

Original Article

Molecular Evaluation of the 2'-aminoglycoside Nucleotidyltransferase Gene in *Escherichia coli* Isolates that Produce Hemolysin and are Sensitive to Mannose Type I pili and P

Neda Soleimani¹, Baharak Farhangi², Morteza Sattari³, Abbas Yadegar¹,
Majid Sadeghizadeh^{4*}

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- M.Sc., Department of Genetics, Faculty of Pardis, Guilan University, Rasht, Iran
- 3- Associated Professor, Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 4- Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: sadeghma@modares.ac.ir

Received: 17/Mar/2014, Accepted: 17/May/2014

Abstract

Objective: Aminoglycosides are highly potent, broad-spectrum antibiotics with many desirable properties for the treatment of life-threatening infections. *Escherichia coli* (*E. coli*) is the most common cause of urinary tract infection (UTI). Antibiotic resistance has recently become prevalent. Enzymatic inactivation of aminoglycosides by aminoglycoside-modifying enzymes is the main mechanism of resistance to these antibiotics in *E. coli*. The main purpose of this research is to evaluate the presence of the 2'-aminoglycoside nucleotidyltransferase (*ant(2'')-Ia*) gene in *E. coli* isolates sensitive to mannose and hemolysin production.

Methods: After collecting 276 *E. coli* isolates from patients that referred to Tehran Heart Center, we used the disk diffusion method to determine the resistance patterns of isolates toward Gentamicin, Tobramycin, Kanamycin, Amikacin and Netilmicin antibiotics according to the CLSI principles. We evaluated hemolysin production by assessing the ability of the isolates to grow on sheep and human blood agar media. Chromosomal DNA of the isolates was extracted using DNA extraction kits and PCR method used for the detection of the *ant(2'')-Ia* gene. In order to study mannose sensitivity we used human RBCs.

Results: Results obtained from antibiotic resistance determination tests showed that the highest rate of resistance was observed against tobramycin (24/63%). Of those resistant, 6% could produce hemolysin in both sheep and human blood agar media. Mannose sensitivity was observed in 14% of isolates during agglutination. There were 24.63% of *E. coli* isolates resistant to Tobramycin, 23.18% resistant to kanamycin, 21.01% resistant to gentamicin, 6.15% resistant to netilmicin and 3.62% resistant to amikacin. *ant(2'')-Ia* gene was detected in 47.88% of *E. coli* isolated from urine.

Conclusion: Due to the high prevalence of urinary tract infections caused by uropathogenic *E. coli* (UPEC) strains and the increasing rate of antibiotic resistance, periodic evaluations should be conducted for outbreaks of resistance in order to select the most suitable treatment to prevent routinely increasing antibiotic resistance.

Keywords: Broad-spectrum antibiotics, Aminoglycoside resistance, Urinary tract infection

ارزیابی مولکولی حضور ژن رمز کننده ۲- آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفراز در جدایه‌های اشیریشیا کلی دارای حساسیت مانوزی (پیلی تیپ I و P) و تولید کننده همولیزین

ندا سلیمانی^۱، بهارک فرهنگی^۲، مرتضی ستاری^۳، عباس یادگار^۱، مجید صادقی‌زاده^۴

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی پردیس گیلان، رشت، ایران
- ۳- دانشیار، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک
Email: sadeghma@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۲/۲۷

دریافت مقاله: ۹۲/۱۲/۲۶

چکیده

هدف: آمینوگلیکوزیدها از جمله آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف هستند که برای درمان عفونت‌های باکتریایی کاربرد دارد. اشیریشیا کلی شایع‌ترین عامل عفونت مجاری ادراری است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشیریشیا کلی رو به افزایش است. غیر فعال‌سازی آنزیمی آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزید توسط آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در اشیریشیا کلی است. هدف اصلی این مطالعه ارزیابی مولکولی حضور ژن رمز کننده *ant(2'')-Ia* در جدایه‌های اشیریشیا کلی دارای حساسیت مانوزی (پیلی تیپ I و P) و تولید کننده همولیزین است. مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری ۲۷۶ جدایه اشیریشیا کلی از بیماران مراجعه کننده به مرکز قلب تهران، الگوی مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین، توبرامایسین، کانامایسین، آمیکاسین و نتیل‌میسین به روش انتشار از دیسک و با رعایت اصول CLSI تعیین شد. برای بررسی حساسیت به مانوز از گلوبول قرمز انسان و برای بررسی قدرت تولید همولیزین جدایه‌ها از محیط بلاد آگار حاوی خون گوسفند و انسان استفاده شد. DNA کروموزومی با کیت استخراج و PCR برای ژن *ant(2'')-Ia* انجام شد.

