بررسی ارتباط بین ژن‌های *sul* و ژن *اینتگرون کلاس I* در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به سولفونامیدها جدا شده از موارد کلینیکی در شهرستان شهرکرد

مرضیه فارسی نژاد[۱]، مریم رئیسی [۲]، جمشید علی بابایی شهرکی[۳]، حسین خدابنده شهرکی [۴*]

۱.کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳. دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران.
۴. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
* نویسنده مسئول: Hossein.khodabandeh.sh@gmail.com

چکیده

مقاومت ضدمیکروبی به یک مشکل عمومی در سراسر جهان تبدیل شده است. کسب *اینتگرون* یکی از عوامل مهم چند مقاومتی در میکروارگانیسم‌های گرم منفی است. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن‌های *sul* و بررسی ارتباط بین ژن‌های *sul* و *اینتگرون کلاس I* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به سولفانامیدها جدا شده از موارد کلینیکی در شهرکرد می‌باشد. در این مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی ۹۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از موارد کلینیکی در شهرکرد، به روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی مقاومت به سولفانامیدها از آنتی بیوتیک کوتریموکسازول استفاده گردید. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به ردیابی ژن‌های *sul1*، *sul2*، *sul3* و *intI* پرداخته شد. پس از انجام آزمون PCR از ۳۳ ایزوله مقاوم به کوتریموکسازول ژن *sul1* در ۱۵ ایزوله (۴۵/۴۵درصد)، ژن *sul2* در ۲۰ ایزوله (۶۰/۶۰درصد)، ژن *Sul3* در ۲ ایزوله (۶/۰۶درصد) و ژن *intI* در ۲۷ ایزوله یافت شد. در تجزیه و تحلیل آماری بین ژن‌های *intI* و *sul1* ارتباط آماری معنی داری مشاهده گردید. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که یک ارتباط قوی بین حمل *اینتگرون* و افزایش مقاومت به تعدادی از کلاس‌های مختلف آنتی بیوتیکی وجود دارد.

واژگان کلیدی: *اینتگرون*، سولفونامیدها، *کلبسیلا پنومونیه*، مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی

مقدمه

عفونت‌های دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی در بیمارستان گزارش شده است که اغلب با مرگ و میر قابل توجهی همراه است (۲،۱). پاتوژن غالب عفونت‌های ادراری، *اشریشیاکلی* است. با این حال، افزایش دیگر *انتروباکتریاسه* مانند *کلبسیلا پنومونیه* و گرم منفی‌های غیرمخمری مانند *اسینتوباکتر* و *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان علل عفونت ادراری گزارش شده است (۵،۴،۳). تری متوپریم-سولفامتوکسازول (TMP-SMX) برای چندین دهه به عنوان آنتی بیوتیک های کارآمد برای درمان عفونت ادراری استفاده شده است (۶). با این حال در بسیاری از کشورها وجود مقاومت در برابر TMP-SMX می‌تواند به شکست درمان در موارد عفونت ادراری منجر شود (۲).

