الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ در جدایه های *اشریشیا کلی* جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد

عنوان مکرر: مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های بالینی *اشریشیاکلی* در شهرکرد

مرضیه سلیمانیان[۱]، ساناز خاکسار حقانی[۲]، نازیلا ارباب سلیمانی*[۳]

۱-دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران.
۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران.
۳- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.
نویسنده مسئول: نازیلا ارباب سلیمانی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.
***نویسنده مسئول**: *Nazilaarbab@yahoo.co.uk*

چکیده

اینتگرون‌ها عناصر متحرک ژنتیکی بوده که قادرند ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را حمل کنند. این عناصر در مکان‌های مختلفی از پلاسمید و کروموزوم یافت شده‌اند. تحقیق حاضر با هدف ردیابی اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد انجام شده است. در این تحقیق تعداد ۶۴ ایزوله *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد مورد بررسی قرار گرفتند. مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های مورد بررسی با استفاده از روش دیسک گذاری ساده در محیط مولر هینتون آگار مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین فراوانی اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ از زوج پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید. پس از انجام آزمون آنتی بیوگرام، بیشترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین (۷۵٪) و کمترین مقاومت نسبت به ایمی‌پنم (۱۲/۵٪) مشاهده گردید. فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و ۲ و ۳ به ترتیب ۱۲/۵٪، ۶/۲۵٪ و ۳/۱۲٪ مشاهده گردید. در ۵۲ جدایه هیچ یک از ژن‌های اینتگرون مشاهده نگردید. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای دو بین اینتگرون کلاس ۱ و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین ارتباط آماری معنی‌داری ($p =0.02< 0.05$) مشاهده گردید. با توجه به این که ژن‌های مقاومت بر روی اینتگرون‌ها قرار دارند و می‌توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند و مقاومت را در بیمارستان یا دیگر محیط‌ها منتشر نمایند، لذا این امر اهمیت شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را دوچندان کرده است.

کلمات کلیدی: *اشریشیاکلی*، اینتگرون، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عفونت ادراری

مقدمه

اشریشیاکلی یکی از ۵ گونهٔ موجود در جنس اشریشیا از تیرهٔ اشریشیه و از خانوادهٔ انتروباکتریاسه می‌باشد. این باکتری برای اولین بار در سال ۱۸۸۵ توسط تئودور اشریش شناسایی و نام‌گذاری گردید. *اشریشیا کلی* باسیل گرم منفی بی‌هوازی اختیاری در روده بوده، قادر است قند لاکتوز را به سرعت تخمیر کرده و تولید اسید نماید، اکسیداز منفی بوده، اغلب سویه‌ها متحرک بوده و از اسیدآمینه تریپتوفان ایجاد ایندول می‌نماید (۱). *اشریشیاکلی* مسئول انواع عفونت‌های روده‌ای و خارج

