

بررسی شیوع اینتگرون های کلاس I و II در ایزوله های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیمارستان های شهر همدان

فهیمه حاجی احمدی^۱، نسیم صفری^۱، پگاه علیجانی^۱، مژگان ربیعی^۱، ندا معصومیان^۲، محمد رضا عربستانی^{۳،*}

^۱ گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
^۲ گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران
^۳ استاد یار میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بروسولوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

*نویسنده مسئول: محمد رضا عربستانی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.
 تلفن: ۰۷۷-۸۱۲۳۸۳۸۰۹۸+، فکس: ۰۵۵-۸۱۲۳۸۳۸۰۹۸+، ایمیل: mohammad.arabestani@gmail.com

DOI: 10.21859/hums-23036

چکیده

مقدمه: با توجه به مقاومت روز افزون باکتریهای اعضای خانواده انتروباکتریاسه، درمان عفونت های ناشی از آنها با مشکل مواجه شده است. لذا هدف از این مطالعه شناسایی اینتگرون های کلاس I و II و کاست های ژنی مربوطه در ایزوله های بالینی اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه است. **روش کار:** در این مطالعه توصیفی- مقطعی از ۵۰۰ ایزوله جدا شده از نمونه های بالینی مختلف از بیمارستان های شهر همدان، ۱۲۹ ایزوله کلبسیلا پنومونیه و ۱۱۸ ایزوله اشریشیا کلی، در سال ۱۳۹۴ جداسازی و مورد بررسی قرار گرفتند. سپس سویه های جدا شده با استفاده از تست های بیوشیمیایی استاندارد مختلف تأیید شدند. در مرحله بعد شناسایی اینتگرون های کلاس I و II و کاست های ژنی مربوطه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با روش PCR انجام شد. **یافته ها:** یافته های حاصل از این مطالعه نشان داد که شیوع اینتگرون های کلاس I به طور چشمگیری بیش از اینتگرون های کلاس II بود. فراوان ترین کاست ژنی در اینتگرون های کلاس I مربوط به کاست ژنی *aadA1* و پس از آن *dfxA7* به ترتیب کد کننده مقاومت به کاناماسین و تری متوپریم بودند.

نتیجه گیری: نتایج نشان دهنده شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی و اینتگرون های کلاس I در ایزوله های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه می باشد. لذا شناسایی این ژن های مقاومتی در جهت اجرای برنامه کنترل عفونت و ممانعت از انتشار سویه های مقاوم از اهمیت بالایی برخوردار می باشند.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۰۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۶/۰۸

واژگان کلیدی:

اشریشیا کلی

اینتگرون

کلبسیلا پنومونیه

مقاومت آنتی بیوتیکی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

مقدمه

ژنی قرار دارند جا به جا نمایند [۳]. انتقال افقی اینتگرون ها به عنوان موفق ترین راه انتشار ژن های مقاومت و پیدایش گونه هایی با مقاومت چندگانه مطرح می باشند [۴]. تاکنون ۹ کلاس از اینتگرون ها بر اساس تفاوت موجود در ژن اینتگراز شناسایی شده است که اینتگرون های کلاس I و متعاقب آن اینتگرون های کلاس II به عنوان شایع ترین کلاس ها در بین ایزوله های بالینی مطرح است [۵]. از نظر ساختاری تمام اینتگرون ها از سه جزء اصلی شامل انتهای ۵' حفاظت شده، انتهای ۳' حفاظت شده و یک ناحیه مرکزی متغیر بین ۵' و ۳' تشکیل شده اند. اجزای ضروری ناحیه ۵' تمام اینتگرون ها شامل ۱- ژن اینتگراز (*IntI*) که کد کننده آنزیم ریکامیناز اختصاصی محل می باشد (attI recombination site) - ۲ که سایت نوترکیبی اختصاصی بوده و در مجاورت ژن *IntI* قرار گرفته است - ۳ توالی پروموتور که برای بیان ژن های موجود در کاست های ژنی، ضروری می باشد. انتهای ۳' یک اینتگرون

مقدار بالای مقاومت چندگانه دارویی (multi drug resistance) به طور معمول مرتبط با عناصر متحرک ژنتیکی است که ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی را کد می کنند. از میان عناصر متحرک ژنتیکی، اینتگرون ها نقش مهمی در کسب و انتشار ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی دارند [۱]. اینتگرون ها با داشتن یک سیستم نوترکیبی خاص مکانی (site specific recombination) سبب ورود و بیان کاست های ژنی (gene cassette) مختلف می شوند و بنابراین منبع گسترده ای از ژن ها محسوب می شوند [۲]. باکتری ها در اکوسیستم جدید با کسب ژن های جدید نیچ اکولوژی خود را گسترش می دهند و مجهز به صفاتی برای سازش با چالش های محیطی می شوند. این عناصر ژنتیکی متحرک می توانند در پلاسمیدها، کروموزوم ها و یا ترانسپوزون ها جا گیرند و ژن های مقاومتی را در حالیکه در داخل کاست های

روش کار

جمع آوری نمونه‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی از ۵۰۰ ایزوله جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف، از بیمارستان‌های آموزشی شهر همدان (سینا، بعثت، بهشتی) ۱۲۹ ایزوله کلبسیلا پنومونیه و ۱۱۸ ایزوله اشیریشیا کلی، در سال ۱۳۹۴ جداسازی و مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). سپس سوبه‌های جدا شده با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی استاندارد شامل واکنش گرم، تست اکسیداز، کاتالاز، سیترات، تحرک، واکنش در محیط TSI، SIM، تولید H_2S ، تخمیر قند گلوکز و لاکتوز تعیین هویت و مورد تأیید قرار گرفتند. ایزوله‌های تأیید شده، در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایشات بعدی ذخیره شدند [۱۰].

