ORIGINAL ARTICLE

The Role of aac(6)-IIa and ant(2'')-Ia Genes and the Presence of Class 1 Integrons in Resistance of Pseudomonas Aeruginosa Clinical Isolates against Aminoglycosides

Leila Ahmadian[1,2],
Zahra Norozi[1],
Reza Valadan[3,4],
Hamidreza Goli[3,5]

[1] MSc Student in Medical Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Student research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received June 18, 2019 Accepted ; September 23, 2019)

Abstract

Background and purpose: The aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) and class 1 integrons in clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa* are the major factors leading to rapid spread of antibiotic resistance. The aim of the present study was to investigate the frequency of *aac(6)-IIa, ant(2'')-Ia*, and class 1 integrons in clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa*.

Materials and methods: For this descriptive-analytic study (2017-2018), 100 clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa* were collected from Sari teaching hospitals and identified by differential diagnostic tests. Antibiotic susceptibility pattern of all isolates against selected antibiotics was evaluated using standard disk agar diffusion method. Subsequently, all isolates were evaluated for the presence of *aac (6) -IIa*, *ant (2'') -Ia* genes, and class I integrons using PCR method.

Results: Out of 100 *pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, 28%, 42%, and 39% were resistant to amikacin, gentamicin, and tobramycin, respectively, while 26 isolates were resistant to all three antibiotics. The results of PCR showed that 42% of the clinical isolates contained class 1 integrons. The prevalence of *aac (6) -IIa* and *ant (2 '') - Ia* genes in aminoglycoside resistant isolates was 41.8% and 13.9%, respectively.

Conclusion: Aminoglycosides are the preferred drug for the combined treatment of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and the prevalence of resistance to them is also high, so the intermittent examination of the susceptibility pattern of these antibiotics and the genes associated with this issue is necessary to prevent the prevalence of high levels of resistance in this bacterium.

Keywords: *pseudomonas aeruginosa*, AMEs, aminoglycosides, class 1 integrons, *ant(2'')-Ia*, *aac(6)-IIa*

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (178): 1-9 (Persian).

*** Corresponding Author: Hamidreza Goli -** Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: goli59@gmail.com)

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و نهم شماره ۱۷۸ آبان سال ۱۳۹۸ (۹-۱)

نقش ژن های *aac(6)-IIa* و *ant(2'')-Ia* و حضور اینتگرون های کلاس ۱ در مقاومت ایزوله های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* به آمینوگلیکوزیدها

لیلا احمدیان[۱و۲]
زهرا نوروزی[۱]
رضا ولدان[۳و۴]
حمیدرضا گلی[۳و۵]

چکیده

سابقه و هدف: حضور اینتگرون‌های کلاس ۱ و ژن‌های کدکننده آنزیم‌های غیرفعال‌کننده آمینوگلیکوزیدها در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* عواملی هستند که باعث گسترش سریع مقاومت به آمینوگلیکوزیدها می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر بررسی شیوع اینتگرون‌های کلاس ۱ و ژن‌های *aac(6)-IIa* و *ant(2'')-Ia* و ارتباط آن‌ها با مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: برای انجام این مطالعه توصیفی- تحلیلی، تعداد ۱۰۰ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* طی بازه یک ساله از سال ۹۶ تا ۹۷ از بیمارستان‌های آموزشی درمانی شهر ساری جمع‌آوری شدند و با استفاده از تست‌های افتراقی مورد تشخیص هویت نهایی قرار گرفتند. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی تمامی ایزوله‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های منتخب، به روش استاندارد دیسک آگار دیفیوژن مورد ارزیابی قرار گرفت. در ادامه، تمامی ایزوله‌ها از نظر حضور ژن‌های *aac(6)-IIa*، *ant(2'')-Ia* و اینتگرون‌های کلاس ۱ با استفاده از روش PCR بررسی شدند.

یافته‌ها: از ۱۰۰ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزای* جمع‌آوری شده به ترتیب ۲۸، ۴۲ و ۳۹ درصد آن‌ها نسبت به آمیکاسین، جنتامایسین و توبرامایسین مقاوم بودند و ۲۶ ایزوله نسبت به هر سه آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. نتایج PCR نشان داد که از ۱۰۰ ایزوله بالینی مورد مطالعه ۴۲ ایزوله دارای اینتگرون‌های کلاس ۱ بودند. شیوع ژن‌های *aac(6)-IIa* و *ant(2'')-Ia* در ایزوله‌های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها به ترتیب ۴۱/۸ و ۱۳/۹ درصد برآورد شد.

