Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2015; 18(96): 9-18

Prevalence of Class 1 Integron and Antibiotic Resistance among *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Patients Admitted to the Burn Unit at Taleghani Hospital in Ahvaz

Seyyed Sajjad Khorramrooz[1*], Farzaneh Gharibpour[2], Najmeh Parhizgari[3], Mahboobeh Yazdanpanah[4], Reza Mohammadi[1], Nasim Rahbari[5]

1- Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.
2- Department of Pathobiology, Shiraz University, Shiraz, Iran
3- Department of Virology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4- Student Research Committee, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
5- Department of Basic Sciences, Islamic Azad University, Sciences and Research Complementaty Education Pardis of Kohgiluyeh-va-Boyerahmad, Yasouj, Iran.

Received: 15 Nov 2014, Accepted: 28 Jan 2015

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the major etiologic agents of nosocomial infection among burn patients that has high resistance to antibiotics. Integrons can extend antibiotic resistance genes among bacteria. The aim of this study was to investigate the antibiotic resistance pattern and the prevalence of integron among *P. aeruginosa* isolates.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, a total of 73 *P. aeruginosa* isolated from burn wound infections among hospitalized patients in Ahvaz Taleghani hospital. Antibiotic resistance pattern of these bacteria was investigated to 9 antibiotics by Disk Agar Diffusion method. Polymerase chain reaction (PCR) method was used to investigate the prevalence of class 1, 2 and 3 integrons. The data were analyzed by Chi-square test. A P-value of <0.05 was considered as a statistical significance level.

Results: The most antibiotic resistance level was seen against ofloxacin (94.5%), aztreonam (94.5%), and ceftazidime (93.6%). Fifteen isolates of *P. aeruginosa* were resistance to all of the antibiotics. The study of molecular results showed that class 1 integron was detected in 35.6% of isolates, while none of them harbored class 2 and 3 integron.

Conclusion: The rates of antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa to antibiotics such as ceftazidime, oflaxacin, aztreonam, cefepime, and ceftriaxone is very high. Although, class 1 integron were detected in 35.6% of isolates, there was no statistically significant differences between the presence of integron and resistance to a specific antibiotic, that it shows the role of the other antibiotic resistance mechanisms among pseudomonas aeruginosa.

Keywords: Antibiotic resistance, Burn unit, Integron, *Pseudomonas aeruginosa*

*Corresponding Author:
Address: Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.
Email: Khoramrooz@gmail.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۸، شماره ۳ (شماره پیاپی۹۶)، خرداد ۱۳۹۴، ۹-۱۸

فراوانی اینتگرون کلاس ۱ و مقاومت آنتی بیوتیکی در *سودوموناس ایروجینوزا* جدا شده از بیماران بستری در بخش سوختگی بیمارستان طالقانی اهواز

سید سجاد خرم روز[1*]، فرزانه غریب پور[2]، نجمه پرهیزگاری[3]، محبوبه یزدن پناه[4]، رضا محمدی[1]، نسیم راهبری[5]

۱- استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، ، یاسوج، ایران

۲- دکترا، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۳- دانشجوی دکترای تخصصی ویروس شناسی، گروه ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران،ایران

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

۵- کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، پردیس تحصیلات تکمیلی علوم و تحقیقات کهگیلویه و بویراحمد، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۸

چکیده

زمینه و هدف: *سودوموناس ایروجینوزا* به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت در بین بیماران سوختگی مقاومت نسبتا بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. اینتگرون‌ها می‌توانند سبب گسترش ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌ها شوند. هدف از مطالعه حاضر بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی اینتگرون در بین ایزوله‌های *سودوموناس ایروجینوزا* بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی- تحلیلی، تعداد ۷۳ *سودوموناس ایروجینوزا* از عفونت زخم سوختگی بیماران بستری در بیمارستان طالقانی اهواز جدا سازی شد. بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک این باکتری‌ها با روش دیسک آگار دیفیوژن و نسبت به ۹ آنتی‌بیوتیک انجام شد. فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۲،۱ و ۳ با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بررسی شد. تحلیل داده‌ها با استفاده آزمون آماری مجذور کای انجام شد. سطح معنی‌داری، $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به افلوکاسین(۹۴/۵ درصد)، آزترونام (۹۴/۵ درصد) و سفتازیدیم (۹۳/۲ درصد) دیده شد. ۱۵ ایزوله *سودوموناس ایروجینوزا* به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت نشان دادند. بررسی نتایج مولکولی نشان داد که اینتگرون کلاس ۱ در ۳۵/۶ درصد از *سودومونس ایروجینوزا* وجود داشت، در حالی که اینتگرون کلاس ۲ و ۳ در هیچ‌کدام از ایزوله‌ها شناسایی نشد.

