مقاله پژوهشی

بررسی نقش اینتگرون کلاس ۲ در الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های اسینتوباکتر بومانی ایزوله شده از بیمارستان های شهر تهران

دکتر رضا میرنژاد* ، سپیده مستوفی** ، فرامرز مسجدیان***

دریافت : ۹۰/۴/۲۴ ، پذیرش : ۹۰/۸/۲

چکیده:

مقدمه و هدف: اسینتوباکتر بومانی که به چندین دارو مقاومت نشان می دهد، یک عامل مهم عفونت بیمارستانی در سراسر دنیا بوده و برای بهداشت عمومی تهدید می باشد. مطالعات مکانیسم های مقاومت داروئی در این باکتریها نشان داد که ژنهای مقاومت داروئی بروی اینتگرون ها قرار دارد. هدف از انجام این مطالعه، تعیین نقش اینتگرون کلاس ۲ در الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی اسینتوباکتر بومانی ایزوله شده از بیمارستان های شهر تهران بود.

روش کار: این مطالعه توصیفی ـ مقطعی در۳ بیمارستان بزرگ شهر تهران بروی ۵۰۰ نمونه کلینیکی در طی مدت ۱۰ماه (اسفند ۱۳۸۸ تا آذر ۱۳۸۹) انجام شد. در آزمایشگاه، پس از شناسائی اسینتوباکتر بومانی با استفاده از روش های کشت و بیوشیمیائی، تعیین حساسیت این باکتریها به ۱۳ آنتی بیوتیک با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و بر اساس معیار CLSI انجام شد. سپس با استفاده از پرایمرهای Int2F/R جهت بررسی انتشار ژن هایی که حاوی اینتگرون کلاس ۲ هستند، PCR انجام گردید. در نهایت ارتباط بین وجود اینتگرون کلاس ۲ و مقاومت داروئی مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: از مجموع ۵۰۰ نمونه کلینیکی، ۵۰ مورد (۷۱/۵٪) اسینتوباکتر بومانی ، ۱۲ مورد(۱۷٪) اسینتوباکتر لوفی و ۸ مورد(۱۱/۵٪) سایر گونه های اسینتوباکتر تشخیص داده شدند. در تست آنتی بیوگرام، اسینتوباکتر بومانی مقاومت بسیار بالائی نسبت به سفی پیم، سفتازیدیم، آزترونام، نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین، اوفلوکساسین و آمیکاسین نشان داد. همچنین مقاومت کمتری نسبت به ایمی پنم، جنتامیسین، آمپی سیلین- سولباکتام، پایپریسیلین- تازوباکتام مشاهده شد .مروپنم و توبرامایسین، موثرترین آنتی بیوتیک ها در این بررسی بودند. در ٤١ مورد (۸۲٪) از نمونه ها اینتگرون کلاس ۲ شناسائی شد. همچنین ارتباط معنی داری میان اینتگرون ها و مقاومت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، اوفلوکساسین، سفتازیدیم، سفپیم، آزترونام و آمیکاسین مشاهده شد.

نتیجه نهائی: نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که اینتگرون کلاس ۲ بطور وسیعی در بین اسینتوباکتر بومانی ایزوله شده در شهر تهران انتشار دارد و نقش مهمی در اکتساب مقاومت به چند دارو در این باکتری ها دارد. بنابراین مونیتورینگ مقاومت داروئی ناشی از اینتگرون ها به خصوص کلاس ۲ با استفاده از PCR ، در پروتکل های کنترل عفونت ناشی از سویه های اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو در بیمارستانهای مختلف شهر تهران دارای اهمیت می باشد.

کلید واژه ها: اسینتوباکتر بومانی / اینتگرون کلاس ۲ / مقاومت همزمان به چند دارو

مقدمه :

اسینتوباکتر بومانی یک پاتوژن فرصت طلب در حال گسترش می باشد که گروه های مختلفی از مردم، به ویژه بیماران بستری شده در بخش مراقبت های ویژه و بخش سوختگی را تحت تاثیر قرار می دهد(۳-۱) اگرچه سویه های اسینتوباکتر بومانی معمولا در خاک و آب یافت می شوند، ولی منشا سویه های اپیدمیک مقاوم به چند داروئی آن از بیمارستان می باشد و این سویه ها معمولاً از لحاظ ژنتیکی بسیار شبیه به هم هستند (۶-۳). توانایی این ارگانیسم برای دست یابی به مکانیسمهای

