فعال می‌شود. مطالعه‌های اولیه نشان داده اند که این توکسین سبب تولید و ترشح پروتئین های التهاب زا و سایتوکاین‌های سیستم ایمنی از طریق فعالیت پروتئین‌های Rho می‌شود. بنابراین این توکسین به واسطه فعالیت

1-Hemolysin
2-Cytotoxic Necrotizing Factor

آنزیمیRho با تحریک سیستم ایمنی بدن می‌تواند خاصیت ادجونت و القاء بی حسی نسبت به درد را نشان دهد(۹). تشخیص فاکتورهای مولد عفونت ادراری یک نگرانی بزرگ در زمینه درمان می‌باشد. بر اساس مطالعه‌های انجام شده، حضور و نقش فاکتورهای همولیزین و سیتوتوکسیک نکروزان در فرایند بیماریزایی اشریشیاکلی در مجاری ادراری بسیار حایز اهمیت گزارش شده است که اطلاع از میزان و توانایی تولید این فاکتورهای بیماری‌زایی در ایزوله‌های بالینی می‌تواند در کنترل عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم‌های مؤثر باشد. از طرفی دیگر هم‌زمان با حضور این فاکتورهای بیماری‌زایی که قابلیت ارگانیسم را در ایجاد و پیشرفت عفونت‌های جدی دستگاه ادراری افزایش می‌دهد، بروز الگوهای مختلف مقاومت دارویی، درمان و کنترل این عفونت‌ها را مشکل می‌سازد(۱۲ـ۱۰)، لذا با توجه به نقش و اهمیت بالینی ایزوله‌های حاوی فاکتورهای بیماری‌زایی همولیزین و سیتوتوکسیک نکروزان در ایجاد عفونت‌های ادراری، هدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی ژن‌های کد کننده این دو توکسین در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های آموزشی شهر قزوین بود.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی ـ مقطعی که در طی ۱۲ ماه از خرداد ۹۲ تا خرداد ۹۳ انجام شد، از مجموع ۲۰۰ نمونه ادرار جمع‌آوری شده از بیماران بستری مبتلا به عفونت ادراری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های آموزشی (بخش‌های داخلی، عفونی، مراقبت‌های ویژه و جراحی عمومی)، ۱۲٦ (٦۳ درصد) ایزوله *اشریشیاکلی* جمع آوری شدند. معیارهای ورود به مطالعه، نمونه‌های ارسالی بودند که از نظر رشد گونه *اشریشیاکلی* مثبت باشند. نمونه‌های ارسالی که نتیجه کشت آنها سایر باکتری‌ها به جز گونه *اشریشیاکلی* بوده و یا نمونه‌های ارسالی آنان تکراری بودند، از مطالعه حذف شدند. در کلیه مراحل مطالعه، ملاحظات اخلاقی و حفظ محرمانه بودن اطلاعات اخذ شده، رعایت گردید. این تحقیق براساس تأیید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام گرفت. تمامی نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت میکروب‌شناسی از جمله مکانکی آگار و بلاد آگار کشت داده شدند. محیط‌های کشت به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شدند و از نظر رشد باکتری و تشکیل کلونی بر روی محیط‌ها بررسی شدند. کلنی‌های باکتری‌های گرم منفی با استفاده از آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروب شناسی از جمله کشت در محیط سیمون سیترات آگار، تولید آنزیم های اوره آز و لیزین دکربوکسیلاز، بررسی تحرک، کشت بر روی محیط های تریپل شوگر آیرون[۱]، متیل رد[۲]و وگس پروسکوئر[۳] تعیین هویت شدند. وجود و یا بیشتر از 10^5 واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر ادرار نشان دهنده عفونت مجاری