نتیجه‌گیری: میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *سودوموناس ایروجینوزا* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، افلوکساسین، آزترونام، سفپیم و سفتریاکسون بسیار بالاست. علیرغم حضور اینتگرون کلاس ۱ در ۳۵/۶ درصد از ایزوله‌ها، اختلاف آماری معنی‌داری بین حضور اینتگرون و مقاومت نسبت به یک نوع خاص از آنتی‌بیوتیک یافت نشد که این موضوع احتمالاً نقش سایر مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در *سودوموناس ایروجینوزا* نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بخش سوختگی، اینتگرون، *سودوموناس ایروجینوزا*

***نویسنده مسئول:** ایران، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

Email: Khoramrooz@gmail.com

مقدمه

سودوموناس ایروجینوزا یک باسیل میله‌ای شکل و گرم منفی است که از لحاظ بالینی اهمیت زیادی دارد و از عوامل مهم عفونت‌های تهدید کننده زندگی در محیط بیمارستان است(۱). این باکتری به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی در بین بیماران سوختگی در سراسر دنیا مطرح است و در بسیاری از مراکز سوختگی دنیا این باسیل گرم منفی به عنوان غالب‌ترین ارگانیسم جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت زخم سوختگی شناسایی شده است(۲، ۳). افزایش ارگانیسم‌های مقاوم به چند دارو (MDR) در باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های کلینیکی بیماران، درمان انتخابی در دسترس را با مشکل مواجه ساخته است. نظارت منظم و دوره‌ای بر روش‌های جداسازی و الگوی حساسیت میکروارگانیسم‌ها در زخم‌های سوختگی به منظور اصلاح تدابیر درمانی و پیش‌گیری از عفونت‌ها ضروری به نظر می‌رسد(۴). MDR به ایزوله‌ای از *سودوموناس ایروجینوزا* گفته می‌شود که حداقل به یکی از داروهای موجود در سه گروه از تمام گروه‌های آنتی‌بیوتیکی مقاوم باشد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس ایروجینوزا به دلیل افزایش روز افزون موارد عفونت با این باکتری و هم‌چنین مکانیسم‌های متعدد مقاومت آنتی‌بیوتیکی از جمله کسب ژن‌های خارجی به واسطه عناصر ژنتیکی متحرک اهمیت زیادی دارد(۵). پلاسمیدها، ترانسپوزون‌های با قابلیت انتقال و اینتگرون‌ها عناصر ژنتیکی هستند که برای جا به جایی، کسب و انتشار ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی مناسب هستند(۶). به دلیل این که پلاسمیدهای با قابلیت هم یوغی و ترانسپوزون‌های قابل انتقال، اینتگرون کلاس ۱ را حمل می‌کنند و از طرف دیگر کاست ژنی مقاوم به آنتی بیوتیک به واسطه نوترکیبی در بین نواحی ثابت اینتگرون وارد می‌شود، اینتگرون کلاس ۱ به عنوان یک عامل بالقوه برای توسعه مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو در بین باکتری‌ها محسوب می‌شود(۷). انتقال افقی ژن‌ها یکی از مهم‌ترین محرک‌های تکامل در باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک است(۸). اینتگرون‌ها به عنوان یکی از منابع اولیه ژن‌های مقاومت شناسایی شده‌اند و به عنوان مخزن ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در درون جمعیت‌های میکروبی مطرح هستند(۹). انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین گونه‌های مختلف باکتریایی به وسیله عناصر ژنتیکی متحرک مثل ترانسپوزون‌ها و پلاسمیدها صورت می‌گیرد. اینتگرون‌ها بر روی این عناصر ژنتیکی متحرک شناسایی شده‌اند و آنها اغلب شامل یک یا چند ژن هستند که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را کد می‌کنند(۱۰). در سال‌های اخیر نقش اینتگرون‌ها و کاست‌های ژنی در انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داده شده است. اینتگرون‌ها عناصر ژنی DNA دار هستند که حاوی سه ناحیه ضروری می‌شوند، از جمله: ژن اینتگراز *(intI)* که یک ریکامبیناز مختص به جایگاه را کد می‌کند، ناحیه پذیرنده ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی *(attI)* که به وسیله ژن اینتگراز شناسایی می‌شود و ناحیه متغیر حاوی کاست‌های ژنی مقاوم به آنتی‌بیوتیک که در ناحیه attI وارد می‌شوند(۱۱). اینتگرون‌ها بر اساس تفاوت در توالی ژن *intI* به کلاس‌های مختلف تقسیم می‌شوند(۱۲) که از میان آنها کلاس ۱، ۲ و۳ اینتگرون بیشتر از بقیه مطالعه شده است و سبب گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌ها می‌شود(۱۳). کلاس ۱ اینتگرون در مقایسه با سایر کلاس‌ها از شیوع بیشتری برخوردار است(۲). با توجه به این که الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و هم‌چنین پراکنش ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌ها از یک منطقه به منطقه دیگر متفاوت است، لزوم انجام مطالعات در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. ارتباط بین حضور اینتگرون و مقاومت چندگانه دارویی در ایزوله‌های *سودوموناس ایروجینوزا* از منابع مختلف کلینیکی در چند مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است(۱۷-۱۴). با توجه به نقش *سودوموناس ایروجینوزا* در عفونت‌های سوختگی و هم‌چنین افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری از یک طرف و اهمیت اینتگرون در کسب کاست‌های ژنی مقاوم به آنتی‌بیوتیک از طرف دیگر، هدف از مطالعه حاضر