* استادیار میکروبیولوژی مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) (rmirnejadreza@yahoo.com)

** کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد واحد تهران شمال

*** عضو هیأت علمی گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

متفاوتی از مقاومت و نیز مقاوم شدن بعضی از سویه ها بـه تمام‌آنتی بیوتیکهای رایج قابل دسترسی و همچنـین فقـدان داروهای ضدمیکروبی جدید و موثر از مهمترین علل ایجاد کننده خطر در این باکتری می باشند(۶،۷). مطالعات مختلف نشان می دهند که اغلب سویه های اسینتوباکتر بومانی نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها مقاوم شده اند و ایـن سـویه هـای مقاوم به چند دارو به سرعت در بـین بیمـاران بـستری در بیمارسـتان در حـال گـسترش مـی باشـند(۸،۹). عناصـر متحرکی مانند پلاسمیدها، ترانسپوزون ها و اینتگـرون هـا از موثرترین عناصر ژنتیکی هستند که در اکتساب و پخش عوامل مقاومت در باکتریهای مختلف گرم منفی به خصوص سویه های اسینتوباکتر بومانی نقش دارند و در ایـن بـین، مطالعات مختلف نشان می دهند که مقاومت چند داروئـی در این باکتری ها به صورت قابل ملاحظه ای در ارتباط بـا وجود اینتگرون ها و کاست های ژنی می باشند(۱۰).

اینتگرونها توالی هائی از DNA حفاظت شده بنـامintI می باشند که ژن اینتگراز را کد می کنند و باعث انتقـال و الحاق کاست های ژنی از طریق مکانیسم هـای نـوترکیبی در جایگاه های ویژه می شـوند(۱۱). تـاکنون چهـار گـروه اصلی اینتگرون ها در باکتریهای گرم منفی و مثبت شـرح داده شده اند. تمام اینتگرون ها دارای ناحیه حفاظت شده (5'CS) و (3'CS) و حاوی ژن های intI و attI می باشـند. اینتگرونهای کلاس۱ شایع ترین اینتگرون در بین بـاکتری گرم منفی می باشند. اینتگرون ها کلاس۲ در ترانس پوزون Tn7 و مشتقات آن یافت می شـود و ناحیـه ی محافظـت شده ی '۳ آن حاوی پنج ژن tns می باشد که در متحرک کردن ترانسپوزون ها نقش دارند. اینتگرونهای کلاس سـوم و چهارم نیز گزارش شده اند ولی هنوز ناحیه ی '۳ حفاظت شده ی آن ها به خوبی بررسی نشده است(۱۰،۱۲،۱۳).

برای تشخیص حضور اینتگرونهای کلاس ۲ ، محققین به طور معمول از دو ناحیه به عنـوان نـواحی هـدف بـرای شناسائی در باکتریها استفاده کرده اند. یکی از این نـواحی ژن آنزیم اینتگراز است، که هـدف خـوبی بـرای شناسـائی اینتگرون کلاس۱ و۲ در نمونه و همچنین تشخیص کلاس اینتگرون موجود می باشد. یکی دیگر از نواحی مورد استفاده توسط اکثر محققین، ناحیه متغییـر(Variable region) در بین دو ناحیه حفظ شده در سـاختار اینتگـرون هـا اسـت. ناحیه متغیر اینتگرون ها محل قـرار گیـری کاسـت هـای ژنی می باشد، که توسط دو ناحیه حفاظت شـــده '3-CS و '5-CS احاطه شده اند. طراحی پرایمر برای ناحیه متغیر به نحوی که ناحیه اتصالی در انتهای دو منطقه حفاظت شده باشد به محققین این امکان را می دهد که از طـول ناحیـه متغیر آگاه شوند. به علت اینکه طول ناحیه متغیـر وابـسته به تعداد کاست های ژنی، اینتگره شده در این ناحیه است، محصولات PCR دارای طول های مختلفی هستند. این بـه محقق علاوه بر تشخیص کلاس اینتگرون (بر اساس اینکه پرایمر برای ناحیه متغیر کلاس ۱ یا ۲ و یـا سـایر کـلاس هـای اینتگرونـی طراحـی شـود) در شناسـائی تعـداد و تشخیص کاست های ژنی کمک می کند(۱۳-۱۰).