1-Triple Sugar Iron
2- Methyl Red
3-Voges-Proskauer

ادراری در نظر گرفته شد (۱۴و ۱۳). همه ایزوله‌ها در محیط تریپی کیس سوی براث[1] با ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی تمامی ایزوله‌ها بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاه بالینی[2](۱۵) و با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفپودکسیم، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، ایمی‌پنم، سفپیم، جنتامایسین، آمیکاسین، گتی‌فلوکساسین، لووفلوکساسین و نورفلوکساسین انجام شد. ایزوله‌های باکتریایی که حداقل به یکی از سه کلاس آنتی‌بیوتیکی بتالاکتام، آمینوگلیکوزید و کینولون مقاوم باشند به عنوان ایزوله‌های با الگوی مقاومت دارویی چندگانه در نظر گرفته شدند. در این آزمون از روش استاندارد دیسک آگار دیفیوژن استفاده شد، بدین صورت که ابتدا محیط مولر هینتون آگار تهیه شد و pH آن بین ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم گردید. سوسپانسیون میکروبی استاندارد بر اساس نیم مک فارلند تهیه شد و به روش چمنی بر روی محیط مولر کشت داده شد. پس از قرار دادن دیسک‌های مذکور، محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس نتایج بر اساس دستورالعمل‌های مربوطه ثبت شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت MAST انگلستان خریداری شدند. در این آزمون از سویه استاندارد اشریشیاکلی با شماره۲۵۹۲۲ جهت کنترل انجام آزمون استفاده گردید.

سپس ایزوله‌های *اشریشیاکلی* از نظر حضور ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تعیین توالی بررسی شدند(جدول۱)(۱۷ و ۱۶). استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن انجام شد، بدین ترتیب که ابتدا ایزوله‌های باکتریایی در محیط کشت تریپتی کیس سوی براث کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از رشد، ٤ تا ٥ کلنی از کشت باکتری را در ۳۰۰ میکرولیتر از بافر تریس(۱۰ میلی‌مول محلول تریس، ۱ میلی مول محلول EDTA در pH مساوی ۸) حل کرده و محلول فوق در ۹۵ درجه به مدت ٥ دقیقه قرار داده و سپس به روی یخ انتقال داده شدند. در ادامه، پس از سانتریفیوژ با دور۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، از مایع روئی به عنوان DNA الگو استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش شامل ۲۰۰ میکرومول داکسی نوکلئوتید تری‌فسفات[3]، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی‌مول در لیتر کلرید منیزیم، ۰/۵ واحد آنزیم پلی‌مراز و ۵۰ نانوگرم DNA الگو بود. تکثیر ژن‌های *hly* و *cnf* جداگانه با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر (Applied Biosystems –

1-Tryptic Soy Broth
2-Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)
3-Deoxynucleotide Triphosphates

ساخت کشور آمریکا) تحت شرایط زیر انجام شد. دمای دناتوراسیون اولیه (۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه)، سپس ۳۵ سیکل حرارتی شامل؛ ۱ دقیقه با دمای دناتوراسیون ۹۵ درجه، ۱ دقیقه دمای اتصال پرایمر در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه مربوط به ژن *hly* و ۴۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه مربوط به ژن *cnf*، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با الکتروفورز بر روی ژل آگارز (۱ درصد) و پس از رنگ‌آمیزی با سایبرگرین و مشاهده با دستگاه ترانس لومیناتور بررسی شدند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی (تعیین فراوانی و درصد) تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

