ORIGINAL ARTICLE

Molecular Investigation of Integrons in Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae Isolated from Urinary Tract Infections

Marzieh Ranjbaran[1],
Mohammadreza Zolfaghari[2],
Alireza Japoni-Nejad[3],
Alireza Amouzandeh-Nobaveh[4],
Hamid Abtahi[5],
Mahsatabib Nejad[6],
Ehsanallah Ghaznavi Rad[7]

[1] MSc in Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
[3] MSc in Medical Microbiology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[5] Associate Professor, Department of Medical Microbiology and Immunology, Molecular Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[6] MSc in Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[7] Assistant Professor, Department of Medical Microbiology and Immunology, Molecular Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received April 14, 2013 ; Accepted August 12, 2012)

Abstract

Background and purpose: Due to the emergence of antibiotic resistance bacteria, treatment of urinary tract infection is becoming more problematic. Integrons are mobile genetic elements that play an important role in dissemination and accumulation of resistance genes of multidrug resistance in bacteria. The aim of the present study was to determine the antibiotic resistant profile, frequency of integron genes (Classes 1,2,3) and investigate the role of integrons in the development of antibiotic resistance among *Escheria coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections.

Material and methods: 50 *E.coli* and 50 *K.pneumoniae* isolated from the urine samples of patients who referred to Valiasr Hospital, Arak, Iran were subjected to this study. All the isolated samples were confirmed by standard biochemical tests. Isolates were tested for susceptibility to 16 antimicrobial drugs by using disk diffusion method and the distribution of different integron classes was determined by polymerase chain reaction (PCR).

Results: The highest rate of antibiotic resistance in *K. pneumoniae* isolates was found in rifampin (90%), erythromycin (90%), ceftriaxone (76%), amoxicillin-Clavulonic acid (76%), cotrimoxazole (70%), cefotaxime (70%) ceftazidime (66%) and for *E.coli* isolates in cotrimoxazole (88%), ceftriaxone (76%), amoxicillin-Clavulonic acid (74%), ceftazidime (72%) and cefotaxime (72%). All the *E.coli* isolates were susceptible to Imipenem, while only three (6%) of *K.pneumoniae* isolates were resistant to this antibiotic. Ninety percent of *K.pneumoniae* and 86% of *E. coli* isolates carried class 1 integrons, whereas class 2 integrons were found in 8% and 2% of *E. coli* and *K.pneumoniae* isolates, respectively. Class 3 integrons were not found.

Conclusion: The high frequency of Class 1 integron in *E.coli* and k. *pneumoniae* isolates associated with the high rate of antibiotic resistant indicate that may be integrons play an important role in facilitating the spread of antimicrobial resistance in this region.

Keywords: Urinary tract infection, *E.coli*, *K.pneumoniae*, Antibiotic resistance, Class 1 integron

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(105): 20-27 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۵ مهر سال ۱۳۹۲ (۲۷-۲۰)

بررسی مولکولی اینتگرون ها در اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه های جدا شده از عفونت های دستگاه ادراری

مرضیه رنجبران[۱]
محمدرضا ذوالفقاری[۲]
علیرضا ژاپونی نژاد[۳]
علیرضا آموزنده نوباوره[۴]
حمید ابطحی[۵]
مهسا طبیبی نژاد[۶]
احسان الله غزنوی راد[۷]

چکیده

سابقه و هدف: درمان عفونت‌های ادراری به دلیل به وجود آمدن مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در عوامل به وجود آورنده، روز به روز مشکل تر می‌شود. اینتگرون‌ها از عوامل ژنتیکی متحرکی هستند که باعث گسترش و حمل ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌ها می گردند. هدف از انجام این مطالعه تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بررسی شیوع اینتگرون‌های کلاس یک، دو و سه وتعیین ارتباط آن در ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک ها در ایزوله‌های *اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌های ادراری می باشد.