استنتاج: از آن‌جایی که آمینوگلیکوزیدها داروی انتخابی برای درمان ترکیبی عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشند و شیوع مقاومت به آن‌ها نیز بالاست، بنابراین بررسی متناوب الگوی حساسیت به این آنتی‌بیوتیک‌ها و ژن‌های دخیل در ایجاد مقاومت برای پیشگیری از شیوع مقاومت سطح بالا در این باکتری ضروری به نظر می‌رسد.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آمینوگلیکوزیدی، اینتگرون‌های کلاس ۱، ژن، *aac(6)-IIa*، *ant(2'')-Ia*

مقدمه

مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها می‌تواند یک عامل تهدید کننده حیات برای بشریت باشد(۱). *سودوموناس آئروژینوزا* از جمله باکتری‌های گرم منفی فرصت‌طلبی است که به دلیل توانایی بالا در زنده ماندن در شرایط

مولف مسئول: حمیدرضا گلی- ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail:goli59@gmail.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. استادیار، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۸/۴/۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۷/۱

نامطلوب محیطی و همچنین استعداد بالا در دریافت ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، امروزه به عنوان یک معضل بزرگ در بیمارستان‌ها (سومین گونه باکتریایی شایع در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی) و به خصوص بخش‌های سوختگی مطرح می‌باشد(۲). این باکتری با به کارگیری مکانیسم‌های مختلفی هم‌چون تغییر نفوذپذیری غشاء، افزایش بیان پمپ‌های افلاکس، دستیابی به مسیرهای متابولیک فرعی، تولید آنزیم‌های مخرب و غیرفعال‌کننده داروها، کسب اینتگرون‌های حامل ژن‌های مقاومت و ... نسبت به بسیاری از عوامل ضد میکروبی مقاوم شده است(۳).

آنتی‌بیوتیک‌های موجود در خانواده آمینوگلیکوزیدها از جمله داروهای مهم و به عنوان خط اول در درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌های گرم منفی به خصوص *سودوموناس آئروژینوزا* مطرح می‌باشند(۴). حال آن که انتشار ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها از طریق پلاسمیدها در بین ایزوله‌های بالینی زمینه‌ساز بروز فنوتیپ مقاومت چندگانه (Multi-drug Resistant(MDR در این باکتری‌ها می‌باشد(۵،۴). مقاومت به داروهای آمینوگلیکوزیدی ازطریق سه مکانیسم کاهش نفوذپذیری غشای باکتری نسبت به دارو، تغییر در جایگاه ریبوزومی اتّصال دارو و غیرفعال سازی آنزیماتیک دارو ایجاد می‌شود، در حالی که غیرفعال‌سازی آنزیماتیک دارو به عنوان اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها شناخته شده است(۶) آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزید (Aminoglycoside Modifying Enzymes (AME باعث آدنیله شدن (توسط آنزیم آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفراز)، استیله شدن (توسط آنزیم آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز (AACs) و فسفریله شدن (توسط آنزیم آمینوگلیکوزید فسفوریل ترانسفراز) آمینوگلیکوزیدها شده و در نهایت با ایجاد تغییر شیمیایی و غیرفعال‌سازی این داروها باعث ایجاد مقاومت بالا نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند(۵). ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها شامل *ant(3")-I*، *ant(2")-I*، *ant(4")-I*، *ant(4")-II*، *ant(6")-I*، *AAC(3)-III*، *AAC(3)-II*، *AAC(3)-I*، *AAC(6")-II*، *AAC(6')-I*، *AAC(3)-IV*، *AAC(3)-VI*، *AAC(2'-I)*، *APH(2")-I*، *APH(3'')-I*، *APH(3')-III*، *APH(3')-II*، *APH(3')-I*، *APH(3')-VII*، *APH(3')-VI*، *APH(3')-V*، *APH(3")-IV* و *APH(6)-* می‌باشند(۸-۶). در حال حاضر سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به آمینوگلیکوزیدهایی هم چون جنتامایسین، توبرامایسین و آمیکاسین از جمله باکتری‌های مهم مقاوم به آنتی‌بیوتیک در عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند و از ژن‌های AME مهمی که منجر به این پدیده می‌شوند می‌توان به *aac(6)-IIa* و *ant(2")Ia* اشاره کرد. آنزیم کد شده توسط این آنزیم‌ها باعث بروز مقاومت نسبت به آمیکاسین، جنتامایسین و توبرامایسین می‌شود(۹).