جدول ۱: انواع نمونه‌های بیماران با عفونت‌های کلبسیلا پنومونیه و اشیریشیا کلی		
درصد بیماران (%)		
پارامتر	اشیریشیا کلی	کلبسیلا پنومونیه
جنس (زن/مرد)	۲۶,۶/۷۲,۵	۴۲,۳/۵۷,۷
نمونه ادرار	۸۰	۸۵/۲
نمونه مدفوع	۱۷	۵/۳
ترشحات		۱/۳
خلط		۵/۳
سایر نمونه‌ها		۲/۷

بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی

تست آنتی‌بیوگرام با روش استاندارد انتشار دیسک (bauer kirby) و بر روی محیط مولر هینتون آگار (Merck, Darmstadt, Germany) انجام شد. این تست بر اساس انتشار در دیسک و طبق دستورالعمل کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه بالینی (CLSI) [۱۱] به وسیله ۱۳ دیسک آنتی‌بیوتیک مختلف شامل سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، ایمپینم (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۳۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، افلوکساسین (۵ میکروگرم)، نورفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، تری متو پریم-سولفامتاکسازول (۲۵ میکروگرم)، سفدیترون (۵ میکروگرم)، سفتریکسون (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفزازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفکسیم (۵ میکروگرم) و پیپراسیلین (۳۰ میکروگرم) خریداری شده از شرکت MAST (انگلستان)، رأی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه انجام شد. از

واجد سه ساختار متفاوت است که در اینتگرون‌های کلاس I سه جزء به شرح زیر وجود دارد [۶]: ۱- ژن *qacEΔ1* که کدکننده مقاومت به ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی و دزافکتانت‌ها است ۲- ژن *Sul1* که کدکننده مقاومت به سولفانامید می‌باشد. ۳- *ORF5,6* کدکننده پروتئین‌هایی با عملکرد ناشناخته است. انتهای ۳' در اینتگرون‌های کلاس II شامل ۱- ژن‌های ترانسپوزیشن (*trnI*) و ژن‌های رزولوشن (*res*) می‌باشد، همچنین حاوی ۹ ORFs بوده که پروتئین‌هایی با عملکرد ناشناخته را کد می‌کنند. انتهای ۳' در اینتگرون‌های کلاس ۳ شامل ۱- ژن *ORF5,6-3 Sul1-2 qacEΔ1* می‌باشد [۶]. کاست ژنی در ناحیه ما بین ۵' و ۳' اینتگرون ادغام می‌شود. کاست‌ها، عناصر ژنتیکی متحرکی هستند که شامل یک یا چند ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی و یک توالی *attC* (attchmant site) می‌باشد که مکان نوترکیبی اختصاصی اینتگراز است و به عنوان عناصر ۵۹ بازی (۵۹ bp element) نیز شناخته می‌شوند. بیش از ۱۳۰ کاست ژنی مقاومت متعاقب نوترکیبی بین توالی *attI* و عنصر ۵۹ بازی، به درون اینتگرون‌ها می‌تواند وارد شود. کاست‌های ژنی مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها شامل استرپتومایسین، اسپکتینومایسین، جنتامایسین و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جدیدتری مانند کارباپنم‌ها را می‌توانند انتقال دهند [۷]. اینتگرون‌های متحرک که حمل‌کننده کاست‌های مقاومت هستند در گونه‌های گرم منفی مختلف خصوصاً در خانواده انتروباکتریاسه شناسایی شده‌اند. خانواده انتروباکتریاسه یک گروه بزرگ نامتجانس از باسیل‌های گرم منفی هستند که به عنوان پاتوژن غالب در ارتباط با عفونت‌های دستگاه ادراری مطرح می‌باشند. اشیریشیا کلی شایع‌ترین باسیل گرم منفی جدا شده از موارد بالینی و عامل بیش از ۸۰٪ عفونت‌های دستگاه ادراری اکتسابی از جامعه و همچنین عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان می‌باشد. همچنین این میکروارگانیسم موجب ایجاد بیماری‌های مختلفی از جمله سپسیس، مننژیت نوزادان و یکی از عوامل مهم گاستروانتریت در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود [۸]. کلبسیلا پنومونیه پاتوژن‌های گرم منفی و فرصت‌طلبی هستند که موجب سپتی سمی، انتریت نوزادان، مننژیت، عفونت‌های دستگاه ادراری و بافت‌های نرم می‌شوند. اهمیت کلبسیلا به عنوان پاتوژن انسانی، در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بوده و بیماران بستری با نقص سیستم ایمنی و مبتلا به بیماری‌های زمینه‌ای از اهداف عمده این باکتری می‌باشد [۹]. هدف از این مطالعه، شناسایی اینتگرون‌های کلاس I و II و کاست‌های ژنی مربوطه در ایزوله‌های اشیریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه است.