مواد و روش‌ها: ۵۰ ایزوله اشرشیا کلی و ۵۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های مربوط به عفونت‌های ادراری بیماران بستری شده در بخش‌های مراقبت ویژه یک بیمارستان سطح سه اراک جمع‌آوری گردید و توسط تست‌های بیوشیمیایی استاندارد تعیین هویت شدند. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن نسبت به ۱۶ آنتی‌بیوتیک تعیین گردید. فراوانی اینتگرون‌های کلاس یک، دو و سه در ایزوله‌ها با استفاده از روش PCR تعیین شد.

یافته‌ها: بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مربوط به آنتی‌بیوتیک های ریفامپین (۹۰ درصد)، اریترومایسین (۹۰ درصد)، سفتریاکسون (۷۶ درصد)، آموکسی کلاو (۷۶ درصد)، کوتریموکسازول (۷۰ درصد)، سفوتاکسیم (۷۰ درصد) و سفتازیدیم (۶۶ درصد) بود، هم‌چنین بیش‌ترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های اشرشیا کلی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول (۸۸ درصد)، سفتریاکسون (۷۶درصد)، آموکسی کلاو (۷۴درصد)، سفتازیدیم (۷۲درصد) و سفوتاکسیم (۷۲درصد) بود. تمامی ایزوله‌های اشرشیاکلی نسبت به ایمیپنم حساسیت نشان دادند، درحالی‌که تنها ۶ درصد از کلبسیلا *پنومونیه ها* به این آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. ۹۰ درصد از کلبسیلا پنومونیه‌ها دارای اینتگرون کلاس یک، ۲ درصد از آن‌ها دارای اینتگرون کلاس دو بودند، میزان فراوانی اینتگرون کلاس یک و دو به ترتیب در *اشرشیاکلی*ها ۸۶ و ۸ درصد بود. اینتگرون کلاس ۳ نیز در ایزوله ها یافت نگردید.

استنتاج: میزان فراوانی اینتگرون کلاس یک درسویه‌های *اشرشیاکلی وکلبسیلا پنومونیه*های مورد مطالعه بسیار بالا می‌باشد، که این عامل احتمالاً می‌تواند نقشی در تسهیل گسترش سویه‌هایی با مقاومت چند دارویی داشته باشد.

واژه های کلیدی: عفونت های ادراری، *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، مقاومت آنتی بیوتیکی، اینتگرون کلاس یک

مقدمه

عفونت‌های دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی در بیماران بستری در بیمارستان می‌باشد(۳-۱). *اشرشیا کلی* عامل بیش از ۸۰ در صد از عفونت‌های ادراری می‌باشد و سایر باسیل‌های گرم منفی

مولف مسئول: احسان غزنوی راد- اراک: میدان بسیج دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه میکروب شناسی e.ghaznavirad@arakmu.ac.irE-mail:
۱. کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
۳. کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۴. استادیار، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۵. دانشیار، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۶. کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۷. استادیار، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۱/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۳/۲۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۲/۵/۲۱

