

فراوانی اینتگرون کلاس I در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا با الگوی مقاومت چند گانه دارویی در بیمارستان‌های انتخابی شهرهای قزوین و تهران

امیر پیمانی^۱، تقی ناصرپور فریور^۲، هادی رحیمی^۳، مرجان رنجبر^۴، رضا نجفی پور^{۵*}

چکیده

زمینه و هدف: حضور اینتگرون کلاس I در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت دارویی چند گانه، نگرانی‌های فراوانی را در کلینیک ایجاد کرده است. با توجه به قرارگیری انواع ژن‌های کدکننده مقاومت دارویی بر روی اینتگرون‌ها و قابلیت انتشار سریع آنها، شناسایی ایزوله‌های حاوی اینتگرون می‌تواند اطلاعات مفیدی در خصوص میزان و توسعه مقاومت دارویی ارائه کند. این مطالعه با هدف بررسی فراوانی اینتگرون کلاس I در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا با الگوی مقاومت چند گانه دارویی جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های انتخابی شهرهای قزوین و تهران انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - مقطعی، ۱۰۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا با انجام روش‌های استاندارد آزمایشگاهی از بیمارستان‌های انتخابی شهرهای قزوین و تهران از خرداد ماه سال ۱۳۹۰ تا خرداد ماه سال ۱۳۹۱ جمع‌آوری شد. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی تمامی ایزوله‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های منتخب، به روش استاندارد دیسک آگار دیفیوژن انجام گرفت. در ادامه، تمامی ایزوله‌ها از نظر حضور اینتگرون کلاس I با استفاده از آزمون PCR بررسی و ارتباط مابین حضور اینتگرون و الگوی مقاومت دارویی چند گانه با آزمون مجذور کای دو سنجیده شد. سطح معنی‌داری، کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در مجموع، ۶۲ ایزوله الگوی مقاومت دارویی چند گانه را نشان دادند که ۳۶ ایزوله (۵۸٪) دارای اینتگرون کلاس I بودند. همچنین ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون کلاس I و الگوی مقاومت دارویی چند گانه و مقاومت نسبت به داروهای بتالاکتام، کینولون‌ها و اکثر آمینوگلیکوزیدها مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع بالای اینتگرون کلاس I در ایزوله‌های مقاوم سودوموناس آئروژینوزا و ارتباط آن با الگوهای مختلف مقاومت دارویی؛ اعمال راهکارهای مناسب کنترل عفونت و درمان در بیمارستان‌های مورد مطالعه برای جلوگیری از انتشار بیشتر آنها ضروری به نظر می‌رسد.

کلیدواژه‌ها: سودوموناس آئروژینوزا؛ اینتگرون کلاس I؛ مقاومت دارویی چند گانه.

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Peymani A, Naserpour Farivar T, Rahimi H, Ranjbar M, Najafipour R.
Frequency of class I integron among multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the selected hospitals in Qazvin and Tehran, Iran.
Qom Univ Med Sci J 2014;8(3):61-69. [Full Text in Persian]

^۱استادیار میکروپزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

^۲استاد میکروپزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

^۳دانشجوی کارشناس ارشد میکروپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

^۴پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

^۵استادیار ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

رضا نجفی پور، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
rnajafipour@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۸

تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۸

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باسیل گرم منفی هوازی و غیر تخمیری بوده که به عنوان ارگانسیم‌های فرصت طلب، به ویژه در بیمارانی که دارای ضعف در سیستم دفاعی هستند، منجر به عفونت‌های شدید و مقاوم به درمان می‌شود (۲،۱). این ارگانسیم به عنوان سومین گونه باکتریایی شایع در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی، بعد از استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی قرار گرفته است (۴،۳). عفونت‌های ایجاد شده به وسیله سودوموناس آئروژینوزا اغلب شدید و تهدیدکننده حیات است. همچنین جلوگیری از انتشار سودوموناس آئروژینوزا در محیط‌های بیمارستانی به علت وجود مکانسیم‌های ذاتی و اکتسابی مقاوم به عوامل ضد میکروبی، اغلب مشکل می‌باشد (۶،۵).