روده‌ای در انسان می‌باشد (۲). در میان پاتوژن‌های ادراری، *اشریشیاکلی* عامل ۸۰ درصد عفونت‌های ادراری حاصل از اجتماع و ۵۰ درصد عفونت‌های ادراری مرتبط با بهداشت و درمان است. عفونت دستگاه ادراری دومین عفونت شایع در بیماران است، تا جایی که نزدیک به هفت میلیون بیمار از این نظر توسط پزشکان در هر سال ویزیت می‌شوند (۳). امروزه شیوع پاتوژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف نگرانی های بالینی را افزایش داده است به طوری که عفونت به این ارگانیسم ها با میزان مرگ و میر بیشتر، افزایش شیوع بیماری‌ها و افزایش هزینه های درمانی مرتبط است. این ارگانیسم به دلیل اکتساب پلاسمیدهایی که تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف[1]راکد می‌کنند، به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سفالوسپورین‌های وسیع الطیف مقاوم شده‌اند (۵،۴). رایج ترین روش انتقال مقاومت های آنتی‌بیوتیکی کانجوگیشن می باشد. در این حالت پلاسمید ها، ترانسپوزون ها و اینتگرون ها، ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی را حمل می‌کنند و می توانند آن را از یک سلول به سلول دیگر حمل کنند (۶). سطح مقاومت آنتی بیوتیکی در بین ایزوله های به دست آمده از جامعه و بیمارستان رو به افزایش است و این یک امر بزرگ جهانی می باشد. صرف نظر از الگوی مصرف آنتی بیوتیک ها، ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی می توانند در بین جمعیت های باکتریایی منتقل شوند که در این میان اینتگرون ها با استفاده از مکانیسم جدید انتشار، ژن های مقاوت را بین باکتری ها منتقل می کنند. انتقال افقی اینتگرون ها موفق ترین راه انتشار ژن های مقاومت و پیدایش گونه هایی با مقاومت چندگانه است. غالب گونه های جدا شده از بیماران و محیط بیمارستان با ویژگی مقاومت چندگانه، دارای ژن اینتگرون کلاس یک هستند (۵).اینتگرون های مقاومتی اساسا کاست‌های ژنی که منجر به مقاومت علیه آنتی بیوتیک ها و دزانفکتان ها می شود را حمل می نمایند و می توانند بر روی کروموزوم قرار گیرند. از نظر ساختاری تمام اینتگرون‌ها از سه جز اصلی شامل انتهای ۵ حفاظت شده، انتهای ۳ حفاظت شده و یک ناحیه مرکزی متغیر بین ناحیه ۳ و ۵ تشکیل شده است. در ناحیه ۵ تمام اینتگرون‌ها ژن اینتگراز، سایت گیرنده att1 و توالی پروموتور قرار دارد. ناحیه ۳ اینتگرون ها واجد سه ساختار متفاوت است که در کلاس های اینتگرون متفاوت می باشد. تا کنون بیش از ۹ کلاس از اینتگرون ها بر اساس تفاوت های موجود در ژن اینتگراز در باکتری‌های گرم منفی شناسایی شده است اما تنها ۴ کلاس اصلی در ارتباط با ایزوله های کلینیکی مطرح می باشد که اینتگرون های کلاس ۱ و متعاقبا اینتگرون های کلاس ۲ به عنوان شایع ترین کلاس ها در بین ایزوله های کلینیکی مطرح می باشند. اینتگرون‌های کلاس۱ اولین بار توسط Stokes وHall، درسال 1989 کشف شدند و بیش از 40 ژن مقاومتی در ارتباط با مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها، کلرامفنیکل، ماکرولیدها، سولفانامیدها، ضدعفونی‌کننده‌ها و دزانفکتان ها را حمل می‌نمایند. این دسته ازاینتگرون‌ها به طورگسترده‌ای در سویه‌های گرم منفی و به‌طور اندمیک در سویه‌های گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس، کورینه باکتریوم، آئروکوکوس* و *بریوی باکتریوم* یافت می‌شوند(۸،۷). اینتگرون‌های کلاس۲ شیوع بالایی را در ایزوله‌های بالینی در باکتری‌های گرم منفی نشان می‌دهند. *اسینتوباکتر، شیگلا* و *سالمونلا* از جمله باکتری‌های گرم منفی هستندکه واجد این دسته از اینتگرون‌ها می‌باشند. انتهای ´۳ دراینتگرون‌های کلاس ۲ شامل ژن‌های ترانسپوزیشن (*tni*) و ژن‌های resolvase (*res*) می‌باشد. این دسته ازکلاس‌ها در ترانسپوزون‌های Tn 7 و ترانسپوزون‌های وابسته یافت شده است. کاست‌های ژنی موجود در این دسته ازکلاس‌ها عمدتاً در ارتباط با مقاومت‌های مختلف مثل استرپتومایسین، اسپکتینومایسین و تریمتوپریم می‌باشند. ژن اینتگراز دراینتگرون‌های کلاس ۲ درحدود ۴۶ درصد مشابه ژن اینتگراز در اینتگرون‌های کلاس ۱ می‌باشد(۹). اینتگرون‌های کلاس ۳ برای اولین بار توسط Arakawa و همکارانش در سال ۱۹۹۶ در ژاپن شناسایی گردید. این دسته از اینتگرون ها به ندرت در نمونه های بالینی وجود دارند ولی اخیرا در نمونه های

1- *ESBL (Extended spectrum ß-lactamase)*

کلینیکی نظیر *سراشیا مارسسنس*، *سودوموناس پوتیدا* و *کلبسیلا پنومونیه* یافت شده است (۱۰).