از مجموع ۱۲۶ ایزوله اشریشیاکلی مورد مطالعه، ۱۰۵ ایزوله(۸۳/۳ درصد) مربوط به زنان و ۲۱ ایزوله(۱۶/۷ درصد) مربوط به مردان بودند. با بررسی میانگین سنی بیماران مشخص شد که بیماران هدف در این مطالعه در محدوده سنی ۱۹ تا ۹۱ سال قرار داشتند که میانگین سنی آنها ۱۷± ۵۲ سال تعیین شد. در این مطالعه، ایزوله‌ها به ترتیب از بیماران بستری در بخش‌های داخلی ۷۵ بیمار (۵۹/۵ درصد)، عفونی ۲۷(۲۱/۴ درصد)، مراقبت‌های ویژه ۲۲ (۱۷/۵ درصد)، جراحی عمومی۲ (۱/۶ درصد) جمع‌آوری شدند. در مجموع، ۴۹(۳۸/۹ درصد) ایزوله الگوی مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند که به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی استفاده شده در این مطالعه مقاوم بودند. بیشترین میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به داروهای آمیکاسین(۹۱/۳ درصد) و ایمی‌پنم(۸۸/۹ درصد) و بیشترین میزان مقاومت نسبت به سفوتاکسیم(۸۳/۳ درصد) و سفتازیدیم(۷۳ درصد) گزارش شد(جدول ۲). پس از انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مشخص گردید که در مجموع ۴۰ (۳۱/۷ درصد) ایزوله از نظر حضور ژن *hly* و ۲۴(۱۹درصد) ایزوله از نظر حضور ژن *cnf* مثبت بودند(شکل ۱). ایزوله‌های حاوی ژن های *hly* و *cnf* اغلب از بیماران بستری در بخش بیماری های داخلی و عفونی جداسازی شدند (جدول۳).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورداستفاده جهت شناسایی ژن های *hly* و*cnf* در ایزوله‌های اشریشیاکلی مورد مطالعه

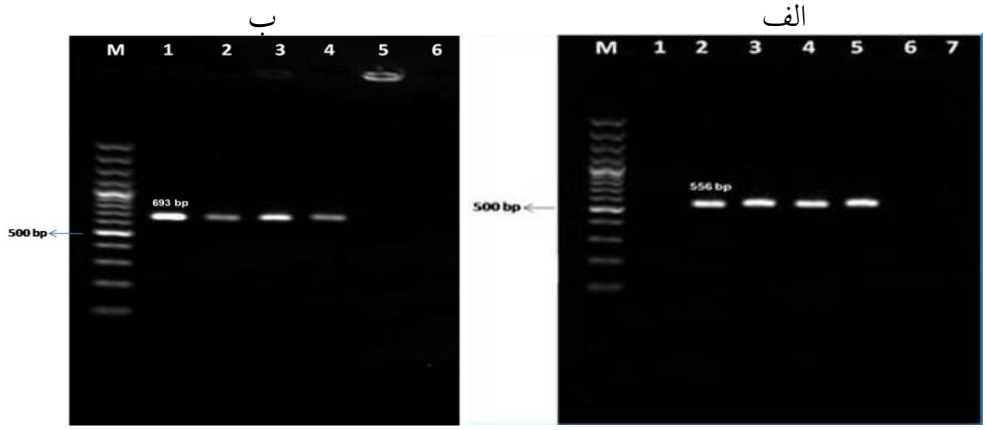
ژن	توالی پرایمر('3-'5)	اندازه محصول (جفت باز)	منابع
hly	AGATTCTTGGGCATGTATCCT TTGCTTTGCAGACTGTAGTGT	۵۵۶	۱۶
cnf	TTATATAGTCGTCAAGATGGA CACTAAGCTTTACAATATTGA	۶۹۳	۱۷

جدول ۲: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در ایزوله های اشریشیاکلی مورد مطالعه

آنتی بیوتیک	حساس تعداد (درصد)	مقاومت حد واسط تعداد (درصد)	مقاوم تعداد (درصد)
آمیکاسین	۱۱۵ (۹۱/۳)	٦ (٤/۸)	٥ (٤)
ایمی‌پنم	۱۱۲ (۸۸/۹)	١٤ (١١/١)	–
جنتامایسین	٦٨ (٥٤)	٨ (٦/٣)	٥٠ (٣٩/٧)
سفیپم	٦٥ (٥١/٦)	١١ (٨/٧)	٥٠ (٣٩/٧)
نورفلوکساسین	٤٧ (٣٧/٣)	–	٧٩ (٦٢/٧)
سیپروفلوکساسین	٤٥ (٣٥/٧)	–	٨١ (٦٤/٣)
لووفلوکساسین	٤٤ (٣٤/٩)	٣ (٢/٤)	٧٩ (٦٢/٧)
گتی فلوکساسین	٤٤ (٣٤/٩)	–	٨٢ (٦٥/١)
نالیدیکسیک اسید	٣٨ (٣٠/٢)	–	٨٨ (٦٩/٨)
سفتازیدیم	٣٤ (٢٧)	١١ (٨/٧)	٨١ (٦٤/٣)
سفوتاکسیم	٢١ (١٦/٧)	٧ (٥/٦)	٩٨ (٧٧/٨)

