مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۳، شماره‌ی ۹۹، مهر و آبان ۱۳۹۴، صفحات ۷۴ تا ۸۲

آنالیز اینتگرون‌ها و کاست‌های ژنی مربوطه در ایزوله‌های بالینی *اشریشیاکلی*

ندا معصومیان[۱]، دکتر فخری حقی[۲]

نویسنده‌ی مسول: زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده‌ی پزشکی، گروه میکروب شناسی haghi@zums.ac.ir

دریافت: ۹۳/۱۰/۲۰ پذیرش:۹۴/۲/۷

چکیده

زمینه و هدف: *انتقال افـقی اینتـگـرون‌ها موفق‌ترین راه انتشـار ژن‌های مـقاومـت ضد میکروبی و پیـدایش گونـه‌هـایی بـا مقاومـت چندگانـه می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ و کاست‌های ژنی مربوطه و تعیـین الگـوی مقاومـت آنتـی‌بیـوتیکی در ایزوله‌های بالینی اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های ادراری و اسهالی می‌باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه‌ی توصیفی مقطعی، ۲۰۰ ایزوله‌ی اشریشیاکلی از نمونه‌های بالینی ادرار و مدفوع جمـع‌آوری گردیـد. پـس از تاییـد ایزوله‌ها توسط آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها با روش دیسک دیفیـوژن طبـق توصـیه CLSI نـسبت بـه ۱۳ آنتی‌بیوتیک انجام شد. فراوانی اینتگرون‌های کلاس ۱و۲ و کاست‌های ژنی مربوطه با روش PCR تعیین گردید.*

یافته‌ها: *بیشترین میزان مقاومت در برابر اریترومایسین (۹۶/۵ درصد) مشاهده شد و ۹۸/۵ درصد سویه‌ها به ایمی‌پنم حساس بودند. از ۲۰۰ ایزوله مورد بررسی، اینتگرون کلاس ۱ در ۱۸۱ ایزوله (۹۰/۵ درصد) شناسـایی شـد و ۷۸/۵ درصـد از سـویه‌هـای حامـل اینتگـرون کـلاس ۱، مولـد کاست‌های ژنی بودند. همچنین اینتگرون کلاس ۲ در ۱۵ ایزوله (۷/۵ درصد) شناسایی شد که تنها ۲ درصد از سویه‌هـا مولـد کاسـت‌هـای ژنـی بودند. فراوانترین کاست های ژنی شناسایی شده، dfrA (کد کننده دی هیدروفولات ردوکتاز) و aad (آمینوگلیکوزید آدنیل ترانسفراز) بودند.*

نتیجه‌گیری: *نتایج این مطالعه، بیانگر انتشار اینتگرون‌های کلاس ۱ در بین ایزوله‌های اشریشیاکلی می‌باشد. بنابراین، شناسـایی ایزولـه‌هـای مولـد اینتگرون و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها در جهت اجرای برنامه‌های کنترل عفونت و ممانعت از انتشار سـویه‌هـای مقـاوم از اهمیـت بالایی برخوردار است.*

واژگان کلیدی: ***اشریشیاکلی، اینتگرون، کاست ژنی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی***

مقدمه

اشریشیاکلی باکتری فرصت‌طلب خانواده انتروباکتریاسـه مـی‌باشـد (۱). *اشریـشیاکلی*هـای روده‌ای در بـسیاری از فاکتورهای بیمـاری‌زا تـشابه دارنـد و هرکـدام دارای الگـوی خاصی جهت ایجاد بیماری هـستند. *اشریـشیاکلی*هـای مولـد اسـهال (DEC) یکـی از عوامـل اصـلی اسـهال باکتریـایی در سراسر جهان می‌باشـند. در بـین سـویه‌هـای *اشریـشیاکلی* بیماری‌زای خارج روده‌ای (ExPEC)، سویه‌های *اشریشیاکلـی* اوروپاتوژن (UPEC) شایع‌ترین سویه‌های بیماری‌زا در انـسان می‌باشند؛ به‌طوری‌که ۷۵ تا ۹۰ درصد از مـوارد عفونـت‌هـای مجـاری ادراری اکتـسابی از جامعـه و بخـش عمـده‌ای

۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
۲-دکترای تخصصی باکتری شناسی، استادیار گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