نتایج: نتایج بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نشان داد که بیشترین میزان مقاومت در برابر توبرامایسین (۲۴/۶۳ درصد) بود. ۶ درصد از جدایه‌های مقاوم به‌طور همزمان قدرت تولید همولیزین را در دو محیط بلاد آگار حاوی خون گوسفند و انسان نشان دادند. ۱۴ درصد از جدایه‌های حساس به مانوز به‌طور همزمان قدرت آگلوتیناسیون را داشتند. ۲۴/۶۳ درصد از جدایه‌های اشیریشیا کلی 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 جدایه‌های اشیریشیا کلی ژن *ant(2'')-Ia* شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع بالای عفونت‌های مجاری ادراری توسط سویه‌های اشیریشیا کلی پاتوژن دستگاه ادراری و افزایش بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این سویه‌ها، لازم است به‌صورت دوره‌ای میزان مقاومت بررسی شود تا بدین‌وسیله با انتخاب مناسب‌ترین گزینه درمانی از افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی جلوگیری شود.

کلیدواژگان: آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، مقاومت آمینوگلیکوزیدی، عفونت مجاری ادراری

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، صفحات: ۵۹-۷۰

ارزیابی مولکولی حضور ژن ۲-آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفراز در جدایه‌های اشریشیا کلی

مقدمه

مقاومت به آمینوگلیکوزیدها است [۴]. از این بین غیر فعال‌سازی آنزیماتیک آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم‌های تغییر دهنده آن‌ها، اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در باکتری‌های گرم منفی است. آنزیم نوکلئوتیدیل ترانسفرازها با استفاده از مولکول ATP به‌عنوان دهنده، گروه آدنیل را به گروه‌های هیدروکسیل آمینوگلیکوزیدها انتقال می‌دهد و منجر به غیر فعال شدن آن‌ها می‌شود. در این خانواده پنج عضو وجود دارد که شامل ANT(2''), ANT(4), ANT(3), ANT(6) و ANT(9) است. یکی از شایع‌ترین این آنزیم‌ها، آنزیم I-ANT(2'') است که سبب مقاومت به جنتامیسین، کانامایسین (Kanamycin)، سیزومایسین (Sisomicin) و توبرامایسین (Tobramycin) می‌شود. این آنزیم به‌طور گسترده در اغلب باکتری‌های گرم منفی حضور دارد. سه ژن *ant(2'')-Ia*، *ant(2'')-Ib* و *ant(2'')-Ic* دارای فعالیت O-نوکلئوتیدیل ترانسفرازهای گزارش شده است [۳، ۴]. جدایه‌های حامل شاخص‌های بیماری‌زایی و در عین حال ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک یک خطر محسوب می‌شود. تشخیص سریع آن‌ها در نمونه‌های ادرار، می‌تواند ما را در تشخیص زود هنگام پیلودنفریت احتمالی و تسریع در مدیریت درمانی کمک نماید. هدف از این مطالعه ارزیابی مولکولی حضور ژن 2'-aminoglycoside nucleotidyltransferase [ANT(2'')] در جدایه‌های اشریشیا کلی دارای حساسیت مانوزی (پیلی تیپ I و P) و تولید کننده همولیزین است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و تعیین هویت باکتری‌ها

تعداد ۲۷۶ جدایه اشریشیا کلی جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری بیماران مراجعه کننده به مرکز قلب تهران جمع‌آوری شد. جدایه‌های اشریشیا کلی با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل چگونگی تخمیر قندها در محیط TSI آگار (Triple Sugar Iron Agar)، تولید اندول و حرکت در

عفونت مجاری ادراری (Urinary Tract Infection: UTI) یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در انسان است که تحت تأثیر جنسیت و سن قرار می‌گیرد. اشریشیا کلی شایع‌ترین عامل عفونت ادراری در میان باکتری‌های جدا شده از بیماران سرپایی یا بستری در بیمارستان در مناطق مختلف جغرافیایی در سراسر جهان است که ۸۰ درصد از عفونت‌های ادراری را به خود اختصاص داده است [۱]. مهم‌ترین خصوصیت این جدایه‌ها توانایی کلونیزه شدن آن‌ها در سطح سلول‌های یوروپیتلیوم (Uroepithelium) میزبان به واسطه داشتن آدهزین (Adhesin) و پیلی (Pili) است و با تولید همولیزین (Hemolysin) سبب آسیب سلولی و بافتی بیشتری در میزبان می‌شوند. عودهای مکرر به دلیل مکانیسم‌های دفاعی باکتری و مقاومت آنتی‌بیوتیکی دیده می‌شود. اهمیت بالینی آمینوگلیکوزیدها به این دلیل است که علیه طیف وسیعی از باکتری‌های هوازی به‌ویژه باکتری‌های گرم منفی، بسیاری از استافیلوکوک‌ها و برخی استرپتوکوک‌ها مؤثر است و بیشترین کاربرد را در درمان عفونت‌های ناشی از باسیل‌های گرم منفی هوازی و بی‌هوازی اختیاری نشان می‌دهد. امروزه جدایه‌های اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله آمینوگلیکوزیدها نشان می‌دهد. جنتامیسین (Gentamicin) دارای فعالیت نسبتاً بیشتری علیه اشریشیا کلی و گونه‌های اسراشیا (*Serratia* ssp.) است [۲-۴]. ترکیب یک آمینوگلیکوزید با یک عامل ضد دیواره مانند بتالاکتام (Beta Lactam) یا گلیکوپپتیدها ایجاد اثر سینرژیستی (Synergism) 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 غیر فعال‌سازی آنزیمی دارو، مسئول