به‌طورکلی مقاومت به سولفانامیدها در باسیل‌های گرم منفی ناشی از دستیابی به ژن *دی هیدروپتروآت سنتتاز* (*DHPS*) در اینتگرون است که توسط داروها مهار نمی‌شود (۶). در حال حاضر سه نوع مختلف از ژن *DHPS*(*sul1*، *sul2* و *sul3*) مسئول مقاومت در برابر سولفانامیدها شناخته شده است. ژن *sul1* به طور انحصاری در پلاسمیدهای بزرگ کونژوگاتیو و انتهای ۳´ *اینتگرون* کلاس ۱ واقع شده است (۸،۷). درحالی‌که ژن *sul2* معمولاً در پلاسمیدهای متعلق به خانواده IncQ و یا در پلاسمیدهایی به نام پلاسمیدهای pBP1 واقع شده‌اند (۹). ساختمان پلاسمید حامل *sul3* هنوز به‌خوبی شناخته نشده است (۱۰). ژن‌های *sul1* و *sul2* شیوع بیشتری نسبت به ژن *sul3* دارند (۱۲،۱۱،۷). تری متوپریم، سنتز اسیدفولیک باکتریایی را توسط مهار دی هیدرو فولات ردوکتاز (DHFR)، تحت‌تأثیر قرار می‌دهد که باعث کاهش کاتالیز دی هیدروفولات به تتراهیدروفولات می‌شود (۶). تری متوپریم دارای مکانیسم‌های مقاومتی متعددی از جمله: گسترش موانع نفوذپذیری، پمپ‌های افلوکس، به طور طبیعی وجود آنزیم‌های DHFR هدف غیرحساس، جهش و تغییرات تنظیمی در آنزیم‌های هدف و بدست آوردن آنزیم‌های هدف مقاوم در برابر دارو می‌باشد (۶). در میان آنها، به‌دست‌آوردن واریانت‌های DHFR کدگذاری شده توسط ژن‌های *dfr*، شایع‌ترین مکانیسم مقاومت‌تری متوپریم است که منجر به مقاومت در سطح بالا برای باکتری‌های مختلف می‌شود (۱۳). در حال حاضر بیش از ۳۰ ژن *dfr* مختلف شناخته شده است که معمولاً در کاست ژنی اینتگرون ها یافت می‌شوند (۱۴،۱۳). در بین کلاس‌های *اینتگرونی* شناخته شده، *اینتگرون کلاس I* از اهمیت بالایی در انتقال ژن‌های مقاومت دارویی برخوردار است (۱۵). این *اینتگرون* در سمت ۵´ خود دارای ژن کدکننده اینتگراز (*intI*) و توالی attI می‌باشد و در سمت ۳´ خود دارای ژن‌های *qacEΔ* و *sulI* می‌باشد. باتوجه‌به این که بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به‌صورت روزافزون در میان باکتری‌های مختلف، به یک معضل بزرگ دررابطه‌با سلامت همگانی تبدیل شده بنابراین مطالعه بررسی فراوانی ژن‌های *sul* و بررسی ارتباط بین ژن‌های *sul* و *اینتگرون کلاس I* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به سولفانامیدها جدا شده از موارد کلینیکی در شهرستان شهرکرد حائز اهمیت است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی *کلبسیلا پنومونیه*در این مطالعه مقطعی-توصیفی از بین ۵۰۰۰ نمونه شامل ادرار، ترشحات چرکی چشم، ترشحات زخم، ترشحات ریه و نمونه کشت خون از افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی المهدی، الزهرا، پاستور، بیمارستان آیت اله کاشانی و هاجر، در سال ۱۳۹۲ تعداد ۹۰ ایزوله از باکتری *کلبسیلا پنومونیه* جدا گردید. در هنگام تهیه نمونه، پرسشنامه‌ای که در آن سن، جنس و نوع عفونت را مشخص می‌کند، تهیه گردید. در این تحقیق از *کلبسیلا پنومونیه* PTCC1290 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. به منظور شناسایی باکتری، نمونه مورد نظر بر روی محیط‌های بلاد آگار، سالمونلا شیگلا آگار و مک‌کانکی آگار کشت داده شد. کلنی‌های رشد یافته از نظر رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل چگونگی تخمیر قندها در محیط TSI، مک کانکی، سالمونلا شیگلا آگار، دکربوکسیلاسیون اسید آمینهٔ لیزین در محیط لیزین آیرون آگار (LIA)، تولید اندول، عدم حرکت در محیط SIM، واکنش در محیط MRVP broth، رشد در محیط سیمون سیترات و اوره آگار بررسی و در نهایت نتایج با استفاده از جداول استاندارد شناسایی گردیدند. در مواردی که مشکلاتی در تشخیص وجود

داشت از کیت محیط‌های API (بیومریو، فرانسه) استفاده شد (۱۶).

آزمایشات مولکولی

استخراج DNA

به‌منظور تشخیص قطعی و بررسی فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی مراحل استخراج DNA با روش جوشاندن بر روی کلنی‌های رشد کرده، صورت گرفت. برای این منظور کشت یک شبه باکتری در محیط پپتون واتر (مرک، آلمان) به‌عنوان منبع برای استخراج DNA، مورداستفاده قرار گرفت. برای این کار ۱۲۰ ماکرولیتر از محیط پپتون واتر که حاوی باکتری رشدیافته در محیط‌های کشت مورد بررسی بود (هر نمونه به شکل جداگانه)، را با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در بشر حاوی آب جوش، جوشانده شد. در این تحقیق از *کلبسیلا پنومونیه* به‌عنوان سویه استاندارد استفاده شد.

تأیید ایزوله‌ها با استفاده از آزمون PCR

بعد از استخراج DNA با استفاده از زوج پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* که در جدول ۱ نشان داده شده است، آزمایش PCR به منظور تشخیص قطعی *کلبسیلا پنومونیه* با استفاده از کیت Accupower PCR PreMix (بیونیر) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۲ میکرولیتر از پرایمرهای F و R و ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۳ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت انجام گرفت. ترکیبات موجود در کیت در جدول ۲ نشان داده شده است (۱۷).

جدول ۱.توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن*16srRNA* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*

ژن	توالی پرایمر (۳ـ۵)	اندازه محصول (bp)
16srRNA	F ATT TGA AGA GGT TGC AAA CGA T R TTC ACT CTG AAG TTT TCT TGT TT C	۱۳۰

تکثیر ژن *16srRNA* با برنامه حرارتی ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، ۶۸ درجه ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه انجام گرفت و مشاهده باند ۱۳۰ جفت بازی نشان‌دهنده مثبت بودن این تست است.