آنالیز نرم افزاری کاست‌های ژنی

پس از تعیین توالی کاست‌های ژنی، توالی نوکلئوتیدی کاست‌ها توسط نرم افزار chromas استخراج و به منظور تعیین نوع کاست‌ها با توالی‌های موجود در genbank مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت (Blast).

یافته‌ها

بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی

مقاومت آنتی بیوتیکی ۲۴۷ ایزوله کلینیکی (۱۱۸ ایزوله اشریشیا کلی و ۱۲۹ ایزوله کلبسیلا پنومونیه) مورد مطالعه قرار گرفت (جدول‌های ۳ و ۴). بیشترین میزان مقاومت در ایزوله‌های اشریشیا کلی مولد اینتگرون به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک‌های داکسی‌سیکلین، نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین و کمترین میزان مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک‌های آمیکاسین و نیتروفوران‌توئین گزارش گردید در حالیکه در ایزوله‌های فاقد اینتگرون بیشترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید و داکسی‌سیکلین و کمترین میزان مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک‌های نیتروفوران‌توئین و آمیکاسین گزارش گردید. همچنین بیشترین میزان مقاومت در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مولد اینتگرون و فاقد اینتگرون به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک‌های سفکسیم و سفدیپورن و کمترین میزان مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک‌های ایمپی‌پنم و آمیکاسین گزارش گردید. ۹۳/۱ درصد و ۴۳/۴ درصد از ایزوله‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه مولد اینتگرون به ترتیب به حداقل سه کلاس آنتی بیوتیکی از خود مقاومت نشان دادند و به عنوان سویه‌های MDR در نظر گرفته شدند.

ایزوله اشریشیا کلی ATCC 25922 و کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 به عنوان کنترل استفاده شد. ایزوله‌هایی که حداقل به سه کلاس آنتی بیوتیک مقاوم بودند، به عنوان ایزوله‌های MDR در نظر گرفته شدند.

استخراج DNA

DNA کروموزومی تمام ایزوله‌های جدا شده با استفاده از روش جوشاندن (Boiling) استخراج گردید [۱۲]. در ادامه خلوص DNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر و ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

حضور ژن‌های اینتگرون و کاست‌های ژنی مربوطه در اینتگرون‌های کلاس I و کلاس II، به واسطه واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد (جدول ۲). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر master mix شرکت آواژن، ایران، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۱۱ میکرولیتر آب دیونیزه شده، انجام شد. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Biorad, US) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلسیوس و به مدت ۳۰ ثانیه (برای ژن‌های *int1* و *int2* و *CS'3 CS'5*)، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه انجام شد. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۲: پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Gene Targets	Primer Sequences, '۳ to '۵	Amplicon/Product Size, bp	References
<i>int1</i>	'۳-F:CAGTGGACATAAGCCTGTTC '۳-R:CCCGACGCATAGACTGTA	۱۶۰	[۱۳]
<i>int2</i>	'۳-F:TTGCGAGTATCCATAACCTG '۳-R:TTACCTGCACTGGATTAAGC	۲۸۸	[۱۳]
ΔCS,CS	F:GGCATCCAAGCAGCAAG R: AAG CAG ACT TGA CCT GA	Variable	[۱۴]

جدول ۳: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های اشریشیا کلی

آنتی بیوتیک	ایزوله‌های دارای اینتگرون (n = ۵۸)			ایزوله‌های فاقد اینتگرون (n = ۶۰)		
	حساس، تعداد (درصد)	متوسط، تعداد (درصد)	مقاوم، تعداد (درصد)	حساس، تعداد (درصد)	متوسط، تعداد (درصد)	مقاوم، تعداد (درصد)
آمیکاسین	۳۴ (۵۸/۶۵)	۶ (۱۰/۳۵)	۱۸ (۳۱)	۴۰ (۶۶/۶۷)	۸ (۱۳/۳۳)	۱۲ (۲۰)
سفوتاکسیم	۱۶ (۲۷/۶)	۰	۴۲ (۷۲/۴)	۳۳ (۵۵)	۱ (۱/۶۷)	۲۶ (۴۳/۳۳)
سیپروفلوکساسین	۹ (۱۵/۵)	۰	۴ (۸/۴۵)	۲۶ (۴۳/۳۳)	۰	۳۴ (۵۶/۶۷)
داکسی سیکلین	۵ (۸/۶۲)	۱ (۱/۷۳)	۵۲ (۸۹/۶۵)	۱۱ (۱۸/۳۳)	۱ (۱/۶۷)	۴۸ (۸۰)
ایمی پنم	۱۸ (۳۱)	۰	۴۰ (۶۹)	۳۷ (۶۱/۶۶)	۱ (۱/۶۷)	۲۲ (۳۶/۶۷)
نالیدیکسیک اسید	۳ (۵)	۰	۵۵ (۹۵)	۹ (۱۵)	۲ (۳/۳۴)	۴۹ (۸۱/۶۶)
نورفلوکساسین	۸ (۱۳/۸)	۰	۵۰ (۸۶/۲)	۳۹ (۶۵)	۰	۲۱ (۳۵)
افلوکساسین	۹ (۱۵/۵۱)	۱ (۱/۷۳)	۴۸ (۸۲/۷)	۲۸ (۴۶/۶۷)	۰	۳۲ (۵۳/۳۳)
پیپراسیلین	۱۹ (۳۲/۷۶)	۱ (۱/۷۳)	۳۸ (۶۵/۵۱)	۳۰ (۵۰)	۰	۳۰ (۵۰)
تری متو پریم سولفامتاکسازول	۱۰ (۱۷/۲۴)	۰	۴۸ (۸۲/۷۶)	۲۱ (۳۵)	۰	۳۹ (۶۵)
سفتزیاکسون	۱۵ (۲۵/۸۷)	۱ (۱/۷۳)	۴۲ (۷۲/۴)	۲۷ (۴۵)	۰	۳۳ (۵۵)
سفتازیدیم	۱۸ (۳۱)	۲ (۳/۵)	۳۸ (۶۵/۵)	۲۹ (۴۸/۳۳)	۰	۳۱ (۵۱/۶۷)
نیتروفورانتاتین	۳۸ (۶۵/۵)	۲ (۳/۵)	۱۸ (۳۱)	۴۵ (۷۵)	۸ (۱۳/۳۳)	۷ (۱۱/۶۷)

