Applied Biology, Volume 10, Issue 38, 2020

The Frequency of of class 1, 2, and 3 Integrons and Extended- spectrum Beta-Lactamase Genes of bla-CTX-M, bla-SHV, and bla-TEM in Gram-negative Bacilli Isolated from Bandar Abbas Pediatric Hospital, Iran-2016[1]

Mahshid Vahdani | Master of Biology-Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Sirjan Branch, Sirjan, Iran. mah.vahdanii@gmail.com
Nooshin Khandan Dezfuli | Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Sirjan Branch, Sirjan, Iran **(Corresponding Author).** nooshinkhandan22@gmail.com
Afsaneh Kermastji | Associate Professor, Infectious and Tropical Diseases Research Center; Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran. Afsanehkk@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Gram-negative bacilli are important hospital pathogens with an increasing prevalence of broad-spectrum beta-lactamase genes and integrons. Therefore, identification of these antibiotic resistance genes is essential to prevent the spread of resistant strains.The aim of this study was to determine the frequency of class 1, 2 and 3 integrons and bla-CTX-M, bla-SHV and bla-TEM broad-spectrum beta-lactamases genes in Gram-negative bacilli isolated from Bandar Abbas Pediatric Hospital.

Materials and Methods: Sixty Gram-negative bacilli strains were isolated from clinical specimens and identified by biochemical tests and their antibiotic resistance patterns were determined by Disk Diffusion method. Multiplex PCR was used for detection of class 1, 2 and 3 integronsand PCR wasperformed to identify the bla-CTX-M, bla-SHV and bla-TEM family's genes, respectively.

Results: The most frequent strains belonged to Escherichia coli 70% and the highest resistance and sensitivity were Sulfomethoxazole 68% and Gentamicin 75% respectively.Of the 60 strains isolated, 61.7% and 26.7% had Class I and 2 integron genes, respectively, whereas no class 3 integron gene was detected in any of the isolates. PCR results showed that blaCTX-M, blaSHV and blaTEM family genes were 66.7%, 10% and 31. 7% strains, respectively.

Conclusion: In this study, there was a significant correlation ($p<0.05$) between the presence of class 1 and 2 integrons, bla-CTX-M, bla-SHV and bla-TEMand antibiotic resistance. Therefore, determination of antibiotic resistance genes and the use of appropriate therapeutic methods based on antibiogram pattern determination of the strains are also suggested.

Keywords: Integron, TEM, SHV, CTX, Multiplex-PCR, Extended- spectrum Beta-Lactamase Genes.

1. **Received:** 2019/10/12 ; **Accepted:** 2020/04/29

**Copyright © the authors

بیولوژی کاربردی، دوره ۱۰، شماره ۳۸، تابستان ۱۳۹۹

بررسی فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۳، ۲، ۱ و بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف bla-CTX-M، bla-SHV و bla-TEM در باسیل‌های گرم منفی جدا شده از بیمارستان آموزشی کودکان بندر عباس (۱۳۹۶)[۱]

مهشید وحدانی | کارشناسی ارشد زیست‌شناسی- میکروب‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران. mah.vahdanii@gmail.com

نوشین خندان دزفولی | استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران (**نویسنده مسئول**). nooshinkhandan22@gmail.com

افسانه کرمستجی | دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری؛ دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران. Afsanehkk@yahoo.com

چکیده

سابقه و هدف: باسیل‌های گرم منفی پاتوژن‌های مهم بیمارستانی‌اند که شیوع ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و اینتگرون‌ها در آنها رو به افزایش است. لذا شناسایی این ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی به منظور جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم، ضروری است. هدف این مطالعه بررسی فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱،۲،۳ و بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف bla-SHV، bla-CTX-M و bla-TEM در باسیل‌های گرم منفی جدا شده از بیمارستان آموزشی کودکان بندر عباس می‌باشد.

مواد و روش کار: تعداد ۶۰ سویه باسیل گرم منفی از نمونه‌های بالینی، جداسازی و با تست‌های بیوشیمیایی شناسایی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها با روش انتشار در ژل تعیین شد. PCR چندگانه برای شناسایی ژن‌های اینتگرون کلاس۱،۲،۳ و از PCR به منظور شناسایی bla-SHV، bla-CTX-M و bla-TEM استفاده شد.

نتایج: بیشترین فراوانی سویه‌ها مربوط به اشرشیاکلی،۷۰٪ و بیشترین میزان مقاومت و حساسیت به ترتیب مربوط به سولفومتوکسازول ۶۸٪ و جنتامایسین ۷۵٪ بود. ۳۷ سویه (۶۱/۷٪) دارای ژن اینتگرون کلاس ۱، و ۱۹ سویه (۲۶/۷٪)، دارای ژن اینتگرون کلاس ۲می‌باشند. اینتگرون کلاس ۳ در هیچ یک از سویه‌ها مشاهده نشد. بیشترین فراوانی ژن‌های کدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به ترتیب مربوط به ژن bla-CTX-M (۴۰ مورد، ۶۶/۷٪)، bla-TEM (۱۹مورد، ۳۱/۷٪) وbla-SHV (۶ مورد، ۱۰٪) می‌باشد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری P<۰/۰۵ بین حضور ژن‌های اینتگرون کلاس ۲ و ۱ و بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف bla-CTX-M، bla-SHV و bla-TEM و مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده گردید. از این‌رو شناسایی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و استفاده از روش درمانی مناسب بر پایه تعیین الگوی آنتی‌بیوگرام سویه‌ها توصیه می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: اینتگرون، TEM، SHV، CTX، PCR چندگانه، ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف.

