

توزیع فراوانی ژن های *Sul1, Sul2, Sul3, drf7* در مقاومت به کوتریموکسازول در باسیل های گرم منفی جدا شده از نمونه های بالینی بیماران بستری در بیمارستان پارس

فرزانه سادات محمدی: دانشجوی دوره کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، ورامین، ایران

فاطمه نوربخش: استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، ورامین، ایران-نویسنده رابط: niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

سحر هنرمند جهرمی: استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: در چند دهه اخیر از داروی کوتریموکسازول که ترکیب دارویی سولفومتوکسازول و تری متوپریم است در درمان عفونت-های مختلف باکتریایی استفاده می شود، ولی بدلیل استفاده گسترده از این داروها سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک در سراسر دنیا به وجود آمده است. یکی از دلایل مقاومت به کوتریموکسازول مربوط به ژن های *drf7* است که موجب مقاومت به تری متوپریم می گردد درحالی که مقاومت به سولفومتوکسازول مربوط به وجود ژن های *Sul* می باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی مقاومت دارویی و وجود ژن های کد کننده مقاومت در باکتری های گرم منفی مقاوم به کوتریموکسازول جدا شده از نمونه های بالینی انجام گرفت.

روش کار: نمونه های بالینی از بیماران بستری در بیمارستان پارس جمع آوری شد و باکتری های گرم منفی توسط آزمایش های بیوشیمیایی تایید شدند، سپس تست تعیین حساسیت نسبت به ۵ آنتی بیوتیک انجام شد. از باکتری های مقاوم به کوتریموکسازول DNA استخراج شد و PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن های *Sul1, Sul2, Sul3, drf7* انجام گردید.

نتایج: در باکتری های مقاوم به کوتریموکسازول، ۲۶ درصد از ایزوله ها دارای ژن *sul1*، ۷۴ درصد دارای ژن *sul2*، ۲ درصد دارای ژن *Sul3* و ۱۶٪ دارای ژن *drf7* بودند. همچنین این ایزوله ها نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامیسین، سفتریاکسون، سپروفلوکساسین و کلیستین به ترتیب ۵۱، ۷۴، ۶۵ و ۳٪ مقاومت داشتند.

نتیجه گیری: در باکتری های گرم منفی مقاوم به کوتریموکسازول نقش ژن *Sul2* در ایجاد مقاومت به سولفونامید بیشتر مشاهده شد. در این تحقیق برای مقاومت به تری متوپریم فقط ژن *drf7* مورد مطالعه قرار گرفت که مطالعات دیگری باید بر روی سایر ژن های *drf* انجام شود تا اهمیت هر یک از ژنها در میزان مقاومت به کوتریموکسازول مشخص گردد.

واژگان کلیدی: کوتریموکسازول، باسیل گرم منفی، مقاومت آنتی بیوتیکی، ژن های *Sul1, Sul2, Sul3, drf7*

بیمارستانی است (Foxman et al. 2000).

مقدمه

عفونت بیمارستانی عفونتی که به صورت محدود یا منتشر و در اثر واکنش های بیماری زای مرتبط با خود عامل عفونی یا سموم آن در بیمارستان ایجاد میشود به شرطی که حداقل ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از پذیرش بیمار در بیمارستان ایجاد شود و در زمان پذیرش، فرد نباید علائم

اعضای خانواده انتروباکتریاسه و سایر باسیل های گرم از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت هستند. یکی از این عفونت های شایع عفونت ادراری است، که بعد از عفونت ریوی جزء شایع ترین عفونت های

هستند در نتیجه این دارو تکثیر آنها را متوقف می‌کند. لذا با استفاده از ترکیب کوتریموکسازول متابولیسیم اسید فولیک در باکتری‌ها با دو سازوکار متفاوت مختل می‌شود (Skold 2001).

تاثیر کوتریموکسازول بر روی دی هیدروفولات ردوکتاز (DHFR) و دی هیدروفولات سنتتاز (DHPS) می‌باشد که DHFR و DHPS در بخشی از مسیر سنتز اسید فولیک در باکتری نقش دارند. مقاومت به کوتریموکسازول به وسیله جهش در ژن های *folA* و *folP* ایجاد می‌شود که کد کننده DHFR, DHPS می‌باشند که این جهش از بیوسنتز اسید فولیک جلوگیری می‌کند. مقاومت به سولفونامیدها به واسطه پلاسمید با تغییر آنزیم دی هیدروفولات سنتتاز صورت می‌گیرد (Bean et al. 2009). ژن های *Sul* تولید دی هیدروفولات سنتتاز می‌کنند و باعث القای مقاومت در برابر سولفونامیدها می‌شوند. مقاومت به سولفونامیدها معمولاً توسط سه ژن *Sul* به صورت *Sul1* و *Sul2* و *Sul3* کد می‌شود که این سه ژن معمولاً توسط پلاسمید انتقال می‌یابند. این پلاسمیدها به سهولت بین سویه‌ها و گونه‌های مختلف از باسیل های گرم منفی که پاتوژن روده‌ای می‌باشند، قابل انتقال هستند. پلاسمیدها عوامل ژنتیکی هستند که خارج از کروموزوم باکتری بوده و به طور مستقل از کروموزوم قادر به تکثیر می‌باشند. این عوامل ژنتیکی معمولاً حامل ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی می‌باشند. از خصوصیات ویژه پلاسمیدها انتقال ساده این عوامل بین سلول‌ها می‌باشد (Carattioli 2009; Mulvey and Simor 2009).