از عفونت‌های ادراری بیمارستانی(۵۰ درصد) را ایجاد می‌کنند (۲). استفاده‌ی بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی و انتشار ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از طریق انتقال افقی موجب بروز مقاومت‌های دارویی گسترده شده است (۳). یکی از مکانیسم‌های انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی انتقال توسط عناصری به نام اینتگرون می‌باشد (۴). اینتگرون‌ها عناصر ژنتیکی متحرکی هستند که می‌توانند در پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها جای گیرند و ژن‌های مقاومتی را به شکل کاست‌های ژنی جابه جا نمایند (۴). انتقال افقی اینتگرون‌ها به‌عنوان موفق‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاومت و پیدایش گونه‌هایی با مقاومت چندگانه مطرح می‌باشد (۴). اینتگرون‌ها به دو گروه اصلی شامل اینتگرون‌های مقاومتی و سوپر اینتگرون‌ها تقسیم می‌شوند. اینتگرون‌های مقاومتی، کاست‌های ژنی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و دزانفکتان‌ها را حمل می‌کنند و معمولا بر روی پلاسمید قرار دارند، در حالی‌که سوپر اینتگرون‌ها بر روی کروموزوم قرار داشته و کاست‌های ژنی با عملکردهای متفاوت را حمل می‌کنند (۵). تاکنون ۵ کلاس از اینتگرون‌های مقاومتی بر اساس تفاوت‌های موجود در ژن اینتگراز در ایزوله‌های باکتری‌های گرم منفی شناسایی شده است، اما تنها ۴ کلاس اصلی در ارتباط با ایزوله‌های کلینیکی مطرح است که شامل اینتگرون‌های کلاس ۱، کلاس ۲ و کلاس ۳ می‌باشد (۶). مطالعات زیادی در ارتباط با تعیین فراوانی اینتگرون‌ها در ایزوله‌های بالینی *اشریشیاکلی* در سراسر جهان انجام شده است؛ ولی گزارشات بسیار محدودی در مورد توزیع و مقایسه اینتگرون‌ها و کاست‌های ژنی بین ایزوله‌های ادراری و اسهالی *اشریشیاکلی* در دسترس می‌باشد. بنابراین هدف از مطالعه حاضر، بررسی فراوانی اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ و کاست‌های ژنی مربوطه و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های ادراری و اسهالی می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی توصیفی- مقطعی، ۱۰۰ ایزوله‌ی *اشریشیاکلی* ادراری، جدا شده از نمونه‌های ادرار بیماران دچار عفونت ادراری و ۱۰۰ ایزوله‌ی مدفوعی جدا شده از نمونه‌های مدفوع بیماران دچار اسهال مراجعه کننده‌ی به آزمایشگاه بیمارستان‌های ولیعصر، آیت ا... موسوی و بهشتی شهر زنجان از شهریور ماه سال۹۲ تا خرداد ماه سال ۹۳ مورد بررسی قرار گرفتند. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، باکتری‌های ایزوله شده با تست‌های افتراقی شامل کشت در محیط TSI، SIM، واکنش در محیط VP و MR و عدم رشد در محیط سیمون سیترات مورد تایید قرار گرفتند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیاکلی*های ایزوله شده با روش کاربی- بایر (دیسک دیفیوژن) (۷) و بر اساس دستورالعمل کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه بالینی (CLSI) در برابر ۱۳ آنتی‌بیوتیک (شرکت MAST انگلستان) سفتازیدیم ۳۰ میکروگرم (CAZ)، سفپیم ۱۰ میکروگرم (CPM)، آزترئونام ۳۰ میکروگرم (ATM)، تتراسایکلین ۳۰ میکروگرم (TE)، کوتریموکسازول ۲۵ میکروگرم (SXT)، کوآموکسی کلاو ۳۰ میکروگرم (AM)، ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم (IMP)، آمیکاسین ۳۰ میکروگرم (AN)، سفوتاکسیم ۳۰ میکروگرم (CTX)، آموکسی‌سیلین ۲۵میکروگرم (AM)، اریترومایسین ۱۵ میکروگرم (ERY)، سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم (FOX) و سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم (CP) انجام شد. از سویه‌ی استاندارد *اشریشیا کلی* ATTC25922 جهت کنترل کیفی آنتی‌بیوگرام استفاده شد. پس از انجام دیسک دیفیوژن، قطر هاله‌ی عدم رشد در اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن با توجه به استانداردهای CLSI به صورت حساس، حدواسط و مقاوم گزارش گردید. ایزوله‌هایی که به بیش از سه آنتی‌بیوتیک از خانواده‌های مختلف مقاوم بودند، به عنوان ایزوله‌هایی با مقاومت چندگانه (Multidrug Resistance) در نظر گرفته شدند.