جدایه‌های مقاوم صورت گرفت [۷]. به منظور بررسی قدرت آگلوتیناسیون و تعیین حساسیت به مانوز جدایه‌های یوروپاتوژنیک اشریشیا کلی (Uropathogenic *Escherichia coli*: UPEC)، از خون تازه سیراته گروه A انسان (HRBC) استفاده شد. خون سیراته سه بار با PBS شستشو داده شد، سپس سوسپانسیون ۳ درصد از خون شسته شده تهیه شد و ۱۰ میکرولیتر از گلبول قرمز انسانی و هم حجم آن از سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند باکتری روی اسلاید قرار داده شد. پس از گذشت ۲ دقیقه نتایج آگلوتیناسیون روی اسلاید بررسی شد. نتایج براساس سرعت واکنش از - تا +۳ رتبه‌بندی شدند [۸].

بررسی حساسیت مانوزی

برای بررسی حساسیت نسبت به قند مانوز، از PBS حاوی ۲۵ میلی‌گرم قند دی-مانوز در هر میلی‌لیتر آن استفاده شد. سپس آزمون هماگلوتیناسیون (Hemagglutination) تکرار شد [۸].

بررسی تولید همولیزین

پس از جداسازی و شناسایی جدایه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید شناسایی پیلی تیپ I یا پیلی حساس به مانوز با آگلوتیناسیون گلبول قرمز انسان یا برای جدایه‌های مقاوم تعیین شد و برای بررسی قدرت تولید همولیزین، جدایه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید به‌طور مجزا در محیط بلاگ آگار حاوی خون گوسفند و انسان کشت داده شد و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه (گرم‌گذاری) شدند. نتایج براساس مشاهده هاله شفاف همولیزین در اطراف کلونی‌ها گزارش شد و براساس مقدار تولید همولیزین از - تا +۳ رتبه‌بندی شدند [۹].

استخراج DNA

برای استخراج و خالص‌سازی DNA از جدایه‌های

محیط SIM (SH₂, Indole, Motility)، واکنش در محیط VP (Methyl Red) MR و (Vogus Proskeur) و عدم رشد در محیط سیمون سیترات (Simmon Citrate) و در نهایت بررسی نتایج با استفاده از جداول استاندارد، تعیین هویت شدند. در تمام آزمایش‌های باکتری‌شناسی از سویه استاندارد اشریشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲ آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس به‌عنوان سویه کنترل استفاده شد. در نهایت از تمامی جدایه‌ها در محیط تریپتیک سوی برات (Tryptic Soy Broth) تهیه شده از شرکت Merck (آلمان) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول کشت ذخیره تهیه شد و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۵].

تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

برای تعیین الگوی مقاومت جدایه‌ها، حساسیت آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین (Gentamicin، ۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (Amikacin، ۳۰ میکروگرم)، نتیل‌میسین (Netilmicin، ۳۰ میکروگرم)، توبرامیسین (Tobramycin، ۱۰ میکروگرم) و کانامایسین (Kanamycin، ۳۰ میکروگرم) به روش انتشار از دیسک کربی - بائر (Kirby Bauer Disk Diffusion Method) با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (Mast، آمریکا) و تفسیر نتایج حاصل مطابق با استانداردهای (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI انجام شد. برای کنترل کیفی دیسک‌ها از سویه‌های استاندارد اشریشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲، استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳ (موجود در آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران) استفاده شد [۶].

شناسایی پیلی تیپ I و P

پس از جداسازی و شناسایی جدایه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید، شناسایی پیلی تیپ I یا پیلی حساس به مانوز با آگلوتیناسیون (Agglutination) گلبول قرمز انسان برای

ارزیابی مولکولی حضور ژن ۲- آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفراز در جدایه‌های اشریشیا کلی

به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محصولات PCR توسط الکتروفورز روی ژل ۱ درصد آگارز از یکدیگر جدا شد. برای تعیین اندازه محصولات PCR از یک نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas, لیتوانی) استفاده شد.

