مقاله پژوهشی

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ در جدایه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* از شهرستان شهرکرد

مرضیه سلیمانیان، الهه تاج بخش*، زهرا بم زاده

گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۷/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: کسب اینتگرون یکی از عوامل مهم چند مقاومتی در باکتری‌های روده‌ای است. رایج‌ترین کاست اینتگرون‌ها حاوی ژن‌های مرتبط با مقاومت در برابر طیف وسیعی از عوامل ضد میکروبی است. تحقیق حاضر باهدف ردیابی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد کلینیکی در شهرستان شهرکرد انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۶۴ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد کلینیکی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد با استفاده از روش دیسک گذاری ساده موردبررسی قرار گرفت. به‌منظور تعیین فراوانی ژن‌های اینتگرون از زوج پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید.

نتایج: پس از انجام آزمون آنتی‌بیوگرام، بیشترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین (۹۰/۶٪) و کمترین مقاومت نسبت به ایمی‌پنم (۹/۳٪) مشاهده گردید. فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۱۲/۵٪، ۹/۴٪ و ۱۵/۶۲٪ مشاهده گردید. در ۴۰ جدایه هیچ‌یک از ژن‌های اینتگرون مشاهده نگردید. در تجزیه‌وتحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین اینتگرون کلاس ۱ و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به این‌که ژن‌های مقاومت بروی 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: اینتگرون، *کلبسیلا پنومونیه*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*) یا باسیل فریدلاندر باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، غیر متحرک و دارای کپسول پلی‌ساکاریدی است، کپسول تمام سطح باکتری را می‌پوشاند. این باکتری یک پاتوژن فرصت‌طلب است که موجب بیماری‌های وخیمی هم چون پنومونی، باکتریمی، عفونت دستگاه ادراری تناسلی، انتریت نوزادان، مننژیت و غیره می‌گردد. اهمیت *کلبسیلا* به‌عنوان پاتوژن فرصت‌طلب انسانی بیشتر در توانایی ایجاد عفونت‌های بیمارستانی در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی و بیماری‌های زمینه‌ای ازجمله اختلالات ریوی و دیابت است (۱، ۲) این باکتری پس از *اشرشیا کلی* دومین عامل ایجادکننده باکتریمی در افراد سالم و بعد از *سودوموناس آئروژینوزا* دومین عامل باکتریمی در افراد دچار سوختگی به‌حساب می‌آید (۵،۴). *کلبسیلا* در ۶ تا ۱۷ درصد عفونت‌های مجاری ادراری نقش دارد (۵-۳). آنچه در مورد این باکتری جلب‌توجه می‌کند مقاومت بالای *کلبسیلا پنومونیه* با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و گسترش سریع این باکتری در افراد و بخش‌های مختلف بیمارستانی به‌خصوص در بخش نوزادان است که باعث سپتی‌سمی و مرگ‌ومیر می‌گردد (۶، ۷). امروزه شیوع

*نویسنده مسئول: **الهه تاج بخش**، گروه زیست‌شناسی، ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، ایران
Email: ee_tajbakhsh@yahoo.com

پاتوژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL Extended spectrum ß-lactamase) نگرانی‌های بالینی را افزایش داده است به‌طوری‌که عفونت به این ارگانیسم‌ها با میزان مرگ‌ومیر بیشتر، افزایش شیوع بیماری‌ها و افزایش هزینه‌های درمانی مرتبط است. این ارگانیسم به دلیل اکتساب پلاسمیدهایی که تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف را کد می‌کنند، به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله سفالوسپورین‌های وسیع الطیف مقاوم شده‌اند، لذا درمان عفونت‌های کلبسیلایی تا حدودی با مشکل مواجه است (۸، ۹). رایج‌ترین روش انتقال مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی هم یوغی (Conjogation) است. در این حالت پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را حمل می‌کنند و می‌توانند آن را از یک سلول به سلول دیگر حمل کنند (۸). صرف‌نظر از الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند در بین جمعیت‌های باکتریایی منتقل شوند که در این میان اینتگرون‌ها با استفاده از مکانیسم جدید انتشار، ژن‌های مقاومت را بین باکتری‌ها منتقل می‌کنند. انتقال افقی اینتگرون‌ها موفق‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاومت و پیدایش گونه‌هایی با مقاومت چندگانه است. غالب گونه‌های جداشده از بیماران و محیط بیمارستان با ویژگی مقاومت چندگانه، دارای ژن اینتگرون کلاس یک هستند (۹). اینتگرون‌های مقاومتی اساساً کاست‌های ژنی که منجر به مقاومت علیه آنتی‌بیوتیک‌ها شود را حمل می‌نمایند و می‌توانند بر روی کروموزوم یا پلاسمید قرار گیرند. ازنظر ساختاری تمام اینتگرون‌ها از سه جز اصلی شامل انتهای ۵′ حفاظت‌شده، انتهای ۳′ حفاظت‌شده 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 پروموتر قرار دارد. ناحیه ۳′ اینتگرون‌ها واجد سه ساختار متفاوت است که در کلاس‌های اینتگرون متفاوت است. تاکنون بیش از ۹ کلاس از اینتگرون‌ها بر اساس تفاوت‌های موجود در ژن اینتگراز در باکتری‌های گرم منفی شناسایی شده است اما تنها ۴ کلاس اصلی در ارتباط با ایزوله‌های کلینیکی مطرح است که اینتگرون‌های کلاس ۱ و متعاقباً اینتگرون‌های کلاس ۲ به‌عنوان شایع‌ترین کلاس‌ها در بین ایزوله‌های کلینیکی مطرح می‌باشند. اینتگرون‌های کلاس ۱ اولین بار توسط Stokes و Hall، در سال ۱۹۸۹ کشف شدند و بیش از ۴۰ ژن مقاومتی در ارتباط با مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها، کلرامفنیکل، ماکرولیدها، سولفانامیدها و ضدعفونی‌کننده‌ها را حمل می‌نمایند این دسته از اینتگرون‌ها به‌طور گسترده‌ای در سویه‌های گرم منفی و به‌طور اندمیک در سویه‌های گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس، کورینه باکتریوم، آئروکوکوس* و *بریوی باکتریوم* یافت می‌شوند (۱۰، ۱۱). اینتگرون‌های کلاس ۲ شیوع بالایی را در ایزوله‌های بالینی در باکتری‌های گرم منفی نشان می‌دهند. *اسینتوباکتر، شیگلا* و *سالمونلا* ازجمله باکتری‌های گرم منفی هستند که واجد این دسته از اینتگرون‌ها می‌باشند. اینتگرون‌های کلاس ۲ در ترانسپوزون‌های Tn۷ و ترانسپوزون‌های وابسته یافت شده است. کاست‌های ژنی موجود در این دسته از کلاس‌ها عمدتاً در ارتباط با مقاومت‌های مختلف مثل استرپتومایسین، اسپکتینومایسین و تریمتوپریم می‌باشند. ژن اینتگراز در اینتگرون‌های کلاس ۲ در حدود ۴۶٪ مشابه ژن اینتگراز در اینتگرون‌های کلاس ۱ است (۱۲). اینتگرون‌های کلاس ۳ برای اولین بار توسط Arakawa و همکاران در سال ۱۹۹۶ در ژاپن شناسایی گردید. این دسته از اینتگرون‌ها به‌ندرت در نمونه‌های بالینی وجود دارند ولی اخیراً در نمونه‌های کلینیکی نظیر *سراشیا مارسسنس، سودوموناس پوتیدا* و *کلبسیلا پنومونیه* یافت شده است (۱۳). بررسی مطالعات گذشته نشان‌دهنده نقش بارز اینتگرون‌ها در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا* است، به‌طوری‌که در مطالعه Rao و همکاران، ۷۰٪ از ایزوله‌های *کلبسیلا* دارای اینتگرون کلاس یک بودند و ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، توبرامایسین، کوتریموکسازول، سفتازیدیم و سفپودوکسیم وجود داشت (۱۴).

هدف از مطالعه‌ی حاضر تعیین فراوانی ژن‌های مقاومتی اینتگرون در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد کلینیکی شهرستان شهرکرد است. نتایج این تحقیق علاوه بر فراهم آوردن اطلاعات اولیه در مورد شیوع عفونت‌های ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* در شهرکرد می‌تواند جهت پایش و برنامه‌ریزی اصولی برای درمان‌های مؤثر علیه عفونت‌های مقاوم این باکتری مورداستفاده‌ی پزشکان و مدیران بهداشتی و درمانی قرار گیرد.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی ۶۴ جدایه‌ی *کلبسیلا پنومونیه* به‌دست‌آمده از نمونه‌های کلینیکی شهرستان شهرکرد موردبررسی قرار گرفتند. نمونه‌های مورد بررسی شامل ۵۴ نمونه