این باکتری از طریق مکانسیم‌های مختلفی نسبت به داروهای ضد میکروبی مقاوم می‌شود که تغییر نفوذپذیری میکروارگانسیم نسبت به داروها، پمپ افلاکس، تغییر گیرنده برای داروها، دستیابی به مسیرهای متابولیک فرعی و تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده داروها از آن جمله می‌باشد (۷-۹). از بین مکانسیم‌های فوق، تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده داروها از مهم‌ترین روش‌ها برای کسب فاکتور مقاومت است که سبب تخریب داروی فعال می‌شود. بخش قابل توجهی از ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها توسط عناصر متحرک ژنتیکی مانند پلاسمید، ترانسپوزون‌ها و باکتریوفاژها انتشار می‌یابند. در سالهای اخیر انتقال ژن‌های بسیاری از آنزیم‌های جدید توسط اینتگرون‌ها، توجه زیادی از محققین را به خود جلب کرده است (۱۰). اینتگرون‌ها، عناصر سیاری هستند که می‌توانند در پلاسمیدها، کروموزوم‌ها و یا ترانسپوزون‌ها جای گیرند. این عناصر در ایجاد و توسعه مقاومت‌های دارویی چندگانه همانند پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها بسیار با اهمیت هستند (۱۱،۱۲). در ساختار کلی اینتگرون‌ها، ژن‌های مقاومت بر روی کاست‌های ژنی مشخص قرار دارند که به سبب قابلیت اتصال این کاست‌ها در مجموعه‌های اینتگرونی، طی فرآیند نو ترکیبی اختصاصی در جایگاه (Site Specific Recombination)، انتقال ژن‌های مقاومت صورت می‌گیرد. ماهیت اصلی اینتگرون‌ها به سبب ژن اینتگرز

می‌باشد که کدکننده آنزیم ریکامیناز اختصاصی در جایگاه بوده و مقدمات اتصال یا جداسازی کاست‌های ژنی کوچک را در جایگاه اتصال فراهم می‌سازد. کاست‌های ژنی معمولاً حاوی یک ژن (غالباً ژن‌های مقاومت دارویی) و یک جایگاه محافظت شده بوده که مقدمات شناسایی اینتگرز طی فرآیند اتصال و برش را فراهم می‌سازد (۱۳،۱۴). تاکنون بیش از ۶۰ کاست ژنی متفاوت شناسایی شده‌اند که مقدمات مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مهمی از جمله آمینوگلیکوزیدها، پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، کرباپنم‌ها، تریمتوپریم، کلرامفنیکل، ریفامپین، اریترومايسين و ترکیب‌های چهارگانه آمونیومی را فراهم می‌سازند.

همچنین در مطالعات زیادی، اینتگرون‌های حاوی بیش از یک کاست ژنی گزارش شده است که ایزوله‌های باکتری‌های حاوی، آنها را مستعد داشتن الگوی مقاومت دارویی چندگانه (Multi Drug Resistance, MDR) می‌کند. در بین کلاس‌های اینتگرونی شناخته شده، اینتگرون کلاس I از اهمیت و شیوع بالایی نسبت به سایر کلاس‌ها در انتقال ژن‌های مقاومت دارویی برخوردار است (۱۵). باسیل‌های گرم منفی حاوی اینتگرون کلاس I، باعث نگرانی‌های جدی برای پزشکان، متخصصان عفونی و کنترل عفونت شده‌اند. نقش این عناصر در بروز ماهیت مقاومت دارویی چندگانه و مقاومت نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، به ویژه آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در بیمارستان‌ها باعث مشکل شدن راهکارهای صحیح درمانی و ابزارهای کنترل عفونت شده است (۷،۱۵). با توجه به قرارگیری ژن‌های مربوط به این نوع مقاومت‌ها بر روی اینتگرون‌ها و امکان انتشار سریع این ژن‌ها در بین سایر گونه‌ها، شناسایی حضور این اینتگرون‌ها می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد میزان شیوع سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم، رهگیری نحوه انتشار و توسعه مقاومت ارائه دهد. لذا این مطالعه با هدف بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به داروهای مهم مصرفی در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده از بیمارستان‌های انتخابی، و تعیین حضور اینتگرون کلاس I در ایزوله‌های مقاوم و ارتباط آن با مقاومت نسبت به داروهای مهم مصرفی در بیمارستان‌ها صورت گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - مقطعی، ۱۰۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا طی مدت یک سال (خرداد ماه سال ۱۳۹۰ تا خرداد ماه ۱۳۹۱) از بخش‌های مختلف بیمارستان‌های آموزشی انتخابی شهرهای قزوین و تهران جمع‌آوری شد. ایزوله‌های باکتریایی از نمونه‌های بالینی خون، ادرار و کاتترهای ادراری، تراشه، خلط، برونکو آلوئولار لاواژ و مایع مغزی - نخاعی و از بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه (ICU)، داخلی، جراحی اعصاب، عفونی، جراحی و اعصاب جمع‌آوری شدند. ایزوله‌های جداسازی شده در آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های مورد بررسی، بر روی دو محیط پایه بلاد آگار و اتوزین متیلن‌بلو، کشت مجدد داده شد و به گروه میکروب‌شناسی و مرکز تحقیقاتی سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین منتقل گردید. در ادامه، با استفاده از آزمون‌های استاندارد آزمایشگاهی (میکروب‌شناسی و بیوشیمیایی) مربوط به شناسایی گونه سودوموناس آئروژینوزا، تعیین هویت شدند. آزمون‌هایی که برای شناسایی این ارگانیزم مورد استفاده قرار گرفتند، شامل: رنگ‌آمیزی گرم، انجام آزمون‌های اکسیداز، بررسی تحرک (کشت بر روی محیط SIM) و مصرف سیترات (کشت بر روی محیط سیمون سیترات)، کشت بر روی محیط کلیگر آیرون آگار (KIA)، کشت بر روی محیط ستریمید آگار، آزمون اکسیداسیون/فرمنتاسیون (کشت بر روی محیط O/F) و توانایی رشد در دمای ۴۲°C بود (۱۶). باکتری‌های جداسازی شده بعد از تشخیص در محیط Tripticase Soy Broth حاوی ۲۰٪ گلیسرول در دمای ۸۰°C تا زمان انجام آزمون‌های بعدی ذخیره شدند. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی تمامی ایزوله‌ها براساس دستورالعمل CLSI (۱۷) و با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی جنتامایسین (۱۰µg)، توبرامایسین (۱۰µg)، تیکارسیلین/کلاولانیک اسید (۷۵/۱۰µg)، کاربنی‌سیلین (۳۰µg)، افلوکساسین (۵µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفتازیدیم (۳۰µg)، ایمی‌پنم (۱۰µg)، مروپنم (۱۰µg)، آزترونام (۳۰µg)، لووفلوکساسین (۵µg)، تری متوپریم - سولفومتوکسازول (۲۵µg)، سپروفلوکساسین (۵µg) و پپراسیلین/تازوباکتام (۱۰۰/۱۰µg) انجام شد. بدین صورت که ابتدا محیط مولر هیتون (مرک آلمان) آگار تهیه و pH آن بین ۷/۴-۷/۲ تنظیم گردید.

