رهیافت‌های نوین در علوم سلولی و مولکولی
JNACMS
دوره ۲ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۳
Journal homepage: https://sanad.iau.ir/journal/nacms

بررسی فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ در ایزوله‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژن جدا شده از بیماران دیابتی در شهرستان شهرکرد

نگین دلی سرراکی[۱]، فاطمه خداوردی پور[۲]، نازیلا ارباب سلیمانی[۳*] محمد رضا افشارزاده[۴]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲. مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.
۴. گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

چکیده

سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن شایع‌ترین سویه‌های بیماری‌زا در انسان می‌باشند. مهم‌ترین خصوصیت سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن، توانایی کلونیزه شدن آن‌ها در سطح سلول‌های یورواپیتلیوم میزبان می‌باشد. مطالعه حاضر بر روی ۳۰۰ نمونه ادرار بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس نوع ۲ مشکوک به عفونت ادراری، مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد در سال ۱۳۹۴ صورت گرفت. ۵ تا ۱۰ سی سی نمونه ادرار بیماران دیابتی در ظروف استریل جمع آوری و با استفاده از لوپ کالیبره، ۰/۰۱ میلی لیتر از نمونه ادرار سانتریفوژ نشده در شرایط استریل بر روی محیط مک کانکی آگار کشت داده شد. در این تحقیق پس از انجام آزمون PCR به منظور تشخیص قطعی باکتری *اشریشیا کلی*، حضور توالی ژن *16srRNA* تمامی نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و در حضور پرایمرهای اختصاصی به فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ پرداخته شد. از ۳۰۰ بیمار دیابتی مورد بررسی در ۱۰۰ نمونه عفونت ادراری تشخیص داده شد که در ۵۱ نمونه (۵۱ درصد) آلودگی *به اشریشیا کلی* گزارش شد. از ۵۱ ایزوله اشریشیاکلی مورد بررسی اینتگرون کلاس ۱ در ۳۰ ایزوله (۵۸/۸۲ درصد)، اینتگرون کلاس ۲ در ۲۰ ایزوله (۳۹/۲۱ درصد) و اینتگرون کلاس ۳ در ۵ ایزوله (۹/۸۰ درصد) گزارش گردید. بیشترین مقاومت به آمپی سیلین (۶۶/۶۶ درصد) و کمترین مقاومت به نیتروفورانتوئین (۱/۹۶ درصد) گزارش شده است. در تجزیه و تحلیل آماری بین مقاومت به جنتامایسین، ایمی‌پنم و نیتروفورانتوئین با اینتگرون کلاس ۱ ارتباط آماری معنی داری مشاهده گردید($p\text{-value}<۰/۰۵$).

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۶
پذیرش:۱۴۰۳/۰۸/۲۲
چاپ: تابستان ۱۴۰۳
DOI:

کلمات کلیدی: دیابت، اینتگرون، عفونت ادراری، *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن.