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی اینتگرون کلاس ۱،۲ و ۳ در بین ایزوله‌های *سودوموناس ایروجینوزا* جدا شده از عفونت‌های سوختگی در جنوب ایران بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی- تحلیلی که طی سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۱ صورت گرفت، با استفاده از سواب استریل از زخم سوختگی بیماران بستری در بیمارستان طالقانی اهواز نمونه‌گیری انجام شد. پس از انتقال نمونه سواب به آزمایشگاه، تعداد ۷۳ ایزوله *سودوموناس ایروجینوزا* با توجه به اندازه کلنی، بوی کلنی و تولید رنگدانه، رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی مثل کاتالاز، اکسیداز، اکسیداسیون-تخمیر (OF) و توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد شناسایی شد. باکتری‌های جداسازی شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان بررسی الگوی حساسیت میکروبی و مطالعات مولکولی در محیط کشت تریپتیک سوی براث حاوی ۱۵ درصد گلیسرول نگهداری شدند. الگوی حساسیت باکتری‌های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، آزترونام، افلوکساسین، سفپیم، مروپنم، سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون، سفوناکسیم و پیپراسیلین-تازوباکتام با استفاده از روش دیسک آگار دیفیوژن و بر اساس دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاهی بالینی CLSI انجام شد(۱۸)؛ به این صورت که بعد از کشت شبانه *سودوموناس ایروجینوزا*، از هر یک از ایزوله‌ها سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه شد و سپس با استفاده از سواب استریل، سوسپانسیون میکروبی بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد و سپس بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با فواصل مناسب بر روی پلیت قرار داده شدند. بعد از گرمخانه گذاری به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نتایج بررسی شد. از سویه *سودوموناس ایروجینوزا* به شماره ATCC 27853 جهت کنترل کیفی آنتی بیوگرام استفاده شد. برای بررسی حضور ژن‌های اینتگرون در باکتری‌ها، استخراج DNA باکتری به روش جوشاندن صورت گرفت. به طور خلاصه، ۲ تا ۳ کلنی از کشت تازه و ۲۴ ساعته باکتری در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل در داخل ویال ۱/۵ سی‌سی وارد گردید، سپس ویال‌ها به صورت شناور در سطح آب در حال جوش در داخل حمام آب گرم(ممرت، آمریکا) به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. بعد از مدت زمان مذکور، ویال‌ها به درون سانتریفیوژ منتقل شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ ۱۵۰ میکرولیتر از مایع فوقانی آن در داخل ویال دیگری منتقل شد و ۵ میکرولیتر از این محلول به عنوان DNA مکمل در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. تمام ایزوله‌های *سودوموناس ایروجینوزا* برای بررسی نواحی ثابت ژنی اینتگراز کلاس ۱، ۲ و ۳ مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی حضور ژن‌های اینتگرون از پرایمرهای طراحی شده توسط گولدشتاین و همکاران استفاده شد(۱۰). توالی اولیگونوکلئوتیدی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ در ایزوله های *سودوموناس ایروجینوزا*

نام پرایمر		توالی	اندازه حاصل از تکثیر (جفت باز)	دمای اتصال پرایمر	منبع
intI1	5'-CCTCCCGCACGATGATC-3'	پیشرو	۲۸۰	۵۵	۱۰
	5'-TCCACGCATCGTCAGGC-3'	معکوس			
intI2	5'-TTATTGCTGGGATTAGGC-3'	پیشرو	۲۳۳	۵۰	۱۰
	5'-ACGGCTACCCTCTGTTATC-3'	معکوس			
intI3	5'- AGTGGGTGGCGAATGAGTG -3'	پیشرو	۶۰۰	۵۰	۱۰
	5'-TGTTCTTGTATCGGCAGGTG-3'	معکوس			