جدول ۲: فراوانی ژن های *hly* و*cnf* درایزوله های اشریشیا کلی جداشده از بخش های بیمارستان های قزوین

ژن بخش	*hly* تعداد (درصد)	*cnf* تعداد (درصد)
بیماری های داخلی	۲۲ (۱۷/۵)	۱۵ (۱۱/۹)
بیماری های عفونی	۹ (۷/۱)	۵ (۴)
مراقبت های ویژه	۹ (۷/۱)	۴ (۳/۲)
مجموع	۴۰ (۳۱/۷)	۲۴ (۱۹)



شکل ۱: نتایج الکتروفورز ژن های *hly* و *cnf* در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از بیمارستان های قزوین
بخش الف): محصول PCR از نظر حضور ژن *hly*: ستون M: مارکر DNA (۱۰۰bp)، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت (تأیید توالی شده)، ستون های ۳ تا ۵: ایزوله های مثبت بالینی، ستون ۶: ایزوله منفی بالینی، ستون ۷: کنترل آزمون PCR (بدون DNA الگو).بخش ب): محصول PCR از نظر حضور ژن *cnf*: ستون M: مارکر DNA (۱۰۰bp)، ستون ۱: کنترل مثبت ،(تأیید توالی شده)، ستون های ۲ تا ۴: ایزوله های مثبت بالینی، ستون ۵: ایزوله منفی بالینی، ستون ۶: کنترل آزمون PCR (بدون DNA الگو).

بحث

عفونت دستگاه ادراری شایع ترین عامل عفونت بیمارستانی محسوب می‌شود. طبق مطالعه‌های انجام شده، ۹۰ درصد از عفونت‌های ادراری به وسیله *اشریشیاکلی* ایجاد می‌شود که در صورت عدم درمان مناسب می‌تواند باعث نارسایی کلیوی شود و افزایش مرگ و میر بیماران را به همراه دارد. *اشریشیاکلی* به واسطه داشتن فاکتورهای بیماری‌زایی متنوع قابلیت بالایی در ایجاد عفونت‌های مختلف بالینی دارد(۱۷). در سال‌های اخیر، حضور ایزوله‌های *اشریشیاکلی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های تجویزی در محیط‌های بیمارستانی، نگرانی های بسیاری برای پزشکان و متخصصین کنترل عفونت ایجاد کرده است(۱۸). هدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی ژن‌های کد کننده این دو توکسین در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های آموزشی شهر قزوین بود.

در مطالعه حاضر، ۳۸/۹ درصد از ایزوله‌ها الگوی مقاومت دارویی چند گانه را نشان دادند و بیشترین حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به داروهای آمیکاسین (۹۱/۳ درصد) و ایمی‌پنم (۸۸/۹ درصد) گزارش شد. در دو مطالعه مشابه در ایران، فرشاد و همکاران در جهرم، بیشترین حساسیت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های اشریشیاکلی جمع آوری شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری را نسبت به ایمی‌پنم(۱۰۰ درصد) و آمیکاسین (۹۶/۸ درصد) گزارش کردند(۱۹). در مطالعه دیگری که به وسیله افشارپیمان و همکاران در تهران انجام شد، بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری نسبت به ایمی‌پنم (۹۷/۳ درصد)، سیپروفلوکساین (۹۰/۴ درصد) و آمیکاسین (۸۲/۹ درصد) گزارش گردید(۲۰). بر اساس نتایج این مطالعه، استفاده منطقی از این داروهای مؤثر و به کارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت در محیط‌های بیمارستانی باید مورد توجه پزشکان و متخصصین کنترل عفونت قرار گیرد.