جدول ۴: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه

آنتی بیوتیک	ایزوله‌های دارای اینتگرون (n = ۱۲۲)			ایزوله‌های فاقد اینتگرون (n = ۷)		
	حساس، تعداد (درصد)	متوسط، تعداد (درصد)	مقاوم، تعداد (درصد)	حساس، تعداد (درصد)	متوسط، تعداد (درصد)	مقاوم، تعداد (درصد)
آمیکاسین	۹۷ (۷۹/۵)	۱۰ (۸/۱۲)	۱۵ (۱۲/۳)	۵ (۷۱/۴)	۱ (۱۴/۳)	۱ (۱۴/۳)
جنتامایسین	۸۸ (۷۲/۱)	۰	۳۴ (۲۷/۹)	۵ (۷۱/۴)	۰	۲ (۲۸/۶)
سفکسیم	۴۹ (۴۰)	۰	۷۳ (۶۰)	۳ (۴۲/۸۵)	۰	۴ (۵۷/۱۵)
سفتازیدیم	۶۱ (۵۰)	۴ (۳/۳)	۵۷ (۴۶/۷)	۴ (۵۷/۱)	۱ (۱۴/۳)	۲ (۲۸/۶)
سیپروفلوکساسین	۸۸ (۷۲/۱)	۰	۳۴ (۲۷/۹)	۴ (۵۷/۱)	۱ (۱۴/۳)	۲ (۲۸/۶)
نالیدیکسیک اسید	۸۵ (۶۹/۷)	۰	۳۷ (۳۰/۳)	۴ (۵۷/۱)	۱ (۱۴/۳)	۲ (۲۸/۶)
نورفلوکساسین	۷۹ (۶۴/۸)	۰	۴۳ (۳۵/۲)	۵ (۷۱/۴)	۰	۲ (۲۸/۶)
ایمی پنم	۱۱۰ (۹۰/۲)	۰	۱۲ (۹/۸)	۶ (۸۵/۷)	۰	۱ (۱۴/۳)
سفتیتورین	۵۶ (۴۵/۹)	۴ (۳/۳)	۶۲ (۵۰/۸)	۳ (۴۲/۸۵)	۱ (۱۴/۳)	۳ (۴۲/۸۵)
تری متو پریم سولفامتاکسازول	۶۹ (۵۶/۵۶)	۰	۵۳ (۴۳/۴۴)	۴ (۵۷/۱)	۱ (۱۴/۳)	۲ (۲۸/۶)

آنالیز اینتگرون‌ها

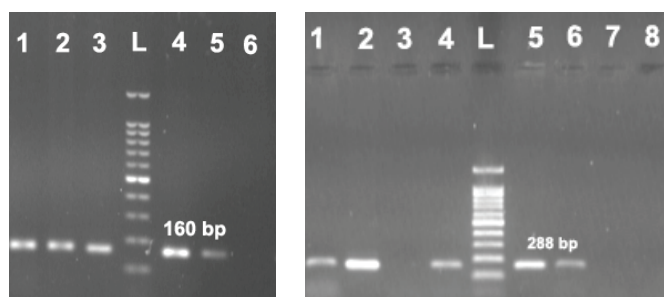
(۸۷/۶٪) مولد اینتگرون‌های کلاس I بودند. همچنین ۵ ایزوله

(۴/۲٪) و ۲۰ ایزوله (۱۵/۵٪) مولد اینتگرون کلاس II بودند

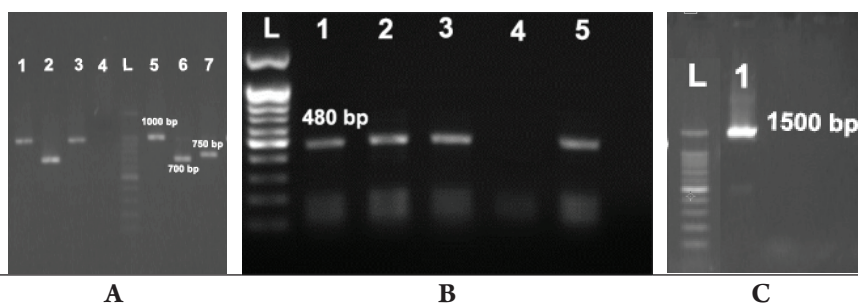
(تصویر ۱). در این مطالعه ۳ ایزوله (۲/۵٪) و ۱۱ ایزوله (۸/۵٪)