جدول ۱ حجم و غلظت نهایی مواد تشکیل دهنده واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر

| غلظت | حجم (میکرولیتر) | ترکیبات واکنش |
|--------------|-----------------|-----------------------|
| ۱X | ۲/۵ | بافر PCR ۱۰X |
| ۱/۵ میلی مول | ۰/۷۵ | MgCl ₂ |
| ۰/۲ میلی مول | ۰/۵ | dNTPs |
| ۰/۱ میکرومول | ۱ | آغازگر پیشرونده |
| ۰/۱ میکرومول | ۱ | آغازگر برگشتی |
| - | ۱۶/۲۵ | آب مقطر استریل (D.W.) |
| - | ۲ | DNA الگو |
| ۱/۵ واحد | ۱ | Taq DNA polymerase |
| - | ۲۵ | حجم نهایی |

نتایج

کلیه جدایه‌ها از نظر تخمیر گلوکز و لاکتوز، حرکت، آزمایش MR و تولید اندول مثبت بودند و از نظر استفاده از سیترات، آزمایش VP، اکسیداز و تولید اوره‌آز منفی ثبت شدند. 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. مقاومت آن‌ها به پنج صورت تک مقاومتی، دو مقاومتی، سه مقاومتی، چهار مقاومتی و پنج مقاومتی ظاهر شد. 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.

اشریشیا کلی و سویه‌های استاندارد، به‌منظور انجام واکنش‌های PCR از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) استفاده شد. تک کلونی از جدایه‌ها در محیط مایع LB کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) 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 (Labsystems, فنلاند) اندازه‌گیری شد. الکتروفورز DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام شد. الکتروفورز به‌صورت 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 داگ (Biometra, آلمان) بررسی شد.

واکنش PCR

برای تکثیر ژن *ant(2'')-Ia* از یک جفت آغازگر (Primer) اختصاصی که توسط ماینارد (Maynard) و همکاران [۱۰] معرفی شده است، استفاده شد.

توالی پیشرونده 5' TCCAGAACCTTGACCGAAC 3'
توالی برگشتی 5' GCAAGACCTCAACCTTTTCC 3'
برای ژن هدف است.

مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۲/۵ میکرولیتر MgCl₂، ۰/۲ میکرولیتر dNTPs، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (سیناژن، ایران) بود که حجم نهایی با آب دیونیزه استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler gradient از شرکت Eppendorf آلمان) انجام شد. اتصال آغازگرها در ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت. در واکنش‌های PCR از DNA الگوی سویه استاندارد اشریشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲ به‌عنوان کنترل منفی و از سویه استاندارد اشریشیا کلی ۸۵۰۸۵ (*ant(2'')-Ia+*)

۲۸ جدایه (۳۹/۴۳ درصد) به سه آنتی بیوتیک تورامایسین، جنتامیسین، کانامایسین مقاومت نشان دادند. ۱۷ جدایه (۲۳/۹۴ درصد) به دو آمینوگلیکوزید مقاومت نشان دادند که این نوع مقاومت به دو شکل تورامایسین، جنتامیسین (۴ جدایه)، تورامایسین، کانامایسین (۱۳ جدایه) مشاهده شد. در نهایت ۳ جدایه (۴/۲۲ درصد)، دارای مقاومت تکمی به آمینوگلیکوزیدها بودند. نتایج حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها به تفکیک در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول 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 |
| تورامایسین | ۲۰۸ | ۷۵/۳۶ | ۰ | ۰ | ۶۸ | ۲۴/۶۳ |
| کانامایسین | ۲۱۰ | ۷۶/۸۰ | ۲ | ۰/۷۲ | ۶۴ | ۲۳/۱۸ |
| جنتامیسین | ۲۱۴ | ۷۷/۵۳ | ۴ | ۱/۴۴ | ۵۸ | ۲۱/۰۱ |
| نتیل میسین | ۲۵۲ | ۹۱/۳ | ۷ | ۲/۵۳ | ۱۷ | ۶/۱۵ |
| آمیکاسین | ۲۵۹ | ۹۳/۸۴ | ۷ | ۲/۵۳ | ۱۰ | ۳/۶۲ |

نتایج بررسی تولید همولیزین نشان می‌دهد که ۳۸ درصد از جدایه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، قدرت تولید همولیزین در محیط بلاد آگار حاوی خون علاوه بر این ۳۰ درصد از جدایه‌های مقاوم به‌طور همزمان قدرت تولید همولیزین را در دو محیط بلاد آگار حاوی خون گوسفند و انسان نشان دادند (نتایج الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی و تولید همولیزین در جدایه‌های مقاوم در جدول ۳ نشان داده شده است).