در قسمت های مختلف جهان مطالعاتی جهت تعیـین میزان شیوع کلاس های مختلف اینتگرون ها و ارتباط آنها با مقاومـت داروئـی در ایزولـه هـای مختلـف بیمارسـتانی اسینتوباکتر بومانی انجام شده است(۱۱). بـه دلیـل اینکـه تاکنون در ایران میزان شـیوع کـلاس ۲ اینتگـرون هـا بـه خصوص در اسینتوباکتر بومانی مشخص نمـی باشـد، ایـن مطالعه با هدف تعیین میزان شیوع اینتگـرون کـلاس ۲ و ارتباط حضور آنها با مقاومت داروئی در ایزوله های مختلف بیمارستانی اسینتوباکتر بومانی در شهر تهران انجام گردید.

روش کار:

ایزوله های باکتریایی: این مطالعه توصیفی ـ مقطعی در۳ بیمارستان بزرگ شهر تهران (امام خمینی، بقیه ا...(عج) و میلاد) بروی ۵۰۰ نمونه کلینیکـی در طـی مـدت ۱۰مـاه (اسفند ۱۳۸۸ تا آذر ۱۳۸۹) انجام شد. در آزمایشگاه ۵۰ ایزوله اسینتوباکتر بومانی از ۱۹ کشت خون، ۱۵ نمونـه از تراشه،۶ نمونه از سوآب های زخم، ۴ نمونه از ادرار و ۵ نمونه نیز که منشا نامعلوم داشتند جمع آوری شدند. همـه ایـن ایزوله ها توسط روشهای متداول بیوشیمیایی و میکروسکوپی شناسـائی شـدند (جـدول ۱). ایزولـه هـا در ۸۰- درجـه سلسیوس در نوترینت براث که حاوی ۵۰٪ گلیـسرول بـود تا زمان انجام کارهای مولکولی نگهداری شدند.

جدول ۱: فراوانی سویه های اسینتوباکتر بومانی بر حسب نوع نمونه بالینی

نوع نمونه	تعداد	درصد
خون	۱۹	۳۸
تراشه	۱۵	۳۰
زخم	۶	۱۲
ادرار	۴	۸
دهان	۱	۲
نمونه های با منشا نامعلوم	۵	۱۰

پروفایل آنتی بیوتیکی: حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هینتون اگـار بـا توجـه بـه دسـتورالعمل هـای سـال ۲۰۱۰ CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجـام شد(۱۴). لازم بذکر است از سـویه اسـتاندارد اشرشـیاکلی ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی کیفیت آنتی بیوگرام و سویه استاندارد اسـینتوباکتر بومـانی ATCC 19606 بـه عنوان کنترل مثبت کیفیت آنتی بیوگرام استفاده شد.

آنتی بیوتیک های (شـرکت Himedia تهیـه شـده از کشور هندوسـتان) مـورد بررسـی شـامل آمپـی سـیلین- سولباکتام (۱۰/۱۰ میکروگرم)، آزترونـام (۳۰ میکروگـرم)، آمیکاسـین (۳۰ میکروگـرم)، سـفپیم (۳۰ میکروگـرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، ایمـی پـنم (۱۰ میکروگـرم)، مـروپنم (۱۰ میکروگـرم) ، نورفلوکـساسین (۱۰ میکروگـرم)، اوفلوکـساسین (۱ میکروگـرم)، سیپروفلوکـساسین (۵ میکروگـرم)، پیپراسـیلین- تازوباکتـام (۱۰/۱۰۰ میکروگـرم) و توبرامایسین (۱۰ میکروگرم) بودند. لازم بذکر است طبـق مطالعات انجام گرفته ، ایزوله های اسینتوباکتر بومانی که به سه یا بیش از سه رده آنتـی بیـوتیکی شـامل کینولونهـا (سیپروفلوکـساسین)، سفالوسـپورینهای وسـیع الطیـف (سفتازیدیم و سـفی پـیم)، ترکیـب بتالاکتـام/مهارکننـده بتالاکتاماز (آمپی سـیلین/سـولباکتام)، آمینوگلیکوزیـدها (آمیکاسین و توبرامایسین)، و کاربـاپنم هـا (ایمـی پـنم و مروپنم) مقاومت نشان دادند، به عنوان سویه های مقاوم به چند دارو (MDR) تعریف گردیدند.