جدول ۲.اجزای کیت AccupowerPCRPreMix

Component	20 µl Reaction
Taq DNA Polymerase	1 U
Each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTp)	250 µM
Tris-HCl (pH=9)	mM10
KCl	30 mM
MgCl2	1.5 mM
Stabilizer and tracking	

شناسایی ژن‌های *sul1*، *sul2* و *sul3* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*

آزمایش PCR به‌منظور ردیابی ژن‌های *sul1*، *sul2* و *sul3* در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۱/۵ میکرولیتر از پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۳/۵ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت انجام گرفت. این آزمون بر روی ایزوله‌هایی که نسبت به آنتی بیوتیک کوتریموکسازول مقاوم بودند صورت گرفت. تکثیر ژن‌های *sul1*، *sul2* و *sul3* با برنامه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۶۵ درجه ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۷ دقیقه انجام گرفت و مشاهده باند ۴۳۳ جفت بازی نشان دهنده وجود ژن *sul1*، باند ۲۹۳ جفت بازی نشان دهنده وجود ژن *sul2* و باند ۷۵۰ جفت بازی نشان دهنده وجود ژن *sul3* می‌باشد (۱۸،۱۷).

جدول ۳. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص ژن‌های ***sul* 1**، ***sul* 2** و ***sul* 3**

Gene	Sequence (5'–3')	Annealing temp (0C)	Size of product (bp)	Reference
Sul 1	F: CGGCGTGGGCTACCTGAACG R: GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	65	433	2
Sul 2	F: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT R: GCGTTTGATACCGGCACCCGT	65	293	2
Sul 3	F: GCCTATGCATCTACACAATC R: TGAGAAATGGACAATGTCCG	65	750	25
IntI	F: CAGTGGACATAAGCCTGTTC R: CCCGAGGCATAGACTGTA	53	160	25

ردیابی ژن *intI* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*

پس از شناسایی ایزوله‌های واجد ژن *sul* در حضور پرایمرهای اختصاصی ژن *intI* که در جدول ۳ نشان داده شده است، واکنش PCR برای تکثیر ژن *intI* در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۱ میکرولیتر از پرایمرهای F، R و ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۴ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت Accupower PCR PreMix انجام گرفت. تکثیر ژن *intI* با برنامه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۳دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه انجام گرفت و مشاهده باند ۱۶۰ جفت بازی نشان‌دهنده مثبت بودن تست است. بعد از انجام آزمایشات PCR، به منظور تأیید وجود قطعه تکثیر شده، محصول PCR روی ژل ۲درصد آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز، آلمان) الکتروفورز و نتیجه با دستگاه تصویر بردار از ژل (انگلستان، یووی تک) مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش آنتی بیوگرام

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش کربی - بائر برطبق دستورالعمل NCCLS (پادتن طب) استفاده شد. در این تحقیق از سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* PTCC1290 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در این آزمایش شامل: کوتریموکسازول (تری‌متوپریم - سولفامتوکسازول) (SXT)، آموکسی‌سیلین (AMX)، سفتریاکسون(CRO30)، نیتروفورانتئین(FM300)، سفالوتین(CF30)، نالیدیکسیک اسید(NA30)، نورفلوکساسین(NOR)، تتراسایکلین(TE30)، ایمی‌پنم (PM)، جنتامایسین(GM10)، کانامایسین(AN) و سیپروفلوکساسین(CP) (پادتن طب، ایران) مورداستفاده قرار گرفتند. برای انجام آنتی بیوگرام طبق دستورالعمل ۳NCCLS تا ۴ کلنی از باکتری مورد نظر را برداشته و به محیط TSB انتقال داده و به مدت ۱ تا ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده تا کدورتی معادل نیم مک فارلند حاصل شود سپس با استفاده از سوآپ استریل از باکتری برداشته و به‌صورت فشرده بر روی محیط مولر هینتون کشت انجام شد و دیسک‌های موردنظر با حفظ فاصله روی آن قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بر اساس اندازه هاله‌ی ممانعت از رشد، بر اساس جدول شرکت پادتن طب نتایج ثبت شد (۱۹).