هدف از مطالعه‌ی حاضر تعیین فراوانی ژن‌های مقاومتی اینتگرون در ایزوله های *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد کلینیکی شهرستان شهرکرد می باشد. نتایج این تحقیق علاوه بر فراهم آوردن اطلاعات اولیه در مورد شیوع عفونت‌های ناشی از *اشریشیا کلی* در شهرکرد می‌تواند جهت پایش و برنامه‌ریزی اصولی برای درمان‌های مؤثر بر علیه عفونت‌های مقاوم این باکتری مورد استفاده‌ی پزشکان و مدیران بهداشتی و درمانی قرار گیرد.

مواد وروش ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی تعداد ۶۴ جدایهٔ *اشریشیا کلی* به‌دست آمده از نمونه‌های عفونت ادراری شهرستان شهرکرد مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور شناسایی باکتری، نمونه مورد نظر پس از کشت بر روی محیط ائوزین متیلن بلو آگار کلنی‌های رشد یافته از نظر رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی افتراقی از قبیل چگونگی تخمیر قندها در محیط تی‌اس‌آی[1]، مک کانکی، هم‌چنین دکربوکسیلاسیون اسدآمینهٔ لایزین در محیط لایزین آیرون آگار[2]، تولید اندول، عدم حرکت در محیط SIM و واکنش در محیط MR VP broth، رشد در محیط سیمون سیترات و اوره آگار مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت با استفاده از جداول استاندارد باکتری *اشریشیا کلی* شناسایی گردیدند. در این تحقیق از *اشریشیا کلی* ATCC25922 (تهیه شده از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها از روش کربی- بایر[3] بر طبق دستورالعمل CLSI (مندرج در راهنمای ارائه شده توسط شرکت پادتن طب) استفاده شد. دیسک‌های آنتی بیوتیک در این آزمایش شامل: سفتریاکسون(30 CRO)، تتراسیکلین(30 TE)، ایمی‌پنم (10 IPM)، نورفلوکساسین (10 NOR)، سفالوتین (30 CF)، نالیدیکسیک اسید(30 NA)، نیتروفورانتئین FM)(300، کوتریموکسازول (SXT)، آمیکایسین(30 AN)، جنتامایسین (10 GM) ازشرکت پادتن طب ایران مورد استفاده قرار گرفتند (). به منظور تشخیص قطعی و بررسی فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ مراحل استخراج DNA با روش جوشاندن[4] بر روی کلنی‌های رشد کرده، صورت گرفت. جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز استفاده شد. بدین منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده روی ژل یک درصد آگاروز الکتروفورز گردید. به منظور کمیت سنجی DNA تخلیص شده از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه‌گیری میزان DNA در طول موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید؛ که میزان ۱/۸ نشان دهندهٔ نمونه DNA هایی که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بودند. بعد از استخراج DNA با استفاده از زوج پرایمرهای طراحی شده مربوط به ژن *16srRNA/شریشیاکلی* که در جدول (۱) نشان داده شده است، به تشخیص قطعی ایزوله‌ها پرداخته شد (۱۱).

واکنش PCR برای ردیابی ژن *16srRNA* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر (buffer 10x) PCR، ۱۰۰ میکرومول MixdNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیوم (Mgcl2)، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلی‌مراز (Taq DNA Polymerase) (فرمنتاس – لیتوانی) و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانو گرم)، صورت گرفت. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *16srRNA /شریشیاکلی* به صورت: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه و ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱دقیقه انجام شد.

جهت ردیابی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و اینتگرون کلاس ۲ واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر متشکل از ۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر، ۱۵۰

[1]- Triple Sugar Iron Agar(TSI)
[2]- Lysine Iron Agar
[3]- Kirby Bauer
[4]- Boiling

میکرومول MixdNTP، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیوم، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلی‌مراز (Taq DNA Polymerase) (فرمنتاس – لیتوانی) و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانو گرم)، صورت گرفت. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و اینتگرون کلاس ۲ در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* به صورت: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۳۲ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه و ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱دقیقه انجام شد (۱۲).