جدول ۳ الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی و تولید همولیزین در جدایه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید اشریشیا کلی جدا شده از ادرار

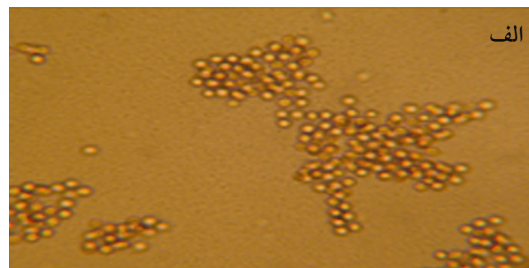
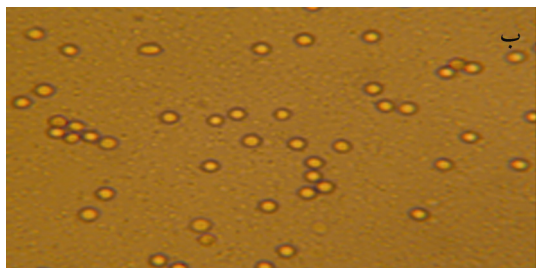
| شماره جدایه | تولید همولیزین (Human blood) | تولید همولیزین (Sheep blood) | فنوتیپ مقاومت آنتی بیوتیکی | |
|-------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|----|
| | | | R | I |
| ۲ | + | + | GM, TN | K |
| ۱۳ | + | - | GM, TN, K | - |
| ۱۶ | + | - | GM, TN, K | NT |
| ۲۱ | +++ | +++ | GM, NT, TN, K | - |
| ۳۶ | + | + | GM, TN | - |
| ۴۹ | +++ | +++ | GM, TN | - |
| ۶۰ | +++ | +++ | GM, TN | - |
| ۶۸ | +++ | +++ | GM, NT, K | TN |
| ۷۹ | + | - | GM, NT, K | - |
| ۸۸ | + | + | TN, K | TN |
| ۹۵ | + | + | GM, TN | - |
| ۱۰۴ | + | + | GM, TN | K |
| ۱۴۴ | + | + | TN, K | - |
| ۱۹۶ | +++ | +++ | GM, TN | K |
| ۱۹۷ | + | + | GM, AK, NT, TN, K | - |
| ۲۰۴ | + | - | GM, TN, K | - |
| ۲۰۹ | + | + | GM, NT, TN, K | - |
| ۲۱۷ | +++ | +++ | GM, TN, K | - |
| ۲۳۳ | +++ | +++ | GM, TN, K | - |

R: مقاوم؛ I: متوسط؛ GM: جنتامیسین؛ AK: آمیکاسین؛ NT: نتیل میسین؛ TN: تورامایسین؛ K: کانامایسین

ارزیابی مولکولی حضور ژن ۲- آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفراز در جدایه‌های اشریشیا کلی

الف جدایه‌های UPEC دارای پیلای P مقاوم به این قند است، بنابراین پیلای موجب تجمع اریتروسیت‌ها شده است (شکل ۱).

در شکل ۱ تصویر ب جدایه‌های UPEC دارای پیلای تیپ I و حساس به مانوز، با قند مانوز واکنش داده و قادر به آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز انسانی نیست، در تصویر



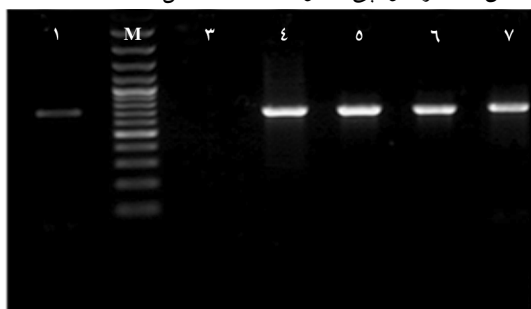
شکل ۱ بررسی حساسیت به مانوز جدایه‌های اشریشیا کلی؛ تصویر الف جدایه مقاوم به مانوز و تصویر ب جدایه حساس به مانوز (بزرگنمایی $\times 600$)

جدول ۴ الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حساسیت و مقاومت به مانوز در جدایه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید اشریشیا کلی جدا شده از ادرار

| فنوتیپ مقاومت آنتی‌بیوتیکی | | MSHA | MRHA | شماره جدایه |
|----------------------------|----|------|------|---------------|
| R | I | | | |
| GM, NT, K | TN | - | + | ۶۸ |
| GM, TN | K | - | + | ۲۱۹، ۱۹۳، ۱۰۴ |
| GM, TN, K | - | - | + | ۲۲۲، ۲۱۷ |
| GM, TN | - | - | + | ۲۳۰ |

R: مقاوم؛ I: متوسط؛ GM: جت‌امیسین؛ AK: آمیکاسین؛ NT: نتیل میسین؛ TN: توبرامایسین؛ K: کانامایسین؛ MSHA: هم‌آگلوتیناسیون حساس به مانوز؛ MRHA: هم‌آگلوتیناسیون مقاوم به مانوز

حساس از نظر فنوتیپی وجود نداشت (شکل ۲).