سوسپانسیون میکروبی استاندارد براساس ۰/۵ مک‌فارلند تهیه و به روش چمنی بر روی محیط مولر کشت داده شد. پس از قرارگیری دیسک‌های مذکور، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵°C انکوبه شدند، سپس نتایج براساس دستورالعمل‌های مربوطه ثبت گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از (شرکت MAST کشور انگلستان) خریداری شد. در این آزمون از سویه کنترل *E.coli* ATCC 25922 جهت کنترل انجام آزمون استفاده گردید. برای تعیین شیوع اینتگرون کلاس I از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شد. در این روش از پرایمر مخصوص نواحی محافظت‌شده ژن اینتگراز (int1) مربوط به اینتگرون کلاس I:

IntR, 5'-GTCAAGGTTCTGGACCAGTTGC

IntF, 5'-ATCATCGTCGTAGAGACGTCGG

استفاده شد (۱۸). پرایمرها توسط شرکت ژن فناوری به شرکت ماکروژن کره ارسال و ساخته شدند که با تکثیر ژن مورد نظر و در نهایت الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز، حضور و یا عدم حضور آن مشخص گردید. ابتدا استخراج DNA توتال تمامی ایزوله‌ها با استفاده از روش جوشاندن (Boiling) انجام گرفت؛ بدین صورت که ۲ یا ۳ کلنی از کشت ۲۴ ساعته باکتری در ۰/۵ml آب مقطر استریل حل شده و سپس سوسپانسیون در بن‌ماری جوش به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. در ادامه، پس از سانتریفوژ در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، از محلول رویی به‌عنوان DNA الگو استفاده گردید. در این مرحله پس از انجام استخراج، برای اطمینان از وجود DNA، دستگاه نانودراپ (Tthermo Fisher Scientific ساخت کشور آمریکا) در دو طول موج ۲۶۰/۲۸۰nm به کار برده شد.