ژن *Sul1* به طور عمده همراه با ایتتگرون کلاس ۱ است در حالی که *Sul2* بیشتر بر روی پلاسمیدهای کوچک متعلق به گروه پلاسمیدهای ناسازگار و یا روی انواعی از پلاسمیدهای کوچک قرار می‌گیرند. ژن *Sul3* در انسان کمتر گزارش شده است و فراوانی این ژن در خوک و گوشت خوک بسیار بالا می‌باشد. شیوع ژن *Sul2* بیشتر از *Sul1* است. در نتیجه نقش ژن *Sul2* در ایجاد مقاومت به سولفونامیدها و همچنین ایجاد مقاومت چندگانه پر رنگ

آشکار عفونت مربوطه را داشته باشد و بیماری در دوره نهفتگی خود نباشد (sheng 2000). پژوهش‌های صورت گرفته، بیانگر این واقعیت است که در بسیاری از کشورها یک نفر از هر ده بیمار در بیمارستان حداقل یک عفونت کسب کرده‌اند. عفونت‌های عمده شامل عفونت‌های مجاری ادرار، زخم‌های جراحی، مجاری تنفسی و پوست است. تفاوت و شدت عفونت‌ها باتوجه به سن بیمار، نوع عمل جراحی، مدت کاتتریزاسیون، درمان ایمونوساپرسیو و غیره متفاوت خواهد بود (Brooks et al. 2010).

سولفونامیدها در درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی و انگلی کاربرد دارند و سازوکار اثر آنها مهار ساخت اسیدنوکلیک است. سولفامیدها فقط از رشد میکروارگانسیم هایی که خود اسید فولیک را تولید می‌نمایند جلوگیری می‌کنند و بر سلول‌های میزبان، مثلاً انسان که ماده فوق را از محیط (غذا) دریافت می‌نماید موثر نمی‌باشند لذا می‌توان سولفونامیدها را برای اکثر بیماری‌های عفونی در پستانداران مصرف نمود (Madigan et al. 2012).

کوتریموکسازول در واقع از ترکیب دو آنتی بیوتیک تری متوپریم و سولفامتوکسازول (گروه سولفو نامیدها) ساخته شده است که مهار کننده رشد باکتری است. سولفونامیدها با اسید پارآمینوزوئیک شباهت ساختمانی داشته و به طور رقابتی یک آنزیم باکتریایی بنام دی هیدروپتروات سنتتاز را که مسئول داخل کردن اسید پارآمینوزوئیک در ساختمان اسید دی هیدروفولیک است، مهار می‌کنند. این عمل ساخت اسید دی هیدروفولیک را که از نظر متابولیک کوفاکتور در ساخت پورین‌ها، تیمیدین و DNA می‌باشد را کاهش می‌دهد. تری متوپریم با تداخل در عملکرد آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز باکتری‌ها ساخت اسیدتتراهیدروفولیک را مهار می‌کند. تتر هیدروفولیک اسید کوفاکتور ضروری در ساخت تیمیدین و DNA می‌باشد. باکتری‌هایی که اسید فولیک را خودشان تولید می‌کنند به این دارو حساس

از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز، از نظر رشد باکتری و تشکیل کلنی بر روی محیط ها، مورد بررسی قرار گرفت. باکتری های گرم منفی ایزوله شده، به کمک آزمایش های مورفولوژی و بیوشیمیایی شامل رنگ آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، حرکت، سیرتات، اندول، متیل رد، و وگس پروسکوئر، اوره، TSI، لیزین دکربوکسیلاز شناسایی شدند.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن بر اساس پروتکل ارائه شده توسط سازمان استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI 2015) و با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیک Rosco شامل: کوتریموکسازول (۲۵۰µg)، سفتریاکسون (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵۰µg)، جنتامیسین (۱۰µg) و کلستین (۱۰ µg) حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های جدا شده مورد مطالعه قرار گرفت، و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه گیری شد و مطابق با جداول 2015 CLSI به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش گردید.

بررسی مولکولی مقاومت به کوتریموکسازول: پس از کشت باکتری بر روی محیط نوترینت آگار با استفاده از کیت شرکت پویا ژن آزما DNA پلاسمیدی استخراج گردید. توالی جفت پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه شامل:

sul1: F
5'CGGCGTGGGCTACCTGAACG3', R
(3'GCCGATCGCGTGAAGTTCCG5')

(*sul2*:
F5'GCGCTCAAGGCAGATGGCATT3', R
3'GCCGATCGCGTGAAGTTCCG5')

(*sul3*:
F5'CAGATAAGGCAATTGAGCATGCTCT
GC3',R
3'GATTTCCGTGACACTGCAATCATT5')

(*Drf7*:
F5'AAATGGCGTAATCGGTAATG3', R
3'GTGAACAGTAGACAAATGAAT5')

که از مقاله (Arabi et al. 2015) توالی پرایمرها استفاده شد و با نرم افزار BLAST در سایت NCBI

تر است (Hammerum et al. 2006). ژن *Sul2* توسط پلاسمید منتقل می شود که ممکن است این پلاسمیدها علاوه بر این ژن ها حامل ژن های مقاومت به دیگر گروه های آنتی بیوتیکی باشد (Trobos et al. 2008). دی هیدروفولات سنتاز محصول ژن های *Sul3* و *Sul2* و *Sul1* است و شباهت کمی به اسید پارا آمینوبنزویک نشان می دهد. به نظر می رسد آنزیمی که محصول ژن *Sul2* است توانایی تشخیص سوسترای نرمال اسید پارا آمینوبنزویک را از بازدارنده دارد (Wu et al. 2010).

بیش از ۲۰ ژن *dfr* آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز را کد می کنند که این ژن ها در ارتباط با کروموزوم و پلاسمید و یا اینتگرون کلاس ۱ هستند (Skold 2001; Mazel 2006). ژن ها *dfr* به دو خانواده A, B تقسیم می شوند که شامل *dfrA*, *dfrB* می باشد. *dfrA* شامل حداقل ۲۰ ژن می باشد که در کروموزوم باکتری یافت می شود. در میان ژن های *dfrA* ۵ گونه *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA17* در حامل های اینتگرونی باعث گسترش و انتشار مقاومت به کوتریموکسازول می گردند (Grape et al. 2005; Recchia and Hall 1997).