از جمله *پروتئوس* و *کلبسیلا* از دیگر عوامل ایجاد کننده این عفونت‌ها می‌باشند(۴). مقاومت آنتی‌بیوتیکی به وجود آمده در این باکتری‌ها مشکلات عمده‌ای را در درمان آن‌ها ایجاد کرده است(۲). کسب عناصر ژنتیکی متحرک از جمله پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها در میان باکتری‌های گرم منفی، نقش مهمی را در گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایفا می‌کند(۵). اینتگرون‌ها یکی از عوامل متحرک ژنتیکی می‌باشند که قادر به حمل و گسترش ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان این باکتری ها هستند و انتقال افقی آن‌ها در بین باکتری‌ها یکی از مهم‌ترین راه‌های انتشار ژن‌های مقاومت و به وجود آمدن سویه‌های مقاوم به چند دارو می‌باشد(۸-۶). از نظر ساختاری اینتگرون‌ها دارای دو ناحیه محافظت شده ´۳ و ´۵، ژن اینتگراز و ناحیه متغیر می‌باشند(۹). تاکنون شش کلاس از اینتگرون‌ها بر اساس اینتگرازهای مختلفی که کد می‌کنند شناخته شده‌اند(۱۰). در واقع با استفاده از ژن کدکننده اینتگراز (*Int*)، کلاس‌های مختلف اینتگرونی در باکتری‌ها قابل شناسایی هستند(۱۲،۱۱). در میان کلاس‌های مختلف اینتگرونی، اینتگرون کلاس یک در بین ایزوله‌های باکتریایی بیش‌تر یافت شده است(۱۰). این اینتگرون در سمت ´۵، دارای ژن کدکننده اینتگراز (*Int1*) و توالی attI1 می‌باشد و در سمت ´۳ خود دارای ژن *qacEΔ1* و ژن *sul1* می‌باشد(۱۳). بیش‌تر از ۷۰ ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی توسط اینتگرون‌ها حمل می‌شوند(۱۴،۹) که این ژن‌ها در ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از جمله آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها، ماکرولیدها، سولفانامیدها، کلرامفنیکل نقش دارند(۵). هم‌چنین ارتباط مشخصی بین فنوتایپ مقاومت و کاست‌های ژنی قرار گرفته در ناحیه متغیر اینتگرون‌ها وجود دارد. بررسی مطالعات گذشته نشان‌دهنده نقش بارز اینتگرون‌ها در ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در *اشرشیا کلی* و *کلبسیلا* می‌باشد، به طوری که در مطالعه Rao و همکارانش ۷۰ در صد از *کلبسیلا*ها و ۴۹ درصد از *اشرشیا کلی*ها دارای اینتگرون کلاس یک بودند و ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، توبرامایسین، کوتریموکسازول، سفتازیدیم و سفپودوکسیم وجود داشت(۱۵). در دسترس بودن اطلاعات جدید از الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها، آشنایی با مقاومت رایج در بین آن‌ها و نیز مطالعه در جهت بررسی علل ایجادکننده مقاومت در آن‌ها می‌تواند در جهت تدابیر درمانی مناسب کمک کند. با توجه به این‌که در بیمارستان‌های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی اراک تاکنون مطالعه‌ای بر روی نقش اینتگرون‌ها در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *اشرشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* صورت نپذیرفته است، در این مطالعه ایزوله‌های *اشرشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه‌های دستگاه ادراری بیماران بستری شده در مرکز آموزشی درمانی ولی عصر (ع) اراک، از نظر وجود ژن‌های اینتگرونی و نقش اینتگرون‌ها در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که به صورت مقطعی توصیفی و در مدت زمان بین فروردین ۱۳۹۱ تا شهریور ماه ۱۳۹۱ صورت پذیرفت، تعداد ۵۰ ایزوله *اشرشیا کلی* و ۵۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* از نمونه‌های مربوط به عفونت‌های ادراری بیماران بستری شده در بخش‌های مختلف مرکز آموزشی درمانی ولی‌عصر(ع) اراک جمع‌آوری گردید(۱۶). عفونت ادراری در بیماران به وسیله علایم کلینیکی و یافته‌های آزمایشگاهی مربوط به این عفونت، تأیید شده بود.

نمونه‌ها با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی استاندارد از جمله رنگ‌آمیزی گرم، رشد بر روی محیط مک کانکی، اکسیداز، OF، TSI، SIM، MR، VP، سیترات، اوره، لیزین دکربوکسیلاز و اورنیتین دکربوکسیلاز گونه‌های *اشرشیا کلی* و *ایزوله کلبسیلا*