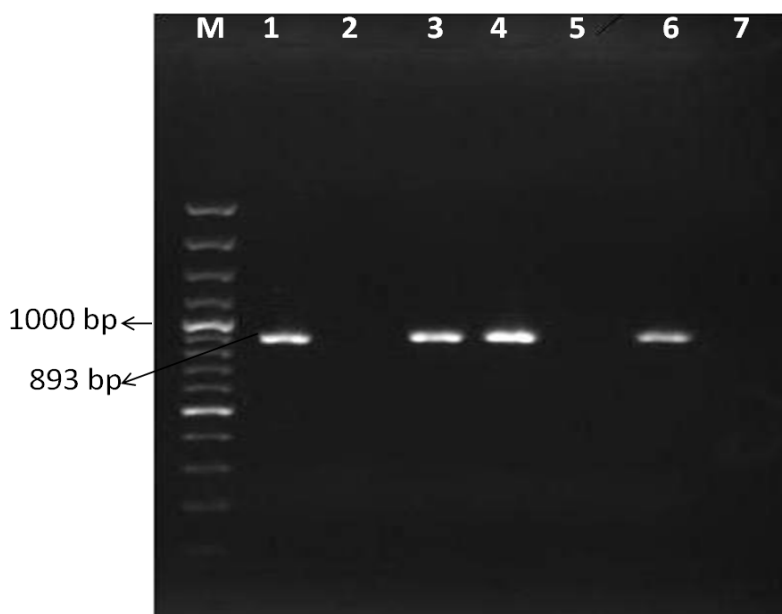
واکنش PCR در حجم ۲۵µl انجام شد. هر واکنش PCR شامل: ۲۰۰µM dNTP، ۱۰pM از هر پرایمر، ۱/۵mM/L MgCL₂، ۰/۵ واحد آنزیم Taq و ۵۰ng DNA الگو می‌باشد. تکثیر ژن اینتگرون کلاس I (Int) تحت شرایط زیر با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر (Applied Biosystems ساخت کشور آمریکا) انجام گرفت. دمای دناتوراسیون اولیه (۹۶°C) به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل: دمای دناتوراسیون (۹۴°C) به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمر (۵۵°C) به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر (۷۲°C) به مدت ۱ دقیقه و در پایان دمای تکثیر نهایی (۷۲°C)

(۱۵٪)، زخم (۱۱٪)، خلط (۶٪) و برونکو آلوئولار لایاژ (۶٪)، کاتتر (۵٪) و مایع مغزی - نخاعی (۲٪) تهیه شد. با بررسی اطلاعات بیماران مشخص گردید ۵۸٪ از بیماران از جنس مرد و ۴۲٪ بیماران از جنس زن بوده‌اند. بیماران در محدوده سنی ۹۰-۱۶ سال قرار داشتند که میانگین سنی آنها 52 ± 19 سال بود. با انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک آگار دیفیوژن، مشخص گردید ۶۲ ایزوله، الگوی مقاومت دارویی چندگانه داشته‌اند و به کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی بتالاکتام، آمینوگلیکوزید و کینولون مقاومت دارویی کامل یا حد واسط نشان داده‌اند. از این تعداد، ۱۶ ایزوله (۲۶٪) به ایمنی‌پنم مقاومت کامل، ۱۲ ایزوله (۱۹٪) مقاومت متوسط و ۳۴ ایزوله (۵۵٪) حساسیت نشان دادند. همچنین مشخص گردید از بین ارگانسیم‌هایی با مقاومت دارویی چندگانه، ۱۴ ایزوله (۲۳٪) به مروپنم مقاومت کامل، ۱۳ ایزوله (۲۱٪) مقاومت متوسط و ۳۵ ایزوله (۵۶٪) حساسیت داشته‌اند. با انجام آزمون PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اینتگرون کلاس I بر روی ۱۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا، مشخص گردید در مجموع، ۴۱ ایزوله دارای اینتگرون کلاس I می‌باشد. همچنین از مجموع ۶۲ ایزوله با الگوی مقاومت دارویی چندگانه، ۳۶ ایزوله (۵۸٪) از نظر حضور اینتگرون کلاس I مثبت بودند (شکل).

به مدت ۱۰ دقیقه) بود (۱۸). محصولات PCR از نظر حضور ژن‌های مورد نظر با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و پس از رنگ‌آمیزی با سایبرگرین بررسی شدند. برای اطمینان از صحت انجام آزمایش، از سویه کنترل سودوموناس آئروژینوزا تأییدشده حاوی اینتگرون کلاس I به‌عنوان کنترل مثبت و *E. coli* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. همچنین برای کنترل انجام آزمون PCR، از میکروتیوب‌های حاوی مواد واکنش بدون DNA الگو استفاده شد. در ادامه، ارتباط مابین حضور اینتگرون کلاس I و مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به داروهای به کار رفته در این مطالعه، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون مجذور کای دو مورد بررسی قرار گرفت. سطح معنی‌داری، کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۱۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا پس از انجام آزمون‌های استاندارد آزمایشگاهی و میکروب‌شناسی انتخاب شدند. نمونه‌های بالینی از بیماران بستری در بخش‌های ICU (۴۴٪)، داخلی (۲۸٪)، جراحی اعصاب (۱۰٪)، عفونی (۱۰٪)، جراحی (۴٪) و اعصاب (۴٪) به ترتیب جمع‌آوری شد. این ایزوله‌ها به ترتیب از نمونه خون (۳۰٪)، ترشه (۱۷٪)، ادرار