در مطالعه حاضر، حضور ژن‌های کد کننده دو فاکتور بیماری‌زایی مهم شامل همولیزین و سیتوتوکسیک نکروزان در بیمارستان‌های آموزشی قزوین بررسی شد که فراوانی این دو ژن به ترتیب ۳۱/۷ و ۱۹ درصد گزارش شد. بر اساس مطالعه‌های انجام شده، ارتباط معنیداری بین این ژن‌ها و ایجاد عفونت مجاری ادراری مشاهده شده به طوری که دخالت این ژن‌ها را در تشکیل و پیشرفت عفونت دستگاه ادراری نشان می‌دهد(۲۱). یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج به دست آمده از کرنی و همکاران در بیمارستان‌های مجارستان مشابه بوده است(۲۲)، ولی با مطالعه‌ای دیگر در این زمینه که به وسیله سانتو و همکاران در برزیل انجام شد، تفاوت داشته است به طوری که میزان فراوانی ژن‌های *hly* و *cnf* ۹۶ درصد گزارش شده است(۲۳). در ایران، در بررسی انجام شده به وسیله خداوردی دریان و همکاران در تهران، فراوانی ژن های *hly* و *cnf* در اشریشیا کلی جدا شده

از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بـه ترتیـب ۴۳/۳۳ و ۵۶/۶۶ درصد گزارش شد که نسبت به مطالعه حاضـر از فراوانی بیشتری برخـوردار اسـت(۱۰). کریمیـان و همکاران در مطالعه‌ای دیگـر گـزارش کردنـد کـه ۵۰/۴ درصد از ایزولـه‌هـای *اشریشیاکلی* دارای هـر دو ژن *hly* و *cnf* بودند که نسبت به مطالعه حاضر از فراوانـی بیشتری برخوردار است. در این پـژوهش ایزولـه‌هـای *اشریشیاکلی* مولـد عفونـت ادراری اغلـب از بیمـاران مبتلا به پیلونفریت جدا شدند(۱۱). مطالعـه‌ای در شـهر کاشان، فراوانی ژن های *hly* و *cnf* را به ترتیـب ۴/۵ و صفر درصد گزارش کردند که با نتایج مطالعه حاضـر همخوانی ندارد(۱۲). در مطالعه انجام شـده در شـیراز بـا بررسـی ۹۸ ایزولـه اشریـشیاکلی جـدا شـده از کودکـان مبـتلا بـه عفونـت ادراری، فراوانـی ژن‌هـای *hly* و *cnf* بـه ترتیـب ۱۵/۶ و ۲۲/۹ درصـد گـزارش شد(۲۴). وجود بیماری‌هـای زمینـه‌ای، نـوع عفونـت و وخامت بیماری، اسـتفاده از ابزارهـای تهـاجمی ماننـد کاتترهای ادراری و عدم رعایت موازین کنترل عفونـت به وسیله بیمار و کادر درمانی می‌تواند یکی از عوامـل مهم حضور این ارگانیسم‌های بیماری‌زا با فاکتورهای بیماری‌زایی متنـوع در ایجـاد عفونـت دسـتگاه ادراری باشد.