جهت ردیابی ژن‌های اینتگرون کلاس ۳ واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۲/۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر، ۱۰۰ میکرومول MixdNTP، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیوم، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلی‌مراز (Taq DNA Polymerase) (فرمنتاس – لیتوانی) و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانو گرم)، صورت گرفت. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن‌های اینتگرون کلاس ۳ در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* به صورت: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه و ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱دقیقه انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

برای تکثیر قطعات ژنی مورد مطالعه از دستگاه Master cycler Gradient استفاده شد. به منظور ردیابی قطعه ژنی تکثیر یافته در PCR، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز 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 دست‌آمده با دستگاه تراس لومیناتور Uviteck تصویر به دست‌آمده روی کاغذ حرارتی ثبت شد.

نتایج حاصل از ارزیابی اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ با استفاده از آزمون دقیق فیشرو با نرم‌افزار SPSS شماره ۱۸ مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن‌های *16srRNA* و اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ در ایزوله های *اشریشیا کلی*

ژن	توالی پرایمر (۳ـ۵)	اندازهٔ محصول (bp)	منبع
16srRNA	F: ATT TGA AGA GGT TGC AAA CGA T R: TTC ACT CTG AAG TTT TCT TGT TT C	۱۳۰	(۱۱)
Int 1	F:GGT CAA GGA TCT GGA TTT CG R:ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC	۴۳۶	(۱۲)
Int 2	F:AGT GGG TGG CGA ATG AGT G R:GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G	۷۸۸	(۱۲)
Int 3	F:TGT TCT TGT ATCGGC AGG TG R: GGC ATC CAA GCA GCA AG	۶۰۰	(۱۲)

نتایج

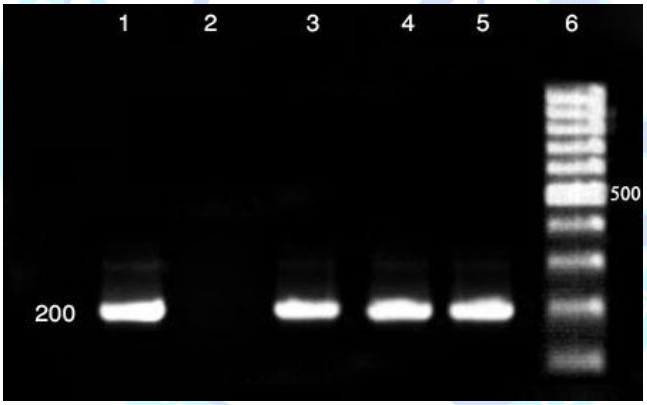
در این مطالعه توصیفی- مقطعی تعداد ۶۴ جدایه *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از نمونه‌های عفونت ادراری شهرستان شهرکرد مورد بررسی قرار گرفتند. پس از جداسازی باکتری *اشریشیاکلی* در محیط کشت اختصاصی، تشخیص نوع باکتری توسط آزمون‌های بیوشیمیایی صورت گرفت.پس از استخراج DNA کیفیت DNA های مورد بررسی روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید. پس از انجام آزمون PCR به منظور تشخیص قطعی باکتری منظور تشخیص قطعی باکتری *اشریشیا کلی* و حضور توالی ژن *16srRNA*، تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۲۰۰ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. نتایج در شکل ۱ نشان داده‌شده است. پس از تایید باکتری با استفاده از آزمون‌های میکروبیولوژی و مولکولی آزمون آنتی بیوگرام انجام شد. نتایج در نمودار ۱ نشان داده شده است.