تجزیه‌وتحلیل آماری

نتایج حاصل از ارزیابی ژن‌های *sul1*، *sul2* و *sul3* و *اینتگرون*‌های کلاس *I* با استفاده از آزمون مربع کای اسکوار و دقیق فیشر و با نرم‌افزار SPSS شماره ۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج به‌منظور شناسایی *اشریشیا کلی* از تست‌هایی نظیر IMViC، H_2S، اوره و لیزین دکربوکسیلاز استفاده گردید که نتایج آن در جدول ۴ نشان‌داده‌شده است:

جدول ۴. نتایج تست‌های بیوشیمیایی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از موارد کلینیکی

نوع باکتری	نوع تست						
	تولید اندول	متیل رد	ووژس پروسکوئر	سیترات	H_2S	اوره	لیزین دکربوکسیلاز
کلبسیلا پنومونیه	-	-	+	+	+	+	+

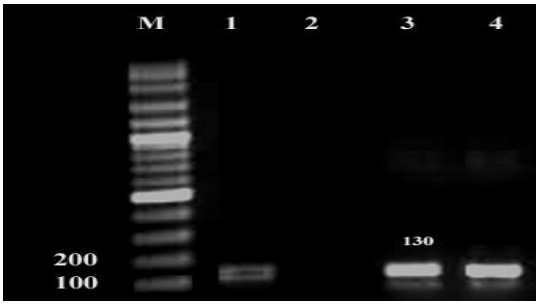
در آزمایش آنتی بیوگرام جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* از آنتی‌بیوتیک‌های معمول در درمان عفونت‌های انسانی استفاده شد که همان‌گونه که در جدول ۵ نشان‌داده‌شده است بیشترین مقاومت نسبت به آموکسی‌سیلین ۹۷/۸درصد و کمترین مقاومت نسبت به ایمی‌پنم ۴/۴درصد گزارش شده است. مقاومت به کوتریموکسازول در ۳۳ ایزوله (۷/۳۶درصد) گزارش گردید. از ۹۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* مورد بررسی در این تحقیق در ۷۱ ایزوله مقاومت به بیش از ۲ آنتی‌بیوتیک مشاهده گردید.

جدول ۵: مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از موارد کلینیکی

	تعداد مقاومت چندگانه	مقاومت آنتی‌بیوتیکی
ایزوله ۲	۷	IPM / FEP / CP/ CRO / AN / GM
ایزوله ۳	۱۱	FM , IPM , FEP, TE , SXT, CP , CRO , CF, NOR , AN , GM
ایزوله ۴	۷	AM , FEP, K , CRO , CF, AN , GM
ایزوله ۵	۴	AM , TE , SXT, CF,
ایزوله ۶	۹	FM , AM , FEP, K , CRO , CF, NOR , AN , GM
ایزوله ۷	۶	FM / AM/ CRO / CF / AN / GM
ایزوله ۸	۹	K / FEP / FM / AM / CRO / CF / AN / GM / NOR
ایزوله ۹	۱	NA , IPM , FEP, TE , SXT, CP , K , CRO , CF, NOR , AN , GM
ایزوله ۱۰	۷	SXT / GM / CF /CRO / K/ AM / FM
ایزوله ۱۱	۵	NOR / TE / CF / AM / FM
ایزوله ۱۲	۷	AN / FEP / GM / CRO / CF / AM / K
ایزوله ۱۳	۳	CF / AM / TE
ایزوله ۱۴	۸	FM , AM , FEP, TE , K , CRO , CF, NOR , AN , GM
ایزوله ۱۵	۲	FM , NA , IPM , FEP, SXT, CP , CRO , NOR , AN , GM
ایزوله ۱۶	۷	AN/FEP/CRO/GM/AM/K/CF
ایزوله ۱۷	۱۳	FM, AM , NA , IPM , FEP, TE , CP , K , CRO , CF, NOR , AN , GM
ایزوله ۱۸	۱۰	NA/TE/AN/FEP/CRO/GM/AM/K/CF/FM/
ایزوله ۱۹	۴	SXT/NA/TE/AM
ایزوله ۲۰	۳	SXT/FM/AM
ایزوله ۲۱	۵	NA/TE/SXT/K/AM
ایزوله ۲۲	۸	CRO/CF/NOR/NA/TE/SXT/AM/FM
ایزوله ۲۳	۸	CRO/CF/NA/TE/SXT/AM/FM/FEP
ایزوله ۲۴	۳	AM/FM/K
ایزوله ۲۵	۴	NA/SXT/AM/K
ایزوله ۲۶	۷	AN/GM/CRO/CF/FEP/AM/K
ایزوله ۲۷	۷	NA/SXT/FM/CRO/CF/FEP/AM
ایزوله ۲۸	۷	NA/SXT/FM/CRO/CF/FEP/AM
ایزوله ۲۹	۴	TE/SXT/CF/AM
ایزوله ۳۰	۸	NOR/GM/CRO/FEP/AN/K/CF/AM
ایزوله ۳۱	۹	SXT/GM/CRO/FEP/AN/CF/FM/AM/K