***نویسنده مسئول:**

nazilaarbab@yahoo.co.uk

مقدمه

این مقدمه است. دیابت[1]یا بیماری قند خون[2]یک اختلال متابولیک در بدن است. در این بیماری توانایی تولید انسولین در بدن از بین می‌رود و یا بدن در برابر انسولین مقاوم شده و بنابراین انسولین تولیدی نمی‌تواند عملکرد طبیعی خود را انجام دهد(۱،۲). دیابت از جمله شایع‌ترین و مهم‌ترین بیماری‌های موجود در جهان می‌باشد و مبتلایان خود را در معرض خطر بالایی از نظر ابتلا به عفونت قرار می‌دهد(۸-۳). در این میان دستگاه ادراری شایع‌ترین محل بروز عفونت در بین مبتلایان به دیابت می‌باشد. دیابت به دلیل ایجاد چندین ناهنجاری در سیستم دفاعی، سبب مستعد شدن فرد به عفونت دستگاه ادراری می‌گردد(۱۱-۹). صدمات وارد شده در اعمال مختلف گلبول‌های سفید از جمله مهاجرت، فاگوسیتوز و کموتاکسی از جمله این ناهنجاری‌ها می‌باشند. علاوه بر این، نوروپاتی دیابتی نیز به علت نقص در تخلیه کامل مثانه، سبب ایجاد عفونت دستگاه ادراری می‌شود. غلظت‌های بالاتر قند در ادرار ممکن است نقش مهمی در افزایش بروز عفونت دستگاه ادراری در بیماران دیابتی بازی کند(۱۱، ۱۲). خطر مرگ و میر زودرس، بیماری‌های قلبی، کلیوی، عصبی و نابینایی در افراد دیابتی دو برابر افراد غیردیابتی است(۱۳). بنابراین نیاز به شناخت موثر و سریع عفونت ادراری و درمان آن با آنتی‌بیوتیک‌هایی که میکروارگانیسم‌های ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری کم‌ترین درجه مقاومت را به آن نشان می‌دهند، به شدت احساس می‌شود. سویه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژن شایع‌ترین سویه‌های بیماری‌زا در انسان می‌باشند. مهم‌ترین خصوصیت سویه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژن توانایی کلونیزه شدن آن‌ها در سطح سلول‌های یورواپیتلیوم میزبان می‌باشد(۱۴، ۱۵). اینتگرون‌های کلاس ۱ اولین بار توسط استوکس[3] و هال[4] در سال ۱۹۸۹ کشف شدند و بیش از ۴۰ ژن مقاومتی در ارتباط با مقاومت به آمینوگلیکوزیدها بتالاکتام‌ها، کلرامفنیکل، ماکرولیدها، سولفانامیدها، ضدعفونی کننده‌ها و دزانفکتان‌ها را حمل می‌نمایند(۱۶،۱۷). متعاقب اینتگرون‌های کلاس ۱، اینتگرون‌های کلاس ۲ شیوع بالایی را در ایزوله‌های بالینی در باکتری‌های گرم منفی نشان می‌دهند(۱۸). کاست‌های ژنی موجود در این دسته از کلاس‌ها عمدتاً در ارتباط با مقاومت‌های مختلف مثل: استرپتومایسین، اسپکتینومایسین و تری‌متوپریوم می‌باشند. ژن اینتگراز در اینتگرون‌های کلاس ۲ در حدود ۴۶درصد مشابه ژن اینتگراز در اینتگرون‌های کلاس ۱ می‌باشد(۱۹). اینتگرون‌های کلاس ۳ برای اولین بار توسط آرکاوا[5] و همکارانش در سال ۱۹۹۶ در ژاپن شناسایی گردید. این دسته از اینتگرون‌ها به ندرت در نمونه‌های بالینی وجود دارند ولی اخیراً در نمونه‌های کلینیکی نظیر: سودوموناس آئروژینوزا، سراشیا مارسنس، سودوموناس پوتیدا و کلبسیلا پنومونیه در

[1]- Diabetes
[2]- Diabetes Mellitus
[3]- Stokes
[4]- Hall
[5]- Arakawa

ژاپن، پرتغال و کانادا یافت شده است(۲۰). مطالعات نشان می‌دهد صرف نظر از الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی می‌توانند در بین جمعیت‌های باکتریایی منتقل شوند. ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی معمولاً در عناصر ژنتیکی به نام اینتگرون‌ها وجود دارند(۴). انتقال افقی اینتگرون‌ها موفق‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاومت و پیدایش گونه‌های با مقاومت چندگانه MDR[6] است. غالب گونه‌های جدا شده از بیماران و محیط بیمارستان با ویژگی MDR متعلق به کلاس ۱ هستند که بر روی پلاسمید یا ترانسپوزون قرار دارند(۲).

مواد و روش کار

تحقیق حاضر بر روی ۳۰۰ نمونه ادرار بیماران دیابتی مشکوک به عفونت ادراری مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد صورت گرفت. نمونه ادرار توسط بیمار در ظروف استریل جمع‌آوری و بلافاصله پس از نمونه گیری، جهت انجام کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی و تشخیص نوع باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. جهت کشت با استفاده از لوپ کالیبره، ۰/۰۱ میلی لیتر از نمونه ادرار سانتریفوژ نشده در شرایط استریل بر روی محیط مک کانکی آگار کشت داده شدند. پس از مشخص شدن نمونه‌های UTI مثبت، تعیین هویت باکتری توسط آزمون‌های بیوشیمیایی و PCR صورت پذیرفت(۲۱،۲۲). برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها از روش کربی- بایر[7] بر طبق دستورالعمل CLSI (مندرج در راهنمای ارایه شده توسط شرکت پادتن طب) استفاده شد. در این تحقیق از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC 25922 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در این آزمایش شامل: کوتریموکسازول(تری‌متوپریم+سولفامتوکسازول) (SXT)، آمیکاسین(AM30)، سفتریاکسون(CRO30)، نیتروفورانتوئین(FM300)، سفالوتین(CF30)، نالیدیکسیک اسید(NA30)، نورفلوکساسین(NOR)، تتراسایکلین(TE30)، ایمی‌پنم(IPM10)، جنتامایسین(GM10) از شرکت پادتن طب-ایران مورد استفاده قرار گرفتند. جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. بدین منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز الکتروفورز گردید. به منظور کمیت سنجی DNA تخلیص شده از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه گیری میزان DNA در نمونه در طول موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید. DNA های دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم، جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش PCR انتخاب گردیدند.

