

بررسی مولکولی اینتگرون کلاس I در سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بخش مراقبت های ویژه بیمارستان شهید بهشتی بابل، ۱۳۸۹

زهرا مولانا^۱ (MSc)، الهه فردوسی شاهاندشتی^۲ (MSc)، سارا غروی^۳ (PhD)، مینو شفیعی^۴، سونیا نورخامی^۵

فاطمه آهنگر کانی^۶ (MSc)، رمضان رجب نیا^۷ (PhD)*

۱- دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

۲- دانشگاه علوم پزشکی بابل

۳- گروه زیست شناسی دانشگاه الزهرا تهران

۴- گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد واحد تنکابن

۵- مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی بابل

دریافت: ۸۹/۱۱/۱۱، اصلاح: ۹۰/۲/۷، پذیرش: ۹۰/۴/۸

خلاصه

سابقه و هدف: کلبسیلا پنومونیه یکی از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی و مقاومت های دارویی می باشد. اینتگرون ها یکی از عناصر متحرک ژنتیکی می باشند که قادرند ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف را حمل نمایند. در این میان نقش اینتگرون کلاس I در ایجاد و انتقال مقاومت های آنتی بیوتیکی بسیار مهم می باشد. هدف از این مطالعه، جداسازی کلبسیلا پنومونیه از محیط و تجهیزات بخش مراقبت های ویژه (ICU)، بررسی مولکولی ژن اینتگرون کلاس I و تعیین حساسیت یا مقاومت آنها به آنتی بیوتیک های مختلف می باشد.

مواد و روشها: این مطالعه مقطعی بر روی ۳۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بخش مراقبت ویژه بیمارستان شهید بهشتی بابل در سال ۱۳۸۹ انجام شد. از محیط و تجهیزات بخش مراقبت ویژه، نمونه برداری شد و بعد از کشت روی محیط های کشت مناسب، شناسایی باکتری انجام شد. پس از جداسازی و استخراج DNA، ژن اینتگرون کلاس I با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بررسی شد. تست تعیین حساسیت برای آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، سفازولین، سفتریاکسون، سفتی زوکسیم، سفوتاکسیم، آمیکاسین، اوفلوکسازین، ایمپنم، سفپیم، تیکارسلین و جنتاماسین انجام شد.

یافته ها: از ۳۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه، ۳۶/۶٪ (۱۱ نمونه) دارای ژن I بودند. پس از انجام تست تعیین حساسیت و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها، از ۲۶ نمونه مقاوم به سفازولین ۹ نمونه، از ۲۵ نمونه مقاوم به سفتریاکسون ۱۰ نمونه، از ۲۷ نمونه مقاوم به سفتی زوکسیم، سفوتاکسیم و سفپیم ۱۱ نمونه، از ۱۸ نمونه مقاوم به سیپروفلوکساسین و ایمپنم ۹ نمونه، از ۲۶ نمونه مقاوم به تیکارسلین ۱۱ نمونه، از ۱۷ نمونه مقاوم به اوفلوکسازین ۵ نمونه، از ۱۱ نمونه مقاوم به آمیکاسین ۵ نمونه و از ۲۶ نمونه مقاوم به جنتاماسین ۸ نمونه دارای ژن اینتگرون کلاس I بودند.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که فراوانی ژن اینتگرون کلاس I در سویه ها زیاد می باشد؛ که می تواند نقش مهمی در ایجاد و انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی داشته باشد و این می تواند به دلیل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها باشد. باید تدابیری اندیشیده شود تا از بروز و انتشار این عناصر مقاومت آنتی بیوتیکی جلوگیری گردد.

واژه های کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، اینتگرون کلاس I، مقاومت آنتی بیوتیکی.

مقدمه

باکتری کلبسیلا پنومونیه یک باسیل گرم منفی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه می باشد. این باکتری گاهی باعث عفونت سیستم ادراری و

باکتری می به همراه آسیب های موضعی در بیماران ضعیف می شود (۱). کلبسیلا پنومونیه را می توان از مجاری فوقانی دستگاه تنفسی و مجاری گوارشی ۵ درصد

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۶۱۰۲۳۰۵ دانشگاه علوم پزشکی بابل می باشد.

* مسئول مقاله:

احتمال انتقال مقاومت توسط این سویه ها، در این مطالعه با نمونه گیری از محیط و تجهیزات بخش مراقبت های ویژه بیمارستان شهید بهشتی بابل و جداسازی این باکتری، اینتگرون کلاس یک را در این سویه ها و میزان مقاومت و حساسیت آنها به آنتی بیوتیک های مختلف بررسی شد.