ادرار (۸۴/۳۷٪)، ۶ نمونه کشت خون (۹/۳۷٪) و ۴ نمونه ترشحات چرکی چشم (۶/۲۵٪) می‌باشند که از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد تهیه شدند. به‌منظور شناسایی باکتری، نمونه موردنظر پس از کشت بر روی محیط ائوزین متیلین بلو (Eosine Methylen Blue) آگار کلنی‌های رشد یافته ازنظر رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی افتراقی از قبیل چگونگی تخمیر قندها در محیط تی‌اس‌آی (Triple Sugar Iron Agar)، مک کانکی، هم‌چنین دکربوکسیلاسیون اسیدآمینه لایزین در محیط لایزین آیرون آگار (Lysine Iron Agar)، تولید اندول، عدم حرکت در محیط SIM و واکنش در محیط MRVP broth، رشد در محیط سیمون سیترات و اوره آگار موردبررسی قرار گرفتند و درنهایت با استفاده از جداول استاندارد باکتری *کلبسیلا پنومونیه* شناسایی گردیدند. در این تحقیق از *کلبسیلا پنومونیه PTCC1053* (تهیه‌شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش کربی- بایر (Kirby Bauer) بر طبق دستورالعمل CLSI (مندرج در راهنمای ارائه‌شده توسط شرکت پادتن طب) استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در این آزمایش شامل: سفتریاکسون (CRO30)، تتراسیکلین (TE 30)، ایمی‌پنم (IPM 10)، سیپروفلوکساسین (CP5)، نورفلوکساسین (NOR 10)، سفالوتین (CF 30)، نالیدیکسیک اسید (NA 30)، نیتروفورانتئین (FM300)، کوتریموکسازول (SXT)، آمیکایسین (AN 30)، جنتامایسین (GM 10)، کانامایسین (K 30) و سفپیم (FEP 30)، آموکسی‌سیلین (AM 10) از شرکت پادتن طب ایران مورداستفاده قرار گرفتند (۱۵). به‌منظور تشخیص قطعی و بررسی فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ مراحل استخراج DNA با روش جوشاندن (Boiling) بر روی کلنی‌های رشد کرده، صورت گرفت. جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج‌شده از نمونه‌های موردمطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز استفاده شد. بدین منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده روی ژل یک درصد آگاروز الکتروفورز گردید. به‌منظور کمیت سنجی DNA تخلیص شده از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه‌گیری میزان DNA در نمونه در طول‌موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید؛ که میزان ۱/۸ نشان‌دهنده‌ی نمونه DNAهایی که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بودند. بعد از استخراج DNA با استفاده از زوج پرایمرهای طراحی‌شده مربوط به ژن *16srRNA کلبسیلا پنومونیه* که در جدول (۱) نشان داده شده است، به تشخیص قطعی ایزوله‌ها پرداخته شد (۱۶).

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 MixdNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلی مراز Taq DNA (Polymerase) (فرمنتاس- لیتوانی) و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم)، صورت گرفت. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *16srRNA کلبسیلا پنومونیه* به‌صورت یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه و ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه 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 میکرومول MixdNTP،

جدول ۱- توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن‌های srRNA۱۶ و اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*

ژن	توالی پرایمر (۳'-۵')	اندازه محصول (bp)	منبع
16srRNA	F: ATT TGA AGA GGT TGC AAA CGA T R: TTC ACT CTG AAG TTT TCT TGT TT C	۱۳۰	۱۶
Int 1	F: GGT CAA GGA TCT GGA TTT CG R:ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC	۴۳۶	۱۷
Int 2	F:AGT GGG TGG CGA ATG AGT G R:GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G	۷۸۸	۱۷
Int 3	F:TGT TCT TGT ATCGGC AGG TG R: GGC ATC CAA GCA GCA AG	۶۰۰	۱۷

۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلی مراز (Taq DNA Polymerase) (فرمنتاس- لیتوانی) و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم)، صورت گرفت. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و ۲ در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به‌صورت: 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 ۱ دقیقه انجام شد (۱۷).

جهت ردیابی ژن‌های اینتگرون کلاس ۳ واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر (PCR buffer 10X)، ۱۰۰ میکرومول MixdNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلی مراز Taq DNA (Polymerase) (فرمنتاس- لیتوانی) و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم)، صورت گرفت (۱۷). برنامه حرارتی برای تکثیر ژن‌های ژن اینتگرون کلاس ۳ در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به‌صورت: 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 ۱ دقیقه انجام شد. توالی پرایمرهای مورداستفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