بعد از استخراج DNA از زوج پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* به تایید ایزوله‌ها پرداخته شد و در نهایت در حضور پرایمرهای اختصاصی به بررسی فراوانی ژن

[6]- multi-drug resistant

[7]- Kirby Bauer

های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ پرداخته شد. توالی پرایمرها در جدول(۱) نشان داده شده است(۲۳).

جدول ۳- نتایج مربوط به ردیابی ژن‌های اینتگرون در ایزوله‌های *اشریشیا کلی*

ژن	توالی پرایمر(۳َ-۵َ)	اندازه محصول(**bp**)
16srRNA	F: ATT TGA AGA GGT TGC AAA CGA T R: TTC ACT CTG AAG TTT TCT TGT TT C	۱۳۰
Int 1	F: GGT CAA GGA TCT GGA TTT CG R:ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC	۴۳۶
Int 2	F:AGT GGG TGG CGA ATG AGT G R:GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G	۷۸۸
Int 3	F:TGT TCT TGT ATCGGC AGG TG R: GGC ATC CAA GCA GCA AG	۶۰۰

واکنش PCR برای ردیابی ژن *16srRNA* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر (PCR buffer 10X)، ۱۰۰ میکرومول dNTP Mix (۱۰ میلی مولار)، ۱/۵ میلی مول کلرید منیزیم (MgCl2)، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم تگ پلی مراز و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم)، صورت گرفت. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *16srRNA/شرشیا کلی* به صورت یک سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد ۶۰ ثانیه و ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه انجام شد.

جهت ردیابی ژن های اینتگرون کلاس۱ و اینتگرون کلاس ۲ واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر متشکل از ۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر، ۱۵۰ میکرومول dNTP Mix، ۱/۵ میلی مول کلرید منیزیم، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم تگ پلی مراز و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم)، صورت گرفت. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن های اینتگرون کلاس ۱ و ۲ در ایزوله های *اشرشیا کلی* به صورت: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه، ۳۲ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی گراد ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه درجه سانتی گراد ۲ دقیقه و ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه انجام شد.

جهت ردیابی ژن های اینتگرون کلاس۳ واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر (PCR buffer 10X)، ۱۰۰ میکرومول

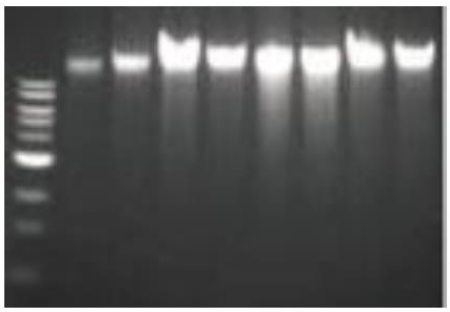
dNTP Mix (۱۰ میلی مولار)، ۱/۵ میلی مول کلرید منیزیم (MgCl2)، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم تگ پلی مراز و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم)، صورت گرفت (۱۷). برنامه حرارتی برای تکثیر ژن های ژن اینتگرون کلاس ۳ در ایزوله های *اشرشیا کلی* به صورت: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی گراد ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه درجه سانتی گراد ۲ دقیقه و ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده جدول (۱) نشان داده شده است.

برای تکثیر قطعات ژنی مورد مطالعه از دستگاه Eppendorf Master cycler Gradient, Germany استفاده شد. به منظور ردیابی قطعه ژنی تکثیر یافته در PCR، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA صورت گرفت و پس از مشاهده ژل به دست آمده با دستگاه تراس لومیناتور (Uviteck ، England) تصویر به دست آمده بر روی کاغذ حرارتی ثبت شد.

نتایج حاصل از ارزیابی اینتگرون های کلاس ۱، ۲ و۳ با استفاده از آزمون دقیق فیشر (Fisher Exact test) و با نرم افزار SPSS شماره ۱۸ مورد ارزیابی قرار گرفت.

