پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۴، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹، صفحات ۶۱ تا ۶۵

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی شیوع اینتگرون در اشرشیا کلی و کلبسیلا در کودکان مبتلا به عفونت دستگاه ادراری مقاوم به چند دارو

دکتر گیتا اسلامی، سیماالسادات سیدجوادی*، دکتر حسین گودرزی، دکتر فاطمه فلاح، مهدی گودرزی

گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در میکروارگانیسم‌ها در حال گسترش است. هدف از این مطالعه، تعیین شیوع اینتگرون در E.coli و klebsiella مقاوم به چند داروی جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری مراجعه کننده به بیمارستان های دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در سال ۱۳۸۸ با استفاده از روش PCR-RFLP بود.*

روش بررسی: *تحقیق به روش توصیفی انجام گرفت. تعداد ۲۰۰ نمونه باکتری از کودکان بستری جدا گردید. حساسیت این باکتری‌ها نسبت به ۱۳ آنتی‌بیوتیک رایج در درمان عفونت‌های دستگاه ادراری سنجیده شد. مقاومت چندگانه دارویی و ارتباط آن با وجود ژن اینتگرون با استفاده از PCR بررسی شد و با آزمون دقیق فیشر مورد قضاوت آماری قرار گرفت.*

یافته‌ها: *از ۲۰۰ نمونه بالینی جدا شده، ۱۷۱ نمونه مقاومت دارویی چندگانه داشتند. وجود ژن اینتگرون در ۲۰/۵ درصد کل باکتری‌ها به دست آمد. ارتباط اینتگرون و مقاومت چندگانه دارویی با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین ($p<0/002$)، سفالوتین ($p<0/005$)، نالیدیکسیک اسید ($p<0/004$)، نورفلوکساسین ($p<0/001$) از نظر آماری معنی‌دار بود.*

نتیجه‌گیری: *مقاومت چندگانه دارویی با ۴، ۵، ۶ آنتی‌بیوتیک این هشدار را می‌دهد که باید سیاست استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری تغییر یابد. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب باعث جلوگیری از انتقال ژن‌های مقاومت به وسیله اینتگرون‌ها خواهد گردید. ایمی‌پنم و آمیکاسین موثرترین دارو بر علیه ایزوله‌ها بود.*

واژگان کلیدی: *اشرشیاکلی، کلبسیلا، حساسیت آنتی‌بیوتیکی، اینتگرون، عفونت دستگاه ادراری.*

مقدمه

عفونت دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در کودکان است که نیاز به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی دارد (۱). بیشترین عامل عفونت دستگاه ادراری، اشرشیا کلی و به مراتب کمتر کلبسیلا می‌باشد. افزایش مقاومت دارویی در عوامل ایجاد کننده عفونت‌های دستگاه ادراری معضل بزرگی است و علت اصلی پیدایش مقاومت، مصرف نامناسب و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (۲). به عنوان مثال، دو آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول و تری‌متوپریم که هر دو جزء داروهای ضد فولات می‌باشند، روزی به عنوان داروی خط اول عفونت‌های دستگاه ادراری بودند ولی امروزه به دلیل مقاومت، کاربرد زیادی ندارند (۳). مطالعات نشان می‌دهد صرف نظر از الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند در بین جمعیت‌های باکتریایی منتقل شوند (۴). ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی معمولا در عناصر ژنتیکی به نام اینتگرون‌ها وجود دارند (۶-۴). اینتگرون‌ها به عنوان مکانیزم جدید انتشار ژن‌های مقاومت بین باکتری‌ها مطرح شده‌اند (۷، ۸). انتقال افقی اینتگرون‌ها موفق‌ترین راه انتشار ژن‌های

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه میکروب شناسی ، سیما السادات سیدجوادی (**e-mail:** sima_seyedjavadi@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۹/۲۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۱۱/٤