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس(سیناژن، ایران)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر معادل ۱۰ پیکومول در هر واکنش(سیناژن، ایران) و ۵ میکرولیتر از DNA مکمل بود. برای واکنش PCR مختص به ژن اینتگراز کلاس ۱ از ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر و برای واکنش مربوط به ژن اینتگراز کلاس ۲ و ۳ که به صورت دو رشته‌ای بود از ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. شرایط واکنش PCR برای تکثیر و طویل سازی قطعات مورد نظر به صورت زیر بود: باز شدن اولیه دو رشته در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل شامل باز شدن دو رشته DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو (در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ژن intI1 و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ژن int2 و int3) به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر و طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت مرحله تکثیر و طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد به مدت یک ساعت در ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند. پس از رنگ آمیزی ژل آگارز با اتیدیوم بروماید، به منظور مشاهده باندهای ۲۸۰ جفت بازی برای شناسایی اینتگرون کلاس ۱، اندازه ۲۳۳ جفت بازی برای اینتگرون کلاس ۲ و اندازه ۶۰۰ جفت بازی برای اینتگرون کلاس ۳ ، از روش تصویربرداری به کمک سیستم مستند سازی ژن استفاده شد. داده‌ها در نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ وارد شدند و تحلیل آنها با آزمون آماری مجذور کای صورت گرفت. سطح معنی‌داری، $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

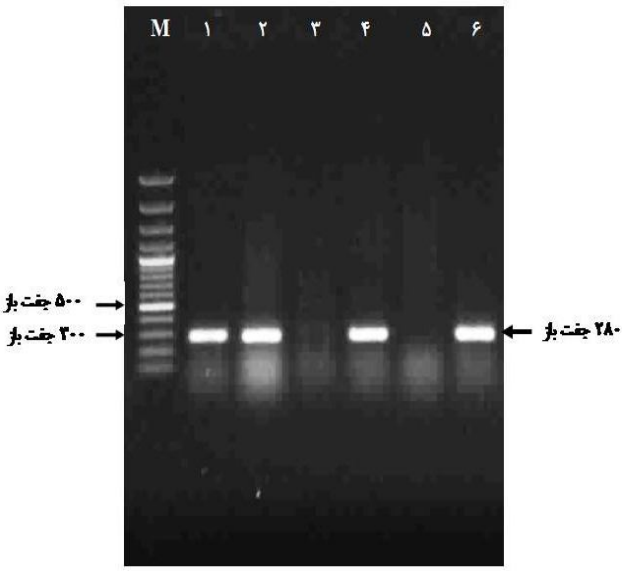
یافته ها

بررسی الگوی حساسیت ضد میکروبی نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به افلوکساسین و آزترونام هر یک برابر با ۹۴/۵ درصد و بیشترین مقاومت نسبت به سفتازیدیم ۹۳/۲ درصد است در حالی که کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به پیپراسیلین- تازوباکتام به میزان ۲۶ درصد دیده شد. بررسی نتایج نشان داد که ۱۵ ایزوله در برابر هر ۹ آنتی‌بیوتیک مورد استفاده مقاوم بودند، ۶ ایزوله به ۸ آنتی‌بیوتیک و ۱۲ ایزوله به ۷ آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. در مجموع، ۴۷ ایزوله *سودوموناس ایروجینوزا* MDR بودند(جدول ۲). بررسی مولکولی برای حضور اینتگرون کلاس ۱،۲ و ۳ نشان داد که ۳۵/۶ درصد از ایزوله‌ها دارای اینتگرون کلاس ۱ بودند، در حالی که اینتگرون کلاس ۲ و ۳ در هیچ کدام از ایزوله‌ها شناسایی نشدند (تصویر ۱). در بررسی ارتباط بین حضور ژن اینتگرون کلاس ۱ و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده شد که تمام ایزوله‌های دارای ژن اینتگرون کلاس ۱ به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم و افلوکساسین نیز مقاوم هستند، این در حالی است که درصد بسیار زیادی از ایزوله‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک‌ها فاقد اینتگرون بودند. در *سودوموناس ایروجینوزا* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون، سفتازیدیم و سفوتاکسیم نشان داده شد که هر چند میزان فراوانی اینتگرون در این ایزوله‌های مقاوم بالاست، اما در تعدادی از ایزوله‌های حساس به این آنتی‌بیوتیک‌ها نیز ژن اینتگرون حضور دارد. در این مطالعه میزان مقاومت *سودوموناس ایروجینوزا* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم، سیپروفلوکساسین و پیپراسیلین- تازوباکتام در مقایسه با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها پایین بود، به طوری که درصد قابل توجهی از باکتری‌های حساس به این آنتی‌بیوتیک‌ها ژن اینتگرون را داشتند.