در این مطالعه از ۱۱۸ ایزوله اشریشیا کلی و ۱۲۹ ایزوله

کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۵۶ ایزوله (۴۷/۵٪) و ۱۱۳ ایزوله



تصویر ۱: الکتروفورز ژل آگارز ۵/۱٪ برای شناسایی ژن *intI1* و *intI2*. چاهک L: سایز مارکر (۱۰۰ bp) شکل سمت چپ: چاهک ۱، ۲، ۳، ۴: کنترل مثبت. چاهک ۵: نمونه‌های حامل ژن *intI1*. چاهک ۶: کنترل منفی. سمت راست: چاهک ۱، ۲، ۳، ۴: نمونه‌های حامل ژن *intI2*. چاهک ۵: کنترل مثبت. چاهک ۶: کنترل منفی. چاهک ۷، ۸: سویه فاقد ژن *intI2*



تصویر ۲: الکتروفورز ژل آگارز ۵/۱٪ برای شناسایی کاست مربوطه در اینتگرون‌های کلاس I: چاهک L: سایز مارکر (۱۰۰ bp) شکل A، چاهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴: سویه‌های بالینی مولد کاست ژنی با طول (adenyltransferase-3 aminoglycoside) bp1000؛ چاهک‌های ۵ و ۶: سویه‌های بالینی مولد کاست ژنی با طول (adenyltransferase-2-aminoglycoside) bp700؛ چاهک ۷: سویه بالینی مولد کاست ژنی با طول (dihydrofolate reductase type I) bp750 در اینتگرون‌های کلاس I. شکل B، چاهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴: سویه‌های بالینی مولد کاست ژنی با طول (dihydrofolate reductase type A17) bp480؛ چاهک ۵: سویه بالینی فاقد کاست ژنی. شکل C: چاهک ۱: سویه‌های بالینی مولد کاست ژنی با طول (adenyltransferase-chloramphenicol acetyltransferase (aminoglycoside 1500 bp)

فراوان‌ترین کاست ژنی در اینتگرون‌های کلاس I مربوط به کاست ژنی *aadA1* و پس از آن *dfrA7* به ترتیب کد کننده مقاومت به کانامایسین و تری متوپریم بودند (تصویر ۲).

بحث

در حال حاضر استفاده بیش از حد و خودسرانه از آنتی بیوتیک‌ها یکی از دلایل مهم شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در مناطق مختلف جهان می‌باشد. در سال‌های اخیر، نقش اینتگرون‌ها به عنوان عناصر ژنتیکی متحرک در انتقال افقی مقاومت آنتی بیوتیکی مشخص شده است. این عناصر از جمله فاکتورهای دخیل در توسعه مقاومت‌های چندگانه بوده و همانند پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها جزء مؤلفه‌های ژنتیکی در کسب و انتشار عوامل مقاومت از یک سویه به سویه دیگر محسوب می‌شود. این امر منجر به انتشار مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی و مشکلات جدی درمانی در سرتاسر جهان گردیده است. به واسطه اهمیت باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه

مولد هر دو اینتگرون کلاس I و II بودند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که شیوع اینتگرون‌های کلاس‌های I به طور چشمگیری بیش از اینتگرون‌های کلاس II بود. جهت شناسایی کاست‌های ژنی، بر روی تمامی ایزوله‌های بالینی مولد اینتگرون‌های کلاس I، PCR با شرایط استاندارد انجام شد. از ۱۱۳ ایزوله اشریشیا کلی و ۵۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه حامل اینتگرون کلاس I، به ترتیب کاست‌های ژنی در ۴۱ سویه (۷۳/۲۵٪) و ۸۷ سویه (۷۷٪) شناسایی شد. ۴ نوع کاست ژنی در ایزوله‌های اشریشیا کلی و ۵ نوع کاست ژنی در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه شناسایی شد. تعیین توالی و آنالیز کاست‌های ژنی نشان داد که کاست ژنی *aadA1* در ایزوله‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه به ترتیب در ۳۰/۸۰٪ ایزوله، کاست ژنی *dfrA7* در ۹/۶٪ ایزوله، کاست ژنی *aadB* در ۷/۴٪ ایزوله، کاست ژنی *dfrA17* در ۳/۱٪ ایزوله یافت شد. همچنین کاست ژنی ترکیبی *aadB-catB3* در ۳٪ ایزوله از کلبسیلا پنومونیه شناسایی گردید. نتایج فوق نشان داد که