از جمله مکانیسم‌های دیگر ایجاد مقاومت به داروهای آمینوگلیکوزیدی حمل ژن‌های مقاومت توسط اینتگرون‌ها می‌باشد(۱۰). اینتگرون‌ها (عناصر ژنتیکی متحرّک) از منابع اولیه ژن‌های مقاومت بوده و به عنوان مخزن ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جمعیت‌های میکروبی شناخته می‌شوند(۱۰). این عناصر ژنتیکی متحرّک قابلیت جای‌گیری در پلاسمید، ترانسپوزون و کروموزوم‌ها را دارا می‌باشند و در انتقال یک یا چند ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی وتوسعه مقاومت‌های دارویی چندگانه ((multi-drug resistant (MDR دارای اهمّیّت بسزایی می‌باشند(۱۱،۱۰). اینتگرون‌ها می‌توانند ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را نیز در قالب کاست‌های ژنی دریافت، حمل و انتشار دهند. نواحی ثابت اینتگرون‌ها، محلی است که کاست‌های ژنی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها به واسطه نوترکیبی وارد آن می‌شوند. ژن اینتگراز (*intI*)، کدکننده آنزیم ریکامبیناز اختصاصی در اینتگرون‌ها، اتصال یا انفصال کاست‌های ژنی کوچک را در جایگاه اتّصال سبب می‌شود و بر اساس تفاوت در توالی همین ژن (*intI*) اینتگرون‌ها به کلاس‌های مختلف طبقه‌بندی می‌شوند(۱۲). بر اساس

مطالعات انجام شده، اینتگرون‌های کلاس ۱ در مقایسه با دیگر کلاس‌ها از شیوع بیشتری برخوردار بوده و سبب گسترش ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های مختلف می‌شوند(۱۲). این درحالی است که هر اینتگرون توانایی حمل بیش از یک کاست ژنی را دارد و ایزوله‌های باکتریایی پذیرنده این اینتگرون‌ها، استعداد تبدیل به سویه‌های MDR را دارا می‌باشند(۱۳). با توجه به افزایش روزافزون مقاومت در سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزای* عامل عفونت‌های بیمارستانی و زخم سوختگی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی و اهمیت شناسایی مکانیسم‌های دخیل در ایجاد این نوع مقاومت، مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط بین مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و شیوع ژن‌های *ant(2")Ia* ،*aac(6)-IIa* و اینتگرون‌های کلاس ۱ در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد.

مواد و روش ها

جمع‌آوری نمونه

برای انجام این مطالعه توصیفی- تحلیلی تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* در بازه زمانی یک ساله (۱۳۹۷-۱۳۹۶) از پنج بیمارستان آموزشی درمانی استان مازندارن جمع‌آوری و با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران منتقل شدند. تعیین حجم نمونه بر اساس فرمول آماری $N=Z^2 \times P \times q/d^2$ و نتایج مطالعات پیشین انجام شد. تمام ایزوله های بالینی بر اساس ویژگی‌های ظاهری مانند مورفولوژی و بوی کلنی، رنگ‌آمیزی گرم، تولید پیگمان، نتیجه تست‌های بیوشیمیایی، تست مثبت اکسیداز و کاتالاز، تست OF و توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد ارزیابی و در نهایت به عنوان *سودوموناس آئروژینوزا* تعیین هویت شدند(۱۴) سپس ایزوله‌های خالص در محیط کشت TSB (مرک، آلمان) حاوی ۱۰درصد گلیسرول کشت داده شده و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره‌سازی شدند.