جدول ۲. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حضور ژن اینتگرون در ایزوله‌های *سودوموناس ایروجینوزا* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های سوختگی

تعداد ایزوله های MDR (۴۸)	تعداد ایزوله های دارای ژن اینتگرون کلاس ۱ (۲۶)	درصد ایزوله های مقاوم به دارو	تعداد ایزوله های مقاوم به آنتی‌بیوتیک (۷۳)	نوع آنتی‌بیوتیک	تعداد آنتی‌بیوتیک
۱۵	۸	٪۲۰/۵	۱۵	CAZ,ATM,OFX,CPM,MEM,CIP,CRO,CTX,PTZ	۹
۲	–	٪۸/۲	۲	CAZ,ATM,OFX,CPM ,CIP,CRO,CTX,PTZ	۸
۳	۱		۳	CAZ,ATM,OFX,CPM MEM,CIP,CRO,CTX	
۱	–		۱	CAZ,ATM,OFX,CPM,CFX,MEM,CRO,CTX	
۲	۱	٪۱۶/۴	۲	CAZ,ATM,OFX,CPM, CRO,CTX,PTZ	۷
۹	۴		۹	CAZ,ATM,OFX,CPM, MEM,CRO,CTX	
۱	–		۱	CAZ,ATM,OFX,CPM, CIP,CRO,CTX	
۱	۱	٪۴۲/۶	۲	CAZ,ATM,OFX,CPM, MEM,CRO	۶
۹	۹		۲۹	CAZ,ATM,OFX,CPM ,CRO,CTX	
۲	–	٪۴/۱	۲	CAZ,ATM,OFX,CPM ,CTX	۳
۱	۱		۱	CAZ,ATM,OFX,CPM,CRO	
–	–	٪۲/۷	۱	CAZ,ATM,CPM,CRO	۴
۱	–		۱	CAZ,OFX,CPM,MEM	
۱	۱	٪۲/۷	۱	CAZ, OFX,MEM	۳
–	–		۱	CAZ,OFX,CPM	
–	–	٪۱/۴	۱	CRO	۱
–	–	٪۱/۴	۱	----	۰

CIP: سیپروفلوکساسین، MEM: مروپنم، CPM: سفپیم، OFX: افلوکساسین، ATM: آزترونام، CAZ: سفتازیدیم، CTX: سفوتاکسیم، CRO: سفتریاکسون، PTZ: پیپراسیلین–تازوباکتام



تصویر ۱. محصولات واکنش PCR مربوط به ژن اینتگرون کلاس ۱، حرف M نشان دهنده وزن مولکولی یا DNA مارکر، شماره ۱، ۲ ،۴ و ۶ اشرشیا کلی دارای ژن اینتگراز کلاس۱، شماره ۳ کنترل منفی و شماره ۴ اشرشیا کلی فاقد ژن اینتگرون کلاس ۱

بحث

امروزه یکی از مشکلات مهم مربوط به عفونت‌های زخم سوختگی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های عامل این عفونت و از جمله *سودوموناس ایروجینوزا* است. نتایج این مطالعه نشان داد که مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، آزترونام، افلوکساسین، سفپیم و سفتریاکسون بسیار بالاست که این موضوع ضرورت هوشیاری و استفاده صحیح از این آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد. از طرف دیگر ظهور ایزوله‌های کلینیکی *سودوموناس ایروجینوزا* مقاوم به چند دارو در حال افزایش است که به عنوان یک چالش جدی برای سیستم‌های بهداشتی–درمانی محسوب می‌شود. در این مطالعه، میزان مقاومت نسبت به سفتازیدیم در دسته آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین‌ها ۹۳/۲ درصد بود که مشابه گزارش ارائه شده از تهران(۱۹) و بیشتر از نتایج حاصل از

مطالعات صورت گرفته در چین و غزه بود(۴، ۱۶). در مطالعه حاضر ۸۹ درصد باکتری‌ها نسبت به سفتریاکسون مقاوم بودند، در حالی که جبل عاملی و همکاران نشان دادند که در ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها مقاومت به سفتریاکسون وجود دارد، ولی در مطالعات دیگری در ایران میزان مقاومت بسیار پایین‌تر و ۲۴ درصد و ۲۹ درصد گزارش شده است(۲۰، ۲۱). در ارتباط با آنتی‌بیوتیک سفپیم در سایر مطالعات، میزان مقاومت بین ۸۵/۲ درصد تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است. هم‌چنین در این مطالعه میزان مقاومت بسیار بالا و به میزان ۹۵/۹ درصد بود(۴، ۱۹، ۲۰).

در دسته آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون‌ها، ۹۵/۵ درصد از ایزوله‌ها به افلوکساسین مقاوم بودند که بسیار بیشتر از نتایج حاصل از مطالعات ایمانی فولادی و همکاران(۷۰/۷ درصد) و هم‌چنین مطالعات مرادیان و همکاران (۵۰ درصد) بوده است(۲۰، ۲۱). در مطالعه حاضر، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در مقایسه با سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی در این مطالعه پایین‌تر و حدود ۳۸/۴ درصد بود، که مشابه نتایج بعضی از مطالعات به میزان ۳۶ درصد و ۳۸/۹ درصد می‌باشد، اما بسیار کمتر از نتایج مطالعه ارائه شده از تهران به میزان ۸۹/۹ درصد است(۱۹). در این مطالعه میزان مقاومت نسبت به مروپنم ۴۳/۸ درصد بود که در مقایسه با سایر مطالعات که میزان ۷۱ درصد تا ۸۹/۵ درصد گزارش کرده‌اند کمتر است. ۹۴/۵ درصد از ایزوله‌های *سودوموناس ایروجینوزا* به آزترونام مقاومت نشان دادند، در حالی که در مطالعات صورت گرفته در تهران ۸۴/۴ درصد و در غزه ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها به این آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند(۴، ۱۹).