در سایر نقاط جهان، نتایج مطالعـه‌هـای انجـام شده به وسـیله فاطیمـا و همکـاران در هنـد، حـاکی از تشابه بالای فراوانی ژن *hly* نسبت به مطالعـه حاضـر می‌باشد(۲۵)، اما یافته‌های به دست آمـده در مطالعـه آریـسوی و همکـاران در آنکـارا بـا مطالعـه حاضـر مغـایرت دارد(۲۶). یوسـین و همکـاران در رومـانی، فراوانی ژن‌های *hly* و *cnf* را در ایزوله‌های جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری بـه ترتیـب ۲۳ و ۱۳ درصد گزارش کردنـد کـه بـا نتـایج مطالعـه حاضر هم‌خوانی دارد(۱۶). در مطالعه دیگر، لنـدرود و همکاران در فرانسه، حـضور ژن *cnf* را در ۳۰ درصـد از ایزولـه هـا مثبـت گـزارش کردنـد کـه تمـامی ایـن ایزوله‌ها فعالیت همولیتیک ناشی از حـضور ژن *hly* را نیز نشان دادنـد(۲۷). اوپـال و همکـاران در ایـسلند بـا بررسـی ژن *hly* و آئروبـاکتین در ایزولـه‌هـای *اشریشیاکلی* با روش‌های فنـوتیپی و ژنـوتیپی میـزان فراوانی ژن *hly* را ۳۸ درصد گزارش کردند که نتیجـه مطالعه‌های آنها تشابه زیادی با نتایج مطالعـه حاضـر نشان داد(۲۸). مطالعه‌ای در تانزانیـا نـشان داد کـه ۱۹ درصـد ایزولـه هـا دارای ژن *hly* و ۳ درصـد ایزولـه دارای ژن *cnf* بودند که نـسبت بـه مطالعـه حاضـر از فراوانی کمتری برخوردار است که این مسئله می‌تواند تا حدودی به دلیل تفاوت جمعیت مورد مطالعـه باشـد (۲۹). عواملی مانند جنسیت، افزایش سن، بیمـاری‌هـای زمینه‌ای مانند دیابت، نوع بیماری، مدت زمان بـستری، مصرف داروهای سرکوب کننده ایمنـی، فـشارخون و گلومرولونفریـت از جملـه فاکتورهـای مـؤثر در ایـن تفاوت‌ها گزارش می‌شوند(۳). شیوع بالای ژن‌های *hly* و *cnf* در مطالعه‌های انجام شده در نقاط مختلف جهان مـی‌توانـد نـشان دهنـده خطـر گـسترش وسـیع *اشریشیاکلی* مولد عفونت ادراری با بیماری‌زایـی بـالا در میان بیماران بـستری در محـیط‌هـای بیمارسـتانی

می‌باشد. با آگاهی از نقش مهم و کلیدی این ژن‌ها در بیماری‌زایی سویه های ایجاد کننده دستگاه ادراری و با وجود هزینه‌های زیادی که هر ساله برای درمان عفونت ادراری بر جامعه تحمیل می‌شود، می‌توان در مطالعه‌های بعدی به فکر طراحی واکسن ترکیبی علیه این دو توکسین بود تا از این طریق بتوان از ایجاد این عفونت در جامعه پیش‌گیری کرد. با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌شود که با آموزش راهکارهای مناسب کنترل عفونت به پرسنل پزشکی بخش‌های بیمارستانی از بروز و گسترش عفونت‌های ادراری در جامعه و مراکز درمانی جلوگیری نمود. هم‌چنین سایر فاکتورهای بیماری‌زایی این ارگانیسم در سایر مناطق جغرافیایی کشور مورد بررسی قرار گیرند تا اطلاعات جامع‌تری در بحث پیشگیری، درمان و نحوه مدیریت عفونت‌های جدی ناشی از این ارگانیسم در محیط‌های درمانی در اختیار محققین قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، حاکی از فراوانی قابل توجه ژن‌های بیماری‌زایی *hly* و *cnf* در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* مولد عفونت ادراری می‌باشد که همراستا با نتایج سایر مطالعه‌های انجام شده در سایر نقاط جهان است. به دلیل اهمیت بالای این ژن‌های بیماری‌زایی در ایجاد عفونت‌های ادراری در بیماران بستری در بیمارستان‌ها، تشخیص سریع آن‌ها در نمونه‌های ادراری می‌تواند به مدیریت بهتر و سریع کنترل این عفونت‌ها کمک کند. هم‌چنین با توجه به ماهیت مقاومت دارویی چندگانه این ایزوله‌ها، انتخاب و تجویز مناسب آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر این ایزوله‌های مقاوم و به کارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت باید مورد توجه متخصصین قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله منتج از پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد زنجان می‌باشد. از مدیریت و کارکنان مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین به دلیل همکاری در اجرای این پروژه تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