شکل: نتایج الکتروفورز PCR ژن اینتگرون کلاس I. ستون M: مارکر 100bp، ستون ۱: نمونه کنترل مثبت از نظر حضور ژن Int؛ ردیف ۲: نمونه بالینی منفی از نظر حضور ژن Int؛ ردیف ۳، ۴ و ۶: نمونه بالینی مثبت از نظر حضور ژن Int؛ ردیف ۵: نمونه بالینی منفی از نظر حضور ژن Int و ردیف ۷: کنترل آزمون PCR (واکنش بدون DNA الگو)

ایزوله‌های دارای اینتگرون اغلب از بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه (۱۴٪) و داخلی (۱۱٪) جدا شدند (جدول شماره ۱). همچنین این ایزوله‌ها غالباً از نمونه‌های خون (۲۰٪) و زخم (۹٪) جداسازی شدند. (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱: فراوانی ایزوله‌های حاوی اینتگرون کلاس I در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بخش‌های بالینی بیمارستان‌های مورد مطالعه

بخش	عفونی	اعصاب	جراحی اعصاب	جراحی داخلی	داخلی	مراقبت ویژه	مجموع
ایزوله‌های دارای اینتگرون	۴	۲	۸	۲	۱۱	۱۴	۱
ایزوله‌های فاقد اینتگرون	۶	۲	۲	۲	۱۷	۳۰	۵۹
مجموع	۱۰	۴	۱۰	۴	۲۸	۴۴	۱۰۰

جدول شماره ۲: فراوانی ایزوله‌های حاوی اینتگرون کلاس I در سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی

نوع نمونه	مایع مغزی- نخاعی	کاتتر تراشه	خلط زخم	BAL*	خون	ادرار	مجموع
ایزوله‌های دارای اینتگرون	۲	۱	۲	۲	۹	۵	۴۱
ایزوله‌های فاقد اینتگرون	۰	۳	۱۵	۴	۳	۱۸	۵۹
مجموع	۲	۴	۱۷	۶	۱۲	۳۸	۱۰۰

*Broncho-alveolar lavage

تیکارسیلین/کلاولانیک اسید، کاربنی‌سیلین، فلوکساسین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، ایمپی‌پنم، مروپنم، آزترونام، لوفلوکساسین، تری‌متوپریم-سولفومتوکسازول، سیپروفلوکساسین و پیراسیلین / تازوباکتام مشاهده گردید (جدول شماره ۳).

براساس نتایج انجام آزمون آماری مجذور کای دو، ارتباط معنی‌داری ($p < 0.001$) بین حضور اینتگرون کلاس I و الگوی مقاومت دارویی چندگانه مشاهده شد. همچنین ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون کلاس I و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، توبرامایسین،

جدول شماره ۳: الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا براساس دارا بودن اینتگرون کلاس I

pvalue	ایزوله‌های دارای اینتگرون			ایزوله‌های فاقد اینتگرون			آنتی‌بیوتیک
	مقاوم	متوسط	حساس	مقاوم	متوسط	حساس	
۰/۰۱۱	۲۲	۱۲	۷	۲۲	۱۰	۲۷	آزترونام
۰/۰۰۲	۳۵	۰	۶	۳۳	۰	۲۶	سیپروفلوکساسین
۰/۰۰۷	۳۵	۰	۶	۳۳	۲	۲۴	جنتامایسین
<۰/۰۰۱	۱۷	۰	۲۴	۵	۰	۵۴	پیراسیلین/تازوباکتام
<۰/۰۰۱	۱۴	۱۰	۱۷	۶	۲	۵۱	ایمپی‌پنم
<۰/۰۰۱	۱۱	۱۲	۱۸	۶	۲	۵۱	مروپنم
۰/۰۱۴	۳۲	۱	۸	۲۹	۳	۲۷	کوتریموکسازول
۰/۱۱	۰	۵	۳۶	۰	۳	۵۶	آمیکاسین
۰/۰۰۱	۳۵	۴	۲	۳۵	۲	۲۲	کاربنی‌سیلین
۰/۰۰۱	۳۵	۰	۶	۳۱	۰	۲۸	تیکارسیلین/کلاولانیک اسید
۰/۰۰۲	۳۵	۰	۶	۳۳	۰	۲۶	لوفلوکساسین
۰/۰۱۳	۳۳	۰	۸	۳۱	۲	۲۶	توبرامایسین
۰/۰۰۱	۳۷	۰	۴	۳۳	۴	۲۲	افلوکساسین
<۰/۰۰۱	۳۳	۰	۸	۱۳	۰	۴۶	پیراسیلین
۰/۰۴۵	۲۵	۰	۱	۲۵	۲۵	۹	سفوتاکسیم
۰/۰۴۸	۱۷	۰	۲۴	۱۷	۰	۴۲	سفتازیدیم