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک آگار دیفیوژن بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار (مرک، آلمان) با استفاده از ۳ دیسک آنتی‌بیوتیکی از خانواده آمینوگلیکوزیدها شامل آمیکاسین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) و توبرامایسین (۳۰ میکروگرم) (MAST، انگلستان) برای تمامی ایزوله‌ها انجام شد و قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک اندازه‌گیری و طبق دستورالعمل جدول CLSI به سه گروه مقاوم، مقاوم حدواسط و حساس تقسیم‌بندی شد.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از روش جوشاندن (boiling) استفاده شد و برای کنترل کیفی، میزان جذب نوری (Optic Dansity (OD)) نمونه‌ها با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. توالی ژن‌های مورد نظر از سایت NCBI مشخص و در نهایت پرایمر اختصاصی برای ژن‌های مورد نظر طراحی و برای سنتز به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. توالی پرایمرهای طراحی شده در جدول شماره ۱ آورده شده است. در ضمن پرایمر مربوط به اینتگرون کلاس ۱ برای مناطق محافظت شده 5′ CS و 3′ CS طراحی شد، به طوری که با توجه به نوع کاست ژنی که در بین این دو منطقه ممکن است قرار بگیرد، طول قطعه محصول PCR می‌تواند متفاوت باشد.

جدول شماره ۱: توالی پرایمر، اندازه آمپلیکون و دمای آنلینگ برای ژن های مورد مطالعه

پرایمر	توالی	طول قطعه محصول PCR	دمای آنلینگ
ant(2")Ia	Pri F: GCA GGT CAC ATT GAT ACA C Pri R: TCC GCT AAG AAT CCA TAG TC	۲۲۵	۵۱
aac(6)-IIa	Pri F: CCA TAA CTC TTC GCC TCA T Pri R: AAT CCT GCC TTC TCA TAG C	۴۴۲	۴۸
integron	Pri F: GGCATCCAAGCA GCAAGC Pri R: AAGCAGACTTGACCTGAT	متفاوت	۵۹

تکثیر ژن‌های aac(6)-IIa ،ant(2")Ia و اینتگرون‌های کلاس ۱

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad، ایالات متحده) با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۳۰۰ نانوگرم DNA، ۵ پیکومول از هر پرایمر، ۷/۵

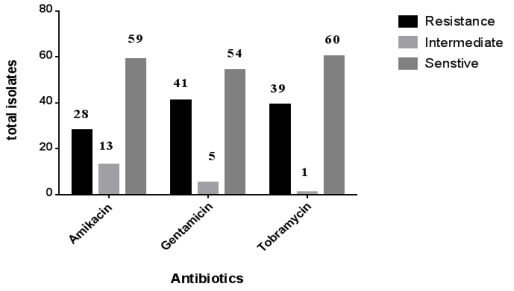
میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon، دانمارک) با غلظت ۱/۵ میلی مولار از $MgCl_2$ و ۶ میکرولیتر آب مقطر با شرایط دمایی زیر انجام شد:

یک سیکل واپاشی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل واپاشی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در دماهای مطابق با جدول شماره ۱ به مدت یک دقیقه و دمای تکثیر DNA در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت تکثیر نهایی DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۹۰ در کنار یک نشان گر طول قطعه DNA (DNA ladder) الکتروفورز شدند.

یافته ها

از مجموع ۱۰۰ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروزینوزا*، ۹۱ ایزوله از بیماران بستری و ۹ ایزوله از بیماران سرپایی به دست آمدند. ۱۱ ایزوله از بیمارستان زارع، ۲۲ ایزوله از بیمارستان رازی، ۱۷ ایزوله از بیمارستان بوعلی، ۱۰ ایزوله ازبیمارستان فاطمه زهرا و ۴۰ ایزوله ازبیمارستان امام خمینی به دست آمدند. باکتری‌ها از نمونه‌های ادرار (۲۶ ایزوله)، خلط (۳۷ ایزوله)، زخم (۲۰ ایزوله)، کاتتر (۸ ایزوله)، خون (۵ ایزوله)، مدفوع (۲ ایزوله) و چشم (۲ ایزوله) جداسازی شدند. در مجموع ۶۰ ایزوله از مردان و ۴۰ ایزوله از زنان به دست آمدند. میانگین سنی کل افراد شرکت‌کننده در مطالعه ۴۶ سال، میانگین سنی زنان ۴۷/۸ و میانگین سنی مردان ۴۴/۷ سال بود. ۴۳ ایزوله حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی (آمیکاسین، جنتامایسین و توبرامایسین) مقاومت نشان دادند (نمودار شماره ۱).