شکل ۲ چاهک ۱) سویه کنترل مثبت، چاهک M نشانگر مثبت ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۲) چاهک کنترل منفی، ستون‌های ۴-۶-۷) جدایه‌های بالینی جدا شده از ادرار دارای ژن *ant(2'')-Ia*

بین حضور ژن *ant(2'')Ia* و مقاومت به توبرامایسین و

نتایج حاصل از آزمایش حساسیت به مانوز در جدایه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید اشریشیا کلی جدا شده از ادرار نشان داد که ۱۴ درصد از جدایه‌ها نسبت به حضور مانوز در هنگام آگلوتیناسیون حساسیت نشان دادند. همچنین تنها ۶ درصد از جدایه‌های حساس به مانوز، به‌طور هم‌زمان قادر به تولید همولیزین در هر دو محیط بلاد آگار حاوی خون انسان و گوسفند بودند (جدول ۴).

بررسی حضور ژن *ant(2'')-Ia* در جدایه‌ها

نتایج PCR جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد که ۴۷/۸۸ درصد دارای ژن *ant(2'')-Ia* بودند و ژن مذکور در جدایه‌های

جتنامیسین 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 جتنامیسین و کانامایسین مقاوم بودند حضور دارد. از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین حضور ژن $ant(2'')Ia$ و مقاومت به توبرامایسین و جتنامیسین و کانامایسین مشاهده شد. در جدول ۵ ارتباط بین حضور ژن‌های آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزید و فنوتیپ‌های مختلف مقاومت آمینوگلیکوزیدی در جدایه‌های بالینی اشریشیا کلی مشاهده می‌شود.

جدول ۵ 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, N, TN, K | + |
| GM, TN | + |
| TN, K | + |
| GM, TN, K | + |
| TN | + |
| K | + |
| N | - |
| GM | + |
| AK | - |

GM: جتنامیسین؛ AK: آمیکاسین؛ N: نتیل میسین؛ TN: توبرامایسین؛ K: کانامایسین؛ +: مثبت؛ -: منفی

بحث

مجاری ادراری شایع‌ترین جایگاه کلونیزاسیون و عفونت‌های باکتریایی در افراد جامعه و بیماران بستری در بیمارستان‌ها است. UPEC به‌عنوان شایع‌ترین عامل UTI عفونت مجاری ادراری است. به‌نظر می‌رسد جدایه‌های اشریشیا کلی که دارای قابلیت عفونت‌زایی ادراری هستند ویژگی‌های ویرولانسی مختلفی را از خود نشان می‌دهند که در کلونیزاسیون سطوح مخاطی میزبان و مهار دفاع میزبانی نقش دارند. بدین ترتیب می‌تواند به باکتری فرصت‌تهاجم به مجاری ادراری را بدهند که در حالت طبیعی استریل هستند. نشان داده شده است که توانایی اتصال به سطوح اپی‌تلیال نقش پیش شرط و لازم را

در کلونیزاسیون مجاری ادراری دارد که می‌تواند در غیاب ناهنجاری‌های اورولوژیک منجر به UTI شود. جدایه‌های UPEC دارای عوامل بیماری‌زایی تخصص یافته‌ای هستند که به آن‌ها توان تهاجم به سلول، اختلال در مکانیسم‌های سلولی، آسیب به بافت‌ها یا تحریک یک پاسخ التهابی مضر در میزبان را می‌دهد [۱۱-۱۵]. از آن‌جا که باکتری اشریشیا کلی یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های مجاری ادراری است، بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن همزمان با حضور عوامل بیماری‌زایی دارای اهمیت است.

در این تحقیق شیوع ژن مقاومت $ant(2'')Ia$ در میان ۷۱ جدایه مقاوم به آمینوگلیکوزیدی از ۲۷۶ جدایه اشریشیا کلی عفونت دستگاه ادراری بیماران مراجعه‌کننده به مرکز قلب تهران با استفاده از روش PCR بررسی شد. وانگ هوف (Vanhoof) و همکاران در سال ۱۹۹۹ با بررسی ۸۹۷ جدایه انتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae) جدا شده از خون، مشاهده کردند ۵/۹ درصد جدایه‌ها نسبت به جتنامیسین، ۷/۷ درصد نسبت به توبرامایسین، ۷/۵ درصد به نتیل میسین و ۲/۸ درصد به آمیکاسین مقاومت دارند [۱۶]. در مطالعه کونگ (Kong) و همکاران در سال ۲۰۰۶ روی ۴۴ جدایه بالینی اشریشیا کلی، ۱۸/۱۸ درصد مقاومت نسبت به آمیکاسین، ۵۶/۸۲ درصد به جتنامیسین، ۶۳ درصد به توبرامایسین را نشان دادند [۱۷]. طی مطالعه هو (Ho) و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی ۲۴۹ جدایه اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های بالینی انسان، ۸۳/۳ درصد از جدایه‌ها نسبت به جتنامیسین مقاوم گزارش شدند [۱۸].