بحث

سودوموناس آئروژینوزا با الگوی مقاومت دارویی چندگانه در سالهای اخیر افزایش روزافزونی داشته و مشکلات فراوانی نیز برای پزشکان بالینی، میکروب‌شناسان و متخصصین کنترل عفونت ایجاد کرده است. یکی از دلایل مهم در بروز و انتقال ژن‌های مقاومت، وجود عناصر سیار ژنتیکی در ایزوله‌های مقاوم می‌باشد. بخش عمده‌ای از ژن‌های مقاومت از جمله بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs)، متالوبتالاکتامازها و بخش عمده‌ای از ژن‌های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها، بر روی یکی از مهم‌ترین عناصر سیار ژنتیکی - اینتگرون‌ها حضور دارند. اینتگرون کلاس I در باکتری‌های گرم منفی از شیوع بالایی برخوردار بوده و به سبب قابلیت پذیرش کاست‌های مختلف مقاومت دارویی، مقدمات مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های عمده مصرفی در بیمارستان‌ها از جمله داروهای بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها و کلرامفنیکل را فراهم می‌سازد (۵، ۱۰).

براساس نتایج حاصل از این مطالعه، در مجموع ۴۱٪ از ایزوله‌ها دارای اینتگرون کلاس I بودند. همچنین ۶۲ ایزوله الگوی مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند که در این میان ۳۶ ایزوله (۵۸٪) از نظر حضور اینتگرون کلاس I مثبت بود. نتایج این مطالعه در مقایسه با سایر مطالعات از نظر شیوع اینتگرون کلاس I، آمار متفاوتی را نشان داد، به‌طوری‌که در مقایسه با برخی از مطالعات، این آمار کمتر بود. در مطالعه‌ای که توسط Nikokar و همکاران در رشت (سال ۲۰۱۳) انجام شد در مجموع، ۴۳٪ از ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا از نظر حضور اینتگرون کلاس I مثبت بود (۱۹). Xu و همکاران نیز (سال ۲۰۰۹) در چین نشان دادند ۴۵/۸٪ از ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا از نظر حضور اینتگرون کلاس I مثبت می‌باشد (۲۰). Poonsuk و همکاران (سال ۲۰۱۲) با بررسی حضور اینتگرون کلاس I در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا در تایلند گزارش کردند در مجموع، ۶۹/۳٪ از ایزوله‌ها حاوی اینتگرون کلاس I بوده‌اند (۲۱). همچنین در مقایسه با برخی از مطالعات این نتیجه از آمار بالاتری برخوردار بود، به‌طوری‌که در مطالعه Chen و همکاران در چین (سال ۲۰۰۷)، مشخص گردید ۳۸٪ از ایزوله‌ها از نظر حضور اینتگرون کلاس I مثبت بوده‌اند (۲۲).

از مجموع ۴۱ ایزوله دارای اینتگرون، ۳۶ ایزوله (۸۸٪) الگوی مقاومت دارویی چندگانه نشان دادند. نتایج این مطالعه با یافته‌های دیگر مطالعه‌ای که در این زمینه انجام شد همخوانی داشت. در این راستا، مطالعه Xu و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد ۹۳/۲٪ از ایزوله‌های حاوی اینتگرون کلاس I، الگوی مقاومت دارویی چندگانه داشته‌اند که بر نقش قابل توجه این عناصر سیار ژنتیکی در بروز و انتقال فاکتورهای مختلف مقاومت دارویی و ایجاد الگوی مقاومت دارویی چندگانه دلالت دارد (۲۰). در مطالعه حاضر اکثر ایزوله‌ها حاوی اینتگرون، از بخش ICU جداسازی شدند که در مقایسه با نتایج اکثر مطالعات انجام‌شده در این زمینه، همخوانی داشت. به نظر می‌رسد بستری طولانی مدت بیماران در این بخش، وخیم‌بودن حال بیماران، به کار بردن ابزارهای تهاجمی درمانی از قبیل تراشه و کاتتر، مواجهه بودن بیماران با آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف و در نهایت نبود ابزارها و راهکارهای مناسب کنترل عفونت می‌تواند از دلایل عمده شیوع ارگانسیم‌های مقاوم در این بخش باشد (۱۰).