استخراج DNA با روش Boiling انجام شد (۸). شناسایی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ (*intI1*) و ۲ (*intI2*) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول ۱ و با روش PCR صورت گرفت (۹). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (Fermentas)، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر پرایمر ۱۰ پیکومول از هر کدام و ۵ میکرولیتر DNA الگو در طی ۳۰ سیکل انجام شد. برنامه‌ریزی دستگاه ترموسایکلر برای *شناسایی ژن‌های intI1 و intI2* به قرار زیر انجام شد: پس از ۵ دقیقه دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، واکنش PCR در ۳۰ سیکل شامل مرحله‌ی دناتوراسیون یک دقیقه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، مرحله‌ی اتصال یک دقیقه در ۵۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای *intI1* و ۵۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای *intI2*، مرحله‌ی تکثیر یک دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و در نهایت مرحله‌ی تکثیر نهایی به‌صورت تک مرحله در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت۱۰ دقیقه انجام شد. پس از انجام هر واکنش PCR، ژل آگارز ۱ درصد جهت الکتروفورز محصولات PCR مورد استفاده قرار گرفت. پس از شناسایی اینتگرون‌ها در ایزوله‌های حامل *intI1* و *intI2*، کاست‌های ژنی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول ۱ مورد بررسی قرار گرفتند (۱۰). جهت تعیین نوع کاست‌های ژنی، محصولات PCR با استفاده از کیت استخراج از ژل (شرکت فرمنتاز)، خالص‌سازی و توسط شرکت ژن فناوران تعیین توالی شدند. در نهایت توالی‌های به‌دست آمده، بلاست و آنالیز شدند. سویه‌ی کنترل مثبت به کار رفته در مطالعه‌ی حاضر، سویه‌ی بالینی حامل ژن‌های *intI1* و *intI2* تهیه شده از گروه باکتری‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس بود که قبلا تعیین توالی و تایید شده بود. داده‌ها توسط نرم‌افزار SSPS version 17.0 و آزمون chi-square آنالیز شدند. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظرگرفته شد.

یافته‌ها

از ۲۰۰ ایزوله‌ی *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های بالینی ادراری و اسهالی، ۷۵/۵ درصد مربوط به جنس مونث و ۲۴/۵ درصد مربوط به جنس مذکر بودند. تمامی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* با تست‌های بیوشیمیایی استاندارد به شرح ذیل مورد تایید قرار گرفتند: واکنش اکسیداز منفی بود. در محیط TSI، تخمیر گلوکز، لاکتوز و تولید گاز مشاهده شد. در محیط SIM، حرکت و اندول مثبت بود و گاز سولفید هیدروژن تولید نشد. در محیط MR و VP براث، واکنش MR مثبت و واکنش VP منفی بود. واکنش در محیط سیمون سیترات منفی بود. تست اوره آز منفی بود. واکنش در محیط LIA نیز مثبت بود. در بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها، بیشترین درصد مقاومت مربوط به اریترومایسین با ۹۶/۵ درصد و کمترین درصد مقاومت مربوط به ایمی‌پنم با ۱/۵ درصد بود. میزان مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها به شرح ذیل بود: آموکسی‌سیلین در ۱۵۳ ایزوله (۷۶/۵ درصد)، سفوکسیتین در ۳۹ ایزوله (۱۹/۵ درصد)، سفتازیدیم در ۹۱ ایزوله (۴۵/۵ درصد)، سفوتاکسیم در ۶۹ ایزوله (۳۴/۵ درصد)، کوآموکسی کلاو در ۱۰۱ ایزوله (۵۰/۵ درصد)، آزترئونام در ۱۲۴ ایزوله (۶۲ درصد)، جنتامایسین در ۷۱ ایزوله (۳۵/۵ درصد)، تتراسایکلین در ۱۱۷ ایزوله (۵۸/۵ درصد)، کوتریموکسازول در ۷۵ ایزوله (۳۷/۵ درصد)، آمیکاسین در ۳۶ ایزوله (۱۸ درصد) و سیپروفلوکساسین در ۶۳ ایزوله (۳۱/۵ درصد). از ۲۰۰ ایزوله *اشریشیاکلی*، ۶۴ درصد ایزوله‌ها نسبت به سه یا تعداد بیشتری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند و به‌عنوان ایزوله‌هایی با مقاومت دارویی چندگانه (Multidrug Resistance) در نظر گرفته شدند.