در کل، به ترتیب ۲۸، ۴۲ و ۳۹ باکتری نسبت به آمیکاسین، جنتامایسین و توبرامایسین مقاوم بودند و ۲۶ ایزوله نسبت به هر سه آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. نتایج PCR نشان داد که از ۱۰۰ ایزوله بالینی مورد مطالعه ۴۲ ایزوله دارای اینتگرون‌های کلاس ۱ بودند و ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون‌های کلاس ۱ و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تست شده وجود داشت ($p < ۰/۰۵$). همچنین از بین ۴۳ ایزوله مقاوم به آمینوگلیکوزیدها، به ترتیب ۱۸ایزوله (۴۱/۸درصد) و ۶ ایزوله (۱۳/۹درصد) حامل ژن‌های *aac(6)-IIa* و *ant(2")Ia* بودند، در حالی که به طور کل ۱۹ (۱۹ درصد) ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* در این مطالعه حامل ژن های کد کننده آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها بودند. در این مطالعه، ۲۶ ایزوله (۶۰/۴ درصد) از ۴۳ ایزوله مقاوم به آمینوگلیکوزیدها دارای اینتگرون‌های کلاس ۱ بودند (جدول شماره ۲).



نمودار شماره ۱: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ۱۰۰ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزای* مورد مطالعه برای آنتی بیوتیک های آمیکاسین، جنتامایسین و توبرامایسین

جدول شماره ۲: نتایج فنوتیپ مقاومت و تعداد (درصد) حضور ژن های *ant(2")Ia*، *aac(6)-IIa* و اینتگرون های کلاس ۱ در۴۳ ایزوله مقاوم به آمینوگلیکوزید

فنوتیپ مقاومت آنتی بیوتیکی	تعداد (درصد) ژن *ant(2")Ia* (n=6)	تعداد (درصد) ژن *aac(6)-IIa* (n=18)	تعداد (درصد) ایزوله های اینتگرون مثبت (n=26)	تعداد (درصد)ژن های *aac(6)- +ant(2")Ia* (n=5) *IIa*	تعداد (درصد) ژن های *ant(2")Ia*+اینتگرون مثبت (n=5)	تعداد (درصد) ژن های *aac(6)-IIa*+اینتگرون مثبت (n=14)	ژن های *aac(6)-IIa +ant(2")Ia* +اینتگرون مثبت (n=5) تعداد (درصد)
AK	۵ (۸۳,۳)	۱۴ (۷۷,۷)	۱۹ (۷۳)	۵ (۱۰۰)	۵ (۱۰۰)	۱۰ (۷۱,۴)	۵ (۱۰۰)
GM	۶ (۱۰۰)	۱۸ (۱۰۰)	۲۶ (۱۰۰)	۵ (۱۰۰)	۵ (۱۰۰)	۱۴ (۱۰۰)	۵ (۱۰۰)
TN	۶ (۱۰۰)	۱۸ (۱۰۰)	۲۵ (۹۶,۱)	۵ (۱۰۰)	۵ (۱۰۰)	۱۴ (۱۰۰)	۵ (۱۰۰)
AK+GM	۵ (۸۳,۳)	۱۴ (۷۷,۷)	۱۹ (۷۳)	۵ (۱۰۰)	۵ (۱۰۰)	۱۰ (۷۱۰۴)	۵ (۱۰۰)
AK+TN	۵ (۸۳,۳)	۱۴ (۷۷,۷)	۱۸ (۶۹,۲)	۵ (۱۰۰)	۵ (۱۰۰)	۱۰ (۷۱,۴)	۵ (۱۰۰)
GM+TN	۶ (۱۰۰)	۱۸ (۱۰۰)	۲۵ (۹۶,۱)	۵ (۱۰۰)	۵ (۱۰۰)	۱۴ (۱۰۰)	۵ (۱۰۰)
AK+GM+TN	۵ (۸۳,۳)	۱۴ (۷۷,۷)	۱۸ (۶۹,۲)	۵ (۱۰۰)	۵ (۱۰۰)	۱۰ (۷۱,۴)	۵ (۱۰۰)

در حالی که در کل ۱۰۰ ایزوله بالینی، یک شیوع ۴۲ درصدی از اینتگرون‌های کلاس ۱ مشاهده شد. نکته مهم در این مطالعه این بود که تمامی ایزوله‌های حامل هر سه ژن فوق به هر سه آنتی‌بیوتیک خانواده آمینوگلیکوزیدها مقاومت داشتند. هم‌چنین ۳۲ ایزوله (۷۴/۴ درصد) از ۴۳ ایزوله مقاوم به آمینوگلیکوزیدها، حداقل یکی از سه ژن مورد مطالعه را حمل می‌کردند.