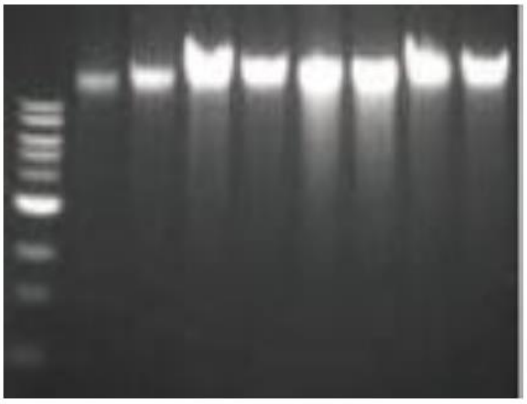
برای تکثیر قطعات ژنی موردمطالعه از دستگاه (Eppendorf Master cycler Gradient, Germany) استفاده شد. به‌منظور ردیابی قطعه ژنی تکثیر یافته در PCR، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA صورت گرفت و پس از مشاهده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

نتایج حاصل از ارزیابی اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ با استفاده از آزمون دقیق فیشر (Fisher Exact test) و با نرم‌افزار SPSS شماره ۱۸ مورد ارزیابی قرار گرفت.

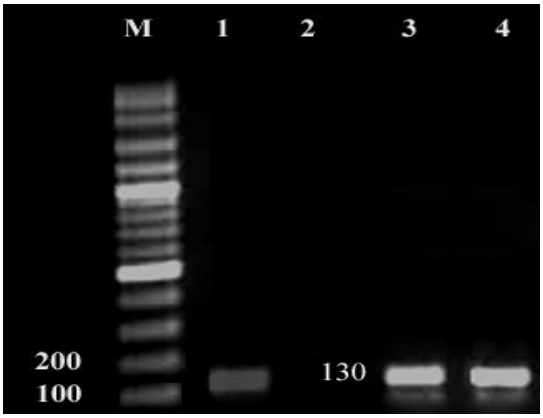
نتایج

مطالعه حاضر بر روی ۶۴ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد کلینیکی مختلف مثل ادرار، کشت خون و ترشحات چرکی چشم در افراد مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد صورت گرفت. پس از جداسازی باکتری *کلبسیلا پنومونیه* در محیط کشت اختصاصی، تشخیص نوع باکتری توسط آزمون‌های بیوشیمیایی صورت گرفت. پس از استخراج DNA کیفیت DNAهای موردبررسی روی ژل آگارز ۱٪ بررسی گردید. نتایج در شکل ۱ نشان داده‌شده است.

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 ۲ نشان داده شده است.

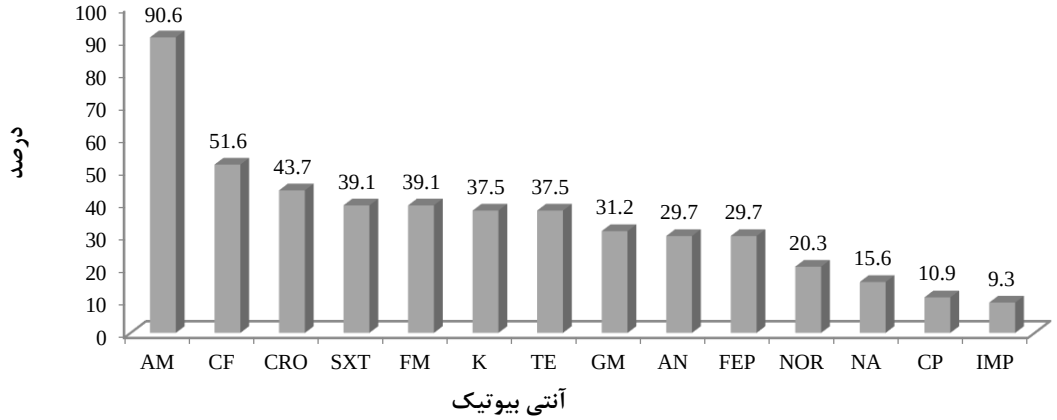


شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز DNA استخراج‌شده از ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جداشده از موارد کلینیکی در شهرستان شهرکرد



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن *16srRNA کلبسیلا پنومونیه*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز (کد SM0623)، ستون ۴ کنترل مثبت، ستون ۲: کنترل منفی، ستون‌های ۱ و ۳ نمونه‌های مثبت

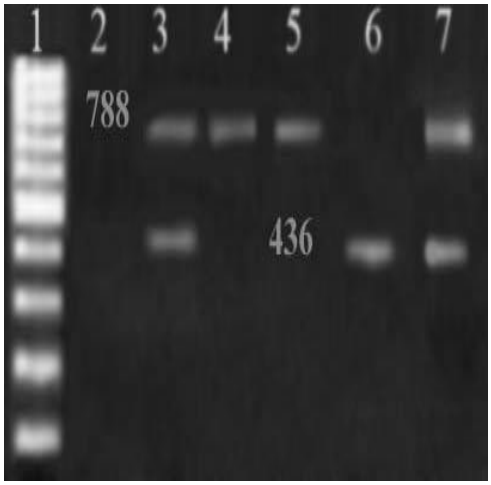
پس از تأیید باکتری با استفاده از آزمون‌های میکروبیولوژی و مولکولی آزمون آنتی بیوگرام انجام شد. نتایج در نمودار ۱ نشان داده شده است.