در مطالعه حاضر مقاومت نسبت به سه آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیدی، توبرامایسین، کانامایسین و جتنامیسین به ترتیب با ۲۴/۶۳، ۲۳/۱۸ و ۲۱/۰۱ درصد مشاهده شد. این مقاومت از اهمیت زیادی برخوردار است زیرا این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله داروهایی است که در درمان عفونت‌های ناشی از UPEC دارای اهمیت بالینی و درمانی است. همچنین در این بررسی مقاومت سطح پایین‌تری در مقابل دو آنتی‌بیوتیک آمیکاسین و

ارزیابی مولکولی حضور ژن ۲- آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفراز در جدایه‌های اشریشیا کلی

دارای ژن *aac(3)-II* بودند، MIC در حدود ۳۲ تا ۵۱۲ میلی‌گرم در لیتر را داشتند که ارتباط بین میزان MIC و مکانیسم اختصاصی ژنتیکی مقاومت نسبت به جنتامیسین را نشان می‌دهد [۲۱]، اما در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که از ۷۶ جدایه مقاوم به جنتامیسین اشریشیا کلی، ۶۳/۱۵ درصد جدایه‌ها ژن *aac(3)-IIa* را حمل می‌کردند ولی در پژوهش آن‌ها ژن *ant(2)-Ia* بررسی نشد [۲۲].

اشریشیا کلی همچنین همولیزین آلفا که نوعی اگزوتوکسین (Exotoxin) خارج سلولی است را تولید می‌کند که موجب متلاشی شدن گلبول‌های قرمز می‌شود [۲۳، ۲۴]. همولیزین آلفا (HLY) با آسیب به سلول‌های میزبان باعث پایداری باکتری‌ها در مجاری ادراری می‌شود [۲۵]. نتایج بررسی تولید همولیزین نشان می‌دهد که ۳۸ درصد از جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، قدرت تولید همولیزین در محیط بلاد آگار حاوی خون انسان را دارند. علاوه بر این ۳۰ درصد از جدایه‌های مقاوم به‌طور همزمان قدرت تولید همولیزین را در دو محیط بلاد آگار حاوی خون گوسفند و انسان نشان دادند.

در این مطالعه اکثر جدایه‌های تولید کننده همولیزین حداقل نسبت به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت نشان دادند. علاوه بر این بین حساسیت به قند مانوز و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نیز ارتباط معنی‌داری ملاحظه شد. جدایه‌های مقاوم به مانوز (Mannose Resistant Hemagglutination: MRHA) دست کم نسبت به یک آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. این مطلب می‌تواند نشانگر آن باشد که شاید ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی و ژن‌های کد کننده پیلای نوع p و همولیزین در جایگاه نزدیک به هم قرار گرفته‌اند و انتقال می‌یابند که برای اثبات این موضوع نیاز به بررسی‌های مولکولی بیشتری است.

با توجه به مقاومت بالای اشریشیا کلی که در پژوهش حاضر و پژوهش‌های مشابه گزارش شده است و فراگیر بودن آن در محیط‌های بیمارستانی، برای پیشگیری از انتشار جدایه‌های مقاوم باید روش‌های کنترل مؤثرتر در ضد عفونی محیط بیمارستان از یک طرف و کاهش مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف

نتیل‌میسین به‌ترتیب با ۳/۶۲ و ۶/۱۵ درصد مشاهده شد که این موضوع کم کاربرد بودن این داروها را در درمان عفونت‌های ناشی از UPEC و حضور ژن *ant* را در ایجاد مقاومت متذکر می‌شود. به‌علاوه ۷۱ جدایه حداقل نسبت به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مورد مطالعه مقاومت نشان دادند. 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 به‌دست 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.

معمول‌ترین مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در اشریشیا کلی، تغییر آن‌ها توسط آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها است، به‌صورتی که این آنتی‌بیوتیک‌ها دیگر قادر به اتصال به ریبوزوم سلول نیستند [۱۹]. ژن‌های رمز کننده این آنزیم‌ها توسط پلاسمید یا کروموزوم حمل شده و اغلب توسط عناصر ژنتیک قابل انتقال نظیر ترانسپوزون‌ها (Transposons) انتقال می‌یابند [۲۰]. نتایج حاصل از PCR نشان داد که ژن مقاومت *ant(2)-Ia* در ۴۷/۸۸ درصد از جدایه‌ها وجود دارد. بین نتایج به‌دست آمده از مطالعه اخیر و سایر مطالعات هماهنگی وجود دارد، به‌گونه‌ای که مطالعات ماینارد و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان داد که ۱۷ درصد از جدایه‌های 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 [۱۰]. در سال ۲۰۰۷ جاکوبسن (Jakobsen) و همکاران، ۱۲۰ جدایه اشریشیا کلی که یکی از ژن‌های مقاومت به جنتامیسین *aac(3)-II* و *aac(3)-IV* و *ant(2)-I* را داشتند از نظر حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامیسین با روش رقیق‌سازی در آگار بررسی کردند. 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

تشکر و قدردانی

این نگارش به روح پر فتوح استاد فرزانه جناب آقای دکتر مرتضی ستاری و استاد گرانمایه مرحوم دکتر سعید سپهری سرشت تقدیم می‌شود.