بحث

داروهای آمینوگلیکوزیدی، به ویژه آمیکاسین، جنتامایسین و توبرامایسین، از جمله مهم‌ترین گزینه‌های دارویی مورد استفاده در درمان عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشند(۹). حال آن که با تداوم استفاده گسترده از این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نسبت به این خانواده آنتی‌بیوتیکی در حال افزایش است(۹). *سودوموناس آئروژینوزا* با به کارگیری مکانیسم‌های مختلفی از جمله تولید آنزیم‌های تغییردهنده ساختار دارو و دریافت اینتگرون‌های حامل ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها باعث افزایش مقاومت نسبت به این داروها می‌شود(۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان مقاومت به آمیکاسین، جنتامایسین و توبرامایسین با مطالعه وزیری و همکاران بسیار قابل مقایسه می‌باشد، به طوری‌که در مطالعه آن‌ها، به ترتیب ۲۴، ۴۳ و ۳۸ درصد ایزوله‌ها به آمیکاسین، جنتامایسین و توبرامایسین مقاوم بودند(۱۵)؛ حال آن‌که در مطالعه زارعی و همکارانش بر روی ایزوله‌های سوختگی، میزان مقاومت به ترتیب ۶۰/۳ درصد، ۶۷/۱ درصد و ۵۸/۹ درصد گزارش شده است(۶)؛ بالا بودن میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این مطالعه، تأیید کننده وجود فشار آنتی‌بیوتیکی بالا بر بیماران بستری در بخش سوختگی و بالا بودن میزان مقاومت در ایزوله‌های جداشده از این بیماران می‌باشد. تجویز نادرست و غیراصولی دارو، عدم توجه به دوز دارو توسط پزشکان، اکتفا به درمان تجربی بدون توجه به نتیجه آنتی‌بیوگرام، کامل نکردن دوره درمان، طولانی شدن مدت بستری و بسیاری موارد دیگر از جمله دلایلی هستند که باعث بروز و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* می‌شوند(۶).

میزان شیوع ژن‌های کدکننده AMEs در کشورهای مختلف، متفاوت می‌باشد. در مطالعه حاضر میزان انتشار این ژن‌ها در ۱۰۰ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* ۱۹ درصد بوده است. در مطالعه‌ای که در کشور نیجریه انجام شده بود، شیوع این ژن‌ها ۲۲/۲ درصد گزارش شده است که به نتایج مطالعه حاضر بسیار نزدیک است(۱۶). همچنین در مطالعه مربوط به کشور یونان و هند فراوانی این ژن‌ها به ترتیب ۸۰ و ۴۳/۵ درصد گزارش شده است(۱۸،۱۷). بالاترین میزان گزارش شده مربوط به کشور کره می‌باشد (۸۷/۳ درصد)(۱۹). ممکن است یکی از علل کم بودن میزان شیوع این ژن‌ها در مطالعه حاضر نسبت به مطالعات یونان و کره دخیل بودن سایر ژن‌های کدکننده آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها باشد. در این مطالعه شیوع ژن‌های *aac(6)-IIa* و *ant(2")-Ia* در نمونه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید به ترتیب ۴۱/۸ درصد و ۱۳/۹ درصد بود، در حالی که این میزان در مطالعه وزیری و همکاران برای ژن‌های *aac (6') –II* و *ant (2") –Ia* به ترتیب ۳۶ و ۲۸ درصد بود(۱۵). همچنین ۸۶/۳ درصد از ایزوله های بالینی مطالعه شده توسط زارعی و همکاران حامل ژن *ant(2")-I* بودند که نسبت به مطالعه حاضر بسیار بیشتر می‌باشد(۶). علاوه بر این Miller و همکاران نشان دادند که ژن‌های *aac(6')-II* و *ant(2')-I* به ترتیب با شیوع ۳۲/۵ درصد و ۱۶/۹ درصد از جمله شایع‌ترین ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در اروپا می‌باشند(۲۰).