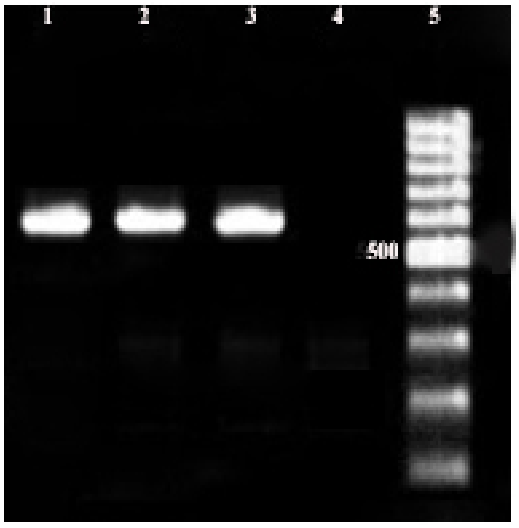
نمودار ۱- درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده

مقاومت نسبت به یک آنتی‌بیوتیک در ۱۲/۵٪، نسبت به ۲ آنتی‌بیوتیک ۱۰/۹۳٪، نسبت به ۳ آنتی‌بیوتیک ۹/۳۷٪، نسبت به ۴ آنتی‌بیوتیک ۱۸/۷۵٪، نسبت به ۵ آنتی‌بیوتیک ۱۳/۱۲٪، نسبت به ۶ آنتی‌بیوتیک ۴/۶۸٪، نسبت به ۷ آنتی‌بیوتیک ۶/۲۷٪، نسبت به ۸ آنتی‌بیوتیک ۱۴/۰۶٪، نسبت به ۹ آنتی‌بیوتیک ۱۰/۹۳٪، نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک ۴/۶۸٪، نسبت به ۱۱ آنتی‌بیوتیک ۱/۵۶٪ و نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک در ۱/۵۶٪ مشاهده شد. در این تحقیق اینتگرون کلاس ۱ در ۸ ایزوله (۱۲/۵٪)، اینتگرون کلاس ۲ در ۶ ایزوله (۹/۴٪) و اینتگرون کلاس ۳ در ۱۰ ایزوله (۱۵/۶۲٪) 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 ایزوله‌ای مشاهده نشد. نتایج در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

از ۵۴ نمونه ادرار موردبررسی در ۸ نمونه (۱۴/۸۱٪) اینتگرون کلاس ۱، در ۵ نمونه (۹/۲۵٪) اینتگرون کلاس ۲ و در ۱۰ نمونه



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و ۲ ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی (سیناژن PR901645)، ستون ۲: کنترل منفی. ستون‌های ۳ و ۷ باند ۴۳۶ جفت بازی اینتگرون کلاس ۱ و باند ۷۸۸ جفت بازی اینتگرون کلاس ۲، ستون‌های ۴ و ۵: باند ۷۸۸ جفت بازی اینتگرون کلاس ۲، ستون ۶: باند ۴۳۶ جفت بازی اینتگرون کلاس ۱.



شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR ژن اینتگرون کلاس ۳: ستون ۵: مارکر ۱۰۰ جفت بازی (سیناژن PR901645)، ستون ۲: کنترل منفی. ستون‌های ۱،۲ و ۳: باند ۶۰۰ جفت بازی ژن اینتگرون ۳.

(۱۸/۵۱٪) اینتگرون کلاس ۳ گزارش گردید. از ۶ نمونه کشت خون موردبررسی در ۱ نمونه (۱۶/۶۶٪) اینتگرون کلاس ۲ مشاهده گردید. در نمونه‌های کشت خون اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۳ مشاهده نگردید. در نمونه‌های مربوط به ترشحات چشم هیچ‌کدام از ژن‌های اینتگرون گزارش نگردید.

در تجزیه‌وتحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین اینتگرون کلاس ۱ و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده گردید (P=۰/۰۰۰<۰/۰۵). بر اساس آزمون دقیق فیشر بین اینتگرون‌های کلاس ۲ (P=۰/۹۲۸>۰/۰۵) و ۳ (P=۰/۴۸۹>۰/۰۵). و آنتی‌بیوتیک‌های موردبررسی ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده نگردید.