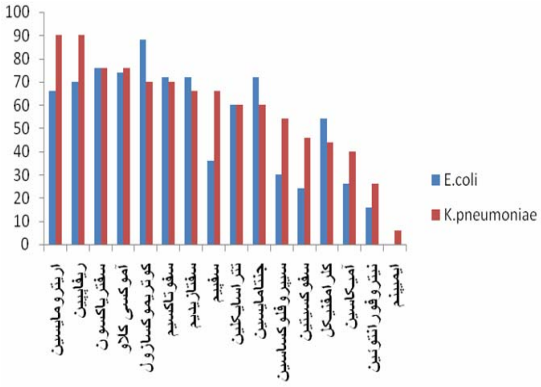
پنومونیه تعیین هویت شدند(۱۷). الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در سویه‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (کربی- بائر) مطابق با معیارهای موسسه استاندارهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) تعیین گردید(۱۸). دیسک‌ها محصول شرکت MAST (انگلستان) و به شرح زیر بودند: سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفوکسیتین، سفپیم، سفترياکسون، آموکسی کلاو، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامایسین، تتراسایکلین، تری متوپریم- سولفامتوکسازول (کوتریموکسازول)، نیتروفورانتوئین، ایمیپنم، کلرامفنیکل، اریترومایسین و ریفامپین. هم‌چنین سویه استاندارد *پسودوموناس آئروژینوزا* ATCC27853 به عنوان کنترل آنتی بیوگرام استفاده گردید.

استخراج DNA و انجام PCR

استخراج DNA ایزوله‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA محصول کره جنوبی (Bio flux bioer) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت. آزمونPCR برای شناسایی ژن‌های کد کننده آنزیم اینتگراز صورت پذیرفت. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و شرایط واکنش در جدول شماره ۱ شرح داده شده است. واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام پذیرفت بدین ترتیب که ۱/۵ میکرولیتر از پرایمر رفت، ۱/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر از DNA به عنوان الگو، ۲۵ میکرولیتر از 2XTaq Master mix (Vivantis) و ۲۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استفاده گردید. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد و ولتاژ ۹۰ به مدت ۱ ساعت صورت پذیرفت. سپس ژل با استفاده از نور ماورا بنفش مورد ارزیابی قرار گرفت، اندازه باندهای به دست آمده در مقایسه با مارکر ۱۰۰ bp (Fermentas) مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها

درصد مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های *کلبسیلا پنومونیه و اشرشیا کلی* در برابر ۱۶ آنتی بیوتیک به کار گرفته شده در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است.

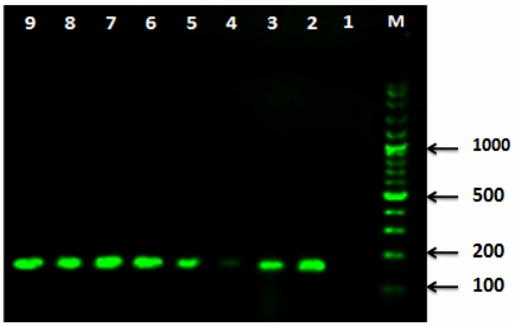


نمودار شماره ۱: درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در ۵۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه و ۵۰ ایزوله اشرشیا کلی

نتایج حاصل از PCR جهت تعیین میزان فراوانی ژن‌های *Int1* و *Int2* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به ترتیب برابر با ۹۰ درصد (n=۴۵) و ۲ درصد (n=۱) (تصویر شماره۱)، هم‌چنین میزان فراوانی ژن‌های *Int1* و *Int2* در ایزوله‌های *اشرشیا کلی* به ترتیب برابر با ۸۶ درصد (n=۴۳) و ۸ درصد (n=۴) گردید. ژن *Int3* در هیچ کدام از ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه و اشرشیا کلی* یافت نگردید.

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و شرایط و اکنش PCR

Target gene	Primer/Sequence(5□ to 3□)	PCR condition	PCR fragment size	Reference
Int1	F: CAG TGG ACA TAA GCC TGT TC R: CCC GAG GCA TAG ACT GTA	35 cycles: 30s 94°C,30 s 55°C, 30 s 72°C	۱۶۰	(۱۹)
Int2	F: TTG CGA GTA TCC ATA ACC TG R: TTA CCT GCA CTG GAT TAA GC	35 cycles: 30s 94°C,30 s 55°C, 30 s 72°C	۲۸۸	(۱۸)
Int3	F: GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG R: ACGGATCTGCCAAACCTGACT	60 s 94°C, 60 s 59°C, 60 s 72°C	۹۷۹	(۱۴)



تصویر شماره ۱: تشخیص ژن Int1 در میان ایزوله های کلبسیلا پنومونیه. M برابر است با مارکر ۱۰۰bp ستون شماره ۱ کنترل منفی، ستون شماره ۲ کنترل مثبت، ستون های شماره ۳ تا ۹ همگی دارای ژن Int1