---

۱. **تاریخ دریافت:** ۱۳۹۸/۰۷/۲۰ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۲/۱۰

۱. مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی به عنوان یکی از مشکلات عمده در بیمارستان‌ها به ویژه بیماستان کودکان مطرح می‌باشند. با توجه به محدوده سنی، عفونت‌های بیمارستانی انواع مختلفی از اختلالات نظیر، سپتی سمی، عفونت‌های ادراری، پنومونی و عفونت‌های زخم به دنبال اعمال جراحی را ایجاد می‌نماید (۲،۱). بیماران بستری در بیمارستان کودکان به دلیل پیچیدگی‌های مراقبتی و استفاده از وسایل پزشکی مختلف در معرض عفونت‌های مقاوم به چند دارو[1] می‌باشند که علاوه بر افزایش هزینه درمانی و طولانی شدن روند بهبودی، نهایتاً می‌تواند موجب مرگ و میر گردد (۳).

امروزه به دنبال استفاده نابجا و بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها، اثر بسیاری از این ترکیبات قدرتمند به علت افزایش مقاومت، کاهش یافته و در سراسر جهان شاهد ظهور سویه‌های با مقاومت چند دارویی هستیم (۴). به گونه‌ای که مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها[2]، عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به چند دارو را به عنوان تهدیدی جدی برای سلامت جامعه بشری مطرح نموده است. انجمن عفونی آمریکا به‌طور خاص سه دسته از باسیل‌های گرم منفی را که شامل سویه‌های کلبسیلا واشرشیاکلی مقاوم به سفالوسپورین، سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو و سویه‌های اسینتوباکتر مقاوم به کارباپنم‌ها می‌باشند را به عنوان سویه‌هایی با مقاومت چند دارویی مطرح کرده است (۵).

نقش انتقال افقی اینتگرون‌ها به عنوان موفق‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه‌ها و پیدایش گونه‌هایی با مقاومت نسبت به چند دارو اهمیت شناسایی این نوع ژن‌های مقاومتی را ضروری می‌نماید. اینتگرون‌ها، عناصر ژنتیکی متحرکی هستند که با قرارگیری در پلاسمیدها، کروموزوم‌ها و ترانس پوزون‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی را در حالی که در داخل قالب‌های ژنی قرار دارند، حمل و جابه‌جا می‌نمایند (۶).

تاکنون بیش از ۹ کلاس اینتگرون براساس تفاوت در ژن اینتگراز در باکتری‌های گرم منفی شناسایی شده‌اند. از میان این ۹ کلاس، تنها ۴ کلاس اصلی در میان جدایه‌های کلینیکی مطرح‌اند که اینتگرون‌های کلاس ۱و ۲ شایع‌ترین آنها می‌باشند (۷).

راهکارهای بروز مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌های مختلف در میان باکتری‌ها متفاوت است.

---

1. MDR: Multi Drug Resistance
2. CDC:Center for Disease control and prevention

یکی از شایع‌ترین مکانیسم‌های مقاومت، تولید آنزیم بتالاکتاماز در میان سویه‌های باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که با هیدرولیز نمودن آنتی بیوتیک‌های گروه بتالاکتام (سفالوسپورین‌های نسل اول، دوم و سوم و منوباکتام‌ها) موجب بی اثر نمون آنها و بروز مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها می‌شوند (۹،۸).

آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف[1] غالبا توسط ژن‌های پلاسمیدی کد می‌شوند و در گروه A و D از طبقه‌بندی مولکولی Ambler قرار دارند. آنزیم‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف شامل طیف گوناگونی از خانواده‌های آنزیمی بوده که Sulfydryl variable (SHV) Temoneria (TEM), Cefotaximase (CTX) از شایع‌ترین ژنوتیپ‌های این خانواده در باسیل‌های گرم منفی می‌باشند (۱۰). مطالعات نشان داده‌اند که شایع‌ترین نوع ESBL در اروپا، کانادا و آسیا، CTX-M است. درحالی‌که در سایر نقاط دنیا TEM, SMV شایع‌اند (۱۱). مطالعات متعدد حاکی از وجود ارتباط معنی‌دار بین حضور اینتگرون‌ها و انتشار ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از جمله ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف است (۱۷-۱۲).

متاسفانه تاکنون اطلاعات کافی در زمینه شیوع ژن‌های کلاس‌های مختلف اینتگرون (کلاس۱، ۲، ۳) و انواع ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در میان باسیل‌های گرم منفی جدا شده از نمونه‌های بالینی کودکان شهر بندرعباس وجود ندارد.