با در نظر گرفتن نقش این ژن ها در ایجاد مقاومت به کوتریموکسازول مطالعه حاضر با هدف بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و ژن های *Sul1*, *Sul2*, *Sul3*, *drf7* در ایزوله های باکتری های گرم منفی جدا سازی شده از نمونه های بالینی بیماران بستری در بیمارستان پارس صورت گرفت.

روش کار

نمونه برداری و شناسایی: این مطالعه بر روی ۲۱۰۰ نمونه از ادرار، خلط، زخم، خون، بال، آبسه و فلوئید از بیماران بستری در بیمارستان پارس در طی ۴ ماه در سال ۱۳۹۴ صورت گرفت. در ابتدا تمامی نمونه ها بر روی محیط های بلاد آگار و مک کانکی آگار کشت داده شدند و پس

نتایج تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: نتایج حاصل از مقاومت دارویی به ۵ آنتی بیوتیک مورد استفاده به روش انتشار از دیسک انجام شد که از ۲۱۰۰ نمونه بالینی ۱۰۰ باکتری مقاوم به کوتریموکسازول جدا شد در این باکتری‌ها میزان مقاومت به سفتریاکسون ۷۴٪، سپیروفلوکساسین ۶۵٪، جتتامیسین ۵۱٪ و کلستین ۴٪ می‌باشد که در نمودار ۱ فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی آن مشخص شده است.

نتایج حاصل از تکنیک های مولکولی: این مطالعه با استفاده از تکنیک PCR، بر روی ۱۰۰ ایزوله مقاوم به کوتریموکسازول برای وجود ۴ ژن *Sul1*، *Sul2*، *Sul3*، *drf7*، مورد بررسی قرار گرفت، بیشترین درصد فراوانی ژن *Sul1* مربوط به باکتری اشیریشیاکلی و کمترین درصد فراوانی مربوط به باکتری های کلبسیلا و سیتروباکتر بود و در باکتری‌های انتروباکتر و پروتئوس هیچ ژنی یافت نشد (شکل ۱).

در میان ۱۰۰ ایزوله باکتری بیشترین درصد فراوانی ژن *Sul2* مربوط به باکتری اسپیتوباکتر و کمترین درصد فراوانی مربوط به باکتری پروتئوس می‌باشد (شکل ۲).

در میان ایزوله‌های باکتری بیشترین فراوانی ژن *Sul3* مربوط به باکتری های پروتئوس و اشیریشیاکلی می‌باشد و در باکتری‌های اسپیتوباکتر و پسودوموناس و کلبسیلا و انتروباکتر و سیتروباکتر هیچ ژنی یافت نشد. همچنین بیشترین فراوانی ژن *drf7* مربوط به باکتری اشیریشیاکلی و کمترین فراوانی مربوط به باکتری سیتروباکتر می‌باشد و در باکتری‌های اسپیتوباکتر و کلبسیلا و انتروباکتر و پروتئوس هیچ ژنی یافت نشد (شکل ۳).

در این مطالعه با استفاده از نرم افزار Excel 2010 فراوانی ۴ ژن *Sul1*، *Sul2*، *Sul3*، *drf7* بر روی ۱۰۰ ایزوله مقاوم به کوتریموکسازول مورد بررسی قرار گرفت. میزان فراوانی ژن *Sul1* ۲۶٪، *Sul2* ۷۴٪، *Sul3* ۲٪ و *drf7* ۱۶٪ می‌باشد. همچنین فراوانی وجود ۲ ژن و ۳ ژن به طور

صحت آن مورد بررسی قرار گرفت. ژن *Sul1* پس از تکثیر باندی به اندازه ۳۳ bp، *Sul2* باند به اندازه ۲۸۵ bp، *Sul3* باندی به اندازه ۵۶۹ bp و *drf7* باندی به اندازه ۳۲۵ bp ایجاد می‌کنند.

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (mgcl2) با غلظت ۲ میلی‌مولار، dNTP با غلظت ۰٫۲ میلی‌مولار، آنزیم Taq DNA Polymerase با غلظت ۱ واحد) (پویا ژن آزما)، ۱ میکرومول از هر پرایمر (سینازن)، ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (primus) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای مورد نیاز برای هر پرایمر *Sul1*، *Sul2*، *Sul3*، *drf7* به ترتیب ۴۷، ۵۴، ۵۹، ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز یک درصد واجد اتیدیوم برمایند منتقل و الکتروفورز گردید.

نتایج

در این مطالعه ۲۱۰۰ نمونه بالینی از بیماران جدا شد و پس از کشت و تست های بیوشیمیایی باسیل‌های گرم منفی جدا شدند و پس از انجام تست تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ۱۰۰ مورد از آنها که دارای مقاومت به کوتریموکسازول بودند جهت بررسی مولکولی و وجود ژن‌های مقاومت به کوتریموکسازول مورد بررسی قرار گرفت. از بین آنها ۳۷ مورد اشیریشیا کلی، ۲۶ مورد اسپیتوباکتر، ۱۶ مورد پسودوموناس آئروژنیوزا، ۱۵ مورد کلبسیلا، ۳ مورد پروتئوس، ۲ مورد انتروباکتر و ۱ مورد سیتروباکتر بودند. از کل نمونه‌های جدا شده ۵۴ مورد از زنان و ۴۶ مورد از مردان بود.

همزمان در باکتری های گرم منفی مورد مطالعه در نمودار ۲ نشان داده شده است.