مقاومت نسبت به آمپی سیلین در ۷۵٪، مقاومت نسبت به تتراسایکلین در ۵۴/۷٪، مقاومت نسبت به

کوتریموکسازول در ۵۰٪، مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید در ۴۳/۷٪، مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین در ۳۴/۳٪، مقاومت نسبت به آمیکایسین در ۳۷/۵٪، مقاومت نسبت به سفالوتین در ۳۱/۲٪، مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین در ۲۶/۵٪، مقاومت نسبت به نورفلوکساسین در ۳۱/۲٪، مقاومت نسبت به جنتامایسین در ۱۷/۲٪، و مقاومت نسبت به ایمی‌پنم در ۱۲/۵٪، مشاهده گردید. حضور هم‌زمان ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و ۲ در ۶/۲۵٪ و حضور هم‌زمان ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و ۳ در ۱/۵۶٪ مشاهده گردید. اینتگرون‌های کلاس ۲ و ۳ هم‌زمان در هیچ ایزوله‌ایی مشاهده نگردیدند. نتایج در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

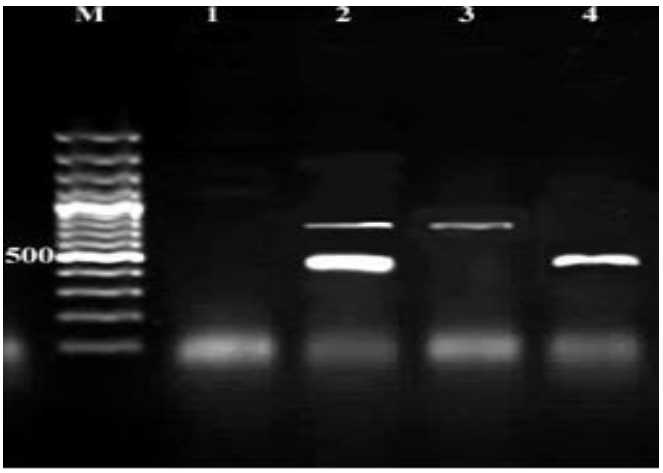
از ۶۴ نمونه بررسی شده در ۸ نمونه (۱۲/۵٪) اینتگرون کلاس ۱، در ۴ نمونه (۶/۲۵٪) اینتگرون کلاس ۲ و در ۲ نمونه (۳/۱۲٪) اینتگرون کلاس ۳ گزارش گردید.

در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای دو بین مقاومت آنتی بیوتیکی با آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده و وجود ژن اینتگرون۱ ارتباط آماری معنی داری مشاهده گردید ($P = 0/022 < 0/05$). اما براساس آزمون دقیق فیشر بین اینتگرون کلاس ۲ وآنتی بیوتیک‌های مورد نظر ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید ($P = 0/137 > 0/05$). هم چنین براساس آزمون دقیق فیشربین اینتگرون کلاس ۳ و آنتی بیوتیک‌های مورد نظر نیز ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید ($P = 0/994 > 0/05$).



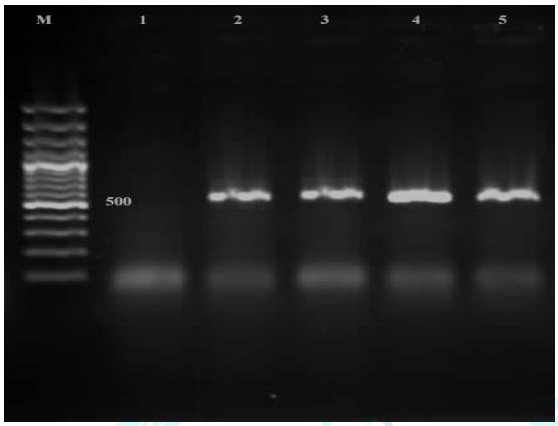
شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *16srRNA* /شریشیا کلی.