فراوانی اینتگرون‌های کلاس یک و دو در ۲۰۰ ایزوله *اشریشیاکلی* مورد بررسی، به ترتیب ۱۸۱ ایزوله (۹۰/۵ درصد) و ۱۵ ایزوله (۷/۵ درصد) بود. مقایسه اینتگرون‌ها در بین ایزوله‌های ادراری و اسهالی نشان داد که

ایزوله‌های اسهالی، اینتگرون‌ها را با فراوانی بیشتری (۹۴ درصد حامل *intI1* و ۸ درصد حامل *intI2*) در مقایسه با ایزوله‌های ادراری (۸۷ درصد حامل *intI1* و ۷ درصد حامل *intI2*) حمل می‌کنند (P<۰/۰۵). در بین ایزوله‌هایی با مقاومت دارویی چندگانه، تنها ۷/۵ درصد از ایزوله‌ها فاقد ژن *intI1* بودند و بقیه سویه‌ها حامل *intI1* بودند. جهت شناسایی کاست‌های ژنی، بر روی تمامی ایزوله‌های بالینی مولد اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲، PCR با شرایط استاندارد انجام شد. از ۱۸۱ ایزوله‌ی *اشریشیاکلی* مولد اینتگرون کلاس ۱، ۱۵۷ ایزوله حامل کاست‌های ژنی بودند. از ۱۵۷ سویه *اشریشیاکلی* حامل کاست، ۸۴ ایزوله مربوط به نمونه‌های ادرار و ۷۳ ایزوله مربوط به نمونه‌های مدفوع بودند. از ۱۵ ایزوله *اشریشیاکلی* مولد اینتگرون کلاس ۲، ۴ ایزوله حامل کاست ژنی بودند. از ۴ ایزوله *اشریشیاکلی* حامل کاست، ۲ ایزوله مربوط به نمونه‌های ادرار و ۲ ایزوله مربوط به نمونه‌های مدفوع بودند (جدول ۲).

جدول ۱: توالی پرایمرهای به کار رفته جهت تکثیر اینتگرون‌ها و کاست‌های ژنی

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی	اندازه محصول	رفرنس
intI1-F *intI1*-R	5'-CAGTGGACATAAGCCTGTTC-3' 5'-CCCGAGGCATAGACTGTA-3'	160 bp	9
intI2-F *intI2-R*	5'-CACGGATATGCGACAAAAAGGT-3' 5'-GATGACAACGAGTGACGAAATG-3'	787 bp	9
5'-CS-F (class I)	5'-GGCATCCAAGCAGCAAGC-3'	Variable	10
3'-CS-R (class I)	5'-AAGCAGACTTGACCTGAT-3'		
hep-F (class II)	5'-CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGT-3'	Variable	10
hep-R (class II)	5'-GATGCCATCGCAAGTACGAG-3'		