بحث

علیرغم اقداماتی که تاکنون در جهت تولید مواد ضد میکروبی وسیع الطیف صورت گرفته است، کماکان موضوع بروز و شیوع مقاومت های میکروبی به خصوص مقاومت باکتری های گرم منفی یکی از موانع اساسی بر سر راه درمان قطعی بیماریهای عفونی محسوب می شود. در بین این باکتری ها، باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک مشکلات فراوانی را در درمان عفونت های خطرناک ناشی از این باکتری ها به وجود آورده اند. بنابراین تاثیر پذیری داروها بر روی این باکتری ها رو به کاهش گذاشته است (Choi et al. 2003). در سال های اخیر استفاده از داروهای ضد میکروبی سولفونامید و تری متوپریم برای درمان عفونت ها در اکثر کشورها در حال افزایش است و استفاده بیش از حد مجاز این داروها منجر به ایجاد مقاومت و ناموفق بودن درمان شده است (Larochelle et al. 2010; Moura and Nicolau 2009).

در تحقیقی که توسط مقبلی و همکاران در سال ۱۳۹۳ در مرکز طبی کودکان مفید تهران انجام شد نشان داد میزان مقاومت به کوتریموکسازول در سویه های شیگلا ۹۴/۵٪ می باشد (Moghbeli 2014) حاکمی و همکاران میزان مقاومت سویه های اشریشیا کلی جدا شده از عفونت های ادراری بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی را بررسی کردند، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۶۲٪ و به سفتریاکسون ۶۶٪ گزارش شد (Hakemi Vala et al. 2013). جاسمی و همکاران در سال ۱۳۹۱ سیتروباکتر را از خون بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی کرمانشاه جدا کردند و حساسیت آنتی بیوتیکی آنها را بررسی نمودند. میزان مقاومت به کوتریموکسازول را ۶۲٪ و سفتریاکسون را ۴۷/۷٪ و سیپروفلوکساسین را ۷۶/۲٪ و جنتامیسین را ۲۸/۵٪ گزارش کردند (Jasemi et al. 2014).

ملاعباس زاده و همکاران در سال ۱۳۹۲ در شهر تبریز میزان مقاومت به کوتریموکسازول در اشریشیا کلی جدا شده از نمونه های ادراری را ۶۳/۹۲٪ گزارش کردند (Molaabaszadeh et al. 2013). در تحقیقی که توسط Ghosh و همکاران در بین سال های ۲۰۰۷-۲۰۰۹ در هند شهر کلکته صورت گرفت حدود ۹۱/۶٪ سویه های شیگلا فلکسنری 2a به کوتریموکسازول مقاوم بودند (Ghosh et al. 2011). Rahman مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های شیگلا فلکسنری به کوتریموکسازول را در سال های ۲۰۰۱-۲۰۰۲ در بنگلادش حدود ۹۶٪ اعلام کرد (Rahman et al. 2007). نتایج تحقیقات و این مطالعه نشان می دهد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های گرم منفی بالاست و تفاوت هایی که در میزان فراوانی مشاهده می گردد ممکن است مربوط به میزان مصرف آنتی بیوتیک در بیمارستان، وجود سویه های مقاوم در بیمارستان و استفاده نادرست آنتی بیوتیک که منجر به جهش و مقاومت به آنتی بیوتیک می گردد، باشد.

خلت آبادی و همکاران در سال ۱۳۸۷ در بیمارستان شهید بهشتی کاشان نشان داد میزان مقاومت به کوتریموکسازول و سیپروفلوکساسین در گونه های اسینتوباکتر به ترتیب ۴۸/۳ و ۵۵٪ می باشد (Kholat Abadi et al. 2009). در حالی که در این تحقیق اسینتوباکتر مقاوم ترین باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها نه تنها کوتریموکسازول و سیپروفلوکساسین می باشد که علت این اختلاف می تواند زمان باشد که نشان دهنده گسترش افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی باشد.

در این تحقیق با توجه به نتایج بیشترین ژنی که در ایجاد مقاومت به کوتریموکسازول نقش دارد *Sul2* است و پس از آن *Sul1* و سپس *drf7* است. *Sul3* نقش کمی در ایجاد مقاومت دارد. ژن های *Sul1* و *Sul2* در ۲۰٪ باکتری ها بطور همزمان وجود دارند که در ارتباط با ایجاد مقاومت در سولفونامیدها در مرحله اول سنتز اسید فولیک (دی هیدروفولات سنتتاز) است. همزمانی ژن های *Sul1* و *drf7* در ۱۵٪ باکتری ها و ژن های *drf7* و *Sul2* در ۱۰٪

باکتری ها مشاهده شد، که مقاومت به کوتریموکسازول در مرحله هر دو مرحله سنتز اسید فولیک (دی هیدروفولات سنتتاز و دی هیدروفولات ردوکتاز) را ایجاد می کند.

مطالعات انجام شده توسط نوروزی در شهر خوی بر روی اشریشیاکلی مقاوم به کوتریموکسازول جدا شده از عفونت ادراری وجود ژن *Sul2* در ۸۰٪ از نمونه ها را نشان داد (Nowroozi et al. 2013). Hammerum.

و همکارانش ۱۹۹ اشریشیا کلی از مدفوع انسان سالم جدا کردند و فراوانی ژن *Sul2* را ۸۱٪ گزارش نمودند (Hammerum et al. 2006). Bean با بررسی ۳۹۱ ایزوله اشریشیاکلی جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری درصد مقاومت به سولفونامیدها را ۴۵/۵٪ گزارش کرد و فراوانی ژن *Sul2* را در ایزوله های مقاوم ۸۱٪ اعلام کردند (Bean et al. 2005).