REFERENCES

1.Rytlewska M, Liberek A, Sikorska-Wisniewska G, Bako W. Fimbriae as virulence factors of uropathogenic strains of *Escherichia coli*. Medycyna Wieku Rozwojowego 2005; 9(4): 743-52.
2.Salvatore S, Cattoni E, Siesto G, Serati M, Sorice P, Torella M. Urinary tract infections in women. European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology 2011; 156 (2): 131-6.
3.Menegueti MG, Pereira MF, Bellissimo-Rodrigues F, Garcia TM, Saber LT, Nardim ME, et al. Study of the risk factors related to acquisition of urinary tract infections in patients submitted to renal transplant. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2015; 48(3): 285-90.
4. Twaj M. A review of UTI pathogenesis and risk factors. Journal of the Royal Society of Health 2000; 120: 220-6.
5.Sader HS, Flamm RK, Jones RN. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteremia isolates in patients with urinary tract infection: results from United States and European hospitals (2009-2011). Journal of Chemotherapy 2014; 26(3):133-8.
6.Ejrnaes K. Bacterial characteristic of importance for recurrent urinary tract infection caused by *Escherichia coli*. Danish Medical Bulletin 2011; 58(4):1-22.
7.Bader MS, Haeboldt J, Brooks A. Management of complicated urinary tract infection in the era of antimicrobial resistance. Postgraduate Medicine 2010; 122(6):7-15.
8.Bielaszewska M, Aldick T, Bauwens A, Karch H. Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: structure, transport, biological activity and putative role in virulence. International Journal of Medical Microbiology 2014; 304(5-6): 521-9.
9.Svanborg C. Urinary tract infections in children: microbial virulence versus host susceptibility. Advances in Experimental Medicine and Biology 2013; 764: 205-10.
10.Khodaverdi Darian E, Dormanesh B, Safarpoor Dehkordi F. Virulence factors and O-serogroups profiles of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Iranian pediatric patients. Iranian Red Crescent Medical Journal 2014; 16(2): 1-7.
11.Karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. African Journal of Microbiology Research 2012; 6(39): 6811-6.
12.Neamati F, Firoozeh F, Saffary M, Mousavi S. The prevalence of uropathogenic *E. coli* and detection of some virulence genes isolated from patients referred to Kashan Shahid-Beheshti hospital during 2012-2013. Kashan University of Medical Sciences Journal (FEYZ) 2014; 18 (3): 267-74.
13.Rahman H, Deka M. Detection and characterization of necrotoxin producing *Escherichia coli* (NTEC) from patients with urinary tract infection (UTI). Indian Journal of Medical Research 2014; 139(4): 632-7.
14.Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Ohio: Saunders Elsevier; 2015 ; 420-454.
15.Wayne P. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2013; M100-S23.
16. Usein CR, Damian M, Tatu-Chitoiu D, Capusa C, Fagaras R, Tudorache D, et al. Prevalence of virulence genes in Escherichia coli strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2001;5: 303-10.
17.Licznar P, Eychenne I, Azéma C, Decramer S, Bouissou F, Fayet O, et al. Revised prevalence of afa+ Escherichia coli strains in acute pyelonephritis of children. Pathologie Biologie (Paris) 2003; 51: 512-5.
18.Kahlmeter G. Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogens in uncomplicated cystitis in Europe. The ECO. SENS study. International Journal of Antimicrobial Agents 2003; 22(2):49-52.
19.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; 15(5): 312-6.
20.Afsharpaiman SH, Bairaghdar F, Torkaman M, Kavehmanesh Z, Amirsalari Su, Moradi M, et al. Bacterial pathogens and resistance patterns in children with community-acquired urinary tract infection: a cross sectional study. Journal of Comprehensive Pediatrics 2012; 3(1):16-20
21.Wang MC, Tseng CC, Chen CY, Wu JJ, Huang JJ. The role of bacterial virulence and host factors in patients with Escherichia coli bacteremia who have acute cholangitis or upper urinary tract infection. Clinical Infectious Diseases. 2002; 35(10):1161-6.