مواد و روشها

این مطالعه مقطعی بر روی ۳۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه انجام شد. نمونه برداری از محیط و تجهیزات بخش مراقبت ویژه بیمارستان شهید بهشتی بابل انجام گردید. با استفاده از سواب استریل مرطوب (آغشته به آب مقطر استریل یا محیط کشت نوترینت براث استریل)، از قسمت های مورد نظر نمونه برداری شد. سپس در محیط ترانسپورت به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی بابل ارسال شد.

کشت و جداسازی: نمونه ها سریعاً و در کنار شعله بر روی محیط های کشت نوترینت آگار و EMB آگار کشت داده شد، سپس به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از رشد باکتریها، با تهیه لازم گرم، خصوصیات ظاهری کلنی ها و استفاده از تست های افتراقی نظیر تخمیر قند گلوکز و لاکتوز، تحرک، اوره، ایندول، تولید SH_2 ، لیزین دکربوکسیلاز، آرژنین دهیدرولاز و ارونیتین دکربوکسیلاز، کلبسیلا پنومونیه شناسایی گردید (۹ و ۱۰). کلنی های خالص هر یک از نمونه های کلبسیلا پنومونیه را در دو و بال ۱/۵ میلی لیتری استریل، یکی حاوی ۱ سی سی آب مقطر استریل و دیگری حاوی ۱ سی سی سرم فیزیولوژی استریل جمع آوری کرده و برای استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری گردید.

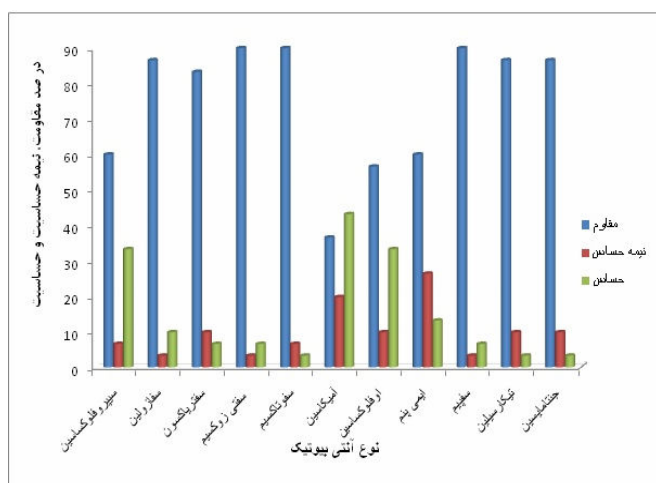
استخراج DNA: در این مرحله جهت استخراج DNA از High pure PCR Template preparation Kit شرکت Roche آلمان استفاده شد. پس از استخراج DNA هر نمونه تا انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

PCR: پرایمر با توالی 5'-TCT CGG GTA ACA TCA AGG-3' و 5'-AGG AGA TCC GAA GAC CTC-3' جهت تکثیر بخشی از توالی *intI* طراحی شد، که قادر است قطعه ای به طول ۲۳۴ جفت باز را تکثیر نماید. واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد که شامل ۱۰ میکرولیتر DNA استخراج شده (معادل ۱ میکروگرم)، ۵ پیکومول در لیتر از هر کدام از پرایمرها، ۱/۵ میلی مول در لیتر $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مول در لیتر dNTPs و ۱/۵ واحد آنزیم Taq بود (۵). تکثیر قطعه مورد نظر در دستگاه ترموسایکلر با دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، annealing ۵۳ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و extension ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. در پایان جهت تکثیر قطعات ناتمام ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گردید (۵).

الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد، ولتاژ ۷۰ و به مدت یک ساعت انجام شد. ژل مورد نظر تحت نور ماوراء بنفش مورد بررسی قرار گرفت. باند بدست آمده در مقایسه با DNA size marker صد جفت بازی (فرمنتاز اوکراین)، به عنوان قطعه مورد نظر از ژن *intI* در نظر گرفته شد.

از اشخاص طبیعی جدا کرد. کلبسیلا از عوامل عفونت های بیمارستانی محسوب می شود. پنومونی حاصل از کلبسیلا بیشتر در بیماران بستری در بیمارستان روی می دهد که فعالیت مخاطی - مژه دستگاه تنفسی مختل شده است (۲). اینتگرون ها یکی از عناصر متحرک ژنتیکی بوده که قادرند ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف را حمل نمایند (۳).