بحث

در چند سال اخیر عفونت ناشی از *کلبسیلا* مشخص گردیده است. قابلیت این ارگانیسم در ایجاد بیماری به علت کاسته شدن دفاع میزبان درنتیجه اعمال جراحی پیچیده و طولانی و همین‌طور مصرف داروهای متفاوت رو به ازدیاد است. اینتگرون‌ها عناصر متحرک ژنتیکی بوده که قادرند ژن‌ها را در برگرفته و آن‌ها را درحالی‌که در داخل کاست ژنی قرار دارند جابه‌جا نمایند (۲۰-۱۸). اولین مطالعه در موردبررسی میزان شیوع اینتگرون‌ها توسط Sallen و همکاران در ۱۹۹۵ صورت گرفت. در این مطالعه شیوع اینتگرون در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه ۵۹٪ برآورد گردید (۲۱).

در تحقیق حاضر که به‌منظور بررسی میزان شیوع اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به آنتی‌بیوتیک جداشده از موارد کلینیکی در شهرستان شهرکرد، صورت گرفت، فراوانی اینتگرون‌ها به ترتیب ۱۲/۵٪، ۹/۴٪ و ۱۵/۶۲٪ برآورد گردید که در تجزیه‌وتحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین اینتگرون کلاس ۱ و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده گردید که حاکی از انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی توسط ژن اینتگرون کلاس ۱ است. ولی بر اساس آزمون دقیق فیشر بین اینتگرون کلاس ۱ و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و اینتگرون‌های کلاس ۲ و ۳ و آنتی‌بیوتیک‌های موردبررسی ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده نگردید.

در اولین مطالعه انجام‌شده توسط Ahangarzaderezaee و همکاران در ایران که به‌منظور ردیابی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و ۲ در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به چند دارو در غرب کشور صورت گرفت، از ۱۵۰ ایزوله موردبررسی اینتگرون کلاس ۱ در ۱۱۷ ایزوله (۷۸/۵٪) و اینتگرون کلاس ۲ در ۲۰ ایزوله (۱۳/۴٪) گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما از فراوانی بالاتری برخوردار است. هم‌چنین در این تحقیق بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، تتراسایکلین، سفتازیدیم، سفالوتین کلرامفنیکل و نالیدیکسیک اسید و وجود اینتگرون کلاس ۱ ارتباط معنی‌دار مشاهده گردید (P=0.01). درحالی‌که تنها بین آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و ژن اینتگرون کلاس ۲ ارتباط معنی‌دار مشاهده گردید (P=0.04) (۲).

در تحقیق انجام‌شده توسط Ranjbaran به بررسی مولکولی اینتگرون‌ها در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از عفونت‌های دستگاه ادراری بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین ۹۰٪، اریترومایسین ۹۰٪، سفتریاکسون ۷۶٪، آموکسی کلاو ۷۶٪، کوتریموکسازول ۷۰٪، سفوتاکسیم ۷۰٪ وسفتازیدیم ۶۶٪ گزارش گردید. هم‌چنین فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ (۹۰٪)، اینتگرون کلاس ۲ (۲٪) و اینتگرون کلاس ۳ در هیچ ایزوله‌ای مشاهده نشد (۲۲). درحالی‌که در تحقیق ما مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول و سفتریاکسون کمتر از مطالعه رنجبران و همکاران است. در تحقیق ما مقاومت نسبت به ایمی پنم ۱۲/۵٪ گزارش گردید، درصورتی‌که در تحقیق رنجبران در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* حساسیت نسبت به ایمی پنم گزارش گردید. در مطالعه صورت گرفته توسط Chang و همکاران فراوانی اینتگرون کلاس یک در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* ۳۴/۲٪ گزارش گردید (۲۳). در مطالعه‌ی دیگر انجام‌شده توسط Islami و همکاران که بر روی ۲۰۰ ایزوله صورت گرفت، ۱۷۱ نمونه به‌عنوان مقاوم به چند دارو گزارش گردیدند که در ۳۵ ایزوله ژن اینتگراز گزارش گردید که در ۲۵ ایزوله (۱۴/۵٪) ژن اینتگرون کلاس ۱ و در ۱۰ ایزوله (۵/۸٪) ژن اینتگرون کلاس ۲ گزارش گردید که با نتایج حاصل از تحقیق ما تقریباً مشابه است. در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین وجود ژن اینتگرون و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، نورفلوکساسین، سفالوتین و نالیدیکسیک اسید گزارش گردید (۲۰). در مطالعه دیگر صورت پذیرفته توسط Molana و همکاران که بر روی ۳۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شهید بهشتی بابل صورت گرفت، مقاومت نسبت به