ستون ۶: ماکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل مثبت، ستون ۲: کنترل منفی، ستون ستون‌های ۵-۳: نمونه‌های مثبت مورد بررسی



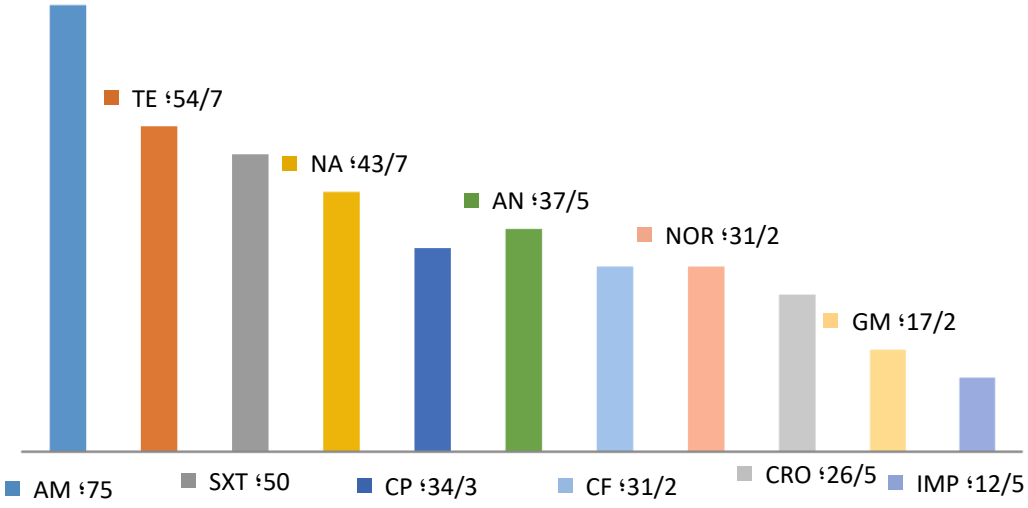
شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن‌های اینتگرون کلاس ۱و ۲

ستون 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 ۴۶: باند ۴۳۶ جفت بازی اینتگرون کلاس ۱.



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR ژن اینتگرون کلاس ۳.

ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل منفی. ستون‌های ۲،۳، ۴ و ۵: باند ۶۰۰ جفت بازی ژن اینتگرون ۳.



نمودار ۱- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده

بحث

در چند سال اخیر روشن شده است که کلبسیلاها عفونت‌های بسیاری را در موارد مختلف باعث شده‌اند و اهمیت این گروه از ارگانیسم‌ها به عنوان عامل عفونت جدی در بیماران بستری شده بیمارستانی پذیرفته شده است. قابلیت این ارگانیسم در ایجاد بیماری به علت کاسته شدن دفاع میزبان در نتیجه اعمال جراحی پیچیده و طولانی و همین طور مصرف داروهای متفاوت رو به ازدیاد می‌باشد. اینتگرون‌ها عناصر متحرک ژنتیکی بوده که قادرند ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف را حمل کنند. این عناصر در مکان‌های مختلفی از پلاسمید و کروموزوم یافت شده‌اند. اینتگرون‌ها قادرند ژن‌ها را در برگرفته و آن‌ها را در حالی که در داخل کاست ژنی قرار دارند جا به جا نمایند. اولین مطالعه در مورد بررسی میزان شیوع اینتگرون‌ها توسط Sallen و همکاران در ۱۹۹۵ صورت گرفت. در این مطالعه شیوع اینتگرون در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه ۵۹٪ برآورد گردید (۱۳). در تحقیق حاضر که به منظور بررسی میزان شیوع اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* مقاوم به آنتی بیوتیک جدا شده از نمونه‌های عفونت ادراری شهرستان شهرکرد صورت گرفت، فراوانی اینتگرون‌ها به ترتیب ۱۲/۵٪ ، ۶/۲۵٪ و

۳/۱۲٪ برآورد گردید. در این مطالعه بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* مربوط به آنتی-بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۷۵٪)، تتراسایکلین (۵۴/۶۸٪)، کوتریموکسازول (۵۰٪) و نالیدیکسیک اسید (۴۳/۷۵٪) گزارش گردید. کمترین مقاومت نسبت به ایمی پنم (۱۲/۵٪) گزارش گردید.بررسی نتایج آنتی-بیوگرام به دست آمده در این تحقیق نشان دهنده افزایش میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های مورد بررسی نسبت به مطالعات صورت گرفته قبلی در ایران می‌باشد، به طوریکه در تحقیق 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. هم-چنین میزان فراوانی اینتگرون کلاسیک در مطالعه حاضر ۱۲/۵٪ بالاتر از میزان فراوانی آن (۶/۲۵٪) در مطالعه فرشاد است(۱۴).