این عناصر در مکان های مختلفی از پلاسمید ها و کروموزوم یافت شده اند. اینتگرون ها قادرند ژن ها را در برگرفته و آنها را در حالی که در داخل کاست های ژنی قرار دارند جا به جا نمایند (۴). آنها دارای ژن این



نمودار ۱. نتایج تست تعیین حساسیت سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از ICU بیمارستان شهید بهشتی بابل در سال ۱۳۸۹

تعداد و درصد حساسیت نمونه های جدا شده به آنتی بیوتیک های نامبرده به ترتیب ۱۰ نمونه (درصد ۳۳/۳)، ۳ نمونه (درصد ۹/۹)، ۲ نمونه (درصد ۶/۶)، ۲ نمونه (درصد ۶/۶)، ۱ نمونه (درصد ۳/۳)، ۱۳ نمونه (درصد ۴۳/۲)، ۱۰ نمونه (درصد ۳۳/۳)، ۴ نمونه (درصد ۱۳/۳)، ۱ نمونه (درصد ۳/۳) و ۱ نمونه (درصد ۳/۳) بود و همچنین نمونه ها نسبت به آنتی بیوتیک های نامبرده به ترتیب ۲ نمونه (درصد ۶/۶)، ۱ نمونه (درصد ۳/۳)، ۳ نمونه (درصد ۹/۹)، ۱ نمونه (درصد ۳/۳)، ۱ نمونه (درصد ۳/۳)، ۲ نمونه (درصد ۶/۶)، ۶ نمونه (درصد ۱۹/۸)، ۳ نمونه (درصد ۹/۹)، ۸ نمونه (درصد ۲۶/۴)، ۳ نمونه (درصد ۹/۹) و ۳ نمونه (درصد ۹/۹) حساس بودند. در ۳۰ سویه کلبسیلا پنومونیه جدا شده، ۱۱ مورد دارای ژن اینتگرون کلاس I بودند. ۱۰۰ درصد سویه های اینتگرون مثبت مقاوم به سفتی زوکسیم، سفوتاکسیم، تیکارسلین و سفییم، ۹۰ درصد مقاوم به سفتریاکسون، ۸۲ درصد مقاوم به سفازولین، سیپروفلوکساسین و ایمی پنم، ۷۲/۷ درصد مقاوم به جنتاماسین و ۴۵/۵ درصد مقاوم به اوفلوکساسین و آمیکاسین بودند (جدول ۱).

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، فراوانی ژن اینتگرون کلاس I در سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از ICU، ۳۶/۶ درصد بوده است. در مطالعات مشابه نیز به ترتیب ۳۴/۲٪ و ۳۲/۹٪ گزارش شده است (۱۱) که با این ما همخوانی دارد. در سال ۲۰۰۶ در بیمارستان های ایالات متحده آمریکا، شیوع این ژن ۷۰ درصد (۵) و در کلبسیلاهای تولید کننده بتا لاکتاماز وسیع الطیف از ۳ بیمارستان در استرالیا ۷۳٪ (۷) گزارش شد که با نتایج ما همخوانی ندارد و این اختلاف می تواند بدلیل تفاوت در منطقه جغرافیایی و سویه باکتری باشد. درصد فراوانی اینتگرون در باکتریهای مختلف و مناطق مختلف متفاوت است. بطور مثال در چین در گزارشی شیوع اینتگرون کلاس I در باکتری سودوموناس ۳۸٪ اعلام شد؛ و در منطقه آمازون ۴۱،۵٪ بوده است (۱۲).

انجام تست تعیین حساسیت و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها: این تست

به روش دیسک دیفیوژن انجام شد (۹). باکتری مورد نظر در محیط ک

جدول ۱. مقایسه حضور ژن I int و تست تعیین حساسیت در نمونه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از ICU بیمارستان شهید بهشتی بابل، سال ۱۳۸۹