سیپروفلوکساسین (۶۰٪)، سفپیم (۹۰٪)، آمیکایسین (۳۶/۶٪)، ایمی پنم (۵۶/۶٪) و جنتامایسین (۸۶/۶٪) گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما بسیار بالاتر است. در این تحقیق ژن اینتگرون کلاس ۱ در ۱۱ ایزوله (۳۶/۶٪) گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما بسیار بیشتر است (۲۴). در تحقیق دیگر انجام‌شده توسط Rao و همکاران در بیمارستان‌های ایالات‌متحده آمریکا، شیوع ژن اینتگرون کلاس ۱ در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* ۷۰٪ گزارش گردید. در این تحقیق بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، توبرامایسین، سفپودوکسیم، سفتازیدیم و کوتریموکسازول و حضور اینتگرون کلاس ۱ ارتباط معنی‌دار وجود داشت (۱۴). اغلب مطالعات انجام‌شده حاکی از عدم حضور ژن اینتگرون کلاس ۳ در نمونه‌های موردبررسی است (۲۵). درحالی‌که در تحقیق ما ۱۵/۱۶٪ مشاهده گردید. شیوع بالای اینتگرون کلاس ۳ در تحقیق ما نسبت به تحقیقات دیگر شایان توجه است.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشخص می‌گردد که بین حمل اینتگرون و افزایش مقاومت به تعدادی از کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی ارتباط 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 آنتی‌بیوتیکی را دوچندان کرده و تعیین شیوع این ژن‌ها جهت اجرای برنامه‌های کنترل عفونت و همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ممانعت از انتشار عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم را ضروری می‌نماید.

نتیجه گیری

پلی‌مورفیسم مورد مطالعه ما در منطقه 55- و به‌صورت تبدیل باز C به T بوده که طبق نتایج به‌دست‌آمده فراوانی باز T در جمعیت افراد چاق بیشتر بوده است. با توجه به این‌که در حوالی منطقه 50- اکثر پروموترهای ژن‌های یوکاریوتی، یک توالی غنی از C وجود دارد که برای تنظیم بیان ژن است (۲۸) تبدیل این C به T شاید بر بیان این ژن مؤثر بوده باشد؛ بنابراین غربالگری افراد چاق جهت وجود پلی‌مورفیسم پروموتری می‌تواند در تعیین راهکارهای منجر به کاهش وزن در این افراد مؤثر باشد. با توجه به قرارگیری پلی‌مورفیسم مورد نظر در منطقه غنی از سیتوزین این ژن شاید الگوهای متیلاسیون در تنظیمات اپی‌ژنتیک و الگوی بیان متفاوت این ژن نیز مؤثر واقع گردد که می‌توان در آینده در افراد حامل هر دو الل الگوهای متیلاسیون DNA را در آن منطقه مطالعه نمود.

تشکر و قدردانی

با تشکر 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. کد پایان‌نامه مربوط به این مقاله ۱۳۳۳۰۵۰۷۹۳۲۰۷۱ است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Foxman B, P B. Epidemiology of urinary tract infection: transmission and risk factors, incidence, and costs. Infect Dis Clin North Am. 2003;17(2):227-241.
2. Ahangarzaderezaee M. Langarizade N., M. A. Prevalence of multi drug resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae* among children and adults with urinary tract infection referred to Tabriz teaching hospitals. J Bio Sci. 2011;4(1):9-17.
3. Chen LF, Chopra T, KS. K. Pathogens resistant to antibacterial agents. Infect Dis Clin North Am. 2009;23(4):817-8145.
4. Hirsch EB, VH. T. Detection treatment options for *Klebsiella pneumonia* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug resistant infection. J Antimicrob Chemother 2010; 65(6):1119-1125.
5. TD. G. The global problem of antibiotic resistance. Crit Rev Immunol. 2010; 30(1):79-93.
6. Paczosa M K, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. Microbiol Mol. Biol. Rev 2016 80(3): 33 629-33661.
7.Młynarczyk G, Młynarczyk A, Bilewska A, Dukaczewska A, Goławski C, Kicman A, et al. High effectiveness of the method with cefpirome in detection of extended-spectrum beta lactamases in different species of gram-negative bacilli. Med Dosw Mikrobiol 2006;58(1):59-65.