در مطالعه حاضر مشخص گردید ارتباط معنی‌داری بین مقاومت به داروهای بتالاکتام و حضور اینتگرون کلاس I وجود دارد که در مقایسه با سایر تحقیقات انجام‌شده در این زمینه، ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون کلاس I و مقاومت به سفالوسپورین‌ها مشاهده گردید. در مطالعه‌ای که توسط Chen و همکاران در چین (سال ۲۰۰۹) انجام شد با بررسی ۷۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا در این زمینه مشخص گردید ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون در ایزوله‌های مورد بررسی و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و سفپیم وجود دارد (۲۲). در مطالعه Nikokar و همکاران در ایران نیز ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون کلاس I و مقاومت به داروهای بتالاکتام از جمله سفتازیدیم و پپراسیلین نشان داده شد (۱۹). همچنین در مطالعه‌ای که توسط GU و همکاران (سال ۲۰۰۷) در این زمینه انجام شد با بررسی بیشتر الگوی مقاومت دارویی در دو گروه حاوی و فاقد اینتگرون کلاس I مشخص گردید اختلاف معنی‌داری بین حضور اینتگرون و بروز مقاومت دارویی، به‌ویژه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام وجود دارد، به‌طوری‌که ایزوله دارای اینتگرون به‌طور معنی‌داری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های

پیپراسیلین، پیپراسیلین - تازوباکتام، سفتازیدیم، سفپیم، آزترونام، ایمینم مقاومت بالاتری داشته است (۲۳). البته براساس مطالعات انجام شده در این خصوص مشخص شده است بخش عمده‌ای از ژن‌های بتالاکتاماز توسط اینتگرون کلاس I انتقال می‌یابند. ژن‌های بتالاکتامازهای تیپ OXA و متالوبتالاکتامازها و برخی از بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) با قرارگیری بر روی کاست‌های ژنی توسط اینتگرون کلاس I انتقال می‌یابند که در نهایت، مقدمات مقاومت دارویی نسبت به طیف وسیعی از داروهای بتالاکتاماز از جمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف، پنی‌سیلین‌ها، ترکیبات مهارکننده بتالاکتامازها و حتی کرباپنم‌ها را فراهم می‌سازند (۲۴). همچنین در مطالعه حاضر مشخص گردید ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون کلاس I و مقاومت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزیدها وجود دارد که نتایج حاصل از آن با نتایج سایر مطالعات مشابه انجام شده در این زمینه همخوانی داشت. به‌طوری‌که در مطالعه Chen و همکاران (سال ۲۰۰۹) نشان داده شد ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون کلاس I و مقاومت ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا به داروهای خانواده آمینوگلیکوزید وجود دارد (۲۲). در مطالعه Gu و همکاران (سال ۲۰۰۷) نیز نتایج مشابهی به دست آمد بدین ترتیب که در این مطالعه ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا حاوی اینتگرون در مقایسه با ایزوله‌های بدون اینتگرون به میزان معنی‌داری در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزید مقاومت نشان دادند (۲۳). ارتباط بین مقاومت به حضور اینتگرون کلاس I و مقاومت به داروهای خانواده آمینوگلیکوزیدها خیلی دور از انتظار نیست؛ چراکه براساس مطالعات انجام شده در این زمینه، مشخص شده است بخش عمده‌ای از ژن‌های ژنی مقاوم آمینوگلیکوزیدها از جمله (ژن‌های acc و aad) بر روی اینتگرون کلاس I انتقال می‌یابند (۲۴). در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون کلاس I و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده کینولون‌ها مشاهده شد. نتایج این مطالعه با یافته‌های سایر تحقیقات انجام شده در این زمینه همخوانی داشت، به‌طوری‌که در مطالعه

Chen و همکاران (سال ۲۰۰۹)، Xu و همکاران (سال ۲۰۰۷) نیز همین نتیجه گزارش شد (۲۲، ۲۰). براساس مطالعات انجام شده در خصوص مکانیسم مقاومت به کینولون‌ها مشخص شده است مقاومت به کینولون‌ها غالباً به واسطه جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های کروموزومی اتفاق می‌افتد و در سالهای اخیر نیز مقاومت نسبت به این داروها به واسطه ژن‌های پلاسمیدی qnr که از سراسر جهان شناسایی شده است، می‌باشد (۲۵). اما در سالهای اخیر گزارشهایی مبنی بر نقش اینتگرون‌ها و پلاسمیدهای وابسته وجود دارد که با کد کردن پروتئین‌ها باعث افزایش نفوذپذیری سلول‌ها در برابر داروهای بتالاکتام و کینولون می‌شوند. لذا با در نظر گرفتن نقش اینتگرون‌ها در بروز مقاومت به کینولون‌ها، نیاز به انجام مطالعات بیشتر ضروری است (۲۶).