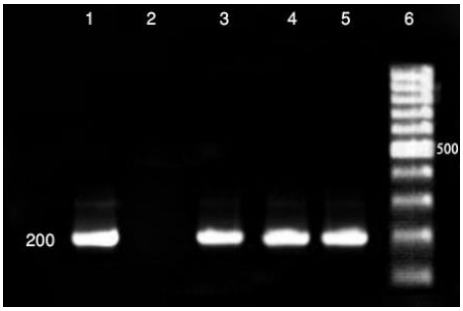
نتایج

مطالعه حاضر بر روی ۳۰۰ نمونه ادرار بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس نوع ۲ مشکوک به عفونت ادراری، مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد در سال ۱۳۹۴ صورت گرفت. پس از کشت نمونه‌های ادرار، جداسازی باکتری‌های عامل عفونت ادراری توسط آزمون‌های بیوشیمیایی صورت گرفته و به منظور تشخیص قطعی آزمون PCRتایید شد. از ۳۰۰ نمونه مورد بررسی در ۱۰۰ نمونه عفونت ادراری تشخیص داده شد. که آلودگی به *اشریشیا کلی* در ۵۱ مورد (۵۱درصد) گزارش گردید. پس از استخراج DNA کیفیت DNA های مورد بررسی روی ژل آگارز ۱درصد بررسی گردید. نتایج در شکل (۱) نشان داده شده است.



شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز DNA استخراج شده از ایزوله‌های *اشریشیا کلی*

پس از انجام آزمون PCR به منظور تشخیص قطعی باکتری اشریشیا کلی و حضور توالی*16srRNA* تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۲۰۰ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است.

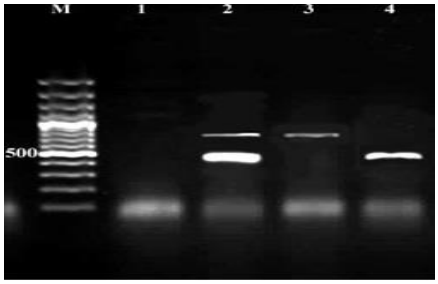


شکل ۲- ژل حاصل از الکتروفورز توالی ژن *16srRNA* استخراج شده از ایزوله‌های *اشریشیاکلی*

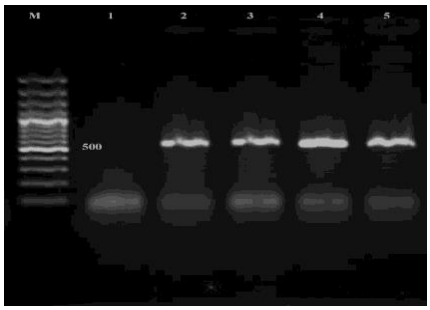
پس از تایید باکتری با استفاده از آزمون‌های میکروبیولوژی و مولکولی مقاومت نسبت به آمپی سیلین ۶۶/۶۶ ، تتراسایکلین ۵۶/۸۶، کوتریموکسازول۵۴/۹۰، نالیدیکسیک اسید۵۲/۹۴، سیپروفلوکساسین ۳۹/۲۱، سفالوتین ۴۱/۱۸، نورفلوکساسین ۳۵/۲۹، آمیکاسین ۲۵/۴۹، سفتریکسون ۲۹/۴۱، جنتامایسین ۱۷/۶۵، ایمی‌پنم ۲۳/۵۳ درصد و مقاومت نسبت به نیتروفورانتوئین ۱/۹۶ درصد گزارش گردید. مقاومت نسبت به یک آنتی‌بیوتیک در ۱۱ ایزوله (۲۱/۵۶درصد)، نسبت به ۲ آنتی‌بیوتیک در ۹ ایزوله(۱۷/۶۴ درصد)، نسبت به ۳ آنتی‌بیوتیک در ۶ ایزوله(۱۱/۷۶ درصد)، نسبت به ۴ آنتی‌بیوتیک در ۴ ایزوله(۷/۸۴درصد)، نسبت به ۵ آنتی‌بیوتیک در ۴ ایزوله(۹/۸۰درصد)، نسبت به ۶ آنتی‌بیوتیک در۶ ایزوله(۱۱/۷۶درصد)، نسبت به ۷ آنتی‌بیوتیک در ۳ ایزوله (۵/۸۸درصد)، نسبت به ۸ آنتی‌بیوتیک در ۲ ایزوله(۳/۹۲درصد)، نسبت به ۹ آنتی‌بیوتیک در ۳ ایزوله(۵/۸۸ درصد)، نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک در ۲ ایزوله(۳/۹۲ درصد)، نسبت به ۱۱ آنتی‌بیوتیک در ۱ ایزوله (۱/۹۶ درصد) و نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک در ۱ ایزوله(۱/۹۶درصد) گزارش گردید. از ۵۱ ایزوله *اشریشیا کلی* مورد بررسی در این تحقیق اینتگرون کلاس ۱ در ۳۰ ایزوله (۵۸/۸۲درصد)، اینتگرون کلاس ۲ در ۲۰ ایزوله (۳۹/۲۱درصد) و اینتگرون کلاس ۳ در ۵ ایزوله (۹/۸۰درصد) گزارش گردید. نتایج در جدول (۳) نشان داده شده است. حضور همزمان ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و ۲ در ۱۴ ایزوله (۲۷/۴۵درصد)، ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و ۳ در ۳ ایزوله (۵/۸۸درصد) گزارش گردید، ژن‌های اینتگرون‌های کلاس ۲ و ۳ همزمان در ۲ ایزوله (۳/۹۲درصد) و حضور همزمان ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ ، ۲ و ۳ در ۳ ایزوله (۵/۸۸درصد) گزارش گردیدند. نتایج در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