آنالیز اینتگرون ها: ژنوم تمام ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با استفاده از کیت high pure PCR template Preparation Kit (ساخت شرکت Roche کشور آلمان) استخراج شدند. واکنش PCR در حجم نهائی ۳۰µL در نظر گرفته شد. هر نمونـه شـامل: 2X Master mix ۱۵µL (سـاخته کمپـانی Ampliqon III کـشور دانمـارک) حـاوی۲۰mM dNTP ، 1.5mM $MgCl_2$، DNA ۱ µgr الگو، ۲۰pmol از هر پرایمر R و F و آب مقطر دوبار تقطیر استریل تا حجم۳۰ µL بود. در ایـــن مطالعـــه هماننـــد مطالعـــه کـــولمن بـــرای بررسـی انتـشار ژن هـایی کـه حـاوی اینتگـرون بودنـد از پرایمرهـای اولیگونوکلئوتیـدی 5'Cs و 3'Cs اسـتفاده شـد همچنـین از پرایمـر Int2F/R بـرای شناسـایی اینتگـرون کلاس۲ استفاده گردید(۱۵) و پرایمرهای Int2F/R بـــرای آمپلی فای کردن قطعه با انـدازه ۲۸۸ جفـت بـازی مـورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲).

جدول ۲: توالی پرایمرها

پرایمرها	سکانس نوکلئوتیدها ('۵ به سمت '۳)
5`-CSa	GGC ATC CAA GCA GCA AG
3`-CSa	AAG CAG ACT TGA CCT GA
Int2F	TTG CGA GTA TCC ATA ACC TG
Int2R	TTA CCT GCA CTG GAT TAA GC

فرایند PCR در دستگاه ترموسـایکلر شـامل ۵ دقیقـه ۹۵ درجه سلسیوس ، بدنبال آن ۳۰ سـیکل ۳۰ ثانیـه در ۹۴ درجه سلسیوس ، ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه سلسیوس مرحله Annealing و ۳۰ ثانیـه در ۷۲ درجـه سلـسیوس و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام گرفت. تمـام آزمایشات بر روی محصولات PCR دوبار تکرار شدند.

بـرای بررسـی محـصولات PCR از الکتروفـورز در ژل آگاروز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی DNA با رنگ اتیـدیوم برمایـد انجام شد. ژلها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایـت محـصول اینتگـرون کلاس ۲ از جهت وجود ژن های IntI2 تعیین توالی شدند.

در مواردی که نیـاز بـه بررسـی ارتبـاط میـان الگـوی مقاومت آنتی بیوتیکی و ژنوتیـپ اینتگـرون مثبـت بـود از تست های آمـاری نظیـر مجـذور کـای اسـتفاده شـد کـه P.value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان داده آماری معنـی دار در نظر گرفته شد.

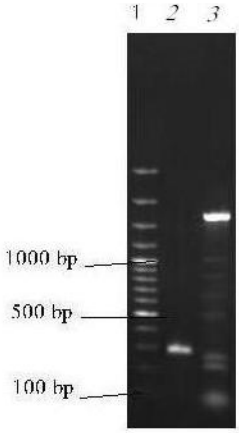
نتایج:

از مجموع ۵۰۰ نمونه مورد بررسی، ۷۰ مـورد(۱۴٪)، اسینتوباکتر شناسائی شد که از این تعداد۵۰ مورد(۷۱/۵٪) اسینتوباکتر بومانی، ۱۲ مورد (۱۷٪) اسینتوباکتر لوفی و ۸ مورد (۱۱/۵٪) سایر گونه های اسینتوباکتر بـود. در میـان سویه های اسینتوباکتر بومانی، ۸۲٪ ، مقاومت به چند دارو داشتند. از بین آنتی بیوتیک های مورد بررسـی، سـفپیم و سفتازیدیم مقاوم ترین (۱۰۰٪) گزارش شده اند در حـالی که آمپی سیلین ـ سولباکتام کمتر مقاوم بوده اند(جدول۳).

نتـایج ایـن مطالعـه نـشان داد کـه ۲۷ نمونـه (۵۴٪) اسینتوباکتربومانی نسبت به ۳ یا بیش از ۳ آنتـی بیوتیـک مقـاوم هـستند و ۱۶ نمونـه (۳۲٪) بـه دو آنتـی بیوتیـک مقاومت نشان دادند. هم چنین در ایـن مطالعـه مـشخص گردید که هیچ سویه ای از اسینتوباکتر بومـانی مقـاوم بـه همه آنتی بیوتیک ها نبودند و آنتـی بیـوتیکی وجـود دارد که بروی آن موثر باشد.