ایزوله ۳۲	۸	SXT/GM/CRO/FEP/AN/CF/AM/K
ایزوله ۳۳	۷	GM/CRO/FEP/AN/CF/AM/K
ایزوله ۳۴	۹	NOR/TE/GM/CRO/FEP/AN/CF/AM/K
ایزوله ۳۵	۸	SXT/GM/CRO/FEP/AN/CF/AM/K
ایزوله ۳۶	۱۰	CP/IPM/NOR/CRO/FEP/CF/AM/TE/K/NA
ایزوله ۳۷	۹	SXT/CP/NOR/CRO/CF/AM/TE/K/NA
ایزوله ۳۸	۴	FM/K/NA/AM
ایزوله ۳۹	۴	SXT/TE/K/AM
ایزوله ۴۰	۴	FM/TE/K/AM
ایزوله ۴۱	۴	AN/SXT/FM/AM
ایزوله ۴۲	۳	FM/AM/TE
ایزوله ۴۳	۹	GM/FEP/NOR/CRO/CF/AN/AM/K/FM
ایزوله ۴۴	۴	SXT/TE/AN/AM
ایزوله ۴۵	۶	NA/SXT/AN/AM/CF/TE
ایزوله ۴۶	۳	AM/TE/FM
ایزوله ۴۷	۴	SXT/NA/AM/TE
ایزوله ۴۸	۸	FEP/CF/CRO/FM/K/SXT/AM/TE
ایزوله ۴۹	۳	CF/SXT/AM
ایزوله ۵۰	۴	NA/FM/AM/TE
ایزوله ۵۱	۸	GM/AN/FEP/CRO/AM/TE/CF/K
ایزوله ۵۲	۴	FM/AN/AM/K
ایزوله ۵۳	۱۱	NOR/CP/IPM/SXT/FEP/CRO/TE/CF/NA/AM/K
ایزوله ۵۴	۸	GM/FEP/CRO/TE/CF/AM/K/AN
ایزوله ۵۵	۵	NA/FEP/TE/AM/FM
ایزوله ۵۶	۶	NOR/CP/AN/NA/AM/CF
ایزوله ۵۷	۴	SXT/FM/AM/TE
ایزوله ۵۸	۱۰	IPM/CRO/NA/CF/SXT/AM/TE/NOR/CP/K
ایزوله ۵۹	۶	NA/SXT/AM/FM/TE/K
ایزوله ۶۰	۹	GM/CRO/FEP/AN/AM/FM/TE/K/CF
ایزوله ۶۱	۵	SXT/AM/FM/TE/CF
ایزوله ۶۲	۸	GM/CRO/FEP/CF/K/AN/AM/TE
ایزوله ۶۳	۵	CRO/FEP/CF/K/AM
ایزوله ۶۴	۵	SXT/CRO/CF/K/AM
ایزوله ۶۵	۷	GM/AN/FEP/CRO/CF/AM/K
ایزوله ۶۶	۵	SXT/TE/CRO/CF/AM
ایزوله ۶۷	۳	SXT/TE/AM
ایزوله ۶۸	۳	SXT/FM/AM
ایزوله ۶۹	۷	GM/AN/FEP/CRO/CF/AM/K
ایزوله ۷۰	۶	SXT/FM/FEP/CRO/CF/AM
ایزوله ۷۱	۴	TE/SXT/CF/AM

در این تحقیق پس از انجام آزمون PCR به‌منظور تشخیص قطعی باکتری *کلبسیلا پنومونیه* و حضور توالی ژن *16SrRNA*، تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۱۳۰ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. نتایج در شکل ۱ نشان‌داده‌شده است.

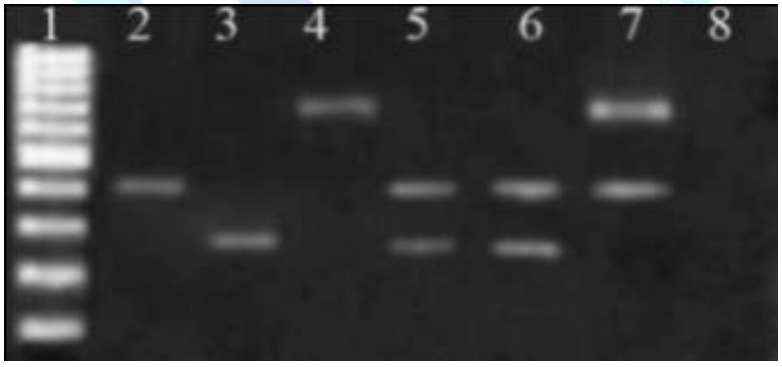


شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن *16srRNA* باکتری *کلبسیلا پنومونیه*: ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱ کنترل مثبت، ستون ۲ : کنترل منفی، ستون‌های ۳ و ۴ نمونه‌های مثبت

همان طور که در جدول ۶ و شکل ۲ نشان داده شده است پس از انجام آزمون PCR در حضور پرایمرهای اختصاصی از ۳۳ ایزوله مقاوم به سولفونامید، ژن‌های *sul1* در ۱۵(۴۵/۴۵درصد) ایزوله، *sul2* در ۲۰(۶۰/۶۰درصد) ایزوله و *sul3* در ۲(۶/۰۶درصد) ایزوله مشاهده گردید.