از طرف دیگر در نظر گرفته شود. به علت افزایش شیوع مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، تشخیص سریع و به موقع جدایه‌های مقاوم به منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

- [1] von Baum H, Marre R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int J Med Microbiol* 2005; 295(6-7): 503-11.
- [2] Wagenlehner FME, Naber KG. Antibiotics and Resistance of Uropathogens. *EAU Update* 2004; 2(3): 125-35.
- [3] Johnson JR, Owens K, Gajewski A, Kuskowski MA. Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12): 6064-72.
- [4] Nys S, Terporten PH, Hoogkamp-Korstanje JA, Stobberingh EE; Susceptibility Surveillance Study Group. Trends in antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from urology services in The Netherlands (1998-2005). *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(1): 126-32.
- [5] Margesin R, Palma N, Knauseder F, Schinner F. Proteases of Psychrotrophic bacteria isolated from glaciers. *J Basic Microbiol* 1991; 5(31): 377-83.
- [6] Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighth informational supplement M100-58, vol.18, No.1, 1998, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania, USA; Available at: www.CLSI.org.
- [7] Evans DJ Jr, Evans DG, Höhne C, Noble MA, Haldane EV, Lior H, Young LS. Hemolysin and K antigens in relation to serotype and hemagglutination type of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. *J Clin Microbiol* 1981; 13(1): 171-8.
- [8] Hagberg L, Jodal U, Korhonen TK, Lidin-Janson G, Lindberg U, Svanborg Edén C. Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Infect Immun* 1981; 31(2): 564-70.
- [9] Suttorp N, Flöer B, Schnittler H, Seeger W, Bhakdi S. Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. *Infect Immun* 1990; 58(11): 3796-801.
- [10] Maynard C, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R, Masson L, Larivière S, Harel J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J Clin Microbiol* 2004; 42(12): 5444-52.
- [11] Kausar Y, Chunchanur SK, Nadagir SD, Halesh LH, Chandrasekhar MR. Virulence

- factors, serotypes and antimicrobial susceptibility pattern of *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Al Ameen J Med Sci* 2009; 2(1): 47-51.
- [12] Zhao L, Chen X, Zhu X, Yang W, Dong L, Xu X, Gao S, Liu X. Prevalence of virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu province (China). *Urology* 2009; 74(3): 702-7.
- [13] Goñi FM, Ostolaza H. *E. coli* alpha-hemolysin: a membrane-active protein toxin. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31(8): 1019-34.
- [14] Elliott SJ, Srinivas S, Albert MJ, Alam K, Robins-Browne RM, Gunzburg ST, Mee BJ, Chang BJ. Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. *Infect Immun* 1998; 66(5): 2040-51.
- [15] Lomberg H, Hellström M, Jodal U, Leffler H, Lincoln K, Svanborg Edén C. Virulence-associated traits in *Escherichia coli* causing first and recurrent episodes of urinary tract infection in children with or without vesicoureteral reflux. *J Infect Dis* 1984; 150(4): 561-9.
- [16] Vanhoof R, Nyssen HJ, Van Bossuyt E, Hannecart-Pokorni E; Aminoglycoside Resistance Study Group. Aminoglycoside resistance in Gram-negative blood isolates from various hospitals in Belgium and the Grand Duchy of Luxembourg. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy (JAC)* 1999; 44: 483-8.
- [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*. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006; 35(1): 83-6.
- [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): 702-7.
- [19] 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*. *Ann Microbiol* 2003; 53: 211-7.
- [20] Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kang JH, Shin WS, Kang MW. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. *J Korean Med Sci* 2003; 18(5): 631-6.
- [21] 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): 830-2.
- [22] Jakobsen L, Sandvang D, Hansen LH, Bagger-Skjøt L, Westh H, Jørgensen C, Hansen DS, Pedersen BM, Monnet DL, Frimodt-Møller N, Sørensen SJ, Hammerum AM. Characterisation, dissemination and persistence of gentamicin resistant *Escherichia coli* from a Danish university hospital to the waste water environment. *Environ Int* 2008; 34(1): 108-15.

- [23] Skals M, Jorgensen NR, Leipziger J, Praetorius HA. Alpha-hemolysin from *Escherichia coli* uses endogenous amplification through P2X receptor activation to induce hemolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(10): 4030-5.
- [24] Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 2008; 85(1): 11-9.
- [25] Costa MM, Drescher G, Maboni F, Weber SS, Botton S, Vainstein MH, Schrank IS, Vargas AC. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in southern of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 2008; 39(4): 741-3.