جدول ۳: درصد مقاومت مشاهده شده در بین سویه های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران

	تعداد ایزوله های مقاوم اسینتوباکتر بومانی	مقاومت (درصد)
سفپیم	۵۰	۱۰۰
سفتازیدیم	۵۰	۱۰۰
آزترونام	۴۹	۹۸
نورفلوکساسین	۴۸	۹۶
اوفلوکساسین	۴۶	۹۲
سیپروفلوکساسین	۴۶	۹۲
آمیکاسین	۴۵	۹۰
ایمی پنم	۳۹	۷۸
جنتامیسین	۳۲	۶۴
آمپی سیلین-سولباکتام	۳۱	۶۲
پیپراسیلین-تازوباکتام	۲۴	۴۸
مروپنم	۲۲	۴۴
توبرامایسین	۱۴	۲۸



شکل۱: الکترفورز ژل آگاروز محصول آمپلی فای شده ژن اینتگرون با PCR . ردیف ۱ مارکر (100bp DNA ladder, SM#333)، ردیف ۲ از نظر اینتگرون کلاس 2 مثبت می باشد و ردیف ۳ محصولات امپلی فای شده ژن اینتگرون با پرایمر CS را نشان می دهد.

نتایج PCR با استفاده از ژن های IntI2 نشان داد که ۴۱/۵۰ (۸۲٪) از ایزوله ها دارای اینتگرون کلاس ۲ بودند. هم چنین نتایج این مطالعه نشان داد که اینتگرونهای با کاست های ژنی متفاوت در ۴۴/۵۰ (۸۸٪) از ایزوله ها یافت شد که دارای ۸ باند با اندازه های ۲۲۰،۵۲۰،۷۵۰،۱۰۳۱،۱۲۵۰،۱۶۰۰،۲۲۰۰،۳۰۰۰ جفت باز بودند (شکل ۱).

در این مطالعه ارتباط وجود اینتگرون ها با حساسیت به ۱۳ آنتی بیوتیک در سویه های اسینتوباکتر بومانی مورد بررسی قرار گرفت. جدول ۴ حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های اسینتوباکتر بومانی دارا و فاقد اینتگرون کلاس ۲ را نشان می دهد. با توجه به این جدول بین حضور اینتگرون کلاس ۲ و مقاومت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، اوفلوکساسین، سفپیم، سفتازیدیم، نورفلوکساسین و آمیکاسین و آزترونام ارتباط معنی داری از لحاظ آماری وجود دارد، بطوریکه سویه های دارای اینتگرون کلاس ۲ نسبت به سویه های فاقد اینتگرون مقاومت بیشتری به آنتی بیوتیک ها از خود نشان می دهند. در مورد آنتی بیوتیک ها نظیر جنتامایسین، پیپراسیلین- تازوباکتام، ایمی پنم، مروپنم، آمپی سیلین- سولباکتام و توبرامایسین و حضور اینتگرون ها ارتباط معنی داری مشاهده نشد.

جدول ۴: حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های اسینتوباکتر بومانی دارا و فاقد اینتگرون کلاس ۲

Antimicrobial agents	Total n=50 , R(%)	Integron negative Class II (n=9)			Integron positive Class II (n=41)			P value
		R	I	S	R	I	S	
Meropenem	22 (44)	41.3	27.5	31.2	47.6	19	33.3	Ns
Tobramaycin	14 (28)	20.6	20.6	58.6	38	14.2	42.8	Ns
Ampicilin-Sulbactam	31 (62)	51.7	31	17.2	76.1	19	4	Ns
Imipenem	39 (78)	72.4	17.2	10.3	85.7	4	9	Ns
Azetronam	49 (98)	96.5	3.4	6	100	0	0	0.05
Amikacin	45 (90)	89.6	3.4	6	90.4	4	4	0.05
PipercilinTazobactam	24 (48)	41.3	34.4	24.1	57.1	33.3	9	Ns
Ceftazidim	50 (100)	100	0	0	100	0	0	0.05
Norfloxacin	48 (96)	93.1	0	6.8	100	0	0	0.05
Cefepim	50 (100)	100	0	0	100	0	0	0.05
Ofloxacin	46 (92)	89.6	3.4	6.8	95.2	4.7	0	0.05
Gentamycin	32 (64)	62	0	37.9	66.6	0	33.3	Ns
Ciprofloxacin	46 (92)	86.2	0	13.7	100	0	0	0.05

بحث:

امروزه گسترش ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی از طریق ساختارهای اینتگرونی با ایجاد مقاومت های آنتی بیوتیکی چندگانه، به مشکل مهمی در درمان عفونت های حاصل از اسینتوباکترها تبدیل شده اند(۹،۱۰).