Al-Agamy با بررسی ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری پرداخت و درصد مقاومت به کوتریموکسازول را ۶۲٪ و فراوانی ژن *Sul2* را ۸۶/۳۶٪ گزارش کردند (Al-Agamy 2012). Koljalg به بررسی ۷۸ ایزوله اشریشیاکلی جداسازی شده از کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری پرداخت و درصد مقاومت به کوتریموکسازول را ۳۳٪ و فراوانی ژن *Sul2* را در ایزوله های مقاوم ۴۰٪ گزارش کردند (Koljalg et al. 2009). Antunes ثابت کرد مهمترین ژن هایی که باعث مقاومت به کوتریموکسازول می شود، ژن های *Sul1*، *Sul2* و *Sul3* می باشد (Antunes et al. 2005). با توجه به تحقیقات انجام شده مشخص است که درباکتری های گرم منفی و مخصوصا در انتروباکتریاسه ژن *Sul2* در ایجاد مقاومت به سولفونامید و کوتریموکسازول یعنی در مرحله اول سنتز اسید فولیک نقش مهمی داشته باشد (Arabi 2015; Frank et al. 2007). فراوانی ژن *sul1* را در انتروباکتریاسه بالاتر از *sul2* گزارش کردند. به موازات این مطالعات (Morsi

ژن دیگری که در مرحله دوم سنتز اسید فولیک دخالت دارد و در ایجاد مقاومت به کوتریموکسازول نقش مهمی ایفا می کند ژن های *dfrA* است و شامل ۲۰ ژن می باشد که ۵ ژن نقش مهمتری در مقاومت به کوتریموکسازول دارند. Grape با بررسی ۳۶۸ نمونه خون و ادرار به این نتیجه رسید همه ۵ گونه ژن *drfA* در باکتری اشریشیاکلی و اغلب باکتری های گرم منفی حضور دارند و باعث ایجاد ۷۵-۸۶٪ مقاومت آنتی بیوتیکی در برابر تری متوپریم می شوند (Grape et al. 2005).

Grape و همکارانش در سال ۲۰۰۷ با بررسی ۷۱ ایزوله اشریشیاکلی جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری میزان فراوانی ژن های *drfA1* را ۳۶٪، *drfA5* ۱۳٪، *drfA7* ۹٪، *drfA12* ۱۳٪ و *drfA17* ۲۸٪، گزارش کردند (Grape et al. 2007). Frank فراوانی ژن های *dfrA1* ۱۷٪، *dfrA7* ۴۹٪ و *drfA2d* را ۱۳٪، گزارش کردند (Frank et al. 2007). در این تحقیق فقط ژن *drf7* مورد بررسی قرار گرفت که نشان می دهد ژن های مرحله دوم سنتز اسید فولیک نقش مهمتری نسبت به ژن *Sul3* در مقاومت به کوتریموکسازول دارند و باید مطالعاتی بر روی سایر ژن های دخیل در این فرایند متابولیک انجام شود تا به درک دقیق تری در مورد نحوه ایجاد مقاومت به این دارو حاصل گردد.

مطالعات انجام شده توسط نوروزی در شهر خوی بر روی اشریشیاکلی مقاوم به کوتریموکسازول جدا شده از عفونت ادراری وجود ژن *Sul2* در ۸۰٪ از نمونه ها را نشان داد (Nowroozi et al. 2013). Hammerum.

و همکارانش ۱۹۹ اشریشیا کلی از مدفوع انسان سالم جدا کردند و فراوانی ژن *Sul2* را ۸۱٪ گزارش نمودند (Hammerum et al. 2006). Bean با بررسی ۳۹۱ ایزوله اشریشیاکلی جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری درصد مقاومت به سولفونامیدها را ۴۵/۵٪ گزارش کرد و فراوانی ژن *Sul2* را در ایزوله های مقاوم ۸۱٪ اعلام کردند (Bean et al. 2005).

Al-Agamy با بررسی ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری پرداخت و درصد مقاومت به کوتریموکسازول را ۶۲٪ و فراوانی ژن *Sul2* را ۸۶/۳۶٪ گزارش کردند (Al-Agamy 2012). Koljalg به بررسی ۷۸ ایزوله اشریشیاکلی جداسازی شده از کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری پرداخت و درصد مقاومت به کوتریموکسازول را ۳۳٪ و فراوانی ژن *Sul2* را در ایزوله های مقاوم ۴۰٪ گزارش کردند (Koljalg et al. 2009). Antunes ثابت کرد مهمترین ژن هایی که باعث مقاومت به کوتریموکسازول می شود، ژن های *Sul1*، *Sul2* و *Sul3* می باشد (Antunes et al. 2005). با توجه به تحقیقات انجام شده مشخص است که درباکتری های گرم منفی و مخصوصا در انتروباکتریاسه ژن *Sul2* در ایجاد مقاومت به سولفونامید و کوتریموکسازول یعنی در مرحله اول سنتز اسید فولیک نقش مهمی داشته باشد (Arabi 2015; Frank et al. 2007). فراوانی ژن *sul1* را در انتروباکتریاسه بالاتر از *sul2* گزارش کردند. به موازات این مطالعات (Morsi

ژن دیگری که در مرحله دوم سنتز اسید فولیک دخالت دارد و در ایجاد مقاومت به کوتریموکسازول نقش مهمی ایفا می کند ژن های *dfrA* است و شامل ۲۰ ژن می باشد که ۵ ژن نقش مهمتری در مقاومت به کوتریموکسازول دارند. Grape با بررسی ۳۶۸ نمونه خون و ادرار به این نتیجه رسید همه ۵ گونه ژن *drfA* در باکتری اشریشیاکلی و اغلب باکتری های گرم منفی حضور دارند و باعث ایجاد ۷۵-۸۶٪ مقاومت آنتی بیوتیکی در برابر تری متوپریم می شوند (Grape et al. 2005).

Grape و همکارانش در سال ۲۰۰۷ با بررسی ۷۱ ایزوله اشریشیاکلی جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری میزان فراوانی ژن های *drfA1* را ۳۶٪، *drfA5* ۱۳٪، *drfA7* ۹٪، *drfA12* ۱۳٪ و *drfA17* ۲۸٪، گزارش کردند (Grape et al. 2007). Frank فراوانی ژن های *dfrA1* ۱۷٪، *dfrA7* ۴۹٪ و *drfA2d* را ۱۳٪، گزارش کردند (Frank et al. 2007). در این تحقیق فقط ژن *drf7* مورد بررسی قرار گرفت که نشان می دهد ژن های مرحله دوم سنتز اسید فولیک نقش مهمتری نسبت به ژن *Sul3* در مقاومت به کوتریموکسازول دارند و باید مطالعاتی بر روی سایر ژن های دخیل در این فرایند متابولیک انجام شود تا به درک دقیق تری در مورد نحوه ایجاد مقاومت به این دارو حاصل گردد.