بحث

افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عوامل ایجادکننده عفونت‌های ادراری، نگرانی‌های بسیاری را در جهت درمان این دسته از عفونت‌ها به وجود آورده است(۲۰). اینتگرون‌ها نقش مهمی در گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی بویژه از طریق انتقال افقی (Horizontal transmission) به عهده دارند(۲۱) و اهمیت این امر تا اندازه‌ای است که مقالات مختلف، نقش اینتگرون ها را در مقاومت چندگانه باکتری گرم منفی قابل توجه می دانند(۲۲، ۲۳) هم‌چنین اینتگرون‌ها به عنوان ابزاری جهت کنترل عفونت ها و هم‌چنین جهت مطالعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها شناخته می شوند(۱۴). با توجه به مطالب گفته شده بالا، در این مطالعه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه و اشرشیا کلی*، شیوع اینتگرون‌های کلاس یک، دو و سه در آن‌ها و ارتباط اینتگرون‌ها با ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله ها مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین، اریترومایسین، سفتریاکسون، آموکسی کلاو، کوتریموکسازول، سفتازیدیم و سفوتاکسیم بود، هم‌چنین بیش‌ترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های اشرشیا کلی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول، سفتریاکسون، آموکسی کلاو، سفتازیدیم و سفوتاکسیم بود. مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر ایزوله های *کلبسیلا پنومونیه* و *اشرشیا کلی*، ایمیپنم و نیتروفورانتوئین بودند، که تنها شش درصد از کلبسیلا پنومونیه‌ها نسبت به ایمیپنم و ۲۶ درصد از آن‌ها نسبت به نیتروفورانتوئین مقاوم بودند. در حالی‌که تمامی ایزوله‌های اشرشیا کلی نسبت به ایمیپنم حساس بودند و ۱۶ در صد از آن‌ها نسبت به نیتروفورانتوئین مقاوم بودند. بررسی نتایج آنتی بیوگرام به دست آمده در این مطالعه نشان دهنده افزایش میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله های مورد بررسی نسبت به مطالعات صورت گرفته قبلی در ایران می‌باشد، به طوری‌که در مطالعه حاضر میزان مقاومت در ایزوله‌های *اشرشیا کلی* نسبت به اکثر آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی از جمله سفتازیدیم، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، نیتروفورانتوئین و آمیکاسین بسیار بالاتر از مطالعه صورت پذیرفته توسط فرشاد و همکارانش می‌باشد. هم‌چنین میزان فراوانی اینتگرون کلاس یک در مطالعه حاضر (۸۶ درصد) بسیار بالاتر از میزان فراوانی آن (۶/۲۵ درصد) در مطالعه ذکر شده است(۲۴)، این موضوع نشان دهنده این مطلب است که با افزایش میزان فراوانی اینتگرون کلاس یک 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. در ضمن هیچ یک از ایزوله ها اشرشیا کلی در مطالعه ما و مطالعه ذکر شده نسبت به ایمیپنم مقاوم نبودند.

در مطالعه صورت پذیرفته توسط Falakian و همکارانش که در شهرکرد صورت پذیرفته است(۲۵)، فراوانی اینتگرون کلاس ۱ و نیز ارتباط آن با ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های اشرشیاکلی برگرفته از عفونت‌های ادراری مورد بررسی قرارگرفت. در مطالعه ذکر شده درصد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم،