از این‌رو پژوهش حاضر با هدف بررسی میزان فراوانی اینتگرون کلاس ۱، ۲، ۳ و همچنین ارزیابی مولکولی ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف bla-CTX-M، bla-SHV و bla-TEM و تعیین شیوع آنها در میان باسیل‌های گرم منفی جدا شده از کودکان بستری در بیمارستان آموزشی کودکان بندرعباس در سال ۱۳۹۶ انجام شده است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. جامعه مورد بررسی و نمونه‌ها

مطالعه حاضر که به صورت توصیفی- مقطعی طی یک دوره چهار ماهه از مهر تا دی ماه ۱۳۹۶ انجام شد، تعداد ۶۰ سویه مختلف باکتری گرم منفی از نمونه‌های بالینی متفاوت شامل

1. ESBL: Extended-spectrum beta-lactamases

ادرار، خون، خلط، لوله تراشه و ترشحات چشم از بیماران بستری در بیمارستان آموزشی کودکان بندرعباس جداسازی شد.

۲-۲. کشت و شناسایی سویه‌ها

تمامی پلیت‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده علوم پزشکی بندرعباس بر روی محیط بلادآگار، مکانکی آگارو ائوزین متیلن بلو آگار کشت داده شدند. سپس، تمام پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸- ۲۴ساعت انکوبه گردیدند. کلنی رشد یافته، پس از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده باسیل و کوکوباسیل‌های گرم منفی، بر مبنای آزمون‌های بیوشیمیایی همچون تست‌های اکسیداز، تریبل شوگر آیرن آگار[1]، سولفور ایندول حرکت[2]، سیترات اوره[3] شناسایی گردیدند (18). محیط کشت‌های مصرفی از شرکت Merk آلمان و Himedia هند خریداری شد.

۲-۳. تست آنتی بیوگرام

حساسیت آنتی بیوتیکی ۶۰ سویه باکتری گرم منفی جدا شده به روش دیسک دیفیوژن آگار بر روی محیط مولر هینتون آگار با روش Kirby-Bauer انجام شد (۱۹).

در این مطالعه ۹ آنتی بیوتیک مورد استفاده از شرکت پادتن طب شامل سولفومتوکسازول (SXT,۲۵ µg)، سفتریاکسون (CRO, 30µg)، سفتازیدیم (CAZ, 30µg)، سفوتاکسیم (CTX, 30µg)، آمپی‌سیلین (AM,10 µg)، ایمیپنم (IPM, 10 µg)، جنتامایسین (GM, 10µg)، سیپروفلوکساسین (CP, 5µg) و فسفومایسین (FO,200 µg) می‌باشند.

نتایج حاصل براساس جدول استاندارد CLSI, Clinical Laboratory Standard Institute مربوط به سال ۲۰۱۷ تفسیر شد (۲۰).

۲-٤. استخراج DNA

DNA ژنومی ۶۰ سویه باکتری گرم منفی جدا شده با استفاده از روش جوشاندن Boiling Method استخراج گردید (۲۱).

---

1. TSI: Triple Sugar Iron Agar
2. Sulfur Indole MotilitySIM
3. OF: Oxidative fermentation

۲-۵. آزمون Multiplex –PCR

ژنوم تخلیص شده جهت بررسی حضور ژن‌های انتگرون کلاس ۲، ۳، ۱ به روش Multiplex-PCR مورد بررسی قرار گرفت (22). جدول (۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی ژن‌های اینگرون کلاس ۳، ۲، ۱ و ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف bla-CTX-M، bla-SHV و bla-TEM را نشان می‌دهد (23). واکنش Multiplex PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۳ میلی‌مول Mgcl2، ۰/۴میکرولار dNTPs، ۱ میکرومول از هر پرایمر، ۰/۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۱ میکرولیتر DNA استخراج شده انجام شد. براساس برنامه دمائی ذکر شده در جدول ۲ مراحل PCR در دستگاه ترموسایکلر (BIO-RAD T100، امریکا) انجام شد (۲۳).

جدول ۱- توالی پرایمرهای به کار رفته در واکنش Multiplex PCR وPCR (۲۳).

منابع	دمای واکنش	توالی پرایمرها	پرایمرها	اندازه محصول (bp)
(۲۴)	۵۴	5'- CAGTGGACATAAGCCTGTTC -3' 5'- CCCGAGGCATAGACTGTA -3'	Int-1F Int-1R	160bp
(۲۵)	۵۴	5'- GTAGCAAACGAGTGACGAAATG -3' 5'- CACGGATATGCGACAAAAAGGT -3'	Int-2F Int-2R	789bp
(۲۴)	۵۴	5'- GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG -3' 5'- ACGGATCTGCCAAACCTGACT -3'	Int-3F Int-3R	979bp
(۲۶)	۶۴	5'- TCAGCGAAAAACACCTTG -3' 5'- TCCCGCAGATAAATCACC -3'	SHV F SHV R	471bp
(۲۷)	۵۱	5'- TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA -3' 5'- CGATATCGTTGGTGGCATA-3'	CTX F CTX R	593bp
(۲۸)	۶۴	5'- GAGTATTCAACATTTCCGTGTC -3' 5'- TAATCAGTGAGGCACCTATCTC-3'	TEM F TEM R	848bp

جدول ۲- برنامهٔ دمائی مورد استفاده دستگاه PCR جهت Multiplex-PCR

زمان (min)	درجه حرارت	مراحل	تعداد چرخه
۷	۹۴	واسرشت اولیه	۱
۴۵ ثانیه	۹۴	واسرشت ثانویه	۳۵
۱	۵۴	اتصال پرایمرها	
۸	۷۲	طویل‌سازی اولیه	
۵	۷۰	طویل‌سازی نهایی	۱

۲-٦. آزمون PCR جهت شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف bla-SHV, bla-CTX-M و bla-TEM:

جهت انجام آزمون PCR به ازای هر نمونه در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر هر ویال شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر از DNA باکتری موردنظر با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱میکرولیتر از هر پرایمر و ۹/۵ میکرو لیتر آب مقطر استریل استفاده شد (۲۴). جدول ۳ برنامه دمائی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن‌های SHV, TEM, CTX را نشان می‌دهد. جهت تایید وزن مولکولی محصولات تکتیر شده در PCR از مارکر ۵۰bp (سیناکلون) استفاده شد. پس از انجام واکنش، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵% در بافر TBE (Tris-borate-EDTA) ۱% به مدت ۳۵ دقیقه با ولتاژ 85V الکتروفورز شدند و سپس در دستگاه ژل داکیومنت[1] مشاهده و بررسی شد.

جدول ۳- برنامه دمائی و زمانی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن‌های bla-CTX-M، bla-SHV و bla-TEM

	تعداد چرخه	مراحل	درجه حرارت	زمان (دقیقه)
ژنSHV	۱	واسرشت اولیه	۹۴	۵
	۳۵	واسرشت ثانویه	۹۴	۱
		اتصال پرایمرها	۶۴	۱
		طویل‌سازی اولیه	۷۲	۱
	۱	طویل‌سازی ثانویه	۷۲	۱۰
ژنCTX	۱	واسرشت اولیه	۹۴	۵
	۳۵	واسرشت ثانویه	۹۴	۱
		اتصال پرایمرها	۵۱	۱
		طویل‌سازی اولیه	۷۲	۱
	۱	طویل‌سازی ثانویه	۷۲	۱۰
ژنTEM	۱	واسرشت اولیه	۹۴	۵
	۳۵	واسرشت ثانویه	۹۴	۱
		اتصال پرایمرها	۶۴	۱
		طویل‌سازی اولیه	۷۲	۱
	۱	طویل‌سازی ثانویه	۷۲	۱۰

1. Bio-Rad Gel Doc

۲-۷. آنالیز آماری

نتایج مربوط به ارتباط ژن‌های اینتگرون کلاس ۱،۲،۳ و ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف bla-SHV،bla-CTX-M و bla-TEM و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ با آزمون کای اسکرئر[1] در سطح معناداری P< 0/05 بررسی گردید.

۳. یافته‌ها

نتایج حاصل از شناسائی باسیل‌های گرم منفی جدا شده بر مبنای تست‌های بیوشیمیایی نشان داد بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به اشرشیاکلی (۴۲ مورد، ۷۰%)، کلبسیلاپنومونیه (۸ مورد، ۱۳/۳%) سودوموناسآئروژینوزا (۶ مورد ۱۰%)، اسنیتوباکتربومانی (۲ مورد ۳/۳%) و انتروباکترآئروزینوزا (۲ مورد ۳/۳%) می‌باشد. نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی در جدول ۴ و ۵ آمده است.

جدول ٤- تعیین هویت باکتری سویه‌های اشریشیاکلی، انتروباکتر و کلبسیلا براساس تست‌های بیوشیمیایی

Bacteria	TSI			SIM			Citrate	Urea
	مصرف قند	گاز	H2S	حرکت	ایندول	H2S		
Escherichia coli	A/A	+	−	±	+	+	−	−
Enterobacter	A/A	-	-	+	-	−	+	±
Klebsiella	A/A	±	−	-	-	-	+	+

جدول ٥- تعیین هویت باکتری سویه‌های اسینتو باکتر و سودوموناس براساس تست‌های بیوشیمیایی

Bacteria	TSI			OF		Oxidase
	مصرف قند	گاز	H2S	رشد در شرایط هوازی	رشد در شرایط بی‌هوازی	
Acinetobacter	ALK/ALK	−	−	+	−	−
Pseudomonas	ALK/ALK	-	-	+	-	+

نتایج تست آنتی بیوگرام نشان داد که در میان ۶۰ سویه باکتری گرم منفی مورد بررسی، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک سولفومتوکسازول (SXT) با ۴۱ مورد (۶۸/۳%) بود، در حالی‌که بیشترین حساسیت به ترتیب در برابر آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین (۷۵%: ۴۵ مورد) و سیپروفلوکساسین (۷۱/۷%: ۴۳ مورد) مشاهده گردید.

1. Chi-square

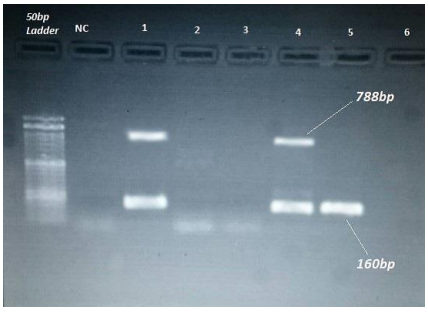
جدول ۶ جزئیات بدست آمده از نتایج آنتی بیوگرام را بر علیه ۶۰ باسیل گرم منفی نشان می‌دهد.