و با داشتن کاست‌های ژنی متحرک باعث ایجاد مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های جدیدتری می‌شوند. فراوانی اینتگرون های کلاس I و II در تحقیق حاضر در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۸۷/۶٪ و ۱۵/۵٪ و در ایزوله‌های اشیریشیا کلی به ترتیب ۴۷/۵٪ و ۴/۲٪ به دست آمد. بیشترین فراوانی کاست‌های ژنی مربوطه در تمامی ایزوله‌های مذکور کاست aadA1 برای مقاومت به استرپتومایسین گزارش شد. در مطالعه‌ای که Ibrahim و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مالزی روی ۱۶۰ ایزوله انتروباکتریاسه انجام دادند، اینتگرون های کلاس I و II به ترتیب ۵۷/۳٪ و ۳/۸٪ گزارش شد [۲۰]. در سال ۲۰۰۵، Janes و همکاران شیوع ژن *intI1* را در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه را ۷۳٪ گزارش کردند [۲۱] که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. در بررسی دیگری که توسط Salimizand و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد، از ۲۳ ایزوله کلبسیلا پنومونیه مولد اینتگرون های کلاس I، کاست‌های ژنی *5-arr*، *aacA4* و *aadA5-dfrA17* به عنوان شایع‌ترین کاست‌ها گزارش شدند [۱۳]. در مطالعه Su و همکاران در سال ۲۰۰۶ اینتگرون های کلاس I و II به ترتیب در ۸۵/۶٪ و ۳/۶٪ از سویه‌های اشیریشیا کلی شناسایی شدند. ۶ کاست ژنی متفاوت گزارش شد که فراوان‌ترین کاست‌های ژنی مربوط به ژن‌های *dfr* و *aad* بودند [۱۴]. که نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در بررسی مشابهی که در سال ۲۰۱۰ در برزیل توسط Lopes و همکاران انجام شد، اینتگرون های کلاس I در ۷ ایزوله اشیریشیا کلی شناسایی شدند و ۳ ایزوله واجد کاست‌های ژنی *aadA1*، *2-blaoxa* و *dfr22* بودند که به ترتیب کدکننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام ها و تری متوپریم بودند [۲۲]. Li و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که از ۱۷۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۵۱/۱٪ (۴۰ ایزوله) مولد ژن *intI1* بودند. که از این میان سویه‌های اینتگراز مثبت، ۱۹ ایزوله حامل کاست‌های ژنی بودند. ۱۰ نوع کاست ژنی با اندازه متفاوت شناسایی شد. بیشترین فراوانی کاست ژنی مربوط به کاست‌های *dfrA* و *aadA* یافت شد. شیوع کاست ترکیبی *orf6-dfrA1* در ۱۳/۶٪ (۲۴ ایزوله) ایزوله‌ها به دست آمد [۲۳]. مقایسه نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که شیوع این ژن‌ها در بیشتر مناطق کشورمان بالا می‌باشد که یک هشدار به افزایش مقاومت را نشان می‌دهد. در مطالعه دیگری که توسط Zeighami و همکاران در سال ۲۰۱۳ در شهر زنجان انجام شد، ۲۰۰ ایزوله اشیریشیا کلی و ۱۴۹ ایزوله کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی جدا شدند. شیوع اینتگرون های کلاس I در ایزوله‌های اشیریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL به ترتیب در

و اشیریشیا کلی در ایجاد عفونت‌های مختلف، به بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی اینتگرون های کلاس I و II و کاست‌های ژنی مربوطه در این دسته از سویه‌ها پرداخته شد. مطالعه حاضر بر روی ۱۲۹ ایزوله کلبسیلا پنومونیه و ۱۱۸ ایزوله اشیریشیا کلی جدا شده از بیمارستان‌های شهر همدان انجام گرفت.

طبق نتایج به دست آمده، مقاومت بالایی به آنتی بیوتیک های داکسی سیکلین (۸۹/۶۵٪)، سیپروفلوکساسین (۸۴/۴۵٪)، نورفلوکساسین (۸۶/۲۵٪)، نالیدیکسیک اسید (۸۱/۶۶٪) و داکسی سیکلین (۸۰٪) در ایزوله‌های اشیریشیا کلی و آنتی بیوتیک های سفکسیم (۶۰٪) و سفدیتورن (۵۰/۸٪) در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه گزارش شد. در مطالعه‌ای که توسط Charrakh و همکاران در سال ۲۰۱۱ در عراق صورت گرفت، مقاومت بالایی به آموکسی سیلین، اریترومایسین و تتراسیکلین به ترتیب با ۱۰۰٪، ۵۶/۲٪ و ۶۳/۱٪ در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به دست آمد [۱۵]. در مطالعه‌ای که توسط Mathai و همکارانش در سال ۲۰۰۴ صورت گرفت، بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به آمپی سیلین، کوتریموکسازول و تتراسیکلین نشان می‌دهد [۱۶]. در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۶ در اسلووانیا توسط Rajavec صورت گرفت، بیشترین مقاومت نسبت به آمپی سیلین، تتراسیکلین و کلرامفنیکل در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه بود [۱۷] همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ در کشور هند توسط Sharya و همکاران انجام شد، بیشترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک های نالیدیکسیک اسید (۴۵٪)، تتراسیکلین (۳۷٪) و آمپی سیلین (۳۷٪) در ایزوله‌های اشیریشیا کلی گزارش شد [۱۸]. در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۸ توسط اصلانی و همکاران در تهران انجام شد، درصد مقاومت به آنتی بیوتیک های تتراسیکلین، آمپی سیلین و استرپتومایسین به ترتیب ۶۳٪، ۶۲٪ و ۵۶٪ گزارش گردید [۱۹]. که بیانگر شیوع بسیار بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در کشور ما و سایر نقاط جهان می‌باشد. طبق نتایج به دست آمده، شیوع بالایی از اینتگرون های کلاس I، در ایزوله‌های مذکور گزارش شد که بیانگر شیوع بسیار بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در کشور ما می‌باشد. همچنین مشاهده گردید که سویه‌های مولد اینتگرون ها بیشتر در ارتباط با مقاومت آنتی بیوتیکی بودند. همان طور که می‌دانیم تا سال ۱۹۹۹ تنها چند گزارش در مورد اینتگرون ها وجود داشت، اما بعد از مطالعات زیادی که در مورد اینتگرون ها صورت پذیرفت، به این نتیجه رسیدند که اینتگرون ها به احتمال زیاد در سرتاسر جهان، به ویژه در میان خانواده انتروباکتریاسه مشترک است