نام آنتی بیوتیک	تعداد باکتری	اینتگرون کلاس	نام آنتی بیوتیک	تعداد باکتری	اینتگرون کلاس یک
حساس	۴	۰	حساس	۳	۱
نیمه حساس	۸	۲	نیمه حساس	۱	۱
مقاوم	۱۸	۹	مقاوم	۲۶	۹
حساس	۲	۰	حساس	۲	۰
نیمه حساس	۱	۰	نیمه حساس	۳	۱
مقاوم	۲۷	۱۱	مقاوم	۲۵	۱۰
حساس	۱	۰	حساس	۲	۰
نیمه حساس	۳	۰	نیمه حساس	۱	۰
مقاوم	۲۶	۱۱	مقاوم	۲۷	۱۱
حساس	۱۰	۴	حساس	۱	۰
نیمه حساس	۳	۲	نیمه حساس	۲	۰
مقاوم	۱۷	۵	مقاوم	۲۷	۱۱
حساس	۱۳	۴	حساس	۱۰	۲
نیمه حساس	۶	۲	نیمه حساس	۲	۰
مقاوم	۱۱	۵	مقاوم	۱۸	۹
حساس	۱	۰	حساس		
نیمه حساس	۳	۳	نیمه حساس		
مقاوم	۲۶	۸	مقاوم		

وجود داشت (۵). که علت این مقاومت ها می تواند حضور کاست های ژنی مقاومت آنتی بیوتیکی در ژن اینتگرون کلاس I باشد. با بررسی نتایج تستهای PCR و تعیین حساسیت با آنتی بیوتیک های سیپروفلوکسازین، اوفلوکسازین و آمیکاسین ارتباط حضور این ژن با مقاومت آنتی بیوتیکی به خوبی دیده نمی شود که احتمالاً "علاوه بر انتقال این ژن، عوامل دیگری از جمله ترانسپوزون ها نیز می توانند در ایجاد مقاومت به این آنتی بیوتیک ها نقش موثر داشته باشند. سطح مقاومت آنتی بیوتیکی در بین ایزوله های بدست آمده از جامعه و بیمارستان رو به افزایش است و این امر یک مشکل بزرگ جهانی می باشد. مقاومت در سویه های ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی رو به افزایش می باشد و این امر در درمان بیماری ها مشکلات زیادی فراهم آورده است. صرف نظر از الگوی مصرف آنتی بیوتیک ها، ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی می توانند در بین جمعیت های باکتریایی منتقل شوند که در این میان اینتگرون ها با استفاده از مکانیزم جدید انتشار، ژن های مقاومت را بین باکتری ها منتقل می کنند (۱۳). انتقال افقی اینتگرون ها موفق ترین راه انتشار ژن های مقاومت و پیدایش گونه هایی با مقاومت چندگانه (MDR) = multi-drug resistant است. غالب گونه های جدا شده از بیماران و محیط بیمارستان با ویژگی مقاومت چندگانه، دارای ژن اینتگرون کلاس یک هستند (۱۴).

در کل مطالعه مشخص شد که محیط و تجهیزات بخش مراقبت ویژه می تواند با باکتری کلبسیلا پنومونیه به عنوان یکی از عوامل عفونت های

شیوع ژن اینتگرون در میان اشرشیاکلی و کلبسیلا در بیمارستان های ۱۳ ایالت در ایالات متحده آمریکا به روش PCR بررسی شد، که از میان ۳۲۰ باکتری جدا شده، ۵۷ درصد آنها دارای اینتگرون کلاس یک بودند، که در این میان ۴۹٪ از باکتری اشرشیاکلی و ۷۰ درصد از باکتری کلبسیلا پنومونیه جدا شده، دارای اینتگرون کلاس یک، بوده اند (۵). درصد مقاومت در سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده در این مطالعه به آنتی بیوتیک های تیکارسیلین، سفازولین، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفپیم، آم

آنتی بیوتیکی داشته باشد که مستلزم کارهای تحقیقاتی بعدی می باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بابل، پرسنل بخش میکروب شناسی دانشکده پزشکی و خانم دکتر ثریا خفری تشکر و قدردانی می گردد.

بیمارستانی کلونیزه شود. این کلونیزاسیون می تواند به عنوان یک منبع عفونت برای بیماران بستری در این بخش محسوب گردد. فراوانی ژن اینتگرون کلاس یک در سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بخش مراقبت های ویژه بالا می باشد. میزان مقاومت های آنتی بیوتیکی این سویه ها نیز بسیار چشمگیر است. از آنجایی که نقش این ژن در ایجاد مقاومت های آنتی بیوتیکی ثابت شده است حضور این ژن می تواند نقش مهم و اساسی در ایجاد و انتقال این مقاومت های

Molecular Investigation of Class I Integron in *Klebsiella Pneumoniae* Isolated from Intensive Care Unit (Shahid Beheshti Hospital of Babol; 2010)

Z. Molana (MSc)¹, E. Ferdosi Shahandashti (MSc)², S. Gharavi (PhD)³, M. Shafii², S. Norkhomami²,
 F. Ahangarkani (MSc)⁴, R. Rajabnia (PhD)^{*5}