جدول٦- الگوی فعالیت آنتی بیوتیکی جدایه باسیل‌های گرم منفی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن*

آنتی‌بیوتیک	حساس(٪)	مقاوم(٪)	نیمه حساس(٪)
SXT سولفومتوکسازول	۱۸ (۳۰٪)	(۶۸٪/۳)۴۱	(٪۸٪/۳)۵
CTX سفوتاکسیم	(۲۶٪/۷)۱۶	(۶۵٪)۳۹	(۸٪/۳)۵
CRO سفتریاکسون	(۳۳٪/۳)۲۰	(۶۱٪/۷)۳۷	(۵٪)۳
IPM ایمیپنم	(۴۸٪/۷)۲۸	(۲۶٪/۷) ۱۶	(۲۶٪/۷)۱۶
FO فسفومایسین	(۴۸٪/۳)۲۹	(۴۵٪)۲۷	(۶٪/۷)۴
AM آمپی سیلین	(۲۶٪/۷)۱۶	(۶۰٪)۳۶	(۱۳٪/۳)۸
GM جنتامایسین	(۷۵٪)۴۵	(۲۰٪)۱۲	(۱٪/۷)۱
CPسیپروفلوکساسین	(۷۱٪/۷)۴۳	(۲۳٪/۳)۱۴	(۸٪/۳)۵
CAZسفتازیدیم	(۴۸٪/۳)۲۹	(۴۵٪)۲۷	(۶٪/۷)۴

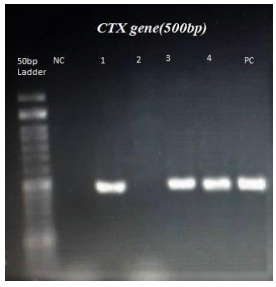
* سولفومتوکسازول (SXT, ۲۵ µg)، سفتریاکسون (CRO, 30 µg)، سفتازیدیم (CAZ, 30µg)، سفوتاکسیم (CTX, 30µg)، آمپی‌سیلین (AM, 10µg)، ایمیپنم (IPM, 10µg)، جنتامایسین (GM, 10µg)، سیپروفلوکساسین (CP, 5µg)، فسفومایسین (FO, 200µg).

آزمون Multiplex-PCR جهت تشخیص ژن‌های اینتگرون کلاس ۱، ۲، ۳ نشان داد که از مجموع ۶۰ سویه باکتری گرم منفی جدا شده مورد بررسی بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به ژن‌های اینتگرون کلاس۱ (۳۷ مورد، ۶۱/۷%) و اینتگرون کلاس ۲ (۱۹ مورد، ۲۶/۷%) می‌باشد. همچنین ژن اینتگرون ۳ در هیچ یک از سویه‌ها یافت نشد. اندازه باند مربوط به اینتگرون کلاس ۱، ۱۶۰bp و اندازه باند مربوط به اینتگرون کلاس ۲، ۷۸۹bp می‌باشد (شکل ۱).



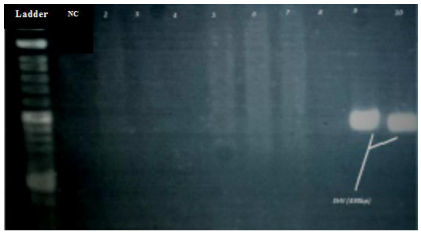
شکل ۱- نتایج PCRMultiplex جهت شناسایی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ (۱٦۰bp) و اینتگرون کلاس۲ (۷۸۹bp)، نشانگر مولکولی یا لدر: ۵۰bp;NC
نمونه کنترل منفی (E.coli ATCC 25922).

نتایج آزمون PCR نشان داد در میان ۶۰ جدایه مورد بررسی بیشترین فراوانی ژن‌های کدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به ترتیب مربوط به ژن CTX (۴۰ مورد، ۶۶/۷%)، TEM (۱۹مورد، ۳۱/۷%) و SHV (۶ مورد، ۱۰%) می‌باشد (شکل ۲،۳،۴).



شکل ۲- نتایج PCR جهت حضور ژن bla-CTX-M (۵۹۳bp)، نشانگر مولکولی یا لدر ۵۰bp: NC؛ نمونه کنترل منفی (E.coli ATCC 25922).

شکل ۳- نتایج PCR جهت حضور ژن bla-TEM (۸۴۸bp)؛ نشانگر مولکولی یا لدر ۵۰bp: PC؛ نمونه کنترل مثبت (K. pneumoniae ATCC700603).



شکل ٤- نتایج PCR جهت حضور ژن bla-SHV (٤٧١bp) ؛ نشانگر مولکولی یا لدر ۵۰bp: NC؛ نمونه کنترل منفی (E.coli ATCC 25922).

نتایج حاصل از توزیع فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف bla-SHV،bla-CTX-M و bla-TEM و اینتگرون‌های کلاس ۱و۲و۳ در میان ۶۰ سویه مورد بررسی نشان‌دهنده حضور هم‌زمان اینتگرون کلاس ۱ و ژن‌های bla-CTX-M در ۲۰ سویه، bla-SHV ۳ سویه و

bla-TEM ۱۴سویه است (جدول ۷). همچنین حضور هم‌زمان اینتگرون کلاس ۲ و ژن‌های bla-CTX-M در ۹ مورد، bla-SHV 2 مورد و bla-TEM در ۸ مورد از سویه‌های جداسازی شده مشخص گردید. ژن اینتگرون کلاس ۳ نیز در میان هیچ‌یک از جدایه‌ها مشاهده نگردید (جدول ۷).