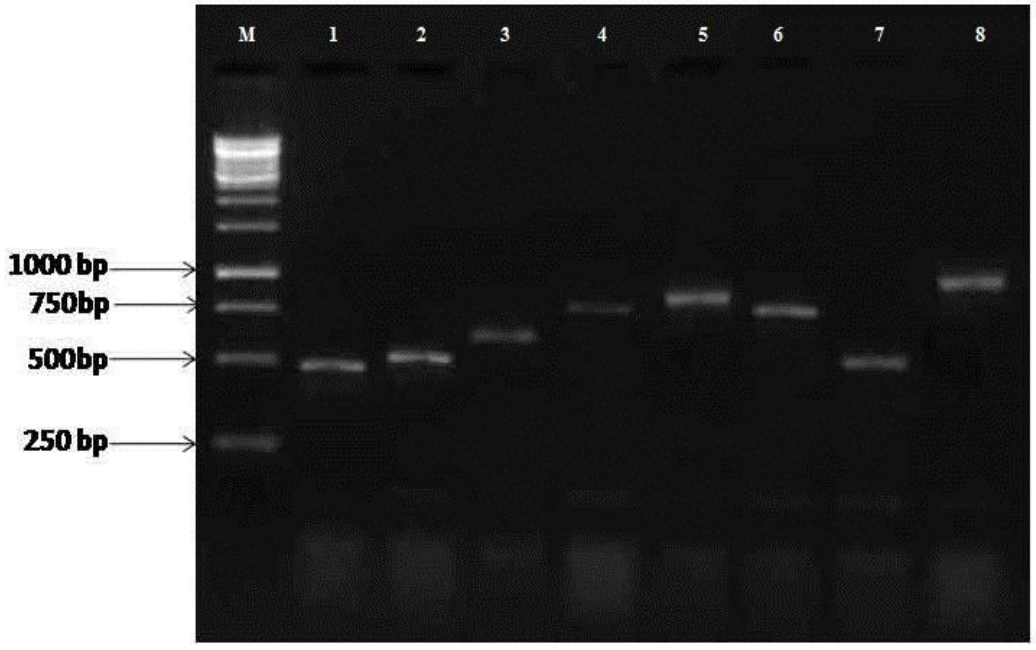
جدول ۲: توالی کاست‌های ژنی در ایزوله‌های ادراری و اسهالی

اندازه کاست ژنی(bp)	کاست‌های ژنی	تعداد ایزوله‌های حامل کاست‌های اینتگرون کلاس ۱		تعداد ایزوله‌های حامل کاست‌های اینتگرون کلاس ۲		جمع
		*UPEC	**DEC	UPEC	DEC	
٤٥٠	***dfrA1	٢٩	٢٨	-	-	٥٧
٥٠٠	*dfrA17*	١٥	٦	-	-	٢١
٦٠٠	*dfr2d*	٢٥	٣	-	-	٢٨
٧٠٠	****aadB*	٢	٢	-	-	٤
٧٥٠	*dfrA7*	٠	١٨	-	-	١٨
١٠٠٠	*aadA1*	٠	٤	-	-	٤
١٣٠٠	*dfrA1-sat2*	٠	١	-	-	١
١٥٠٠	*dfrA1-aadA1*	٧	٧	٢	-	١٦
١٨٠٠	*dfrA12-orfF-aadA2*	٦	١	-	-	٧
٢٠٠٠	*dfrA1-sat-aadA1-orfX*	٠	٣	-	٢	٥

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)* Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) **

Dihydropholate redoctase (*dfrA*)*** Aminoglycoside Adenyltransferase (*aadB*)****

نتایج تعیین توالی و بلاست محصولات PCR، ۱۰ نوع کاست ژنی با اندازه‌های متفاوت در ارتباط با اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ نوع کاست ژنی در ارتباط با اینتگرون‌های کلاس ۲ نشان داد (شکل ۱، جدول ۲). در اینتگرون‌های کلاس ۱، کاست‌های ژنی با اندازه‌های زیر شناسایی شدند: ۵۷ ایزوله حاوی کاست با اندازه bp ۴۵۰، ۲۱ ایزوله حامل کاست با اندازه bp۵۰۰، ۲۸ ایزوله حامل کاست با اندازه bp ۶۰۰، ۴ ایزوله حاوی کاست با اندازه bp ۷۰۰، ۱۸ ایزوله حامل کاست با اندازه bp ۷۵۰، ۴ ایزوله حامل کاست با اندازه bp ۱۰۰۰، ۱ ایزوله حامل کاست با اندازه bp ۱۳۰۰، ۱۴ ایزوله حامل کاست با اندازه bp ۱۵۰۰، ۷ ایزوله حاوی کاست با اندازه bp ۱۸۰۰ و ۳ ایزوله حامل کاست با اندازه bp ۲۰۰۰. در اینتگرون‌های کلاس ۲، ۲ ایزوله حامل کاست با اندازه bp۱۵۰۰ و ۲ ایزوله حامل کاست با اندازه bp ۲۰۰۰ بودند. نتایج توالی یابی و آنالیز کاست‌های ژنی با توالی‌های موجود در Genebank در جدول ۲ ذکر شده است. بیشترین و کمترین فراوانی کاست‌های ژنی به‌ترتیب مربوط به کاست‌های *dfrA1* کد کننده دی هیدروفولات ردوکتاز (۳۱/۴۹ درصد) و *dfrA1-sat2* کد کننده دی هیدروفولات ردوکتاز-استرپتوسریسین استیل ترانسفراز (۰/۵ درصد) بود.