کشورهای مختلف و همچنین در یک کشور از یک بیمارستان با بیمارستان دیگر متفاوت می‌باشد، که این امر بستگی به سیستم کنترل عفونت در آن منطقه و نحوه درمان بیماران آن بیمارستان دارد. همچنین ریسک فاکتورهای متفاوتی در افزایش میزان باکتری‌های مولد این ژن‌ها دخالت دارند که از جمله این فاکتورها می‌توان به طولانی بودن مدت زمان بستری شدن بیماران در بیمارستان، مصرف بیش از اندازه آنتی‌بیوتیک‌ها (از جمله سفالوسپورین‌های نسل سوم)، استفاده از کاتترهای عروقی و ادراری، نگهداری طولانی مدت در بخش مراقبت ویژه، سابقه جراحی قبلی و کاربرد غیر منطقی و ناکافی درمان‌های ضد میکروبی اشاره کرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۹۳۱۲۱۸۶۷۵۷ است که با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از این معاونت ابراز می‌دارند.

تضاد منافع

نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تضاد نمی‌باشد.

REFERENCES

- Sunde M, Simonsen GS, Slettemeas JS, Bockerman I, Norstrom M. Integron, Plasmid and Host Strain Characteristics of Escherichia coli from Humans and Food Included in the Norwegian Antimicrobial Resistance Monitoring Programs. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128797. DOI: 10.1371/journal.pone.0128797 PMID: 26047499
- Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordmann P. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of Escherichia coli which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol*. 2001;183(1):235-49. DOI: 10.1128/JB.183.1.235-249.2001 PMID: 11114922
- Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33(4):757-84. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x PMID: 19416365
- Krauland M, Harrison L, Paterson D, Marsh J. Novel integron gene cassette arrays identified in a global collection of multi-drug resistant non-typhoidal Salmonella enterica. *Curr Microbiol*. 2010;60(3):217-23. DOI: 10.1007/s00284-009-9527-3 PMID: 19921331
- Khosravi Y, Tay ST, Vadivelu J. Analysis of integrons and associated gene cassettes of metallo-beta-lactamase-positive Pseudomonas aeruginosa in Malaysia. *J Med Microbiol*. 2011;60(Pt 7):988-94. DOI: 10.1099/jmm.0.029868-0 PMID: 21436370
- Gillings MR, Gaze WH, Pruden A, Smalla K, Tiedje JM, Zhu YG. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J*. 2015;9(6):1269-79. DOI: 10.1038/ismej.2014.226 PMID: 25500508
- Roth A, Breaker RR. Integron attI1 sites, not riboswitches, associate with antibiotic resistance genes. *Cell*. 2013;153(7):1417-8. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.043 PMID: 23791167
- Petty NK, Ben Zakour NL, Stanton-Cook M, Skippington E, Totsika M, Forde BM, et al. Global dissemination of a multidrug resistant Escherichia coli clone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(15):5694-9. DOI: 10.1073/pnas.1322678111 PMID: 24706808
- Garbati MA, Al Godhair AL. The growing resistance of Klebsiella pneumoniae; the need to expand our antibiogram: case report and review of the literature. *Afr J Infect Dis*. 2013;7(1):8-10. PMID: 24381721

۵۲ ایزوله (۷۸/۸٪) و ۴۶ ایزوله (۷۹/۳٪) گزارش شد. شیوع اینتگرون‌های کلاس II در سویه‌های مزبور به ترتیب در ۳ ایزوله (۴/۵٪) و ۲۵ ایزوله (۴۳/۱٪) گزارش گردید. در این مطالعه شایع‌ترین کاست ژنی در هر دو سویه‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه، کاست‌های *dfrA* (کد کننده مقاومت به تری متوپریم) و *aad* (کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها) بودند که با مطالعه ما همخوانی دارد [۲۴]. نتایج این مطالعه با گزارش‌های مشابه در سرتاسر جهان در مورد کاست‌های ژنی *aadA* و *dfrA* در بین انتروباکتریاسه و سویه‌های گرم مثبت همسو است. کاست‌های ژنی *dfrA* و *aadA* مقاومت به تری متوپریم و استرپتومایسین را کد می‌کند. شیوع کاست ژنی *dfrA* به دلیل استفاده از تری متوپریم به عنوان خط اول درمان UTI در کلینیک‌ها است، اما شیوع کاست ژنی *aadA* ممکن است منعکس کننده انتقال همزمان ژن‌های مقاومت به دلیل پیوند ژنتیکی کاست *dfrA* و *aadA* باشد.