جدول ۷- توزیع فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و اینتگرون‌های کلاس ۱،۲،۳.

	bla-CTX-M	bla-SHV	bla-TEM	تعدادکل
اینتگرون کلاس ۱	۲۰	۳	۱۴	۳۷
اینتگرون کلاس ۲	۲	۲	۸	۱۹
تعداد کل	۲۹	۵	۲۲	۵۶

*ژن اینتگرون کلاس ۳ در میان هیچ‌یک از جدایه‌ها مشاهده نشد.

با توجه به نتایج حاصل از آنتی بیوگرام، در میان باسیل‌های گرم منفی مورد بررسی، سولفومتوکسازول به عنوان مقاوم‌ترین آنتی بیوتیک شناسایی شد (جدول ۶). در میان سویه‌های مقاوم به سولفومتوکسازول، به ترتیب ۲۴ (۵۸/۵%) سویه دارای ژن اینتگرون کلاس ۱ ,۱۵ سویه (۳۶/۵۸%) ژن اینتگرون کلاس ۲، ۲۳سویه (۵۶%) ژن bla-CTX-M، ۵ سویه (۱۲%) ژن bla-SHV و ۱۶ سویه (۳۹%) دارای ژن bla-TEM می‌باشند.

همچنین نتایج حاصل از آنتی بیوگرام نشان داد بیشترین حساسیت سویه‌های جداسازی شده نسبت به آنتی بیوتیک جنتامایسین (۷۵%، ۴۵سویه) است. بر این مبنا در میان ۴۵ سویه حساس به آنتی بیوتیک جنتامایسین، ۲۶ (۵۷/۷%) سویه فاقد bla-CTX-M، ۴۱ (۹۱/۱۱%) سویه فاقد ژن bla-SHV و ۲۹ (۶۴/۴۴%) سویه فاقد ژن bla-TEM بودند.

٤. بحث

در سال‌های اخیر به دلیل انتشار ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی، عفونت‌های ایجاد شده توسط سویه‌های مختلف باسیل‌های گرم منفی از جمله کلبسیلا پنومونیه، آسینتوباکتربومانی، سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی تهدیدی جدی در حوزه درمان خصوصاً درمان عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شوند (۲۹). نقش اینتگرون‌ها به عنوان عناصر ژنتیکی متحرک و همچنین حضور ژن‌های مقاومت بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در انتشار گسترده مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از این رو، به منظور اجرای برنامه‌های کنترل

عفونت و ممانعت از انتشار سویه‌های مقاوم، لزوم شناسائی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی به دنبال شناسایی سویه‌های عفونت‌زا ضروری می‌باشد (۳۰).

بر این اساس در مطالعه حاضر میزان شیوع ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی (انتیگرون کلاس‌های ۲، ۳، ۱ و ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف bla-CTX-M، bla-SHV و bla-TEM در میان سویه‌های باسیل‌های گرم منفی جدا شده از بیماران بیمارستان آموزشی کودکان بندرعباس بررسی شد.

در مطالعه حاضر در میان ۶۰ سویه باسیل گرم منفی جدا شده، بیشترین میزان فراوانی متعلق به باکتری اشر شیاکلی (۷۰%) و کمترین فراوانی مربوط به اسنیتوباکتربومانی (۳/۳%) بود. نتایج بدست آمده هم‌راستا با نتایج نعیم و همکاران (۲۰۱۸) می‌باشد که میزان فراوانی باکتری اشرشیاکلی را ۲۲/۴% به عنوان بیشترین فراوانی در میان جدایه‌های بدست آمده از نمونه‌های بالینی در هند گزارش نمودند (۳۱). مطالعات نشان داده است که اشرشیاکلی به عنوان پاتوژن اولیه، عامل ۹۰-۷۵% عفونت‌های دستگاه ادراری بویژه در کودکان محسوب می‌شود (۳۲) در حالی‌که اسنیتوباکتربومانی نسبت به انواع آنتی بیوتیک‌ها دارای مقاومت ذاتی بوده و به عنوان یکی از مهمترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی در نقاط مختلف دنیا شناسایی شده است (۳۳).

در مطالعه حاضر، بیشترین درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در میان جدایه باسیل‌های گرم منفی به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک‌های سولفومتوکسازول (SXT: % 68)، سفوتاکسیم (CT: %65)، سفتریاکسون (CRO: %61) و آمپی سیلین (AM: %60) بود. در حالی‌که بیشترین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین (GM: %75) و سیپروفلوکساسین (CP: %71) مشاهده گردید. در مطالعه‌ای که توسط تینگ و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد، بیشترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین (از گروه بتالاکتام‌ها) گزارش شد (۳۴).

سویه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به‌طور ذاتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده گروه بتالاکتام از جمله همه سفالوسپورین‌ها مقاوم هستند، حتی اگر در شرایط آزمایشگاهی[1] نسبت به آنها حساسیت نشان دهند. چنانکه در این مطالعه سویه‌ها بیشترین مقاومت را بعد از سولفومتوکسازول به ترتیب نسبت به سفوتاکسیم و سفتریاکسون نشان دادند. اگرچه امروزه

1. Invitro

آنتی بیوتیک‌های گروه بتالاکتام به همراه مهارکننده‌های بتالاکتاماز به طور ترکیبی در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به کار می‌روند، اما به دلیل مصرف آنها در دوزهای بالا، عوارض جانبی به همراه دارند (۳۵).