مقاومت و پیدایش گونه‌هایی با مقاومت چندگانه (MDR= multi-drug resistant) است. اینتگرون‌های کد کننده مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها را می‌توان به چهار کلاس تقسیم کرد که هر کلاس واجد اینتگراز خاص خود است (۶، ۹، ۱۰). .بیشتر اینتگرون‌های شناخته شده به کلاس ۱ تعلق دارند و حاوی ژن sull می‌باشند. کلاس ۲ اینتگرون‌ها در ترانسپوزون‌های Tn-7 قرار دارند و کلاس ۳ اینتگرون واجد ژن‌های Metallo-beta-lactamase است (۱۱). به طور کلی، براساس تفاوت‌های موجود در ژن اینتگراز، اینتگرون‌ها را به کلاس‌های مختلف تقسیم می‌نمایند. چهار کلاس متمایز اینتگرون‌های مسئول مقاومت چندگانه، هرکدام واجد کد ژنتیکی یک اینتگراز ویژه هستند. ژن‌های اینتگراز فوق شامل IntI 1، IntI 2، IntI 3 و IntI 4 هستند. غالب گونه‌های جدا شده از بیماران و محیط بیمارستان با ویژگی مقاومت چندگانه (MDR)، متعلق به کلاس۱ هستند که بر روی پلاسمید و یا ترانسپوزون قرار دارند (۱۴-۱۲). در بین انتروباکتریاسه‌ها شیوع اینتگرون متغیر می‌باشد و تا ۵۹٪ گزارش شده است (۱۸-۱۵). هدف از این مطالعه، تعیین شیوع اینتگرون در اشرشیا کلی و کلبسیلای مقاوم به چند داروی جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری مراجعه کننده به بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و ارتباط آن با مقاومت دارویی در سال ۱۳۸۸ بود.

مواد و روشها

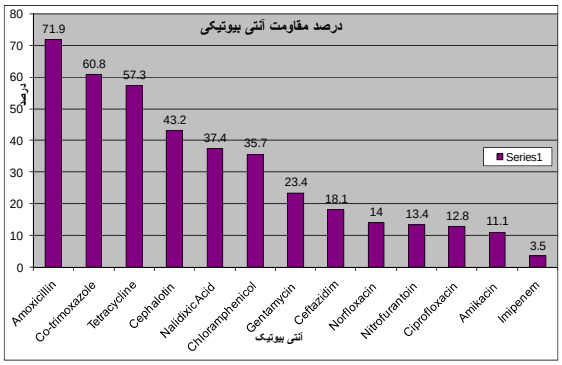
تحقیق به روش توصیفی روی کلیه کودکان مبتلا به عفونت دستگاه ادراری صورت گرفت. پس از انتقال نمونه‌های ادرار به آزمایشگاه، بر روی محیط‌های باکتریولوژیک جهت تشخیص کشت داده شدند.

از کلنی‌های ظاهر شده اشرشیا کلی و کلبسیلا سوسپانسیونی از باکتری بر اساس استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد و بر روی محیط مولرهینتون فعالیت ایزوله‌ها به صورت in vitro در برابر ۱۳ آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰ µg) G، تتراسایکلین (۳۰ µg) T، سفتازیدیم (۱۰ µg) CAZ، کوتریموکسازول (µg ۲۵) TS، ایمی‌پنم (۱۰ µg) IMI، سیپروفلوکساسین (۵ µg) CIP، نورفلوکساسین (۱۰ µg) NOR، سفالوتین (۳۰ µg) KF، آمیکاسین (۳۰ µg) AK، کلرامفنیکل (۳۰ µg) C، نالیدیکسیک اسید (۳۰ µg) NA، آموکسی‌سیلین (۱۰ µg)A و نیتروفورانتوئین (۱۰ µg) NIT مورد بررسی قرار گرفت. میزان حساسیت یا مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بر مبنای NCCLS گزارش شدند (۱۹). سپس نمونه‌هایی که به بیشتر از دو آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند، به عنوان نمونه‌های با مقاومت چندگانه [multidrug resistance (MDR)] در نظر گرفته شدند و بقیهٔ ایزوله‌هایی که به کمتر از دو آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند، حذف شدند. بر روی این نمونه‌ها (MDR) مراحل استخراج DNA به روش فنل کلروفرم انجام شد و سپس عمل PCR جهت تکثیر ژن اینتگراز و RFLP توسط دو آنزیم محدود کننده HinfI و RsaI جهت تعیین کلاس اینتگرون انجام شد.

ارتباط ایزوله‌های مقاوم با وجود اینتگرون توسط نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری کای‌دو انجام شد. در مورد ایمی‌پنم به خاطر کم بودن نمونه‌های مقاوم از آزمون دقیق فیشر استفاده شد.