سیپروفلوکساسین، کوتریموکسازول، آمیکاسین، جنتامایسین، نیتروفورانتوئین و ایمیپنم به ترتیب برابر با ۳۱ درصد، ۲۱/۱ درصد، ۲۰/۵ درصد، ۱۱/۸ درصد، ۲۲/۴ درصد، ۱۹/۹ درصد، ۷/۵ درصد، ۱۱/۸ درصد، ۶/۲ درصد و ۱/۹ درصد بود. هم‌چنین فراوانی اینتگرون کلاس یک در ایزوله‌های مورد بررسی در این مطالعه ۴۱/۹ درصد بود. در صورتی که فراوانی اینتگرون کلاس یک در ایزوله‌های اشرشیاکلی در مطالعه حاضر ۸۶ درصد به دست آمد. مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعه ما نشان‌دهنده این مطلب است که میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده در بالا به جز ایمیپنم بسیار کم‌تر از میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعه حاضر می‌باشد. فراوانی بالای اینتگرون کلاس یک در مطالعه حاضر می‌تواند دلیلی جهت ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا در ایزوله‌های اشرشیاکلی در مطالعه حاضر به نسبت مطالعه صورت گرفته توسط Falakian و همکارانش باشد(۲۵). نکته قابل توجه در این تحقیق فراوانی بالای اینتگرون کلاس یک در ایزوله‌های مقاوم به سفالوسپورین‌های نسل سوم (از ۶۶ الی ۷۲ درصد در هر دو گونه) می‌باشد. اگر چه در انتروباکتریاسه‌ها این نوع از مقاومت مرتبط با بیان ژن‌های بتالاکتامازی کلاس A همراه است ولی در هر صورت این امریا به دلیل قرار گرفتن ژن‌های بتالاکتامازی (bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{GES}, bla_{VEB},$bla_{CTX-M-2/-9}$, bla_{CMY}) در پلات فرم‌های اینتگرونی بوده ویا در غیر این صورت به علت همراهی ژن‌های بتالاکتامازی (bla_{TEM} and bla_{SHV}) و ژن‌های اینتگرون در یک پلاسمید مشترک می‌باشد که در برخی از مطالعات نیز به آن اشاره شده است(۳۱- ۲۶).

در مطالعه صورت پذیرفته توسط مولانا و همکارانش(۳۲) که بر روی *کلبسیلا پنومونیه* صورت پذیرفت، میزان مقاومت ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمیپنم ۶۰ درصد، سفپیم ۹۰ درصد و جنتامایسین ۹۰ درصد بود، که میزان مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در مطالعه ما به ترتیب ۶۶/۶ و ۶۰ درصد گردید. مقاومت نسبت به مابقی آنتی‌بیوتیک‌ها در هر دو مطالعه در محدوده یکسانی قرار داشت. در مطالعه ما میزان فراوانی اینتگرون کلاس یک در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه (۹۰ درصد) بسیار بالاتر از میزان اینتگرون کلاس یک در مطالعه ذکر شده بود (۳۶/۶ درصد) (۳۲).

در مطالعه صورت گرفته توسط Chang و همکارانش(۱۵) فراوانی اینتگرون کلاس یک در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه ۳۴/۲ درصد گزارش گردید(۳۳). هم‌چنین در مطالعه دیگری که در بیمارستان‌های ایالت متحده آمریکا جهت تعیین فراوانی اینتگرون کلاس یک در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه و اشرشیا کلی صورت پذیرفت ۴۹ درصد از ایزوله های اشرشیا کلی و ۷۰ درصد از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه دارای اینتگرون کلاس یک بودند که این میزان کم‌تر از میزان اینتگرون کلاس یک (۹۰ درصد در کلبسیلا و ۸۶ درصد در اشرشیاکلی) در مطالعه ما بود.

در مطالعه حاضر با توجه به وجود اینتگرون در ایزوله‌ها، درصد بالایی از آن‌ها نسبت به ایمیپنم حساس بودند که این موضوع نشان دهنده این است که بین حضور این عامل و مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک در این مطالعه ارتباطی وجود ندارد. از طرف دیگر ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون و مقاومت آنتی‌بیوتیکی کوتریموکسازول، جنتامایسین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و آموکسی‌کلاو وجود دارد. مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های مورد بررسی و شیوع بالای اینتگرون‌ها در آن‌ها در این مطالعه موئید این مطلب است که کاست‌های ژنی قرار گرفته در ناحیه متغیر این عوامل در ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی نقش مستقیمی را ایفا می‌کنند. درصد پایین مقاومت نسبت به ایمیپنم، مقاومت ۴۶ و ۲۴ درصدی نسبت به سفوکسیتین، مقاومت ۷۶ و ۷۴ درصدی نسبت به آموکسی کلاو و نیز مقاومت بالا نسبت به دیگر آنتی‌بیوتیک‌های نسل سومی

در کلبسیلاها و اشرشیاکلی‌ها(۳۴) انجام مطالعه‌ای در زمینه ارزیابی مقاومت از نوع AmpC در این ایزوله‌ها پیشنهاد می‌شود.