شکل ۱: الکتروفورز ژل آگارز ۱% برای شناسایی کاست‌های ژنی اینتگرون‌های کلاس I. چاهک M: سایز مارکر (250 bp)، چاهک‌های ۱-۸: محصولات PCR تخلیص شده کاست‌های ژنی با اندازه‌های متفاوت.

بحث

مقاومت آنتی‌بیوتیکی و انتشار ژن‌های مقاومت در بین ایزوله‌های بالینی یکی از مشکلات بهداشتی درمانی در سطح جوامع به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (۱۱). در مطالعه‌ی حاضر که بر روی ۲۰۰ ایزوله بالینی *اشریشیاکلی* صورت گرفت، ۹۶/۵ درصد از ایزوله‌ها به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند و ۶۴ درصد ایزوله‌ها مقاومت چند دارویی داشتند. بیشترین میزان مقاومت نسبت به

اریترومایسین و کمترین مقاومت نسبت به ایمی‌پنم مشاهده شد. در مطالعه‌ی احسان غزنوی راد و همکارانش در سال ۱۳۹۲ نیز، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به اریترومایسین گزارش شد (۱۲). همچنین در نتایج الشارخ و همکاران در سال ۲۰۱۱ در عراق، مقاومت بالایی نسبت به آموکسی‌سیلین، اریترومایسین و تتراسیکلین به ترتیب با ۱۰۰، ۵۶/۲ و ۶۳/۱ درصد مشاهده شد (۱۳). در مطالعه‌ی سیدجوادی و همکارانش در سال ۱۳۸۹، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آمپی‌سیلین، کوتریموکسازول و تتراسایکلین گزارش شد (۱۴). همچنین در مطالعه‌ی ریجاوک در سال ۲۰۰۶ کمترین مقاومت نسبت به ایمی‌پنم گزارش شد (۱۲و ۱۵). در سال ۲۰۱۲ مطالعه‌ای توسط آقازاده و همکارانش انجام شد که از ۱۵۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه*، ۱۴۹(۹۹/۳ درصد) ایزوله مقاومت دارویی چند گانه (MDR) داشتند (۱۶). چنین مقاومت‌های دارویی مشکلات پیچیده‌ای را برای درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط *اشریشیاکلی* ایجاد می‌کند. در مطالعه‌ی حاضر، فراوانی اینتگرون‌های کلاس یک و دو در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* به‌ترتیب ۹۰/۵ و ۷/۵ درصد بود. در مطالعه‌ی ابراهیم و همکاران در سال ۲۰۱۱، شیوع اینتگرون‌های کلاس ۱، ۵۷/۳ درصد و کلاس ۲، ۳/۸ درصد گزارش شد (۱۷). در مطالعه‌ی یان و همکاران در سال ۲۰۱۰، فراوانی اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ به‌ترتیب ۷۶/۳ و ۰/۸ درصد گزارش گردید (۱۸). در بررسی که در کشور هند در سال ۲۰۰۸ توسط بهاتاجارچی و همکاران انجام شد، از ۱۳۶ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه*، به‌ترتیب ۵۲ ایزوله (۸۲ درصد) و ۶ ایزوله (۹ درصد) دارای اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ بودند (۱۹). در مطالعه‌ی اپیدمیولوژیکی که در سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ توسط برولوند و همکاران در سوئد انجام شد، فراوانی اینتگرون کلاس ۱ و ۲ در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* به‌ترتیب ۲۷۳ ایزوله (۸۵ درصد) و ۳۱ ایزوله (۵۷ درصد) گزارش شد (۲۰). در مطالعات انجام شده در سرتاسر جهان فراوانی اینتگرون کلاس ۲ بسیار کمتر از اینتگرون کلاس ۱ می‌باشد؛ در مطالعه‌ی حاضر نیز اینتگرون‌های کلاس ۲ فراوانی کمتری (۷/۵ درصد) نسبت به کلاس ۱ داشتند. از ۱۸۱ ایزوله *اشریشیاکلی* مولد اینتگرون کلاس ۱ و از ۱۵ ایزوله‌ی *اشریشیاکلی* مولد اینتگرون کلاس ۲، به‌ترتیب ۱۵۷ و ۴ ایزوله حامل کاست‌های ژنی بودند. فراوانترین کاست ژنی در اینتگرون کلاس ۱ کاست ژنی *dfrA1* (۳۱/۴۹ درصد) و در اینتگرون کلاس ۲ کاست‌های ترکیبی *dfrA1-aadA1* (۱۳/۳ درصد) و *dfrA1-sat-aadA1-orfX* (۱۳/۳ درصد) بودند. در مطالعه‌ی یان و همکاران در سال ۲۰۱۰، ۷ کاست ژنی متفاوت در اینتگرون‌های کلاس ۱ شناسایی شد. فراوانترین کاست ژنی در اینتگرون کلاس ۱، *dfrA12-orfF-aadA2* کد کننده مقاومت به تری‌متوپریم و آمینوگلیکوزیدها بود. تمام اینتگرون‌های کلاس ۲ حامل کاست ژنی *dfrA1-sat2-aada1* کد کننده‌ی مقاومت به تری‌متوپریم، استرپتوتریسین و آمینوگلیکوزیدها بودند که با نتایج مطالعه‌ی ما همسو بود (۱۸). به‌طور کلی در مطالعه‌ی حاضر، فراوانی اینتگرون کلاس یک در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری و عفونت روده‌ای در بیمارستان‌های شهر زنجان بسیار بالا بوده و همین عامل در به‌وجود آوردن سویه‌هایی با مقاومت چند دارویی نقش بسیار مهمی دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داد ایمی‌پنم می‌تواند به‌عنوان موثرترین آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های ناشی از *اشریشیاکلی* به‌کار رود؛ به‌طوری‌که تنها ۱/۵ درصد از ایزوله‌های اسهالی مولد اینتگرون، مقاوم به ایمی‌پنم بودند و هیچ کدام از ایزوله‌های ادراری مولد اینتگرون مقاوم به ایمی‌پنم نبودند. همچنین، نتایج بیانگر انتشار اینتگرون‌های کلاس ۱ در بین ایزوله‌های *اشریشیاکلی* می‌باشد. بنابراین،