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آمار قابل توجه حضور اینتگرون کلاس I در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های مورد بررسی می‌باشد. با توجه به نقش حضور اینتگرون کلاس I، در انتشار فاکتورهای مختلف مقاومت دارویی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مهمی از جمله داروهای بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها و تتراسایکلین، لزوم توجه بیشتر به آنها ضروری است. در عین حال، به سبب ماهیت سیار اینتگرون‌ها و چرخش آن بین گونه‌های مختلف باکتری‌های دخیل در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی، به کارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت و راهکارهای مناسب درمانی برای جلوگیری از انتشار بیشتر آنها ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین بابت حمایت مالی این طرح (به شماره ۹۰/۴۳۷) قدردانی می‌شود.

References:

1. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2000 Jul; 2(9):1051-60.
2. Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C. *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients. *Intensive Care Med* 2007 Jul; 33(7):1155-61.
3. Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr Opin Infect Dis* 2005 Aug; 18(4):306-13.
4. Sarlangue J, Brissaud O, Labrèze C. Clinical features of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Arch Pediatr* 2006 Oct; 13(Suppl 1):S13-6.
5. Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2005 Jul; 11(Suppl 4):17-32.
6. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Jan; 50(1):43-8.
7. Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat* 2000 Aug; 3(4):247-255.
8. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2001 Mar; 47(3):247-50.
9. Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 May; 43(5):1085-90.
10. Severino P, Magalhães VD. The role of integrons in the dissemination of antibiotic resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an intensive care unit in Brazil. *Res Microbiol* 2002;153:221-6.
11. Poirel L, Gerome P, De Champs C, Stephanazzi J, Naas T, Nordmann P. Integron-located oxa-32 gene cassette encoding extended-spectrum variant of OXA-2 β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Feb; 46(2):566-9.
12. Yatsuyanagi J, Saito S, Harata S, Suzuki N, Ito Y, Amano K, et al. Class 1 integron containing metallo- β -lactamase gene blaVIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Feb; 48(2):626-8.
13. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: Capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 1995 Feb; 15(4):593-600.
14. Rowe-Magnus DA, Mazel D. Role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol* 2002 Jul; 292(2):115-25.
15. Severino P, Magalhães VD. Integrons as tools for epidemiological studies. *Clin Microbiol Infect* 2004 Feb; 10(2):156-62.
16. Hall GS. Nonfermenting and miscellaneous Gram negative bacilli. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G: *Textbook of diagnostic microbiology*. 3rd ed. Ohio: Saunders-Elsevier; 2007. p. 564-84.
17. Clinical and Laboratory Standard Institute. (2011). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard M2-A9. Wayne, PA.
18. Reyes A, Bello H, Domínguez M, Mella S, Zemelman R, González G. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant enterobacteriaceae from several Chilean hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2003 Feb; 51(2):317-21.

19. Nikokar I, Tishayar A, Flakiyan Z, Alijani K, Rehana-Banisaheed S, Hossinpour M, et al. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from burn patients in Guilan, Iran. *Iran J Microbiol* 2013 Mar; 5(1):36-41.
20. Xu Z, Li L, Shirliff ME, Alam MJ, Yamasaki S, Shi L. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in southern China. *J Clin Microbiol* 2009 Jan; 47(1):230-4.
21. Poonsuk K, Tribuddharat C, Chuanchuen R. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical samples. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2012 Mar; 43(2):376-84.
22. Chen J, Su Z, Liu Y, Wang S, Dai X, Li Y, et al. Identification and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang, China. *Int J Infect Dis* 2009 Nov; 13(6):717-21.
23. Gu B, Tong M, Zhao W, Liu G, Ning M, Pan S, Zhao W. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. *J Clin Microbiol* 2007 Jan; 45(1):241-3.
24. Weldhagen GF. Integrons and beta-lactamases-a novel perspective on resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2004 Jun; 23(6):556-62.
25. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998 Mar 14;351(9105):797-9.
26. Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Mabilat C. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist* 1995 Fall; 1(3):195-202.