به طور کلی در رابطه با مقاومت آنتی‌بیوتیکی، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که میزان سویه‌های مقاوم به چند دارو در ایزوله‌های *سودوموناس ایروجینوزا* جدا شده از سوختگی بسیار بالا است و هم‌چنین مقاومت بسیار بالایی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص سفالوسپورین‌های نسل سوم دیده می‌شود. در رابطه با فلوروکینولون‌ها میزان مقاومت نسبت به افلوکساسین در مقایسه با سیپروفلوکساسین بسیار بیشتر است. مقاومت نسبت به مروپنم نیز بالا است و به عنوان هشدار به جهت مقاومت‌های روزافزون نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها دریافت می‌شود تا در زمینه استفاده صحیح و درست از این آنتی‌بیوتیک‌ها نهایت دقت و حساسیت به عمل آید تا در آینده نزدیک کارایی این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها در عفونت‌های سوختگی ناشی از *سودوموناس ایروجینوزا* از بین نرود. در این مطالعه هم‌چنین مشاهده شد که ۱۵ ایزوله *سودوموناس ایروجینوزا* به هیچ کدام از ۹ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی حساس نبودند، هرچند که حساسیت این ۱۵ ایزوله نسبت به آمینوگلیکوزیدها و پلی میکسین B بررسی نشد، ولی مقاومت بیش از حد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها زمینه را برای بقاء چنین ایزوله‌های مقاومی فراهم می‌کند تا به تدریج در فرایند درمان، ایزوله‌های مقاوم‌تر جایگزین ایزوله‌های حساس‌تر در بیمارستان‌ها شوند و کلون های در چرخش بیمارستان و به خصوص در بخش سوختگی را در بر گیرند. درمان چنین بیمارانی و حذف این ایزوله‌های مقاوم به دارو بایستی در اولویت قرار گیرد.

عوامل ژنی اینتگرون نقش مهمی را در کسب کاست‌های ژنی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و انتشار آنها در بین ایزوله‌های باکتریایی ایفا می‌کنند و به دنبال آن مقاومت آنتی‌بیوتیکی را سبب می‌شوند. در میان اینتگرون‌های شناخته شده، اینتگرون کلاس ۱ در مقایسه با سایر کلاس‌های اینتگرون در باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک شناخته شده است. در مطالعه حاضر اینتگرون کلاس ۱ در ۲۶ ایزوله(۳۵/۶ درصد) از ۷۳ ایزوله *سودوموناس ایروجینوزا* شناسایی شد، در حالی که اینتگرون کلاس ۲ و ۳ در هیچکدام از ایزوله‌ها شناسایی نشدند. مطالعاتی در سایر نقاط دنیا و ایران فراوانی اینتگرون را از منابع کلینیکی مختلف بررسی نموده‌اند. در مطالعه‌ای که توسط نیکوکار و همکاران صورت گرفت، اینتگرون کلاس ۱ در ۴۳ درصد از *سودوموناس ایروجینوزا* جدا شده از بخش سوختگی شناسایی شد(۲۲). یوسفی و همکاران با مطالعه بر روی *سودوموناس ایروجینوزا* جدا شده از منابع مختلف کلینیکی در بیمارستان امام شهر ارومیه فراوانی اینتگرون کلاس ۱ را

۵۶/۳ درصد گزارش کردند(۲۳). در مطالعه‌ای دیگر که توسط رجب نیا و همکاران روی ۳۹/۴ درصد از *سودوموناس ایروجینوزا* جدا شده از منابع محیطی و تجهیزات بخش مراقبت‌های ویژه در بابل صورت گرفت، اینتگرون کلاس ۱ شناسایی شد(۲۴). در گزارشاتی از سایر نقاط دنیا و مطالعات مختلف و منابع کلینیکی متعدد کشور چین، فراوانی اینتگرون ۳۸ تا ۴۰/۸ درصد گزارش شده است(۱۶، ۱۷) هم‌چنین فراوانی اینتگرون در مالزی ۶۰ درصد، برزیل۴۱/۵ درصد و تایلند ۶۹/۳ تا ۸۲ درصد گزارش شده است(۲۵-۲). که همگی نشان دهنده فراوانی بیشتر اینتگرون در این مطالعه ها در مقایسه با مطالعه حاضر می‌باشد.