1. Faculty of Paramedical Sciences, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

2. Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

3. Department of Biology, Al Zahra University, Tehran, Iran

4. Microbiology, Islamic Azad University of Tonekabon, Tonekabon, Iran

5. Cellular and Molecular Biology Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

J Babol Univ Med Sci; 13(6); Nov 2011

Received: Jan 31st 2011, Revised: Apr 27th 2011, Accepted: Jun 29th 2011.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: *Klebsiella pneumoniae* is one of the most important agents of nosocomial infections and drug resistance. Integrons are genetic elements that carry genetic determinants for antimicrobial drug resistance. The role of class I integron genes is very important to transfer of antibiotic resistance. The aim of the present study is isolation of *Klebsiella pneumoniae* from the environment and equipments in intensive care unit (ICU), investigation of class I integron genes in these strains and determine their susceptibility or resistance to antibiotics.

METHODS: The descriptive and analytical study was carried out on 30 *Klebsiella pneumoniae* isolated from ICU of Shahid Beheshti hospital in Babol, Iran in 2010. Sampling of environment and equipments in ICU was carried out. After isolation and extraction of DNA, class I integron gene was investigated by PCR and specific primers. Also for the sensitivity test to antibiotics of Ciprofloxacin, Cefazolin, Ceftriaxone, Ceftizoxime, Cefotaxime, Amikacin, Ofloxazin, Imipenem, Cefepim, Ticarcilin and Gentamicin was performed by disk diffusion method.

FINDINGS: From 30 *Klebsiella pneumoniae* isolates, 36.6 percent (11 samples) have had class I integron gene. After sensitivity test, from 9 of the 26 resistant isolates to Cefazolin, 10 of 25 resistant isolates to Ceftriaxone, 11 of 27 resistant isolates to Ceftizoxime, Cefotaxime and Cefepim, 9 of 18 resistant isolates to Ciprofloxacin and Imipenem, 11 of 26 resistant isolates to Ticarcilin, 5 of 17 resistant isolates to Ofloxazin, 5 of 11 resistant isolates to Amikacin and 8 of 26 resistant isolates to Gentamicin had class I integron gene.

CONCLUSION: The results of this study show contamination of environment and equipments in ICU was increased. The class I integron gene frequency in these strains is high; that can have important and basic role in occurrence and transfer of antibiotic resistance. The antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*, isolated from the environment and ICU equipments, is very high; that it can be due to the irregular use of antibiotics. Measures should be thought to prevent occurrence and dissemination of antibiotic resistance elements.

KEY WORDS: *Klebsiella pneumoniae*, Integron class I, Antibiotic resistance.

^{*}Corresponding Author;

Address: Microbiology Department, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

Tel: +98 111 2199597

E-mail: Ramazan69@yahoo.com

References

1. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg medical microbiology. 24th ed. New York: McGraw-Hill Co 2007; p: 222.
2. Murray PR, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. Medical microbiology. 5th ed. Philadelphia, Mosby 2002; p: 278.
3. Stokes H, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 1989;3(12):1669-83.
4. Roy PH. Integrons: novel mobile genetic elements mediating antibiotic resistance in enterobacteria and *Pseudomonas*. *APUA Newsletter* 1995;13(3):1,4-6.
5. 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):1011-4.
6. Actis LA, Tolmasky ME, Crosa GH. Bacterial plasmids: replication of extra chromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Front Biosci* 1999;3:43-62.
7. Jones LA, McIver CJ, Kim MJ, Rawlinson WD, White PA. The *aadB* gene cassette is associated with *bla*SHV genes in *Klebsiella* species producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(2):794 –7.
8. Sligl W, Taylor G, Brindley PG. Five years of nosocomial gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: epidemiology, antimicrobial susceptibility patterns, and outcomes. *Int J Infect Dis* 2006;10(4):320-5.
9. Baron EJ, Fingold SM. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. 12th ed. Philadelphia: Mosby 2007; pp: 236-40, 365-584.
10. Mahon C, Lehman DC, Mannuselis G. Diagnostic microbiology. 4th ed. St. Louis: Elsevier 2011; pp: 473-475.
11. 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 -16.
12. Fonseca EL, Vieira VV, Cipriano R, Vicente AC. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Clinical settings in Amazon region, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;44(1):303-9.
13. 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(Suppl 3): S78-84.
14. Janda JM, Abbot SL. The enterobacteria. New York: Lippincott-Raven 1998; pp: 30-110.