نتیجه گیری

مقایسه نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده آن است که میزان شیوع اینتگرون‌های کلاس I و II در سویه‌های ایزوله شده از

- Tille P. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. US: Elsevier Health Sciences; 2013.
- Cockerill FR. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-first informational supplement: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2013.
- Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R, et al. Survey for virulence determinants among Enterococcus faecalis isolated from different sources. *J Med Microbiol*. 2004;53(Pt 1):13-20. DOI: 10.1099/jmm.0.05353-0 PMID: 14663100
- Sun J, Zheng F, Wang F, Wu K, Wang Q, Chen Q, et al. Class 1 integrons in urinary isolates of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Southern China during the past five years. *Microb Drug Resist*. 2013;19(4):289-94. DOI: 10.1089/mdr.2012.0130 PMID: 23573964
- Su J, Shi L, Yang L, Xiao Z, Li X, Yamasaki S. Analysis of integrons in clinical isolates of Escherichia coli in China during the last six years. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;254(1):75-80. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2005.00025.x PMID: 16451182
- Al-Charrakh H, Yousif Y, Al-Janabi S. Occurrence and detection of extended-spectrum beta-lactamases in Klebsiella isolates in Hilla, Iraq. *Afr J Biotech*. 2011;10(2):657-65.
- Mathai E, Grape M, Kronvall G. Integrons and multidrug resistance among Escherichia coli causing community-acquired urinary tract infection in southern India. *APMIS*. 2004;112(3):159-64. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm1120301.x PMID: 15153157
- Rijavec M, Staric Erjavec M, Ambrozic Avgustin J, Reissbrodt R, Fruth A, Krizan-Hergouth V, et al. High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic Escherichia coli (UPEC) of the four major phylogenetic groups. *Curr Microbiol*. 2006;53(2):158-62. DOI: 10.1007/s00284-005-0501-4 PMID: 16802204
- Shakya P, Barrett P, Diwan V, Marothi Y, Shah H, Chhari N, et al. Antibiotic resistance among Escherichia coli isolates from stool samples of children aged 3 to 14 years from Ujjain, India. *BMC Infect Dis*. 2013;13:477. DOI: 10.1186/1471-2334-13-477 PMID: 24381721

- [24124728](#)
19. Aslani MM, Ahrabi SS, Alikhani YM, Jafari F, Zali RM, Mani M. Molecular detection and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal cases. *Saudi Med J*. 2008;29(3):388-92. [PMID: 18327365](#)
20. Ibrahim N, Wajidi MF, Yusof MY, Tay ST. The integron prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacterial isolates in a Malaysian teaching hospital. *Trop Biomed*. 2011;28(3):668-71. [PMID: 22433898](#)
21. Jones LA, McIver CJ, Kim MJ, Rawlinson WD, White PA. The aadB gene cassette is associated with blaSHV genes in *Klebsiella* species producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(2):794-7. [DOI: 10.1128/AAC.49.2.794-797.2005](#) [PMID: 15673771](#)
22. Lopes AC, Veras DL, Lima AM, Melo Rde C, Ayala J. bla(CTX-M-2) and bla(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(2):163-7. [PMID: 20428675](#)
23. Li B, Hu Y, Wang Q, Yi Y, Woo PC, Jing H, et al. Structural diversity of class 1 integrons and their associated gene cassettes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a hospital in China. *PLoS One*. 2013;8(9):e75805. [DOI: 10.1371/journal.pone.0075805](#) [PMID: 24098729](#)
24. Zeighami H, Haghi F, Hajjiahmadi F. Molecular characterization of integrons in clinical isolates of betalactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Iran. *J Chemother*. 2014.

Assessment of the Prevalence of Class I and II Integrons of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates From Hospitals of Hamadan

Fahimeh Hajiahmadi ¹, Nasim Safari ¹, Pegah Alijani ¹, Mojgan Rabiei ¹, Neda Masomian ², Mohammad Reza Arabestani ^{1,3,*}

¹ Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

² Department of Microbiology, Islami Azad University of Zanjan, Zanjan, Iran

³ Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

* Corresponding author: Mohammad Reza Arabest, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. Tel: +98-8123838077, Fax: +98-8123838055, E-mail: mohammad.arabestani@gmail.com

DOI: 10.21859/hums-23036

Received: 27.04.2016

Accepted: 29.08.2016

Keywords:

Escherichia coli

Integron

Klebsiella pneumoniae

Antibiotic Resistance

How to Cite this Article:

Hajiahmadi F, Safari N, Alijani P, Rabiei M, Masomian N, Arabestani M R. Assessment of the Prevalence of Class I and II Integrons of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates From Hospitals of Hamadan. *Sci J Hamadan Uni Med Sci*. 2016;**23**(3):193-201. DOI: 10.21859/hums-23036

Abstract

Introduction: Due to the increasing trend of antibiotic resistance in the Enterobacteriaceae family, treatment of infections caused by these bacteria has been difficult. The aim of this study was to identify of class I and II integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.

Methods: In this cross-sectional study, of 500 strains isolated from clinical samples of hospitals in Hamadan, Iran, in 129 ,2015 *K. pneumoniae* and 118 *E. coli* isolates were isolated and examined. Then, the isolates were verified by standard biochemical methods and PCR was performed on class I and II integron genes using specific primers.

Results: The results of this study showed that the prevalence of class I integrons was more than class II integrons. The most frequent class I integron gene cassettes were *aadA1* and *dfrA7* respectively, which are resistance encoding genes for kanamycin and trimethoprim.

Conclusions: The result of this study indicated a high prevalence of class I integrons in *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates. Thus, the identification of these resistance genes for infection control programs and to prevent the spread of resistant strains is very important.