یافته های این مطالعه همانند مطالعات بایوگا و یوشی نشان داد که مقاومت آنتی بیوتیکی بدلیل مصرف بی رویه داروها در سویه های اسینتوباکتر بومانی به صورت جدی در حال افزایش است، بطوریکه ۸۲٪ از ایزوله های اسینتوباکتر بومانی مورد بررسی در این مطالعه، فنوتیپ مقاومت به چند دارو (MDR) را دارا بودند. آنان در مطالعات خود میزان جداسازی سویه های اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو را حدود ۴۵٪ تا ۷۵٪ گزارش کردند(۱۶،۱۷).

در مطالعه حاضر بیشترین الگوی مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفپیم، سفتازیدیم، آزترونام، نورفلوکساسین، اوفلوکساسین، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین مشاهده شد و توبرامایسین، مروپنم و پیپراسیلین- تازوباکتام موثرترین آنتی بیوتیک ها برعلیه سویه های اسینتوباکتر بومانی بودند که با نتایج مطالعه آیان و همکارانش در مورد آنتی بیوتیک های سفپیم، سفتازیدیم و آزترونام و آمپی سیلین- سولباکتام(۱۸) و نتایج مطالعه وانگ و همکارانش در مورد آنتی بیوتیک های آزترونام، سفتازیدیم، سفپیم و سیپروفلوکساسین(۱۹) و نیز با مطالعات رهبر و همکارانش که طی سال های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۶ در ایران انجام شد در مورد آنتی بیوتیک های سفتازیدیم، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین تا حد زیادی مطابقت دارد(۲۰).

در مطالعه حاضر، همانند مطالعات کولمن(۱۵)، گونزالس (۲۱)، پلوی (۲۲) و همکارانشان از دو نوع PCR متفاوت برای جداسازی اینتگرون ها با کاست های ژنی اینتگره شده در آن(با استفاده از پرایمرهای 5'Cs و 3'Cs) و جداسازی اینتگرون کلاس ۲ با استفاده از ژن IntI2 استفاده گردید. این مطالعات نشان دادند که PCR ژنهای اینتگراز دارای قدرت جداسازی و حساسیت بیشتری نسبت به PCR اینتگرون در جداسازی اینتگرون های کلاس مختلف در سویه های اسینتوباکتر بومانی می باشند.

در مطالعات مختلف در سراسر دنیا میزان شیوع اینتگرون ها در سویه های اسینتوباکتر بومانی، با استفاده از پرایمر CS بسیار متغیر بوده و از ۵٪ تا ۸۰٪ را شامل می شوند. در مطالعه حاضر با استفاده از این پرایمرها، ۸۸٪ از نمونه ها حاوی اینتگرون با اندازه بین ۲۸۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز بودند که با نتایج مطالعات رویز (۲۳)، ریبرا (۲۴) و کولمن(۱۵) که میزان جداسازی اینتگرون با اندازه های مختلف کمتر از ۳۰۰۰ جفت باز بین ۲۷/۵٪-۴۴٪ بیان نمودند، متفاوت می باشد. با توجه به اینکه پرایمرهای بکار رفته در این مطالعه با مطالعات فوق یکسان بود، لذا این تفاوت می تواند ناشی از انتشار بسیار زیاد این نوع اینتگرون ها با کاست های ژنی مختلف در سویه های اسینتوباکتر بومانی ایزوله شده از نمونه های بالینی باشد.

در مطالعه حاضر، همانند مطالعه گونزالس و همکارانش و برخلاف مطالعه کولمن و همکارانش میزان جداسازی اینتگرون کلاس ۲ بالا بود. در این مطالعه ۸۴٪ از سویه های اسینتوباکتر بومانی دارای اینتگرون کلاس ۲ بودند که بالاتر از گزارشات محققین دیگر از سراسر دنیا می باشد که میزان جداسازی اینتگرون کلاس ۲ را بین ۰-۵۲/۶٪ گزارش نموده اند. این تفاوتها می تواند ناشی از روشهای بررسی باشد(۲۹-۲۵).