جدول ۶: فراوانی ژن‌های *sul 1*، *sul 2* و *sul 3* در *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به سولفونامیدها

	No. of isolates with genes					
Strain Charachteristic	*Sul 1*	*Sul 2*	*Sul 3*	*Sul 1* *Sul 2*	*Sul 1* *Sul 3*	*Sul 1* *sul 2* *Sul 3*
Sulfonamide Resistance N=33	15 45.45%	20 60. 60%	2 6. 06%	2 6. 06%	1 3. 03%	- 0%

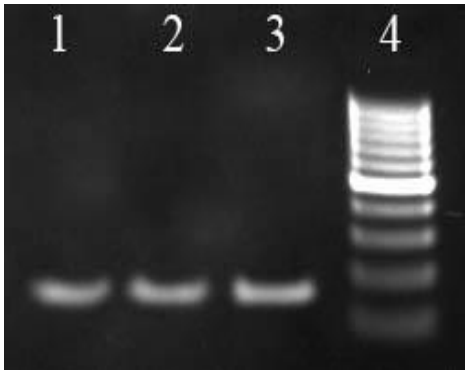


شکل ۲. ژل حاصل از الکتروفورزمحصولات PCR ژن‌های *sul1, 2, 3*: ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۲: باند ۴۳۳ جفت بازی مربوط به ژن *Sul1*، ستون ۳: باند ۲۹۳ جفت بازی مربوط به ژن *Sul2*، ستون ۴: باند ۷۵۰ جفت بازی مربوط به ژن *Sul 3*، ستون‌های ۵ و ۶: باندهای مربوط به ژن‌های *sul1* و *sul2* ، ستون ۷: باندهای مربوط به ژن‌های *sul1* و *sul3*

همان‌طور که در جدول ۷ و شکل ۳ نشان داده شده است پس از انجام آزمون PCR از ۳۳ ایزوله مقاوم به کوتریموکسازول ژن *intI* در ۲۷ ایزوله مشاهده گردید. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون مربع کای بین وجود *intI* و *sul1* ارتباط آماری معنی داری مشاهده گردید (pvalue<0. 05).

جدول ۷: فراوانی ژن *intI* در ایزوله‌های مقاوم به سولفونامیدها

	No. of isolates with genes		
Strain Charachteristic	*Sul 1* + *Int 1*	*Sul 2* + *Int 1*	*Sul 3* + *Int 1*
Sulfonamide Resistance N=33	22 66. 66%	3 15. 15%	2 6. 06%



شکل ۳. ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR ژن *intI*: ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون‌های ۱،۲،۳ باند ۱۶۰ جفت بازی ژن *intI*

بحث

مطالعه حاضر باهدف فراوانی ژن‌های *sul* و بررسی ارتباط بین ژن‌های *sul* و اینتگرون کلاس *I* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به سولفانامیدها جدا شده از موارد کلینیکی در شهرستان شهرکرد با دو روش آنتی بیوگرام و مولکولی (PCR) انجام گرفت. از ۵۰۰۰ نمونه شامل ادرار، ترشحات چرکی چشم، ترشحات زخم، ترشحات ریه و نمونه کشت خون بیماران مبتلا به عفونت‌های انسانی، مقاومت به کوتریموکسازول در ۳۳ ایزوله (۷/۳۶درصد) گزارش گردید که از ۹۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* مورد بررسی در این تحقیق در ۷۱ ایزوله مقاومت به بیش از ۲ آنتی‌بیوتیک مشاهده گردید که بیشترین مقاومت نسبت به آموکسی‌سیلین (۹۷/۸درصد) و کمترین مقاومت نسبت به ایمی‌پنم (۴/۴درصد) گزارش شده است.