در نهایت می‌توان نتیجه‌گیری کرد که میزان فراوانی اینتگرون کلاس یک در سویه‌های اشرشیاکلی وکلبسیلا پنومونیه های جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری در بیمارستان‌های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی اراک بسیار بالا می‌باشد و همین عامل در به وجود آوردن سویه‌هایی با مقاومت چند دارویی نقش بسیار مهمی دارد. هم‌چنین فراوانی اینتگرون‌های کلاس دو و سه در ایزوله‌های این مطالعه حاکی از این است که نتایج این طرح مشابه با گزارشات قبلا منتشر شده می‌باشد که در اغلب آن‌ها اینتگرون کلاس دو فراوانی ناچیز داشته و اینتگرون کلاس سه نیز ردیابی نشده است. یافته‌های این طرح می‌تواند به عنوان پایه‌ای برای مطالعات دیگر قرار گرفته تا بتواند مکانیسم‌های مقاومت آنتی بیوتیکی را در سویه‌های مقاوم توجیه نموده تا بتوان با راهکار مناسب از گسترش آن‌ها جلوگیری نمود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاران بخش میکروب شناسی آزمایشگاه بیمارستان ولی عصر اراک تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Sefton AM. The impact of resistance on the management of urinary tract infections. Int J Antimicrob Agents 2000; 16(4): 489-491.
2. Eslami G, Seyedjavadi SS, Goudarzi H, Fallah F, Goudarzi M. Distribution of Integrons among Multidrug Resistant E. coli and Klebsiella Strains. Pejouhesh 2010; 34(1): 61-65 (Persian).
3. Ahanjan M, Haghshenas MR, Naghshvar F, Bairamvand E. Survey and detect of bacteria caused UTI in patients referring to the Imam Khomeini hospital in Sari city 1388-89. J Mazand Univ Med Sci 2013; 22(Suppl 1): 82-86.
4. Delzell Jr JE, Lefevre ML. Urinary tract infections during pregnancy. Am Fam Physician 2000; 61(3): 713-720.
5. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. Trends in Microbiology 2007; 15(7): 301-309.
6. 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.
7. Leverstein-van Hall MA, M Blok HE, T Donders AR, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. J Infect Dis 2003; 187(2): 251-259.
8. van Belkum A, Goessens W, van der Schee C, Lemmens-den Toom N, Vos MC, Cornelissen J, et al. Rapid emergence of ciprofloxacin-resistant enterobacteriaceae containing multiple gentamicin resistance-associated integrons in a Dutch hospital. Emerg Infect Dis 2001; 7(5): 862-871 .
9. 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(4): 742-245.