همانند مطالعه کولمن و همکارانش این مطالعه نشان داد که در سویه های حاوی اینتگرون کلاس ۲ به نسبت سویه های فاقد اینتگرون مقاومت چند داروئی بالاتر می باشد که این می تواند به این دلیل باشد که کاستهای ژنی مقاوم به آنتی بیوتیک می توانند مقاومت به چندین آنتی بیوتیک را کد نمایند. در بررسی حاضر میان حضور اینتگرون ها و مقاومت به سیپروفلوکساسین، اوفلوکساسین، سفپیم، سفتازیدیم، آزترونام، آمیکاسین و نورفلوکساسین از لحاظ آماری ارتباط معنی داری مشاهده شد بطوریکه سویه های حاوی اینتگرون ها به این آنتی بیوتیک ها مقاومت بیشتری نشان دادند که این نتیجه مشابه نتایج مطالعه لین و همکارانش(۱۱) می باشد که گزارش نمودند میان حضور اینتگرون ها و مقاومت به سفپیم، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین ارتباط معنی داری وجود دارد. همچنین در مطالعه ای که توسط کولمن انجام شد ارتباط معنی داری بین حضور اینتگرون های کلاس ۲ و مقاومت به آمیکاسین، سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم مشاهده شد و همچنین ارتباط بین حضور اینتگرون ها و مقاومت به ایمی پنم و مروپنم از لحاظ آماری قابل توجیه

نبود که با مطالعه حاضر کاملا مطابقت دارد. نتایج بدست آمده از مطالعه گایور و همکارانش نیز در مورد وجود ارتباط میان حضور اینتگرون های کلاس ۲ و مقاومت به آمیکاسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین نیز(۱۲) با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مواردیکه ارتباط معنی داری میان حضور اینتگرون های کلاس ۲ و مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده نمی شود مقاومت حاصل می تواند از راههای مختلف از جمله نقص در آنزیم های اتولیتیک در دیواره سلولی و یا تحت کنترل پلاسمید و یا مقاومت تحت کنترل کروموزوم بدست آمده باشد(۳،۱۵).

نتیجه نهایی:

بطور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کلاس ۲ اینتگرون ها در بین سویه های اسینتوباکتر بومانی ایزوله شده از بیمارستانهای تهران بطور وسیعی منتشر می باشند و وجود این اینتگرون ها نقش مهمی در اکتساب مقاومت به چند دارو در این سویه ها دارند. بیشترین مقاومت در سویه های حاوی اینتگرون کلاس ۲ ، مربوط به آمینوگلیکوزیدها، سفالوسپورین ها، کینولون ها و مونوباکتام بود و در مورد سایر آنتی بیوتیک ها ممکن است مکانیسم های مقاومتی دیگری دخیل باشند. در این مطالعه صرف نظر از اینکه ژنهای مقاومت در اینتگرون ها وجود دارند یا خیر، ارتباط قوی میان وجود اینتگرون ها و کاهش حساسیت به بسیاری از گروه های آنتی بیوتیکی مشاهده شد و این می تواند نگران کننده باشد چراکه این ساختارها می توانند باعث جابجائی ژن های دخیل در مقاومت در بین سویه ها شده و آنها به آنتی بیوتیک های جدید مقاوم شوند. بنابراین مونیتورینگ مقاومت داروئی ناشی از اینتگرون ها به خصوص کلاس ۲ با استفاده از PCR ژنهای اینتگراز، در پروتکل های کنترل عفونت ناشی از سویه های اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو در بیمارستانهای مختلف ایران دارای اهمیت می باشد. هرچند که بایستی در این زمینه در بخش های مختلف این کشور مطالعات بیشتری انجام گیرد.

سپاسگزاری:

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردید، لذا از معاونت پژوهش و کارکنان آزمایشگاه بیمارستان های امام خمینی، بقیه ا...(عج) و بیمارستان میلاد جهت همکاری در انجام این تحقیق نهایت سپاسگزاری را داریم.