در تحقیق انجام شده توسط رنجبران و همکاران که به منظور بررسی مولکولی اینتگرون‌ها در سویه های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری بیماران بستری شده در بخش‌های مراقبت ویژه یک بیمارستان در اراک صورت گرفت، بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول ۸۸٪، سفتریاکسون۷۶٪، آموکسیکلاو ۷۴٪، سفتازیدیم۷۲٪ وسفوتاکسیم ۷۲٪ بود. در حالی که در تحقیق ما مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های کوتریموکسازول و سفتریاکسون کمتر از مطالعه رنجبران و همکاران می‌باشد. در تحقیق ما مقاومت نسبت به ایمی‌پنم ۱۲/۵٪ گزارش گردید، در صورتی که در تحقیق رنجبران تمامی ایزوله‌های اشریشیا کلی نسبت به ایمی پنم حساسیت نشان دادند. شیوع بالای اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* مقاوم به ایمی‌پنم تحقیق ما می‌تواند حاکی از وجود ارتباط بین حضور اینتگرون و مقاومت آنتی بیوتیکی باشد. در تحقیق رنجبران ارتباط معنی داری بین حضور اینتگرون و مقاومت آنتی بیوتیکی کوتریموکسازول، جنتامایسین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و آموکسی کلاو گزارش گردید. در مطالعه دیگری که در بیمارستان های ایالت متحده آمریکا جهت تعیین فراوانی اینتگرون کلاسیک در ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* و *اشریشیاکلی* صورت پذیرفت ۴۹٪ از ایزوله‌های *اشریشیاکلی* دارای اینتگرون کلاسیک بودند که این میزان بیش‌تر از میزان اینتگرون کلاسیک در مطالعه ما بود. در تحقیق حاضر از ۶۴ ایزوله مورد بررسی در ۲۸ ایزوله (۴۳/۷۵٪) به بیش از ۳ آنتی بیوتیک 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 محقیقن باشد(۱۶،۱۵)..

در تحقیق ما بین وجود مقاومت با آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین، تتراسایکلین، کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، آمیکایسین، سفالوتین، سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، جنتامایسین و ایمی‌پنم وجود اینتگرون کلاس ۱ ارتباط آماری معنی داری مشاهده گردید (P =0/022) که نشان دهنده انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌ها از طریق اینتگرون کلاس ۱ می‌باشد و علت این مقاومت می‌تواند حضور کاست‌های ژنی مقاومت آنتی بیوتیکی در ژن اینتگرون کلاس ۱ باشد. اما بین اینتگرون‌های کلاس ۲ و ۳ و آنتی بیوتیک‌های مورد نظر ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید (P =0/137) و (P =0/994). که نشان دهنده این است که علاوه بر اینتگرون‌ها عوامل دیگری نظیر ترانسپوزون‌ها نیز می‌توانند در انتقال مقاومت نقش داشته باشند.نکته قابل توجه در تحقیق ما شیوع ۳/۱۲٪ اینتگرون کلاس ۳ در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* می‌باشد که نسبت به تحقیقات سایر محققین بیشتر می‌باشد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده مشخص می‌گردد که یک ارتباط قوی بین حمل اینتگرون و افزایش مقاومت به تعدادی از کلاسهای مختلف آنتی بیوتیکی وجود دارد. با توجه به این ژن‌های مقاومت بروی اینتگرون‌ها قرار دارند که می‌توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند و

مقاومت را در بیمارستان یا دیگر محیط‌ها منتشر نمایند لذا این امر اهمیت شناسایی این نوع از ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی را دو چندان 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.

تشکر و قدردانی

باتشکر و قدردانی از معاونت محترم پژوهشی و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد که در این تحقیق ما را یاری نمودند.