جدول ۳- نتایج مربوط به ردیابی ژن‌های اینتگرون در ایزوله‌های *اشریشیا کلی*

نوع اینتگرون	کلاس ۱	کلاس ۲	کلاس ۳	کلاس ۱ و ۲	کلاس ۱ و ۳	کلاس ۲ و ۳	کلاس ۱ ، ۲ و ۳
تعداد ایزوله	۳۰ (٪۵۸/۸۲)	۲۰ (٪۳۹/۲۱)	۵ (٪۹/۸۰)	۱۴ (٪۲۷/۴۵)	۳ (٪۵/۸۸)	۲ (٪۳/۹۲)	۳ (٪۵/۸۸)



شکل۳- الکتروفورز محصول PCR ژن های اینتگرون کلاس ۱و ۲ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل منفی. ستون ۲: باند ۴۳۶ جفت بازی اینتگرون کلاس ۱ و باند ۷۸۸ جفت بازی اینتگرون کلاس ۲، ستون ۳: باند ۷۸۸ جفت بازی اینتگرون کلاس ۲، ستون ۴: باند ۴۳۶ جفت بازی اینتگرون کلاس ۱.



شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR ژن اینتگرون کلاس ۳. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل منفی. ستون‌های ۳،۲، ۴ و ۵: باند ۶۰۰ جفت بازی ژن اینتگرون ۳.

در تجزیه و تحلیل آماری براساس آزمون دقیق فیشر بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، ایمی پنم و نیتروفورانتوئین و اینتگرون کلاس ۱ ارتباط معنی‌داری مشاهده گردید($p\text{-value}<۰/۰۵$) و بین سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ ارتباط آماری معنی‌دار مشاهده نگردید($p\text{-value}>۰/۰۵$).

بحث

افزایش مقاومت دارویی معضل بزرگی است و علت اصلی پیدایش مقاومت، مصرف نامناسب و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد صرف نظر از الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند در ایجاد مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها نقش داشته باشند(۲۵، ۲۶). نقش اینتگرون‌ها در گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ویژه از طریق انتقال افقی تا اندازه‌ای است که مقالات مختلف، نقش اینتگرون‌ها را در مقاومت چندگانه باکتری‌های گرم منفی قابل توجه می‌دانند(۲۷، ۲۸). همچنین اینتگرون‌ها، به عنوان ابزاری جهت کنترل عفونت‌ها و همچنین جهت مطالعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها شناخته می‌شوند(۲۹). با توجه به مطالب گفته شده بالا، در این مطالعه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* شیوع اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ در آن‌ها و

ارتباط اینتگرون‌ها با ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌ها مورد بررسی قرارگرفت. به طوری که اینتگرون کلاس ۱ در ۲۰ ایزوله(۳۹/۲۱درصد)، اینتگرون کلاس ۲ در ۱۰ ایزوله(۱۹/۶۰درصد) و اینتگرون کلاس ۳ در ۵ ایزوله(۹/۱۸درصد) گزارش گردید.