8. Actis LA, Tolmasky ME, JH. C. Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encodikg resistance to antimicrobial compounda. Front Biosci. 1999;a:D43-D62.
9. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Spectr. 2016; 4(1). 445-455
10. Stokes HT. Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Mol Microbiol. 1989;3(12):1669-83.
11. Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, MC P. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. Fron Microbiol. 2012; 3(119):1-14.
12. Barlow RS, KS. G. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. J Antimicrob Chemother. 2006;58(6):1133-1138.
13. Fluit AC, FJ. S. Resistance integrons and super integrons. Clin Microbail Infect 2004;10 (4):272-88.
14. Rao AN, Barlow M, Clark LA, Boring JR, Tenover FC, JE M. Class 1 integrons in resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp, US Hospitals. Emerg Infect Dis. 2006;12(6):1011-1014
15. Clinical and laboratory standards institute (CLSI) (2012) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement M100-S21. 2012;
16. Kerrn MB, Klemmensen T, Frimodt Møller N, F E. Susceptibility of danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. J Antimicrob Chemother. 2002;50(3):513.
17..Turton JF, Perry C, Elgohari S, CV. H. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. J Med Microbiol. 2010;59(4):541-7.
18. Arora DR, TD C. Klebocin types of *Klebsiella pneumoniae* isolated from normal and diarrhoeal stool. Indian J Med Res. 1981;72(1):856-873.
19. Wallace MR, Johnson A, Daniel M, M M, AA Y. Sequential emergence of multi resistant *Klebsiella pneumoniae* in Bahrain. J Hosp Infect. 1995;31(4):247-52.
20.Islami G, Seyed Javadi S, Fallah H, F G. Prevalence of integrons in multi drug resistance *E. coli* and *Kelebsiella* isolated from urinary tract infections in children. Pajohandeh. 2010;34(1):61-65.
21. Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Mabilat C. (1995).Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of enterobacteriaceae.Microb Drug Resist; 1(3):195-202
22. Ranjbaran M, Zolfaghari M, Japoni-Nejad A, Amouzandeh Nobaveh AR, Abtahi H, Nejad M, et al. Molecular investigation of integrons in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections. J Mazandaran Univ Med Sci. 2013;23(105):20-27.
23. Chang CY, Fang YT, Tsai SM, Chang LL, Yu WL. Characterization of class 1 integrons and gene cassettes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 65(2): 214-216.
24. Molana Z, Ferdosi Shahandahti E, Gharavi S, Shafii M, Norkhomami S, Ahangarkani F ea. Molecular investigation of class integron in *Klebsiella pneumoniae* isolated from intensive care unit (Shahidbeheshti hospital of babol. J Babol Univ Med Sci. 2011;13(6):1-12.
25.White P, McIver C, W R. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(9):2658-2661.

Original Article

Investigating Antibiotic Resistance Pattern and Prevalence of Class I, II, III Integron Genes in *K. Pneumoniae* Isolated from Clinical Samples in Sahrekord, Iran

Soleymanian M, Tajbakhsh E*, Bamzadeh Z

Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Iran

Received: 21 Oct 2016 Accepted: 19 May 2017

Abstract

Background & Objective: Acquiring integron is an important factor in multidrug resistance in the intestinal gram negative microorganisms. The most common integron cassette contains the genes associated with resistance to a wide range of antimicrobial agents. The aim of this study was to determine the prevalence of class 1, 2 and 3 integron genes in Klebsiella pneumoniae strains which was isolated from clinical samples in Shahrekord.

Material & Methods: In this study antibiotic resistance pattern of 64 strains of Klebsiella pneumonia isolated from clinical samples in medical diagnostic laboratories in Shahrekord were tested by disk diffusion. In order to determine the prevalence of integrons class 1, 2 and 3 were used as specific primers.

Results: After performing antibiogram tests, the most resistant was observed to be ampicillin (90.6%) and the lowest resistance one was imipenem (9.3%). Class 1, 2 and 3 integron were observed in 8 isolates (12/5%), 6 isolates (9/4%) and 10 isolates (15/62%). In 40 isolates were not observed Integron genes. In the statistical analysis by Fisher exact test between class 1 integron and resistance to the ampicillin significant association was observed.

Conclusion: Resistance genes are located on the integrons and can be transmitted from one strain to another and disseminate resistance in the hospital or other environments, it is important to identify these types of antibiotic resistance genes twofold has done.

Keywords: Antibiotic resistance, Integron, Klebsiella pneumonia

***Corresponding Author: Elahe Tajbakhsh**, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Iran
Email: ee_tajbakhsh@yahoo.com

Journal of Fasa University of Medical Sciences 8 (2018): 692-700