شناسایی ایزوله‌های مولد اینتگرون و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها در جهت اجرای برنامه‌های کنترل عفونت و ممانعت از انتشار سویه‌های مقاوم از اهمیت بالایی برخوردار است.

References

1- Goossensa H, Grabeind B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum β- lactamas and AmpC- producing Enterobacteriaceaefrom the MYSTIC program in Europe and United States (1997- 2004). *Diag Microbiol Infect Dis*. 2005; 53: 257-64.

2- Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economic costs. *Dis Mon*. 2003; 49: 53-70.

3- Turner PJ. Extended-spectrum β-lactamases. *Clin Infect Dis*. 2005; 41: 273-5.

4- Gillings MR. Integrons: past, present and future. *Microbio Mol Biol Rev*. 2014; 78: 257-77.

5- Collis CM, Hall RM. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol*. 1992; 174: 1574-85.

6- Ravi A, Avershina E, Ludvigsen J, L'Abe e-Lund TM, Rudi K. Integrons in the intestinal microbiota as reservoirs for transmission of antibiotic resistance genes. *Pathogens*. 2014; 3: 238-48.

7- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23th informational supplement (M100-S23) Vol. 31 No. 1. CLSI, Wayne, PA.

8- Mndelson G, Hait V, Ben-Israel J, Gronich D, Granot E, Raz R. Prevalence and risk factors of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in an Israeli long-term care facility. *Eur J Clin Microbial infect Di*s. 2005; 24: 17-22.

9- Chen B, Zheng W, Yu Y, et al. Class 1 integrons, selected virulence genes, and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from the Minjiang river, Fujian province, China. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77: 148-55.