بررسی نتایج آنتی‌بیوگرام به دست آمده در این مطالعه نشان دهنده افزایش میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های مورد بررسی نسبت به مطالعات صورت گرفته قبلی در ایران می‌باشد، به طوری که در مطالعه حاضر میزان مقاومت در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی از جمله جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، نیتروفورانتوئین و آمیکاسین بسیار بالاتر از مطالعه صورت پذیرفته توسط فرشاد و همکارانش می‌باشد. همچنین میزان فراوانی اینتگرون کلاس ۱ در مطالعه حاضر ۳۹/۲۱درصد می‌باشد که از میزان فراوانی آن در مطالعه فرشاد بالاتر است(۳۲). همچنین به نظر می‌رسد که با افزایش میزان فراوانی اینتگرون کلاس ۱ در ایزوله‌های مورد بررسی در مطالعه ما نسبت به ایزوله‌های مورد بررسی در مطالعه فرشاد و همکارانش، میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز در آن‌ها افزایش یافته است. کلاس ۱ اینتگرون‌ها غالباً در سویه‌های انتروباکتریاسه گزارش شده است که یک عامل جدی برای گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. مطالعات انجام شده بر ایزوله های *اشریشیا کلی* جدا شده از مبتلایان به عفونت ادراری در اروپا و آسیا نشان می‌دهد که شیوع اینتگرون از ۲۲ تا ۵۹ درصد متغیر می‌باشد(۳۰). در مطالعه انجام شده توسط فلکیان و همکاران فراوانی اینتگرون کلاس ۱ در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از موارد عفونت ادراری ۴۱/۹درصد برآورد گردید که نسبت به نتایج حاصل از تحقیق ما بیشتر می‌باشد. در این مطالعه از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین وجود اینتگرون و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، آمیکاسین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین و ازترونام مشاهده گردید که حاکی از انتقال ژن مقاومت توسط این عناصر می‌باشد(۳۱). در تحقیق انجام شده توسط رنجبران و همکاران که به منظور بررسی مولکولی اینتگرون‌ها در ایزوله‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری بیماران بستری شده در بخش مراقبت‌های ویژه یک بیمارستان در اراک صورت گرفت، بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول ۸۸، سفتریاکسون۷۶، آموکسی‌کلاو ۷۴، سفتازیدیم۷۲ و سفوتاکسیم ۷۲ درصد بود. در حالی که در تحقیق ما مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول و سفتریاکسون کمتر از مطالعه رنجبران و همکاران می‌باشد. در تحقیق ما مقاومت نسبت به ایمی پنم ۲۳/۵۳ درصد گزارش گردید، در صورتی که در تحقیق رنجبران تمامی ایزوله‌های اشریشیاکلی نسبت به ایمی پنم حساسیت نشان دادند(۳۲). در مطالعه انجام شده توسط اسلامی و همکاران که بر روی ۲۰۰ ایزوله *اشریشیا کلی* صورت گرفت، ۱۷۱ نمونه به عنوان مقاوم به چند دارو گزارش گردیدند که در ۳۵ ایزوله ژن اینتگراز گزارش گردید که در

۲۵ ایزوله (۱۴/۵درصد) ژن اینتگرون کلاس ۱ و در ۱۰ ایزوله (۵/۸درصد) ژن اینتگرون کلاس ۲ گزارش گردید که با نتایج حاصل از تحقیق ما مغایرت دارد. در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین وجود ژن اینتگرون و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، نورفلوکساسین، سفالوتین و نالیدیکسیک اسید گزارش گردید (۳۳).

نتیجه گیری

شیوع بالای اینتگرون کلاس ۱ در ایزوله‌های اشریشیاکلی مقاوم به ایمی پنم، جنتامایسین و نیتروفورانتوئین در تحقیق ما می‌تواند حاکی از وجود ارتباط بین حضور اینتگرون و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشد. در تحقیق رنجبران ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون و مقاومت آنتی‌بیوتیکی کوتریموکسازول، جنتامایسین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و آموکسی کلاو گزارش گردید.

در تحقیق حاضر از ۵۱ ایزوله مورد بررسی در ۲۵ ایزوله (۴۹درصد) به بیش از ۳ آنتی‌بیوتیک مقاومت داشتند و درصد بالایی از ایزوله‌ها فاقد مقاومت چندگانه بودند که این امر می‌تواند دلیلی برای کمتر بودن شیوع اینتگرون‌ها نسبت به تحقیقات سایر محققین باشد.