در این مطالعه، ارتباط آماری معنی‌داری بین حضور اینتگرون و مقاومت به نوع خاصی از آنتی‌بیوتیک یافت نشد. مطابق با این نتایج، مطالعه بوراک و همکاران در ترکیه نیز اختلاف آماری معنی‌داری بین حضور ژن اینتگرون و مقاومت به یک آنتی‌بیوتیک خاص نشان نداد(۵). در حالی که در مطالعاتی از ایران(۲۰، ۲۴) و مطالعات دیگری از سایر نقاط دنیا که توسط گو و همکاران و هم‌چنین فونسکا و همکاران انجام شد، اختلاف معنی‌داری بین ایزوله‌های مقاوم به چند دارو و حضور ژن اینتگرون یافت گردید(۵، ۱۷). در مطالعه حاضر، از بین ۱۵ ایزوله *سودووناس ایروجینوزا* که به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت نشان دادند، ۵۳/۳۳ درصد از ایزوله‌ها دارای ژن اینتگرون کلاس ۱ بودند. در حالی که در ۵۸ ایزوله دیگر که حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت داشتند، ۳۱/۰۳ درصد دارای اینتگرون بودند. هر چند این مطالعه نشان داد که کل ایزوله‌های *سودوموناس ایروجینوزا* دارای اینتگرون کلاس ۱ به سفپیم و افلوکساسین مقاوم بودند، ولی درصد قابل توجهی از باکتری‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک‌ها فاقد ژن اینتگرون بودند. از طرف دیگر، با توجه به فراوانی کمتر باکتری‌های مقاوم به مروپنم و پیپراسیلین-تازوباکتام در این مطالعه، ژن اینتگرون در تعداد زیادی از باکتری‌های حساس به این نوع از آنتی‌بیوتیک‌ها حضور داشت. با توجه به فراوانی متغیر ژن اینتگرون کلاس ۱ در مطالعات مختلف و هم‌چنین در نظر داشتن این موضوع که اینتگرون کلاس ۱ در ایزوله‌های حساس به یک نوع آنتی‌بیوتیک و مقاوم به نوع دیگری از آنتی‌بیوتیک یافت می‌شود، می‌توان حدس زد که کاست‌های ژنی مقاوم به آنتی‌بیوتیک ممکن است حاوی یک یا چند نوع آنتی بیوتیک در داخل ساختار اینتگرون باشند که مقاومت به آن نوع خاص از آنتی‌بیوتیک را سبب می‌گردند و از طرفی ممکن است بین حضور اینتگرون و مقاومت به آنتی‌بیوتیک ارتباط حاصل شود، به طوری که یک ایزوله که دارای اینتگرون حاوی کاست ژنی مقاوم به یک آنتی‌بیوتیک خاص است در آن لحظه به دلیل نداشتن ژن مقاومت به نوع دیگری از آنتی‌بیوتیک‌ها حساس گردد. از طرف دیگر، حضور ژن‌های اینتگرون تنها یکی از مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها و به خصوص *سودوموناس ایروجینوزا* است. به طور مثال جهش در ژن کد کننده پورین غشاء خارجی، فعالیت پمپ‌های افلاکس و جهش در ژن‌های کد کننده آنزیم‌های خاص که باعث تغییر در مکان هدف آنتی‌بیوتیک می‌شوند، مکانیسم‌های مقاومت مستقل از اینتگرون هستند. به طور مثال یک ایزوله باکتریایی که فاقد اینتگرون است و در عین حال دارای مقاومت به یک یا چند نوع آنتی‌بیوتیک است، نشان دهنده این است که مکانیسم‌های دیگری به جز اینتگرون در ایجاد مقاومت نقش دارند، لذا بایستی همه موارد را در ارتباط با بحث مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نظر داشت.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *سودوموناس ایروجینوزا* جدا شده از بخش سوختگی بیمارستان طالقانی اهواز نسبت به بعضی آنتی‌بیوتیک‌ها مثل سفتازیدیم، افلوکساسین، آزترونام، سفپیم و سفتریاکسون بسیار بالا بود و در مقایسه مقاومت کمتری نسبت به مروپنم، سیپروفلوکساسین و پیپراسیلین-تازوباکتام وجود داشت که روند افزایشی را نشان می‌دهد. اینتگرون کلاس ۱ در ۳۵/۶ درصد از ایزوله‌ها شناسایی شد، در حالی‌که اینتگرون کلاس