10- Eftekhar F, Rastegar M, Golalipoor M, Mansour N. Detection of extended spectrum β-lactamases in urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae* in relation to bla_{SHV}, bla_{TEM} and bla_{CTX-M} gene carriage. *Iran J Public Health*. 2012; 41: 127-132.

11- David L, Bonomo P, Bonomo R. Extended spectrum lactamases: a Clinical Update. *Clinic Microb Rev*. 2005; 18: 657-686.

12- GhaznaviRad E, Ranjbaran M, et al. Molecular investigation of integrons in *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* isolated from urinary tract Infections. *J Mazand Univ Med Sci*. 2013; 23: 20-7.

13- Al-Charrakh H, Yousif Y, Al-Janabi S. Occurrence and detection of extended-spectrum β-lactamases in Klebsiella isolates in Hilla, Iraq. *Afr J Biotechnol*. 2011; 10: 657-65.

14- Eslami G, Seyedjavadi S, Goudarzi H, Fallah F, Goudarzi M. Distribution of integrons among multidrug resistant *E. coli* and Klebsiella strains. *Pejouhesh*. 2010; 34: 61-5.

15- Rijavec M, Starcic EM, Ambrozic AJ, et al. Prevalence of multidrug resistance and ran dom distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. *Curr Microbiol*. 2006; 53: 158-62.

16- Rezaee MA, Langarizadeh N, Aghazadeh M. First report of class 1 and class 2 integrons in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from northwest Iran. *Jpn J Infect Dis*. 2012; 65: 256-9.

17- Ibrahim N, Wajidi MF, Yusof MY. The integron prevalence of extended spectrum beta lactamase producing enterobacterial isolates in a Malaysian teaching hospital. *J Trop Med*. 2011; 28: 668-71.

18- Yan H, Li L, Zong M. Occurrenece and characteristic of class I and class II integrons in clinical bacterial isolates from patientsin south China. *J Health Sci*. 2010; 54: 442-50.

19- Bhattacharjee A, Sen M, Prakash P, Gaur A, Anupurba S, Nath G. Observation on integron carriage among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β-lactamases. *Indian J Med Microbiol*. 2010; 28: 207-10.

20- Brolund A, Sundqvist M, Kahlmeter G, Grape M. Molecular characterisation of trimethoprim resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a two year intervention on trimethoprim use. *PLoS One*. 2010; 5: e9233.

Analysis of Integrons and Associated Gene Cassettes in Clinical Isolates of *Escherichia coli*

Masoumian N[1], Haghi F[2]

[1]Dept. of Microbiology, Zanjan Islamic Azad University, Zanjan, Iran

[2]Dept. of Microbiology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding Author: Haghi F, Dept. of Microbiology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

E-mail: haghi@zums.ac.ir

Received: 10 Jan 2015 **Accepted:** 27 Apr 2015

Background and Objective: Horizontal transfer of integrons is the most successful transfer of antimicrobial resistance genes and the emergence of multi-drug resistance strains. The aim of the present study was to investigate the prevalence of class I and II integrons and their gene cassette assortments and antibiotic resistance profile in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal and urine specimens.

Materials and Methods: In this cross-sectional study 200 *E. coli* isolates were collected from the clinical urine and stool specimens. After identification of isolates by biochemical tests, the antibiotic susceptibility test (disk diffusion method) was done according to CLSI advice against 13 antibiotics. DNA extraction was performed and class 1 and 2 integrons and associated gene cassettes were determined using PCR method.

Results: The highest resistance was found against erythromycin (96.5%) and %98.5 of isolates were susceptible to imipenem. Out of 200 isolates, class 1 integron was detected in 181 (90.5%) isolates and 78.5% of these isolates were positive for the gene cassettes. Also, class 2 integron was detected in 15 (7.5%) isolates and 2% of them were positive for the gene cassettes. Dihydrofolate reductase (*dfrA*) and aminoglycoside adenyl transferase (*aad*) gene cassettes were found most frequently in *intI1* positive isolates.

Conclusion: These results indicate that class 1 integrons are widespread among *E. coli* isolates. Therefore, appropriate surveillance and control measures are essential to prevent further spread of integron producing isolates.

Keywords: Escherichia coli, Integron, Gene cassette, Antibiotic resistance