در این مطالعه بین وجود مقاومت با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، ایمی پنم و نیتروفورانتوئین و اینتگرون کلاس ۱ ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده گردید که نشان دهنده انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌ها از طریق اینتگرون کلاس ۱ می‌باشد و علت این مقاومت می‌تواند حضور کاست‌های ژنی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ژن اینتگرون کلاس ۱ باشد. اما بین اینتگرون‌های کلاس ۲ و ۳ و آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده نگردید که نشان دهنده این است که علاوه بر اینتگرون‌ها عوامل دیگری نظیر ترانسپوزون‌ها نیز می‌توانند در انتقال مقاومت نقش داشته باشند.

منابع

1. Melanitou E., Fain P., and Eisenbarth G. 2003. Genetics of Type 1A (immune mediated) diabetes. J. Auto. 21 (2): 93–98.
2. Seyedjavadi S., Eslami G., Goudarzi M., Goudarzi H,and Fallah F. 2013. Integrons and multidrug resistance among E. coli and Klebsiella pneumoniae isolated from children with urinary tract infections. Health Med. 7(1):243-249.
3. Shaw JE., Sicree RA .,and Zimmet PZ.2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Res Clin Pract. 87 (1): 4-14.
4. Balasoiu D., van Kessel KC., Van kats-Renaud HJ., Collet J., and Hoepolman AI. 1997. Granulocytes function in women with diabetes and asymptomatic bacteriuria. Diabetes Care; 20: 393–395.
5. Bertoni AG., and Saydah S. 2001. Diabetes and the risk of infection related mortality in the US. Diabetes Care; 24: 1004–1009.
6. Pozzilli P and Lesli RDG. 1994. Infections and diabetes: Mechanisms and prospects for prevention. Diabet Med; 11: 935-941.
7. Carton JA., Maradona JA., Nuno FJ., Fernandez-Alvarez R., Perez-Gonzalez F., and et al. 1992. Diabetes mellitus and bacteremia: A comparative study between diabetic and non diabetic patients. Eur J Med. 1: 281-287.
8. Boyko EJ., Fihn SD., Scholes D., Abraham L., and Monsey B.2005. Risk of urinary tract infection and asymptomatic bacteruria among diabetes and nondiabetic postmenopausal women. J Am Epidemiol; 161: 557-564.
9. Stapleton A., 2002. Urinary tract infection in patients with diabetes. Am J Med ;113(1A): 80- 84.
10. Hosking DJ., Bennet T., and HamptonJR.1978. Diabetic autonomic neuropathy. J Diabetes Care. 27: 1043-54.
11. Ronald A., and Ludwig E.2001. Urinary tract infection in adults with diabete. J Antimicrobial Agent. 17: 287-289.
12. Brown JS., Wessells H., Chancellor MB., Howards SS., Stamm WE., and et al.2005. Urologic complication of diabetes. Diabetes Care. 8(1): 177–185.
13. Thomas GN., Jiang CQ., Taheri S., Xiao ZH, Tomlinson B., and et al .2010. A systematic review of life style modification and glucose intolerance in the prevention of type 2 diabetes. Cur Diabetes Rev. 6: 378-87.
14. Kargar M., Daneshvar M., Homayoun M. 2011. Surveillance of virulence markers and antibiotic resistance of shiga toxin purchase in Shiraz. 14: 76-83.
15. Wilson BA., Salyers AA., and Whitt DD. 2010. Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach. 3rd ed Washington DC ASM Press. 91-11.
16. Rowe-Magnus DA., Guerout AM.,Ploncard P,Dychinco B., Davies J., and Mazel D .2001. The evolutionary history of chromosomal super integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. Proc Natl Acad Sci USA. 98(2):652-657.