یافته‌ها

از ۲۰۰ نمونه جمع‌آوری شده، ۱۷۴ نمونه اشرشیا کلی (۸۷ درصد) و ۲۶ نمونه کلبسیلا (۱۳ درصد) بودند. از ۲۶ سویه کلبسیلا، ۲۳ سویه (۸۸/۵ درصد) و از ۱۷۴ سویه اشرشیا کلی، ۱۴۸ سویه (۸۷/۱ درصد) MDR بودند، به عبارتی ۱۷۱ سویه MDR به دست آمد. فراوانی الگوی مقاومت دارویی در ایزوله‌های دارای مقاومت‌های چندگانه آنتی‌بیوتیکی در نمودار ۱ ارائه شده است.



نمودار ۱- میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیکهای مختلف در سویه‌های MDR

از بین ۲۰۰ ایزولهٔ باکتری، ۱۷۱ نمونه (۸۵/۵ درصد) به عنوان ایزوله‌های MDR در نظر گرفته شدند و بر روی این ۱۷۱ ایزوله مراحل جداسازی و استخراج DNA به روش فنل کلروفرم صورت پذیرفت.

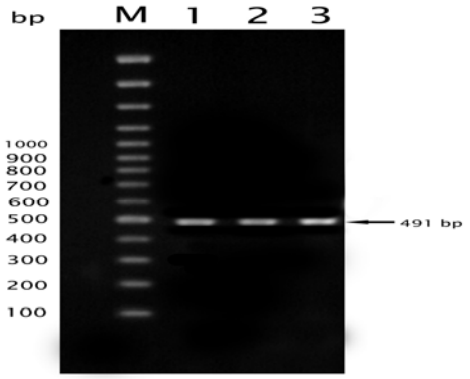
کلیه ۱۷۱ نمونه (۸۵/۵ درصد) باکتری پس از استخراج DNA و انجام PCR به منظور تشخیص حضور یا عدم حضور ژن اینتگراز (*int*) با روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز کنترل

جدول۱- فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ارتباط با اینتگرون در سویه MDR اشرشیا کلی و کلبسیلا (n=۷۱)

آنتی بیوتیک	مقاومت اینتگرون	مقاومت اینتگرون کلاس ۱	مقاومت اینتگرون کلاس ۲	کل مقاومت	p-value*
جنتامایسین	۱۲(۳۰)†	۱۲(۳۰)	۰	۴۰(۲۳/۴)	<۰/۰۰۲
تتراسایکین	۲۶(۲۶/۵)	۲۱(۲۱/۴)	۵(۵/۱)	۹۸(۵۷/۳)	<۰/۰۴۳
سفتازیدیم	۱۰(۳۲/۲)	۵(۱۶/۱)	۵(۱۶/۱)	۳۱(۱۸/۱)	<۰/۰۲۵
کوتریموکسازول	۲۸(۲۶/۹)	۲۱(۲۰/۲)	۷(۶/۷)	۱۰۴(۶۰/۲)	<۰/۰۲۱
ایمی پنم	۱(۱۶/۶)	۱(۱۶/۶)	۰	۶(۳/۵)	<۰/۳۲
سیپروفلوکساسین	۵(۲۲/۷)	۲(۹/۱)	۳(۱۳/۶)	۲۲(۱۲/۸)	<۰/۰۳۲
نورفلوکساسین	۲(۸/۳)	۰	۲(۸/۳)	۲۴(۱۴)	<۰/۰۰۱
سفالوتین	۳۰(۴۰/۵)	۲۵(۳۳/۸)	۵(۶/۷)	۷۴(۴۳/۲)	<۰/۰۰۵
آمیکاسین	۲(۱۰/۵)	۲(۱۰/۵)	۰	۱۹(۱۱/۱)	<۰/۰۲
کلرامفنیکل	۱۵(۲۴/۵)	۱۴(۲۲/۹)	۱(۱۶/۶)	۶۱(۳۵/۷)	<۰/۶۲
نالیدیکسیک اسید	۱۴(۲۱/۹)	۱۰(۱۵/۶)	۴(۶/۳)	۶۴(۳۷/۴)	<۰/۰۰۴
آموکسی سیلین	۳۴(۲۷/۶)	۲۴(۱۹/۵)	۱۰(۸/۱)	۱۲۳(۷۱/۹)	<۰/۱۸
نیتروفورانتوئین	۴(۱۷/۳)	۲(۸/۳)	۰	۲۳(۱۳/۵)	<۰/۰۲۴

* ارتباط با اینتگرون؛ † اعداد داخل پرانتز معرف درصد هستند.