Refrence

1. Ahangarzadeh Rezaee M., Sheikhalizadeh V. and Hasani A. 2011. Detection of integrons among multi drug resistant (MDR) *Escherichia coli* strains isolated from clinical specimens in Northern West of Iran. Braz J Microbiol. 42: 1308-1313.
2. Gould I.M. 2008. The epidemiology of antibiotic resistance. Int J Antimicrob Agents: 32-39.
3. Shahidal AK.,Rashed N. 2013. Study of extended-spectrum beta- lactamase producing bacterial from urinary tract infections in Bangladesh. Tzu Chi Med J. 25: 39-42.
4. Gootz TD. 2010.The global problem of antibiotic resistance.Crit .Rev. Immunol. 30 (1):79-93.
5. Gupta P., Murali MV., Faridi MM., Kaul PB., Ramachran VG and Talwar V. 1993. Clinical profile of *Klebsiella* septicaemia in neonates. Indian. J. Paediatr. 60(4):565-672.
6. Actis L.A., Tolmasky M.E. and Crosa J.H. 1999. Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encodikg resistance to antimicrobial compounda. Front Biosci. D43-D62.
7. Arora D.R. and Chugh T.D. 1981. Klebocin types of *Klebsiella pneumonia* isolated from normal diarrhoeal stool. Indian J Med Res. 72(1):856-859.
8. Młynarczyk G., Młynarczyk .A., Bilewska A., Dukaczewska A., Goławski C., Kicman A. and Pupek J. 2006. High effectiveness of the method with cefpirome in detection of extended-spectrum beta-lactamases in different species of gram-negative bacilli. Med Dosw Mikrobiol.58(1):59-65.
9. Obrien T.F. 2003. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistsnce: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. Clin. Infect. Dis. 34(3):S78-S84.
10. Essack S.Y. 2000. Treatment options for extended spectrum beta- lactamses-producers.FEMS Microbiol Lett. 90(2):181-184.
11. Kerrn M.B., 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(3):513–516.
12. Turton J.F., Perry C., Elgohari S. and Hampton CV.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):541–547.
13. Sallen B., Rajoharsion A. and Desvarenne S.C.M. 1995. Molecular epidemiology of integrin.associated antibiotic resistance gene in clinical isolates of Enterobacteriaceae. Microb Drug Resist. 195-202.
14. White P., McIver C and Rawlinson W. 2001. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 45(9): 2658-2661.
15. Yu H, Lee J and Kang H. 2003. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among Escherichia coli isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. J. Clin. Microbiol. 41(12):Pp 5429-5433.
16. Muhammad I., Uzma M and Yasmin B. 2011. Prevalence of antimicrobial resistance and integrons in *Escherichia coli* from Punjab, Pakistan. Braz. J. Microbiol. 42(2): 462-466.

Antibiotic resistance pattern and prevalence of class 1, 2 and 3 integron genes in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in Shahrekord

Marzeyeh Soleymanian[1], Sanaz Khaksar Haghani[2], Nazila Arbab Soleymani[3]

1. phD, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Iran
2. MSc, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Iran.
3. Department of Microbiology, Department of Microbiology,Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan,Iran.

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

Abstract

Integrons are mobile genetic elements capable of carrying resistance genes to various antibiotics. These elements have been found in different places of plasmid and chromosome. The aim of this present study was determine the prevalence of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolates isolated from urinary tract infection in Shahrekord. In this research, the number of 64 isolates of *Escherichia coli* were investigated. The antibiotic resistance of the investigated isolates was evaluated using a simple disking method in Mueller Hinton agar medium. In order to determine the frequency of class 1, 2 and 3 integrons, specific primer pairs were used. After the antibiogram test, the highest resistance to ampicillin (75%) and the lowest resistance to imipenem (12.5%) were observed. The frequency of class 1, 2 and 3 integron genes was observed as 12.5%, 6.25% and 3.12%, respectively. None of the integron genes were observed in 52 isolates. In the statistical analysis with chi-square test, a statistically significant relationship was observed between class 1 integron and resistance to the antibiotic ampicillin ($p = 0.02 < 0.05$). Due to the fact that resistance genes are located on integrons and can be transferred from one strain to another strain and spread resistance in the hospital or other environments, this has doubled the importance of identifying this type of antibiotic resistance genes. Key words: Escherichia coli, integron, antibiotic resistance, urinary infection

New approaches in Cellular and Molecular Sciences
رهیافت های نوین در علوم سلولی و مولکولی