در این تحقیق فراوانی ژن‌های *sul1*، *sul2* و *sul3* در ایزوله‌های مقاوم به کوتریموکسازول به ترتیب در (۴۵/۴۵درصد)۱۵ ایزوله، (۶۰/۶۰درصد)۲۰ ایزوله و (۶/۰۶درصد)۲ ایزوله مشاهده گردید. در مطالعه‌ای که توسط Sallen و همکاران‌صورت گرفت میزان شیوع *اینتگرون‌ها* در باکتری‌های خانواده *انتروباکتریاسه* ۵۹درصد برآورد گردید (۲۰). شیوع پائین *اینتگرون‌های کلاس I و II* در گزارش Farshad وهمکاران قابل توجه می‌باشد، در این تحقیق که بر روی باکتری‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از موارد عفونت‌های بیمارستانی در کودکان شیراز صورت گرفت، شیوع *اینتگرون کلاس I* در (۶/۲۵ درصد) از ایزوله‌ها و شیوع *اینتگرون کلاس II* در (۱۰/۴۱ درصد) ازایزوله‌ها گزارش گردید (۲۱). در این مطالعه ارتباط معنی داری بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول و حضور *اینتگرون کلاس I* مشاهده گردید. در مطالعه انجام شده توسط اسلامی و همکاران شیوع *اینتگرون* در باکتری‌های *اشریشیا کلی* مقاوم به چند دارو، جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری کودکان ۲۰/۵ درصد گزارش گردید (۲۲). دراین مطالعه ارتباط معنی داری بین *اینتگرون* و مقاومت به جنتامایسین، نورفلوکساسین، سفالوتین و نالیدیکسیک اسید مشاهده شد.

در تحقیق انجام شده توسط رنجبران و همکاران مقاومت ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول ۷۰ درصد و فراوانی *اینتگرون کلاس I*، ۹۰درصد برآورد گردید (۲۳). در این تحقیق ارتباط معنی‌داری بین حضور *اینتگرون کلاس I* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی کوتریموکسازول، جنتامایسین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و آموکسی کلاو مشاهده گردید. در مطالعه Zhaoو همکاران ۷۰درصد از ایزوله‌های *کلبسیلا* و ۴۹درصد از ایزوله‌های *اشریشیاکلی* دارای *اینتگرون* کلاس*I* بودند (۲۴). در این تحقیق ارتباط معنی‌داری بین حضور *اینتگرون* و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، توبرامایسین، کوتریموکسازول، سفتازیدیم و سفوتاکسیم گزارش گردید.

نتیجه‌گیری

در نتیجه این مطالعه نشان داده است که در بررسی ارتباط بین ژن‌های *sul* و *intI* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به سولفانامیدهای جدا شده از موارد کلینیکی، فراوانی این ژن‌ها به ترتیب *intI+sul1* (۶۶/۶۶درصد)۲۲، *intI+sul2* (۱۵/۱۵درصد)۳ و *intI+sul3* (۶/۰۶درصد)۲ مشاهده شد که باتوجه‌به نتایج بدست آمده از آزمون PCR و همچنین بررسی‌های حاصل از تجزیه‌وتحلیل آماری نشان می‌دهد که بین *intI* و ژن‌های *sul* ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به سولفانامیدها ارتباط معنی‌داری وجود دارد. گزارشات

حاکی از وجود *اینتگرون*‌ها در اغلب نقاط دنیا می‌باشد و باتوجه‌به نتایج به‌دست‌آمده مشخص می‌گردد که یک ارتباط قوی بین حمل *اینتگرون* و افزایش مقاومت به تعدادی از کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی وجود دارد. باتوجه‌به این ژن‌های مقاومت بر روی *اینتگرون*‌ها قرار دارند و می‌توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند و مقاومت را در بیمارستان یا دیگر محیط‌های درمانی منتشر نمایند لذا این امر اهمیت شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را دوچندان کرده و تعیین شیوع این ژن‌ها جهت اجرای برنامه‌های کنترل عفونت و هم چنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ممانعت از انتشار عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم را ضروری می‌نماید.