شدند. PCR بر روی ۱۷۱ نمونه باکتری با کمک پرایمرهای اختصاصی hep 35 و hep 36 و کنترل انجام و محصولات حاصل الکتروفورز شدند که از این تعداد، ۱۳۶ ایزوله (۷۹/۵ درصد) فاقد ژن اینتگراز بودند و ۳۵ ایزوله (۲۰/۵ درصد) از لحاظ وجود ژن اینتگراز مثبت بودند. این ژن، محصولی به اندازه ۴۹۱ bp تولید می‌کند (شکل ۱).



شکل۱- نتایج PCR ژن اینتگراز. لاین M: مارکر به قدرت تفکیک 100bp؛ لاین ۱: کنترل مثبت؛ لاین۲ و ۳: نتیجه PCR دو نمونه مثبت 491bp

نتایج RFLP نشان داد که از ۳۵ نمونه اینتگرون مثبت، ۲۵ نمونه (۱۴/۵ درصد) دارای اینتگرون کلاس ۱ و ۱۰ نمونه (۵/۸ درصد) دارای اینتگرون کلاس ۲ بودند. ارتباط معنی‌داری بین وجود اینتگرون و برخی آنتی‌بیوتیک‌ها به دست آمد که در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

بحث

سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌های کسب شده از جامعه و بیمارستان رو به افزایش است و این امر یک مشکل بزرگ و جهانی می‌باشد. مقاومت در سویه‌های ایجاد کننده عفونت‌های دستگاه ادراری که یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها می‌باشد، افزایش یافته و این امر نگران کننده است (۲۰). این مطالعه که بر روی اشرشیا کلی و کلبسیلاهای ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری صورت گرفته، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به آمپی‌سیلین، کوتریموکسازول و تتراسایکلین نشان می‌دهد. در مطالعه‌ای که توسط Mattai و همکارانش در سال ۲۰۰۴ صورت گرفت، نتایجی مشابه این مطالعه به دست آمد (۲۱). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۶ در اسلووانیا توسط Rijavec صورت گرفت، بیشترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل بود (۲۲).

کمترین مقاومت در این مطالعه نسبت به ایمی‌پنم بود که مشابه مطالعات Mattai در سال ۲۰۰۴، Tariq در سال ۲۰۰۶ و Gulsun در سال ۲۰۰۵ است (۲۱، ۲۳، ۲۴). این امر نشان می‌دهد که در حال حاضر، ایمی‌پنم داروی انتخابی کلبسیلا و اشرشیا کلی جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری می‌باشد.

در این مطالعه درصد بالایی از سویه‌ها، دارای مقاومت چندگانه (MDR) بودند، به طوری که ۸۵/۵ درصد ایزوله‌ها به بیش از ۲ آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری از کشوری

به کشور دیگر متغیر است. به طوری که در ایالات متحده در سال ۲۰۰۰ و دراسلووانیا در سال ۲۰۰۶ و در ایران در سال ۲۰۰۸ درصد سویه های MDR به ترتیب ۷/۱ درصد، ۴۲ درصد و ۸۲/۵ درصد بود (۲۲، ۲۵، ۲۶). چنین مقاومت‌های دارویی، مشکلات پیچیده‌ای را برای درمان‌های تجربی عفونت‌های ایجاد شده توسط اشرشیاکلی و کلبسیلا ایجاد می‌کنند.

هدف از این مطالعه، بررسی نقش اینتگرون‌ها در مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی بود. اینتگرون‌ها نقش گسترده و مهمی در سویه‌های دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی اشرشیاکلی و کلبسیلا دارند. شیوع اینتگرون در این مطالعه در سویه‌های MDR، ۲۰/۵ درصد بود. شیوع اینتگرون در سویه‌های اشرشیاکلی و کلبسیلا بین ۲۲ تا ۵۹ درصد گزارش شده است (۲۷). این آمار نشان می‌دهد که اینتگرون‌ها در سراسر دنیا به خصوص در خانواده انتروباکتریاسه به طور معمول وجود دارند.

شیوع نسبتا پایین اینتگرون در این مطالعه می‌تواند به این دلیل باشد که کاست‌های ژنی مقاومت روی عناصر دیگری مثل ترانسپوزون‌ها و پروفاژها قرار دارند.

در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین اینتگرون و مقاومت به جنتامایسین، نورفلوکساسین، سفالوتین و نالیدیکسیک اسید مشاهده شد که این امر نشان می‌دهد که ژن مقاومت این آنتی‌بیوتیک‌ها در داخل اینتگرون قرار دارد.