با توجه به میزان مقاومت بالای باسیل‌های گرم منفی نسبت به آنتی بیوتیک‌های خانواده گروه بتالاکتام (۵۰%<)، به منظور جلوگیری از ظهور سویه‌هایی با مقاومت آنتی بیوتیکی، استفاده صحیح از آنتی بیوتیک‌های خانواده گروه بتالاکتام همواره توصیه می‌شود. از این رو، انجام آزمون‌های تعیین حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی (آنتی بیوگرام) قبل از تجویز دارو اهمیت بسزایی در انتخاب درمان، کنترل عفونت و مقاومت دارویی ایفا می‌نماید.

مطالعه حاضر میزان بالایی از شیوع ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ (۶۱/۶۶%) و۲ (۲۶/۷%) را به ترتیب در میان ۶۰ سویه باسیل گرم منفی جدا شده نشان داد، در حالی که ژن اینتگرون کلاس ۳ در میان هیچ یک از جدایه‌ها مشاهده نگردید. در مطالعه‌ای که wu و همکاران (۲۰۱۲) جهت بررسی حضور ژن اینتگرون در میان ۱۴۴۷ سویه باکتری گرم منفی مقاوم به چند دارو در چین انجام دادند، از میان جدایه‌های مورد بررسی، ۸۲۵ سویه (۵۷%) دارای ژن اینتگرون کلاس ۱ بودند (۳۲). همچنین در ایران مطالعات فراوانی در این خصوص انجام پذیرفته که با نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا می‌باشند (۳۶،۳۷).

در مطالعه حاضر فراوانی ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی CTX-Mbla- و SHVbla- به ترتیب با ۶۶/۵% و ۱۰% بیشترین و کمترین میزان فراوانی را در میان سویه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از خود نشان دادند. مطالعات نشان داده است که در اروپا، کانادا و آسیا شایع‌ترین نوع ESBL، CTX-M-Type ESBL می‌باشد که به عنوان جایگزین bla-SHV, bla-TEM محسوب می‌شود (۱۱).

در مطالعه‌ای که ترشیزی و همکاران با هدف بررسی شیوع ژن CTX-M در میان جدایه‌های انتروباکتریاسه مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از نمونه‌های بالینی بیمارستان آموزشی شهرکرد با روش PCR انجام دادند، مشخص شد در میان ۳۲۵ جدایه آنتروباکتریاسه ژن CTX-M نقش مهمی در بروز مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام ایفا می‌نماید. فراوانی ژن CTX-M در میان آنتروباکتریاسه‌های فنوتیپ مثبت ۵۰/۵% گزارش شد (۳۸).

در مطالعه‌ای که پیمانی و همکاران بر روی۱۲۰ سویه آنتروباکتر کلواکه جدا شده از

بیمارستان‌های شهر تهران و قزوین انجام دادند، فراوانی ژن-TEM به ترتیب 32/2% :1, CTX-M: %60 و SHV: %7/5 گزارش شد که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (۳۹).

در مطالعه حاضر با توجه به نتایج بدست آمده ارتباط معنی‌داری (p<۰/۰۵) بین حضور ژن‌های اینتگرون کلاس۲و۱ و بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (bla-CTX-M، bla-SHV و bla-TEM) و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک مشاهده گردید.

نتایج مطالعه حاضر اهمیت ویژه اینتگرون‌ها را در انتشار ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مولد مقاومت آنتی بیوتیکی در میان جدایه‌های بیمارستانی تائید کرد.

۵. نتیجه‌گیری

در میان باسیل‌های گرم منفی جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان کودکان بندر عباس در سال ۱۳۹۶، حضور ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی از جمله ژن‌های کدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و همچنین اینتگرون‌ها نشان از اهمیت تجویز آنتی بیوتیک منطقی به منظور جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم در محیط درمانی بیمارستانی و همچنین درک پیامدهای بالینی ناشی از عفونت با ارگانیسم‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف دارد.

٦. پیشنهادات

هر یک از عوامل بیماری‌زا، میزان حساسیت و مقاومت متفاوتی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها از خود نشان می‌دهند و این ویژگی می‌تواند نوع آنتی بیوتیک مصرفی، میزان مصرف و مدت زمان درمان آن را تحت تاثیر قرار داده و در نهایت می‌تواند نوساناتی را در مجموع هزینه‌های درمانی بیمارستان فراهم آورد. از این رو استفاده از روش درمانی مناسب بر پایه تعیین الگوی آنتی بیوگرام سویه‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی به طور خاص پیشنهاد می‌گردد.