منابع :

1. Maragakis LL, Perl TM. Acinetobacter baumannii: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clin Infect Dis 2008; 46(8): 1254-63.
2. Nemec A. Multidrug resistant Acinetobacter baumannii. Klin Mikrobiol Infekc Lek 2008; 14(5):162-7.
3. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of Acinetobacter baumannii in health care facilities. Clin Infect Dis 2006; 42:692-99.
4. Bassetti M, Righi E, Esposito S, Petrosillo N, Nicolini L. Drug treatment for multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections. Future Microbiol 2008 ; 3(6):649-60.
5. Michalopoulos A, Falagas ME. Treatment of Acinetobacter infections. Expert Opin Pharmacother 2010; 11(5):779-88.
6. Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections. Lancet Infect Dis. 2008; 8(12):751-62.
7. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Nat Rev Microbiol 2007; 5(12):939-51.
8. Neonakis IK, Spandidos DA, Petinaki E. Confronting multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: a review. Int J Antimicrob Agents 2011; 37(2):102-9.
9. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R. Multiresistant Acinetobacter baumannii infections: epidemiology and management. Curr Opin Infect Dis 2010; 23(4):332-9.
10. Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. Annu Rev Genet 2010; 44:141-66.
11. Lin MF, Chang KC, Yang CY, Yang CM, Xiao CC, Kuo HY, et al. Role of integrons in antimicrobial susceptibility patterns of Acinetobacter baumannii. Jpn J Infect Dis 2010;63(6):440-3.
12. Gaur A, Prakash P, Anupurba S, Mohapatra TM. Possible role of integrase gene polymerase chain reaction as an epidemiological marker: study of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolated from nosocomial infections. Int J Antimicrob Agents 2007; 29(4):446-50.
13. Labbate M, Case RJ, Stokes HW. The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. Methods Mol Biol 2009; 532: 103-25.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; 20th informational supplement. CLSI/NCCLS M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute,Wayne, Pa
15. 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.
16. Bayuga S, Zeana C, Sahni J, Della-latta P, el-Sadr W, Larson E. Prevalence and antimicrobial patterns of Acinetobacter baumanii on hands and nares of hospital personnel and patients:the iceberg phenomena again. Heart Lung 2002; 31(5): 382-90.
17. Joshi SG, Litake GM, Niphadkar KB, Ghole VS. Multidrug resistant Acinetobacter baumannii isolates from a teaching hospital. J Infect Chemother 2003; 9(2): 187-90.
18. Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired Acinetobacter baumannii infection in a teaching hospital. J Hosp Infect 2003;54: 39-45
19. Wang SH, Sheng WH, Chang YY, Wang LH, Lin HC, Chen ML, et al. Healthcare- associated outbreak due to pan-drug resistant Acinetobacter baumanii in a surgical intensive care unit. J Hosp Infect 2003 ; 53(2):97-102.
20. Rahbar M, Mehrgan H, Aliakbari NH. Prevalence of antibiotic-resistant Acinetobacter baumannii in a 1000-bed tertiary care hospital in Tehran, Iran. Indian J Pathol Microbiol 2010; 53: 290-3.
21. Gonzalez, G, Sossa K, Bello H, Dominguez M, Mella S, Zemel-man R. Presence of integrons in isolates of different biotypes of Acinetobacter baumannii from Chilean hospitals. FEMS Microbiol Lett 1998; 161:125–128.
22. Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T. Molecular Characterization of Integrons in Acinetobacter baumannii, description of a hybrid class 2 integron. Antimicrob Agents Chemother 2000 ; 44(10):2684-8.
23. Ruiz J, Navia MM, Casals C, Sierra JM, Jiménez De Anta MT, Vila J. Integron-mediated antibiotic multiresistance in Acinetobacter baumannii clinical isolates from Spain. Clin Microbiol Infect 2003; 9(9):907-11.
24. Ribera A, Vila J, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Pascual A, Beceiro A, et al. Type 1 integrons in epidemiologically unrelated Acinetobacter baumannii isolates collected at Spanish hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(1):364-5.
25. Ramírez MS, Stietz MS, Vilacoba E, Jeric P, Limansky AS, Catalano M, et al. Increasing frequency of class 1 and 2 integrons in multidrug-resistant clones of Acinetobacter baumannii reveals the need for continuous molecular surveillance. Int J Antimicrob Agents 2011; 37(2):175-7.
26. D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P, Ballardini M, Bartolini S, et al. Epidemic multidrug-resistant Acinetobacter baumannii related to European clonal types I and II in Rome (Italy). Clin Microbiol Infect 2009; 15(4):347-57.
27. Koo SH, Kwon KC, Cho HH, Sung JY. Genetic basis of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates from three university hospitals in Chungcheong Province, Korea. Korean J Lab Med 2010; 30(5):498-506.
28. Kansakar P, Dorji D, Chongtrakool P, Mingmongkolchai S, Mokmake B, Dubbs P. Local dissemination of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clones in a Thai hospital. Microb Drug Resist 2011; 17(1):109-19.
29. 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):3074-82.