در کل به نظر می‌رسد مقاومت چندگانه دارویی با ۶،۵،۴ آنتی‌بیوتیک خطرناک است و این هشدار را می‌دهد که باید سیاست استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها جهت عفونت‌های حاصل از این باکتری تغییر یابد. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب باعث جلوگیری از انتقال ژن‌های مقاومت به وسیله اینتگرون‌ها خواهد گردید. در مطالعه ما، ایمی‌پنم و آمیکاسین موثرترین دارو بر علیه ایزوله‌ها بودند.

REFERENCES

1. Sefton AM. The impact of resistance on the management of urinary tract infections. Int J Antimicrob Agents 2000; 16: 489-91.
2. World Health Organization. WHO Global Straegy for Containment of Antimicrobial Resistance. Geneva, Switzerland: WHO; 2001. p.1-105.
3. Enne VI, Livermore DM, Stephens P, Hall LM. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. Lancet 2001; 357: 1325–28.
4. O'Brien TF. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. Clin Infect Dis 2002; 34: S78–84.
5. Ploy MC, Lambert T, Couty JP, Denis F. Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. Clin Chem Lab Med 2000; 38: 483–87.
6. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site specific recombination. Mol Microbiol 1995; 15: 593–600.
7. Jada JM, Abbot SL. The Enterobacteria. New York: Lippincott-raven; 1998. p.110-30.
8. Crys SJ. Progress in immunization against Klebsiella infections. Eur J Clin Microbiol 1983; 2: 523-28.
9. Chang CY, Chang LL, Chang YH. Characterization of drug resistance gene cassettes associated with class 1 integrons in clinical isolates of *E.coli* from Taiwan. J Med Microbial 2000; 49: 1097-102.
10. Van Belkum A, Goessens W, Van der schee C. Rapid emergency of ciprofloxacin resistant Entrobacteriaceae containing multiple gentamycin resistance associated integrons in a Dutch hospital. Emerg Infect Dis 2001; 7: 862-71.
11. Collis CM, Kim MJ, Partridge SR. Characterization of the class 3 integron and the site- specific recombination system it determines. J Bacteriol 2002; 184: 3017-26.
12. Mazel D, Dychino B, Webb VA. A distinctive class of integron in the Vibrio cholera genome. Science 1998; 280: 605-608.
13. 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.
14. Hall RM, Brookes DE, stokes HW. Site-specific insertion of gene into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. Mol Microbiol 1991; 5: 1941-59.
15. Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 761–70.

16. Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Grek VS, Verhoef J, Jones ME. Class I integrons in Gram negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 689–96.

17. White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2658–61.

18. Jones ME, Peters E, Weersink AM, Fluit A, Verhoef J. Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. Lancet 1997; 349: 1742–43.

19. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for disk antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa: 2003

20. Kahlmeter G. Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogens in uncomplicated cystitis in Europe. The ECO.SENS study. Int J Antimicrob Agents 2003; 2: 49–52.

21. Mathai E, Grape M, Kronvall G. Integrons and multidrug resistance among *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in southern India. APMIS 2004; 112: 159–64.

22. Rijavec M, Starcic Erjavec M, Ambrozic Avgustin J, Reissbrodt R, Fruth A, Krizan-Hergouth V, et al. High 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.

23. Gulsun S, Oguzoglu N, Inan A, Ceran N. The virulence factors and antibiotic sensitivities of *Escherichia coli* isolated from recurrent urinary tract infections. Saudi Med J 2005; 26: 1755–58.

24. Tariq N, Jaffery T, Ayub R, Alam AY, Javid MH, Shafique S. Frequency and antimicrobial susceptibility of aerobic bacterial vaginal isolates. J Coll Physicians Surg Pak 2006; 16: 196–99.

25. Sahm DF, ThornsberryC, Mayfield DC, Jones ME, Karlowsky JA. Multidrug-resistant urinary tract isolates of Escherichia coli: prevalence and patient demographics in the United States in 2000. Antimicrob Agents Chemother 2000; 45: 1402–406.

26. Japoni A, Gudarzi M, Farshad SH, Basiri E, Ziyaeyan M, Alborzi A, et al. Assay for integrons and pattern of antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* strains by PCR-RFLP in southern Iran. Jpn J Infect Dis 2008; 61: 85–88.

27. Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 761–70.