References

1. Zerr DM, Qin X, Oron AP, Adler AL, Wolter DJ, Berry JE, et al. Pediatric Infection and Intestinal Carriage Due to Extended-Spectrum-Cephalosporin-Resistant Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Ch. 2014; 58(7): 3997-4004.
2. Ivády B, Kenesei É, Tóth-Heyn P, Kertész G, Tárkányi K, Kassa C, et al. Factors influencing antimicrobial resistance and outcome of Gram-negative bloodstream infections in children. Infection. 2016; 44(3): 309-21.
3. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(4): 657-86.
4. Dezfully NK, Heidari A. Natural bioactive compounds: antibiotics. J Fundam Appl Sci. 2016; 8(2): 674-84.
5. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. Pharm.Therapeut. 2015; 40(4): 277.
6. Diene SM, Rolain J-M. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species. Clin Microbiol Infect. 2014; 20(9): 831-8.
7. Cambray G, Guerout A-M, Mazel D. Integrons. Annu Rev Genet. 2010; 44(1): 141-66.
8. Sun S, Zhang W, Mannervik B, Andersson DI. Evolution of broad-spectrum beta-lactam resistance in an engineered metallo-beta-lactamase. J Biol Chemi. 2013; 288(4): 2314-24
9. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to Cephalosporins and Carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. Int J Med Microbiol. 2010; 300(6): 371-9.
10. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Antibiotic resistance and Extended Spectrum Beta-Lactamases: types, epidemiology and treatment. Saudi J Biol. Sci. 2015; 22(1): 90-101.
11. Cantón R, TM C. The CTX-M β-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol. 2006; 9(5): 466-75.
12. Villa L, Pezzella C, Tosini F, Visca P, Petrucca A, Carattoli A. Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an Extended-Spectrum Beta-Lactamase gene and a class 1 integron. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(10): 2911–2914.
13. Frank T, Gautier V, Talarmin A, Bercion R, Arlet G. Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 Integron gene cassettes in Enterobacteriaceae, Central African Republic (CAR). J Antimicrob Chem. 2007; 59(4): 742-5.
14. Kuihai W, Fengping W, Jingjing S, et al. Class 1 Integron gene cassettes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China. Int J Antimicrob Agents. 2012; 40(3): 264-267.
15. Moammadi F, Arabestani MR, Safari M, Roshanaii G, Alikhani MY. Prevalence of class1, 2 and 3 integrons among extensive drug resistance Acinetobacter baumanii strains isolated from intensive care units in Hamadan, west province, Iran . Iran J Med Microbiol. 2014; 8(3): 8-14.
16. Hajiahmadi F, Safari N, Alijani P, Rabiei M, Masomian N, Arabestani MR. Assessment of the Prevalence of Class I and II Integrons of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae Isolates From Hospitals of Hamadan. Avicenna J Clin Med. 2016; 23(3):193-201.
17. Ardeshiri N, Nasrollahi M, Goudarzi H, Goudarzi M, Ghalavand Z, Dadashi M. The

prevalence of Integron 1, 2 and 3 classes in Acinetobacter baumanii clinical isolates from Sari Hospitals, Iran. Res Med. 2017; 41(3): 217-225.
18. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. Elsevier Health Sciences; 2015, 8 th edition.
19. Biemer JJ. Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. Ann Clin Lab Sci. 1973; 3(2): 135-40.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, Pa: CLSI. 2017.
21. Yazdi M, Nazemi A, Mirinargasi M, Khataminejad M, Sharifi S, Babaikochkaksaraei M. Prevalence of SHV/CTXM/TEM (ESBL) beta-lactamase resistance genes in Escherichia coli isolated from urinary tract infections in Tehran. Med Lab J. 2010; 4: 67-80.
22. Manyahi J, Tellevik MG, Ndugulile F, Moyo SJ, Langeland N, Blomberg B. Molecular characterization of cotrimoxazole resistance genes and their associated integrons in clinical isolates of Gram-negative bacteria from Tanzania. Microb. Drug Resist. 2017; 23(1): 37-43.
23. Sedighi M, Halajzadeh M, Ramazanzadeh R, Amirmozafari N, Heidary M, Pirouzi S. Molecular detection of β-lactamase and integron genes in clinical strains of Klebsiella pneumoniae by multiplex polymerase chain reaction. Rev Soc Bras Med Trop. 2017; 50(3): 321-328.
24. Derakhshan S, Najar Peerayeh S, Bakhshi B. Association between presence of virulence genes and antibiotic resistance in clinical Klebsiella Pneumoniae isolates. Laboratory medicine. 2016; 47(4): 306-11.
25. Agersø Y, Petersen A. The tetracycline resistance determinant Tet 39 and the sulphonamide resistance gene sulII are common among resistant Acinetobacter spp. isolated from integrated fish farms in Thailand. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2006; 59(1): 23-7.
26. Zaniani FR, Meshkat Z, Nasab MN, Khaje-Karamadini M, Ghazvini K, Rezaee A, et al. The prevalence of TEM and SHV genes among extended-spectrum beta-lactamases producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Iranian journal of basic medical sciences. 2012; 15(1): 654.
27. Shahbazi S, Karam MRA, Habibi M, Talebi A, Bouzari S. Distribution of extended-spectrum β-lactam, quinolone and carbapenem resistance genes, and genetic diversity among uropathogenic Escherichia coli isolates in Tehran, Iran. Journal of global antimicrobial resistance. 2018; 14: 118-25.
28. Poirel L, Pham J, Cabanne L, Gatus B, Bell S, Nordmann P. Carbapenem-hydrolysing metallo-β-lactamases from Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli isolated in Australia. Pathology. 2004; 36(4): 366-7.

استناد به این مقاله:

وحدانی، مهشید؛ خندان دزفولی، نوشین؛ کرمستجی، افسانه (۱۳۹۹). بررسی فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱،۲،۳ و بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف bla-SHV، bla-CTX-M و bla-TEM در باسیل‌های گرم منفی جداشده از بیمارستان آموزشی کودکان بندرعباس (۱۳۹۶). *بیولوژی کاربردی*، دوره ۱۰، شماره ۳۸، ص ۴۷-۶۲ .