۲ و ۳ شناسایی نشد. بین حضور اینتگرون و مقاومت نسبت به یک نوع خاص از آنتی‌بیوتیک اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری یافت نشد که خود نقش سایر مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به غیر از اینتگرون در *سودوموناس ایروجینوزا* نشان می‌دهد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی یاسوج به خاطر حمایت‌های مالی این تحقیق تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. Tsakris A, Poulou A, Kristo I, Pittaras T, Spanakis N, Pournaras S, et al. Large dissemination of VIM-2-metallo-β-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa strains causing health care-associated community-onset infections. Journal of clinical microbiology. 2009;47(11):3524-9.
2. Kiddee A, Henghiranyawong K, Yimsabai J, Tiloklurs M, Niumsup PR. Nosocomial spread of class 1 integron-carrying extensively drug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates in a Thai hospital. International journal of antimicrobial agents. 2013;42(4):301-6.
3. Nasser S, Mabrouk A, Maher A. Colonization of burn wounds in Ain Shams University burn unit. Burns. 2003;29(3):229-33.
4. Elmanama AA, Al Laham NA, Tayh GA. Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from burn units in Gaza. Burns. 2013; 39(8): 1612-8.
5. Fonseca ÉL, Vieira VV, Cipriano R, Vicente AC. Class 1 integrons in Pseudomonas aeruginosa isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2005;44(3):303-9.
6. Stokes Ht, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Molecular microbiology. 1989;3(12):1669-83.
7. Leverstein-van Hall MA, Blok HE, Donders ART, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. Journal of infectious diseases. 2003;187(2):251-9.
8. Díaz-Mejía JJ, Amábile-Cuevas CF, Rosas I, Souza V. An analysis of the evolutionary relationships of integron integrases, with emphasis on the prevalence of class 1 integrons in Escherichia coli isolates from clinical and environmental origins. Microbiology. 2008;154(1):94-102.
9. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature. 2000;405(6784):299-304.
10. Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, et al. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001;45(3):723-6.
11. Ploy M-C, Lambert T, Couty J-P, Denis F. Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. Clinical chemistry and laboratory medicine. 2000;38(6):483-7.
12. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes H. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. Trends in microbiology. 2007;15(7):301-9.
13. Nield BS, Holmes AJ, Gillings MR, Recchia GD, Mabbutt BC, Nevalainen KH, et al. Recovery of new integron classes from environmental DNA. FEMS Microbiology Letters. 2001;195(1):59-65.
14. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Musilek M. Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of Pseudomonas aeruginosa in the Czech Republic. Research in microbiology. 2010;161(3):234-42.
15. Kor S-B, Choo Q-C, Chew C-H. New integron gene arrays from multiresistant clinical isolates of members of the Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa from hospitals in Malaysia. Journal of medical microbiology. 2013; 62(Pt 3):412-20.
16. Gu B, Tong M, Zhao W, Liu G, Ning M, Pan S, et al. Prevalence and characterization of class I integrons among Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii isolates from patients in Nanjing, China. Journal of clinical microbiology. 2007;45(1):241-3.

17. Chen J, Su Z, Liu Y, Wang S, Dai X, Li Y, et al. Identification and characterization of class 1 integrons among Pseudomonas aeruginosa isolates from patients in Zhenjiang, China. International Journal of Infectious Diseases. 2009; 13(6):717-21.
18. Franklin R, Cockerill III M. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-First Informational Supplement M100-S21. Clinical and Laboratory Standard Institute. 2011:68-80.
19. Jabalameli F, Mirsalehian A, Khoramian B, Aligholi M, Khoramrooz SS, Asadollahi P, et al. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Burns. 2012; 38(8):1192-7.
20. Kouchaksaraei F, Shahbandashti E, Molana Z. Molecular detection of integrin genes and pattern of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa isolated from intensive care unit, Shahid Beheshti Hospital, Northern of Iran. IJMCM. 2012;1:209-16.
21. Imani Fooladi A, Sattari M, Pourbabaei AA, Gholami M. Relation between quinolones and beta-lactams resistance with feature of producing capsules in pseudomonas aeruginosa isolated from urine. Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch. 2009;19(2):97-103.
22. Nikokar I, Tishayar A, Flakiyan Z, Alijani K, Rehana-Banisaeed S, Hossinpour M, et al. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among Pseudomonas aeruginosa, isolated from burn patients in Guilan, Iran. Iranian journal of microbiology. 2013;5(1):36-41.
23. Yousefi S, Nahaei M, Farajnia S, Ghojazadeh M, Akhi M, Sharifi Y, et al. Class 1 integron and imipenem resistance in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa: prevalence and antibiotic susceptibility. Iranian journal of microbiology. 2010;2(3):115-21.
24. Rajabnia R, Asgharpour F, Ferdosi Shahandashti E, Khalilian M, Norkhomami S, Shafii M, et al. Class 1 Integron in Pseudomonas aeruginosa Isolates From Different Places and Devices of ICU in Babol, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2013;6(2):138-43.
25. Khosravi Y, Tay ST, Vadivelu J. Analysis of integron and associated gene cassettes of MBL positive Pseudomonas aeruginosa in Malaysia. Journal of medical microbiology. 2011; 60:988–94.
26. Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, Fusté E, Vinuesa T, Martínez J, Viñas M. Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. International journal of antimicrobial agents. 2011;38(5):398-402.
27. Budak F, Kasap M, Kolayli F, Karadenizli A, Vahaboğlu MH. Integron-associated resistance genes among multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from clinical specimens. Turkish Journal of Medical Sciences. 2012;42(1):149-56.