10. Japoni S, Japoni A, Farshad S, Ali AA, Jamalidoust M. Association between existence of integrons and multi-drug resistance in Acinetobacter isolated from patients in southern Iran. Pol J Microbiol 2011; 60(2): 163-168.
11. Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Coelho JM, Warner M, Pike R, et al. Detection and typing of integrons in epidemic strains of Acinetobacter baumannii found in the United Kingdom. J Clin Microbiol 2005; 43(7): 3074-3082.
12. Su H-C, Ying G-G, Tao R, Zhang R-Q, Zhao J-L, Liu Y-S. Class 1 and 2 integrons, sul resistance genes and antibiotic resistance in Escherichia coli isolated from Dongjiang River, South China. Environ Pollut 2012; 169: 42-49.
13. Thungapathra M, Sinha KK, Chaudhuri SR, Garg P, Ramamurthy T, Nair GB, et al. Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes aac (6′)-Ib, dfrA5, dfrA12, and ereA2 in class I integrons in non-O1, non-O139 Vibrio cholerae strains in India. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(9): 2948-2955.
14. Dillon B, Thomas L, Mohmand G, Zelynski A, Iredell J. Multiplex PCR for screening of integrons in bacterial lysates. J Microbiol Methods 2005; 62(2): 221-232.
15. Rao AN, Barlow M, Clark LA, Boring JR 3rd, Tenover FC, McGowan JE Jr. Class 1 integrons in resistant Escherichia coli and Klebsiella spp., US hospitals. Emerg Infect Dis 2006; 12(6): 1011-1014.
16. 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.
17. Mahon CR, Manuselis G, Lehman DC. Textbook of diagnostic microbiology 2nd ed. Pennsylvania: W B Saunders; 2000.
18. Wikler MA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement. United State: Wayne, clinical and laboratory standards Instiute, 2006.
19. Koeleman JG, Stoof J, Van Der Bijl MW, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Identification of Epidemic Strains of Acinetobacter baumannii by Integrase Gene PCR. J Clin Microbiol 2001; 39(1): 8-13.
20. Kahlmeter G. Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogens in uncomplicated cystitis in Europe. The ECO. SENS study. Int J Antimicrob Agents 2003; 22(Suppl 2): 49-52.
21. Roy Chowdhury P, Ingold A, Vanegas N, Martínez E, Merlino J, Merkier AK, et al. Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in Klebsiella pneumoniae isolates from four countries: a comparative study. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(7): 3140-3149.
22. Hussein AI, Ahmed AM, Sato M, Shimamoto T. Characterization of integrons and antimicrobial resistance genes in clinical isolates of Gram-negative bacteria from Palestinian hospitals. Microbiol Immunol 2009; 53(11): 595-602.
23. Machado E, Ferreira J, Novais Â, Peixe L, Cantón R, Baquero F, et al. Preservation of integron types among Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). Antimicrob Agents and Chemother 2007; 51(6): 2201-2204.
24. Farshad S, Japoni A, Hosseini M. Low distribution of integrons among multidrug

resistant E. coli strains isolated from children with community-acquired urinary tract infections in Shiraz. Iran. Pol J Microbiol 2008; 57(3): 193-198.

25. Falakian Z, Nikookar I, Nafisi M, Karimi A, Validi M. Frequency of Class 1 Integrons among Escherichia coli Isolates of Patients with Urinary Tract Infection. Iran J Clin Infect Dis 2011; 6(4): 157-160 (Persian).
26. Bhattacharjee A, Sen MR, Prakash P, Gaur A, Anupurba S, Nath G. Observation on integron carriage among clinical isolates of Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum beta-lactamases. Indian J Med Microbiol 2010; 28(3): 207-210.
27. Valverde A, Cantón R, Galán JC, Nordmann P, Baquero F, Coque TM. In117, an unusual In0-like class 1 integron containing CR1 and blaCTX-M-2 and associated with a Tn21-like element. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(2): 799-802.
28. Novais Â, Cantón R, Valverde A, Machado E, Galán JC, Peixe L, et al. Dissemination and persistence of blaCTX-M-9 are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(8): 2741-2750.
29. Correia M, Boavida F, Grosso F, Salgado MJ, Lito LM, Cristino JM, et al. Molecular characterization of a new class 3 integron in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(9): 2838-2843.
30. Corkill JE, Anson JJ, Hart CA. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from blood cultures in Liverpool, UK. J Antimicrob Chemother 2005; 56(6): 1115-1117.
31. Jones LA, McIver CJ, Kim MJ, Rawlinson WD, White PA. The aadB gene cassette is associated with blaSHV genes in Klebsiella species producing extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(2): 794-797.
32. Molana Z, Ferdosi Shahandahti E, Gharavi S, Shafii M, Norkhomami S, Ahangarkani F, et al. Molecular investigation of class i integron in klebsiella pneumoniae isolated from intensive care unit (shahid beheshti hospital of babol; 2010). JBUMS 2011; 13(6): 1-12.
33. 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.
34. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2009; 22(1): 161-182.