17. Stokes HT., and Hall RM. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Molecular microbiology. 3(12):1669-83.
18. Stalder T., Barraud O., Casellas M., Dagot C.,and Ploy MC.2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. Fron Microbiol. 3(119):1-14.
19. Barlow RS., and Gobius KS. 2006. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. J Antimicrob Chemother. 58(6): 1133-1138.
20. Partridge SR., Tsafnat G., Coiera E., and Iredell JR.2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS microbiology reviews. 33(4):757-84.
21. Clinical Laboratory Stards Institute(CLSI). Performance Stards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved stard-Ninth Edition (M2-A9). Clinical Laboratory Stards Institute, Wayne, PA. 2006.
22. 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.
23. Turton JF., Perry C., Elgohari S., and CV Hampton. 2010. PCR characterization and typing of Klebsiella pneumoniae using capsular type-specific., variable number tandem repeat and virulence gene targets. J Med Microbiol. 59(4):541-7.
24. Kerrn MB., Klemmensen T., Frimodt-Møller N., and Espersen F.2002. Susceptibility of Danish Escherichia coli strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. J Antimicrob Chemother. 50, 513–516.
25. Schwartz T., Kohnen W., Jansen B., and Obst U.2003. Detection of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMSMicrobiol Eco. 43(2): 325–335.
26. Kümmerer K. 2004. Resistance in the environment. J Antimicrob Chemother. 54(3): 311-320.
27. Hussein AI., Ahmed AM., Sato M., and Shimamoto T. 2009.Characterization of integrons and antimicrobial resistance genes in clinical isolates of Gram-negative bacteria from Palestinian hospitals. Microbiol Immunol. 53(11): 595-602.
28. Machado E., Canton R., and Baquero F.2005. Integron content of extended-spectrum-b-lactamase-producing Escherichia colistrains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. Antimicrob Agents Chemother. 49 (5): 1823-1829.
29. Dillon B., Thomas L,Mohmand G., Zelynski A., and Iredell J.2005. Multiplex PCR for screening of integrons in bacterial lysates. J Microbiol Methods. 62(2): 221-232.
30. Farshad Sh., Japoni A., and Hosseini M.2008. Low Distribution of Integrons among

Multidrug resistant E.coli Strains Isolate from Children with community-Acquired urinary tract infections in Shiraz, Iran. Polish J Microbiol. 57 (3): 193-198.

31. Falakian Z., Nikokar I., Nafisi MR., and Karimi AM V.2011. Frequency of class 1 Integrons among Escherichia coli isolates of patients with urinary tract infection Iran. J Clin Infect Dis. 6 (4): 24.
32. Ranjbaran M., Zolfaghari M., Japoni-Nejad A., Amouzandeh Nobaveh AR., Abtahi H., Nejad M., and et al.2013. Molecular investigation of integrons in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from urinary tract infections. J Mazandaran Univ Med Sci. 23(105):20-7.
33. IslamiG., Seyed Javadi S., and Fallah H FG.2010. Prevalence of integrons in multi drug resistance E. coli and Kelebsiella isolated from urinary tract infections in children. Pajohandeh. 34(1):61-5.

The frequency of genes in integron class 1, 2 and 3 in uropathogenic Escherichia coli strains isolated from diabetic patients in Shahrekord city

Negin Deli Sarraki[1], Fatemeh Khodaverdipour[2], Nazila Arbab soleimani[3*] Mohammad Reza Afsharzadeh[4]

1- Master's degree in microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
2- Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Islamic Azad University, Shahrekord Branch,Shahrekord ,Iran.
3- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan,Iran.
4- Department of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

***Corresponding author**: *Nazilaarbab@yahoo.co.uk*

Abstract

The most common uropathogenic strains of *Escherichia coli* strains are pathogenic in humans. The most important feature of uropathogenic Escherichia coli strains, the ability of colonization on the surface of host is the euro epithelium cells.

The present study took place on 300 urine samples of patients with diabetes mellitus type 2 suspected urinary tract infections, referred to clinical laboratories of Shahrekord city, Iran in 1394. 5 to 10 cc of urine samples from diabetic patients were collected and by calibrated loop, 0.01 ml of urine cultured in Mac kanky agar media. After performing PCR test were examined to 16srRNA *Escherichia coli* gene, all samples tested for the presence of class 1, 2 and 3 integron genes at the present of specific primers.

Of 300 diabetic patients UTI diagnosed in 100 samples. In 51 patients (51%) E.coli was diagnosed. Results indicate that class 1 integron was seen in 30 isolations (58.82%), class 2 in 20 (39.2%) and the third class in 5 ones (9.8%). Most resistance reported to ampicillin (66.66%) and the lowest resistance reported to Nitrofurantoin (1.96%).

Based on statistical analysis had a significant relationship was observed between resistance to gentamicin, imipenem and Nitrofurantoin with class 1 integron (p-value< 0/05).

Keywords: Diabetic pateients, *Escherichia coli*, Integron, Urinary Tract nfection.