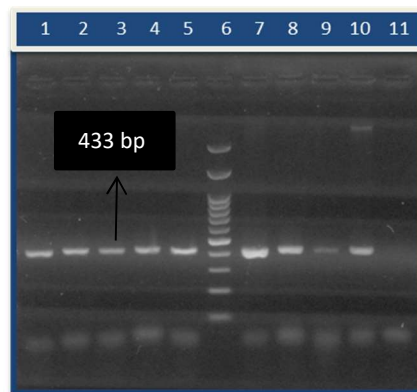
دخیل هستند، می توان نتیجه گرفت که ژن های *drf* دیگر نیز می توانند در ۹۰-۸۵٪ بقیه مقاومت نقش داشته باشند و یا عوامل دیگر ایجاد کننده مقاومت مثل پمپ افلاکس یا تغییرات دیواره در ایجاد فنوتیپ مقاومت نقش داشته باشد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از زحمات کلیه پرسنل آزمایشگاه بیمارستان پارس که ما را مورد لطف قرار داده و در انجام این پروژه همکاری نموده صمیمانه تقدیر و تشکر می نمایم.

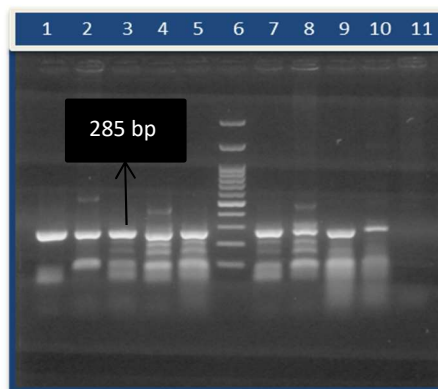
نتیجه گیری

باسیل های گرم منفی به عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی محسوب می شوند. گزارش های مختلفی از سراسر جهان مبنی بر نقش مهم آن در ایجاد عفونت های مختلف در بخش های مختلف بیمارستانی به ویژه بخش مراقبت ویژه وجود دارد. با توجه به مقاومت ۱۰۰٪ نسبت به کوتریموکسازول در باکتری های مورد بررسی در این تحقیق و با توجه به این که ژن های *Sul* و *drf* در مقاومت به کوتریموکسازول



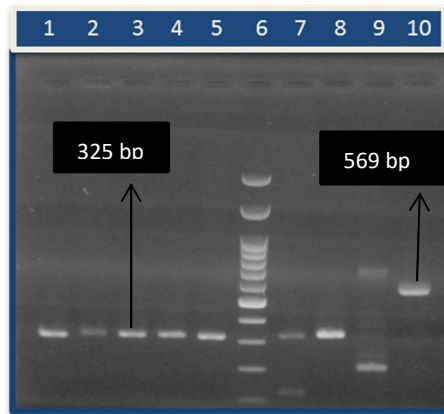
شکل ۱- محصول PCR ژن *sul1*، ۵-۱: اشیریشیا کلی، ۶: ladder 100bp، ۷: سیتروباکتر، ۸-۱۰: پseudوموناس،

۱۱: کنتری منفی در باکتری های مقاوم به کوتریموکسازول

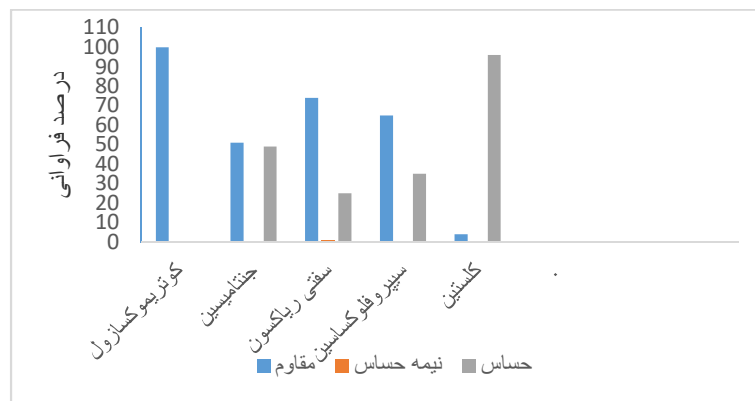


شکل ۲- محصول PCR ژن *sul2*، ۱-۲: اشیریشیا کلی، ۳-۵: اسمنتوباکتر، ۶: ladder 100bp

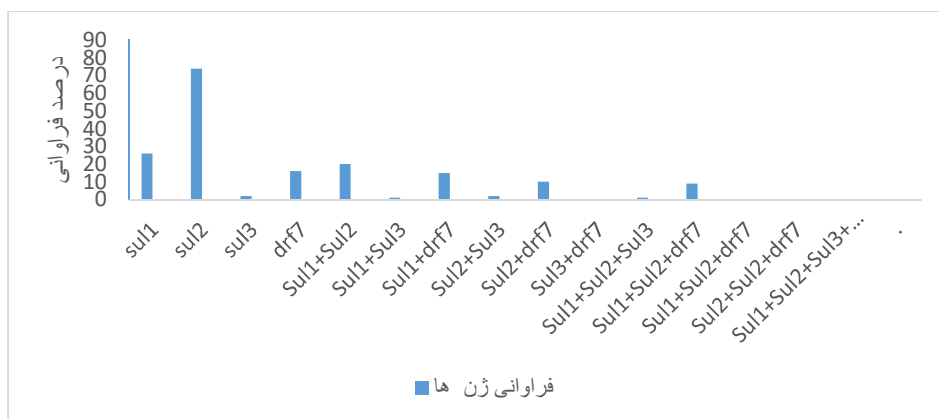
۷: پروتئوس، ۸: انتروباکتر، ۹ و ۱۰: کلپسیلا، ۱۱: کنترل منفی در باکتری های مقاوم به کوتریموکسازول