منابع

1. 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 Chemother. 2007; 59: 742-745.
2. Gundogdu A, Long YB, Vollmerhausen TL, Katouli M. Antimicrobial resistance and distribution of sul genes and integron-associated *intI* genes among uropathogenic *Escherichia coli* in Queensland, Australia. J Med Microbiol. 2011; 60: 1633-1642.
3. Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. Nat Rev Urol. 2010; 7: 653-660.
4. Djordjevic Z, Folic MM, Zivic Z, Markovic V, Jankovic SM. Nosocomial urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *acinetobacter* species: sensitivity to antibiotics and risk factors. Am J Infect Control. 2013; 41: 1182-1187.
5. Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. J Infect Public Health. 2009; 2: 101-111.
6. Huovinen P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clin Infect Dis. 2001; 32: 1608-1614.
7. Trobos M, Christensen H., Sunde M, Nordentoft S, Agerso Y, Simonsen GS, Hammerum AM, Olsen JE. Characterization of sulphonamide-resistant *Escherichia coli* using comparison of *sul2* gene sequences and multilocus sequence typing. Microbiology. 2009; 155:831–836.
8. Hall RM, Collis CM. Antibiotic resistance in gramnegative bacteria: the role of gene cassettes and *integrons*. Drug Resist Updat. 1998; 1:109–119.
9. van Treeck U, Schmidt F, Wiedemann B. Molecular nature of a streptomycin and sulfonamide resistance plasmid (pBP1) prevalent in clinical *Escherichia coli* strains and integration of an ampicillin resistance transposon (TnA). Antimicrob Agents Chemother. 1981; 19: 371–380.
10. Wu S, Dalsgaard A, Hammerum AM, Porsbo LJ, Jensen LB. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. Acta Vet Scand. 2010; 52:47.
11. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Que TL. Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. Lett Appl Microbiol. 2009; 49:627–634.
12. Bean DC, Livemore D, Hall LM. *E.coli*: implications for Plasmids imparting sulfonamide resistance in persistence. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 1088-1093.
13. Seputiene V, Povilonis J, Ruzauskas M, Pavilonis A, Suziedéliene E. Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania. J Med Microbiol. 2010; 59: 315-322.
14. Cambray G, Guerout AM, Mazel D. *Integrons*. Annu Rev Genet. 2010; 44: 141-166.
15. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and *integrons*: capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol Microbiol. 1995; 15 (4): 593-600.
16. Walker TS. Microbiology. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998, p. 202-217.
۱۷. ادیب فر پ. میکروب شناسی پزشکی. چاپ هفتم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۸۳؛ صفحات ۶۰-۸۰.
18. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, Jawetz MA. Medical Microbiology. McGrave -Hill Medical, New York, NY,USA. 2010; 224-233.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Methods for disk antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. Wayne, Pa: 2003.
20. Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Mabilat C. Molecular epidemiology of *integron*-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of enterobacteriaceae. Microb Drug Resist. 1995; 1(3):195-202.
21. Farshad Sh, Japoni A, Hosseini M. Low Distribution of *Integrons* among multidrug resistant *E. coli* strains isolate from children with community-acquired urinary tract infections in shirazTiran. polish J Microbiol. 2008; 57 (3):193-198.

ادراری. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۱۳۹۲؛ دوره ۲۳، شماره ۱۰۵، صفحات ۲۰-۲۷.

24. Zhao HX, Shan JZ, An XP, Fan HL, Cao JS, Li PF. Characterization of *integrons* in multiple antimicrobial resistant Escherichia coli isolates from bovine endometritis. Res Vet Sci. 2011; 91(3): 412-414.

25. Mazel D. *Integrons*: agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol. 2006; 4: 608-20.

۲۲. اسلامی ج.، سید جوادی س، فلاح چ، گودرزی ف. شیوع *اینتگرون های* مقاوم به چند دارو در *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا* جدا شده از عفونت ادراری در کودکان. مجله پژوهنده، ۱۳۸۹؛ دوره ۳۴، شماره ۱، صفحات ۶۱-۶۵.

۲۳. رنجبرانم، ذوالفقاریم ر، ژاپنی نژاد ع، عموزاده نوباوه ع، ابطحی ح، طبیب نژادم، غزنوی راد ا. بررسی مولکولی *اینتگرون ها* در *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌های

Investigate the frequency of genes *sul* and investigate the relationship between genes *sul* and Class *I* integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to sulfonamides isolated from clinical cases in Shahrekord

Marziyeh Farsinejad [1], Maryam Reisi [2], Jamshid Ali Babaei Shahraki [3], Hossein Khodabandeh Shahraki [4*]

1. M.Sc. Student of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2.Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Master's degree student, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran.
4. PhD Student in Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author: Hossein.khodabandeh.sh@gmail.com

Abstract

Antimicrobial resistance is a common problem throughout the world. Acquire integrons is one One of the main causes multi- resistance in gram-negative microorganisms. The purpose of this study, Investigate the frequency of genes sul and investigate the relationship between genes sul and Class *I integrons* in *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to sulfonamides isolated from clinical cases in Shahrekord. In this study, antibiotic resistance 90 isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical cases of Shahrekord,disk diffusion method was performed. In order to investigate resistance to sulfonamides of the antibiotic cotrimoxazole was used. Then using specific primers was performed tracing genes *sul1*, *sul2* and *sul3* and *intI*. After PCR reaction of 33 isolates resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole *sul1* gene in 15 isolates (45/45%), *sul2* gene in 20 isolates (60/60%), gene *Sul3* in 2 isolates (6/06%) and the gene *intI* 27 isolates was found. The statistical analysis between genes *sul1*and *IntI* significant relationship was observed. The results of this study show that is a strong correlation between carry integrons and increased resistance to a number of different classes of antibiotics.

Keywords: *Integron*, *Klebsiella pneumonia*, Multi-resistance antibiotics, Sulfonamides