22. Kerenyi M, Allison HE, Batai I, Sonnevend A, Emody L, Plaveczky N, et al. Occurrence of *hlyA* and *sheA* genes in extraintestinal *Escherichia coli* strains. Journal of Clinical Microbiology 2005; 43(6): 2965-8.
23.Santo E, Macedo C, Marin JM. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2006; 48(4): 185-8.
24.Farshad S, Emamghoraishi F, Japoni A. Association of virulent genes hly, sfa, cnf-1 and pap with antibiotic sensitivity in *Escherichia coli* strains isolated from children with community-acquired UTI. Iranian Red Crescent Medical Journal 2010; 12(1): 33-7.
25.Fatima N, Agrawal M, Shukla I, Anwar khan P. Characterization of uropathogenic *E. coli* in relation to virulence Factors. Scientific Reports 2012; 1: 342.
26.Arisoy M, Aysev D, Ekim M, Ozel D, Kose SK, Ozsoy ED, et al. Detection of virulence factors of *Escherichia coli* from children by multiplex polymerase chain reaction. International Journal of Clinical Practice 2006; 60(2):170-3.
27.Landraud L, Gauthier M, Fosse T, Boquet P. Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor (cnf-1) in nosocomial urinary tract infections. Letters in Applied Microbiology 2000; 30(3): 213-6.
28.Opal SM, Cross AS, Gemski P, Lyhte LW. Aerobactin and alpha-hemolysin as virulence determinants in *Escherichia coli* isolated from human blood, urine, and stool. Journal of Infectious Diseases 1990; 161(4): 794-6.
29. Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. International Journal of Infectious Diseases 2013; 17(6): 450-3.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Relative Frequency of Hemolysin and Cytotoxic Necrotizing Virulence Factors in *Escherichia coli* Isolated From Educational Hospitals of Qazvin, in 2012-2013

Barikbin M[1], Peymani A[2*], Pourzereshki N[2]

[1]Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran, [2]Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Received: 27 Feb 2016 Accepted: 5 Jul 2016

Abstracts

Background & aim: Urinary tract infections are the most common type of nosocomial infection. *Escherichia coli* (*E. coli*) is the most common cause of urinary tract infections (UTIs) in the community and in clinics. The treatment of these infections is often difficult due to several virulence factors and drug resistance. Adhesions, enzymes and toxins are important virulence factors which promote colonization and pathogenicity of this organism. In the present study, frequency of hemolysin and cytotoxic necrotizing factor-encoding genes and antimicrobial susceptibility were evaluated in *E. coli* isolates collected from urine samples in the educational hospitals of Qazvin, Iran.

Methods: The present cross-sectional study was conducted during 2012-2013. Urine samples were collected from patients with urinary tract infection from different wards of Qazvin teaching hospitals. All of the isolates were identified using standard biochemical and microbiology tests. Antimicrobial susceptibility was further evaluated by Kirby-Baure method according to Clinical and Laboratory Standards Institute guideline. For the presence of genes HLY and CNF, specific primers was used and then using polymerase chain reaction the strains were analyzed and sequenced. Data were analyzed using statistical tests.

Results: Altogether, 49 (38.9%) isolates showed the multidrug resistant pattern in which the highest susceptibility rate was shown to amikacin (91.3%) and imipenem (88.9%) and the resistance rate was reported against cefotaxime (83.3%) and ceftazidime (73%), respectively. PCR assay showed that 40 (31.7%) and 24 isolates (19%) were positive for the presence of *hly* and *cnf* genes, respectively. *Hly* and *cnf*-positive isolates were mostly obtained from patients admitted in internal medicine wards.

Conclusion: The findings of this study indicated multidrug resistant isolates and a considerable rate of hemolysin and cytotoxic necrotizing virulence factors in *E.coli* collected from urine specimens in hospitalized patients in Qazvin, emphasizing the importance of these virulence factors in infection prevention and control strategies.

Key Words: *Escherichia coli*, Hemolysin, Cytotoxic necrotizing factor, PCR

[*]**Corresponding author: Peymani A,** Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, IR Iran.
Email: a.peymani@gmail.com

Please cite this article as follows:
Barikbin M, Peymani A, Pourzereshki N. Relative Frequency of Hemolysin and Cytotoxic Necrotizing Virulence Factors in Escherichia coli Isolated From Educational Hospitals of Qazvin, in 2012-2013. Armaghane-danesh 2016; 21 (4): 360-371.