شکل ۳- محصول PCR ژن *sul3*: ۱-۴ اشریشیا کلی، ۵ و ۷ پسمودوموناس، ۸: سمیترباکتر، ۶: ladder 100bp، ۹: پروتئوس، ۱۰: *drf7* در باکتری های مقاوم به کوتریموکسازول



نمودار ۱- مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی در باکتری های مقاوم به کوتریموکسازول



نمودار ۲- فراوانی ژن های مقاومت در باکتری های مقاوم به کوتریموکسازول

References

- Al-Agamy, M., 2012. Molecular resistance mechanisms to older antimicrobial agents in *Escherichia coli* isolates. *J African Microbiol.* 6, pp. 106-111.
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J.C. and Piexe, L., 2005. Dissemination of sulfonamide resistance gene (*sul1*, *sul2* and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, pp. 836-9.
- Arabi, H., Pakzad, I., Nasrollahi, A., Hosainzadegan, H., Azizi Jalilian, F., Taherikalani, M., Samadi, N. and MonadiSefidan, A., 2015. Lactamase (ESBL) and Non-ESBL Producing *Escherichia coli* Isolated From Iranian Hospitals. *Jundishapur J Microbiol.* 8(7), e19961.
- Bean, D., Livermore, D.M., Hall, L. and Papa, I., 2005. Resistance among *Escherichia coli* to sulfonamides and other antimicrobials now little used in man. *J Antimicrob Agents Chemother.* 56, pp. 962-966.
- Bean, D.C., Livemore, D.M. and Hall, L.M., 2009. E.coli: implications for Plasmids imparting sulfonamide resistance in persistence. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, pp. 1088-1093.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A. and Mietzner, T.A., 2010. Medical Microbiology. UniteStates, The Mc Graw-Hill Companies, Chapter 15, P. 219.
- Carattoli, A., 2009. Resistance plasmide families in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 53, pp. 2227-2238.
- Choi, S.M., Kim, S.H., Kim, H.J., Lee, D.G., Choi, J.H., Yoo, J.H., Kang, J.H., Shin, W.S. and Kang, M.W., 2003. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. *J Korean Med Sci.* 18(5), pp. 631-636.
- Foxman, B., Gillespie, B., Koopman, J., Zhang, L., Palin, K., Tallman, P., Marsh, J.V., Spear, S., Sobel, J.D., Marty, M.J. and Marrs, C.F., 2000. Risk factors for second urinary tract infection among college women, *Am J of Epidem.* 151(5), pp. 1194-1204.
- Frank, T., Gautier, V., Talarmin, A., Bercion, R. and Guillaume., 2007. Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in Enterobacteriaceae, Central African Republic (CAR). *J Antimicrob Chemother.* 59, pp. 742-745.
- Ghosh, S., Pazhani, G.P., Chowdhury, G., Guin, S. and Dutta, S., 2011. Genetic characteristics and changing antimicrobial resistance among *Shigella* spp. Isolated from hospitalized diarrhoeal patients in Kolkata, India. *J Med Microbiol.* 60, pp. 1460-1466.
- Grape, M., Farra, A., Kronall, G. and Sundstrom, L., 2005. Integrons and gene cassettes in clinical isolates of co trimoxazole resistant gram negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 11, pp. 185-192.
- Grape, M., Motakefi, A., Pavuluri, S. and Kahlmeter, G., 2007. Standard and realtime multiplex PCR methods for detection of trimethoprim resistance *drf* genes in large collections of bacteria. *Clin Microbiol Infec.* 13(11), pp. 1112-1118.
- Hakemi Vala, M., Abdi, S.H., Ranjbar, R. and Bagheri Bejestani, F., 2013. Dispersion of *qnrA* gene in *E.coli* resistant to fluoroquinolones isolated of pateints in Imam Khomeini hospital. *ranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine.* 19(64), pp. 63-66. [In Persian]
- Hameda, H.M., Goda, A.M. and Abd El-Gaber, G., 2017. Molecular Characterization of Trimethoprim Sulphamethoxazole Resistant *Stenotrophomonas maltophilia* at Sohag University Hospital. *Egypt J Med Microbiol.* 26(1), pp.105-111
- Hammerum, A., Sandvaye, D. and Andersen, S.R., 2006. Detection of *sul1*, *sul2*, *sul3*, in sulfonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans pork and pigs in