اینتگرون‌ها نیز با دریافت و جابه‌جایی کاست‌های حاوی توالی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند نقش بسزایی در اشاعه مقاومت به آمینوگلیکوزیدها داشته باشند(۹). بنابراین در این مطالعه بررسی اینتگرون‌ها به‌طور جداگانه انجام شد. در مطالعه حاضر از ۱۰۰ ایزوله بالینی جمع‌آوری شده ۴۲ ایزوله دارای اینتگرون‌های

کلاس ۱ بودند و از ۴۳ ایزوله مقاوم بـه آمینوگلیکوزیـد ۲۶ ایزوله (۶۰/۴ درصد) حامل اینتگرون‌هـای کـلاس ۱ بودند. در مطالعات مشابهی در شمال غربی کشور ایـران و در شهرهای تبریز و ارومیه، میزان شیوع بـه ترتیـب ۶۶ درصد و ۵۶/۳ درصد گزارش شده بـود کـه بـیش‌تـر از مطالعه حاضر بوده است(۲۱،۱۱). در سایر مطالعات انجـام شده در داخـل کشـور نیـز میـزان شـیوع اینتگـرون‌هـای کلاس ۱ بین ۴۳ تا ۶۶ درصد بوده است و نتـایج مطالعـه حاضر نیز بسیار نزدیک به این آمار می‌باشـد(۱۱، ۲۱). در مطالعه‌ای مشابه در کشور ترکیه، میزان شـیوع اینتگـرون کلاس ۱ در ایزوله‌های بـالینی *سـودوموناس آئروژینـوزا* ۴/۸ درصـد گـزارش شـده اسـت کـه بسـیار کـم‌تـر از بررسی‌های انجام شده در داخل ایران می‌باشد و نشـان از سیاست‌های مـدیریتی صـحیح و انتخـاب آنتـی‌بیوتیـک مناسب دارد(۲۲). این میزان در کشـورهای اروپـایی بـین ۲۲ درصد تا تقریبـا ۴۷ درصـد و در کشـورهای جنـوب شرق آسیا از ۳۵ تا ۹۵ درصد متغیر بـوده اسـت(۲۶- ۲۳). آمارها و ارقام نشان از شیوع بالای ایـن عناصـر ژنتیکـی متحرّک در اکثر مناطق دنیا دارد. ولی بـا ایـن حـال ایـن میـزان در کشـورهای توسـعه یافتـه کـه سیاسـت‌هـای مدیریتی بهتری دارند کمتر می‌باشد(۱۱).

بـا توجـه بـه نتـایج ایـن مطالعـه و مطالعـات مشـابه استدلال می‌شود که با گذشت زمان میزان شیوع ژن‌های مقاومت به داروهای آمینوگلیکوزیدی در حـال افـزایش است که این امر لزوم بررسی سالیانه شیوع ژن‌های حامل این نوع مقاومـت و سـایر مکانیسـم‌هـای دخیـل در ایـن مقاومت مثل پمپ‌های افلاکس، تغییر نفوذپذیری غشـاء و ... را تأیید می‌کند. شیوع اینتگرون‌های حامل ژن مقاومت و این آنزیم‌ها از نظر جغرافیایی بسیار متنـوع مـی‌باشـند؛ بنابراین تعیین میزان شیوع در هر کشور به طور جداگانـه ضروری می‌باشد. با توجه به شـیوع بـالای عفونـت‌هـای بیمارسـتانی و اکتسـابی از جامعـه لازم اسـت کـه میـزان شیوع و مکانیسم‌های دخیـل در مقاومـت آنتـی‌بیـوتیکی بررسی شود تا بـدین وسـیله منشـاء مقاومـت مشـخص و راهکار درمانی مناسب اندیشیده شود. هـر چنـد یکـی از عمده‌ترین علل مقاومت دارویـی را بـه حضـور ژن‌هـای مقاومت نسبت داده‌اند امّا نبایـد از نظـر دور داشـت کـه می‌توان با کاهش فشار آنتی بیوتیکی و با انتخاب بهترین آنتی‌بیوتیک موثر از اشـاعه مقاومـت و بـه‌وجـود آمـدن باکتری‌های با مقاومت چندگانه جلوگیری کرد.

سپاسگزاری

این مقاله با کد اخـلاق IR.MAZUMS.REC.1398.075 در دانشگاه علوم پزشکی مازندران مـورد تصـویب قـرار گرفته است. بدین وسیله از کلیه افـرادی کـه در ایـن طـرح همکـاری داشتند، بسیار سپاسگزاریم.

References

1. Ceyssens PJ, Lavigne R. Bacteriophages of Pseudomonas. Future Microbiol 2010; 5(7): 1041-1055.
2. Kashfi M, Hashemi A, Eslami G, Sadredin Amin M, et al. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes among Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn patients. Arch Clin Infect Dis 2017; 12(1): e40896.
3. Hassett DJ, Charniga L, Bean K, Ohman DE, Cohen MS. Response of Pseudomonas aeruginosa to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. Infect Immun 1992; 60(2): 328-336.
4. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev 2003; 16(3): 430-450.
5. Murray BE. Diversity among multidrug-resistant enterococci. Emerg Infect Dis 1998; 4(1): 37-47.

6. Zarei-Yazdeli M, Eslami G, Mirsafaei H, Zandi H, Shokohi Far M, Kiani M. Prevalence of aminoglycoside resistance and ant (2")-I gene in Pseudomonas aeruginosa isolated from burn wound specimens in Yazd. FEYZ 2017; 20(6): 532-538.
7. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: our worst nightmare? Clin Infect Dis 2002; 34(5): 634-640.
8. Mandell G, Dolin R, Bennett J. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2009.
9. Poole K. Aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(2): 479-487.
10. Dubois V, Poirel L, Marie C, Arpin C, Nordmann P, Quentin C. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing blaGES-1 and a fused product of aac (3)-Ib/aac (6")-Ib" gene cassettes in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(3): 638-645.
11. Goli HR, Rezaee MA, Nahaei MR. Prevalence and molecular characterization of Class 1 integrons among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in Northwest of Iran. Mol. Genet Microbiol Virol 2017; 32(2): 109-115.
12. Xu Z, Li L, Shirtliff 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; 47(1): 230-234.
13. Poirel L, Lambert T, Türkoglü S, Ronco E, Gaillard J, Nordmann P. Characterization of Class 1 Integrons from Pseudomonas aeruginosa That Contain the bla VIM-2Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamase Gene and of Two Novel Aminoglycoside Resistance Gene Cassettes. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(2): 546-552.
14. Greaves P. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. J Med Microbiol 1991; 35(2): 125-126.
15. Vaziri, F, Peerayeh SN, Nejad QB, Farhadian A. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (aac (6')-I, aac (6')-II, ant (2")-I, aph (3')-VI) in Pseudomonas aeruginosa. Clinics 2011; 66(9): 1519-1522.
16. Odumosu BT, Adeniyi BA, Chandra R. Occurrence of aminoglycoside-modifying enzymes genes (aac (6′)-I and ant (2′′)-I) in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa from Southwest Nigeria. Afr Health Sci 2015; 15(4): 1277-1281.
17. Zakova A, Talábová E, Giamarellou H, Mačičková T, et al. Comparison of aminoglycoside resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa isolates from Slovakia and Greece. Biologia, Bratislava 2001; 57(6): 617-624.
18. Chaudhary M, Payasi A. Resistance patterns and prevalence of the aminoglycoside modifying enzymes in clinical isolates of gram negative pathogens. Global J Pharmacol 2014; 8(1): 73-79.
19. Kim JY, Park YJ, Kwon HJ, Han K, Kang MW, Woo GJ., Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with β-lactamases in Pseudomonas aeruginosa: a Korean nationwide study. J Antimicrob Chemother 2008; 62(3): 479-483.
20. Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, Glupczynski Y, Mackey P, Shlaes D, et al. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms—changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Clin Infect Dis 1997; 24(Suppl_1): S46-S62.

21. 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. Iran J Microbiol 2010; 2(3): 115-121.
22. Cicek AC, CizmeciZ, Saral A, Düzgün A. Screening of Class 1 and Class 2 integrons in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa collected from seven hospitals in Turkey: A multicenter study. J Med Microbiol 2013; 3(4): 227.
23. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Musilek M. Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of Pseudomonas aeruginosa in the Czech Republic. Res Microbiol. 2010; 161(3): 234-242.
24. 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. Int J Infect Dis 2009; 13(6): 717-721.
25. Wu Y, Li H, Li J, Huang ZH. Detection of Pseudomonas aeruginosa carried a new array of gene cassettes within class 1 integron isolated from a teaching hospital in Nanjing, China. J Microbiol 2008; 46(6): 687-691.
26. Gu B, Tong M, Liu G, Ning M, Pan Sh, Zhao W, et al. Prevalence and characterization of class I integrons among Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii isolates from patients in Nanjing, China. J Clin Microbiol 2007; 45(1): 241-243.