- Denmark. *Int J Food Microbiol.* 106, pp. 235-239.
- Jasemi, S.S., Alipoor, F., Dehbashi, S., Mardaneh, J., 2014. Isolation of *Citrobacter* spp. from Blood Specimens in Patients Hospitalized in Kermanshah Imam Khomeini hospital. and determination of the of isolates sensitivity to antibiotics. *Journal of Birjand University of Medical Sciences.* 21(3), pp. 394-400. [In Persian]
- Kholat Abadi, R., Moniri, R., Shajari, Gh., Nazem Shirazi, M.H., Mosavi, S.Gh., Ghasemi, A. and Hajaghazadeh, S., 2009. Study the antibiotic resistance pattern and spriding of antibiotic resistant gene in acinetobacter strains isolated in kashan shahid beheshti hospital. *FEYZ.* 12(4), pp. 60-66. [In Persian]
- Koljalg, S., Trusaluk, K., Vainumae, I., Stsepetova, J. and Mikelsaar, M., 2009. Presistance of *Escherichia coli* colonies and phenotype and genotypic antibiotic resistance in recurrent urinary tract infections in childhood. *J Clin microbial.* 47, pp. 99-105.
- Larochelle, A., Lovatsis, D., Walter, J.E., Easton, W. and Farrell, SA., 2010. Recurren Urinary tract infection. *J Obstet Gynaecol Can.* 32, pp. 1082-1101.
- Moura, A. and Nicolau, A., 2009. Antibiotherapy and pathogenesis of uncomplicated UTI. *J Appl Microbiol.* 106, pp. 1779-1791.
- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D., 2012. Brock Biology of Microorganisms (13th ed.), Pearson Education, p. 797 ISBN 9780321735515.
- Mazel, D., 2006. Integrons: Agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol.* 4, pp. 608-620.
- Molaabaszadeh, H., Hajisheikhzadeh, B., Mollazadeh, M., Eslami, K., MohammadzadehGheshlaghi, N., 2013. The study of Sensibility and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Iso-lated from urinary tract infection in Tabriz City. *Journal of Fasa University of Medical Sciences.* 3(2), pp. 149-154. [In Persian].
- Moghbeli, M., Behnood, V. and Ranjbar, R., 2014. A study to determine antibiotic resistance and recognition *qnr* genes in *Shigella* strains isolated from patients admitted to Mofid's Children Medical Center, Tehran. *Journal of Microbial World.* 7(1), pp. 49-57. [In Persian]
- Morsi, S.S., Sharaf, H.E. and Gerges, M.A., 2016. Association of sul genes and class1 integron with Trimethoprim sulfamethoxasole resistance clinical isolates in Zagazig University, Egypt. *Afr J. clin. Exper. Microbiol.* 17(3), pp. 158-165.
- Mulvey, M. and Simor, A., 2009. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? *CMAJ.* 180, pp. 408-415.
- Nowroozi, J., Akhavansepahi, A. and Bazazzadeh, N., 2013. Recognition of Sul2 gene in in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection in Khoyy city clinical centers. *Journal of Zanjan University of Medical Sciences & Health Services.* 21(88), pp. 76-83. [In Persian]
- Rahman, M., Shoma, S., Rashid, H., Arifeen, S.E. and Baqui, A.H., 2007. Increasing spectrum in antimicrobial resistance of *Shigella* strains in Bangladesh: Resistance to azithromycin and ceftriaxone and decreased susceptibility to ciprofloxacin. *J Health Popul Nutr.* 25(2), pp. 158-167.
- Recchia, G.D. and Hall, R.M., 1997. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends in Microbiology.* 5, pp. 389-394.
- Sheng, W.H., Wang, J.T., Lin, M.S., Chang, S.C., 2007. Risk factors affecting in-hospital mortality in patients with nosocomial infections. *J Formos Med Assoc.* 106 (2): 110-118.
- Skold, O., 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res.* 32, pp. 261-73.
- Trobos, M., Jakobsen, L. and Olsen, K.E., 2008. Prevalence of sulfonamide resistance and class 1 integron genes in

Escherichia coli isolates obtained from broilers, broiler meat healthy humans and urinary infections in Denmark. *J Antimicrob Agents*. 32, pp. 367-369.
Wu, S., Dalsgard, A., Hammerum, A.M., Porsbo, L. and Jensen, L.B., 2010.

Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes. Among E.coli from pigs, pig carcasses and human. *Acta Vet Scand*. 52, pp. 1-7.

Frequencies of *sul1*, *sul2*, *sul3*, *drf7* Genes in Co-Trimoxazole Resistance in Gram-Negative Bacilli Isolated from Clinical Specimens of Hospitalized Patients in Pars General Hospital, Tehran, Iran

Mohammadi, F., MSc. Student, Department of Microbiology, Biological Science College, Islamic Azad University, Varamin-pishva branch, Varamin, Iran

Noorbakhsh, F., Ph.D. Assistant Professor, Department of Microbiology, Biological Science College, Islamic Azad University, Varamin-pishva branch, Varamin, Iran- Corresponding Author: niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

Honarmand jahromi, S., Ph.D. Assistant Professor, Department of Microbiology, Biological Science College, Islamic Azad University, Varamin-pishva branch, Varamin, Iran

Received: Dec 30, 2016

Accepted: Aug 12, 2017

ABSTRACT

Background and Aim: In the last few decades co-trimoxazole, an antibacterial combination of trimethoprim and sulfamethoxazole, has been used for treatment of bacterial infections, but due to the vast usage of these drugs, resistant strains have appeared throughout the world. One of the reasons for resistance to co-trimoxazole is related to *drf* genes, which are responsible for trimethoprim resistance, while the sulfamethoxazole resistance is due to sulfonamide *sul* genes. The aim of this study was to investigate drug resistance and frequencies of resistance genes in gram-negative bacteria isolated from clinical specimens.

Materials and Methods: Clinical samples were collected from patients in Pars Hospital, Tehran, Iran, in which presence of gram-negative bacteria was confirmed by biochemical tests. Then antibiotic susceptibility tests were performed for 5 antibiotics by disk diffusion agar technic. DNA was extracted from bacteria resistant to co-trimoxazole, followed by PCR using specific primers for *sul1*, *sul2*, *sul3*, and *drf7* genes.

Results: In the co-trimoxazole-resistant bacteria, 26%, 74%, 2% and 16% of the isolates contained *sul1* gene, *sul2* gene, *sul3* gene and *drf7* gene, respectively. Further analysis of the data showed that 51% of the isolates were resistant to gentamicin, 74% to ceftriaxone, 65% to ciprofloxacin and 3% to colistin. For resistance to trimethoprim only the *drf7* gene was used.

Conclusion: The results of this study show that in the isolates of co-trimoxazole-resistant gram-negative bacteria, the *sul2* gene has a major role in development of resistance to sulfonamides. In this study only the *drf7* gene was used to assess the resistance of trimethoprim, so we recommend to conduct studies also on other *drf* genes, so that the importance of each in resistance to co-trimoxazole can be determined.

Keywords: Cotrimoxazole, Gram-Negative Bacilli, Antibiotic Resistance, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *drf7* genes