فصلنامه بیماری های عفونی و گرمسیری وابسته به انجمن متخصصین بیماری های عفونی و گرمسیری
سال شانزدهم ، شماره 53 ، صفحات 17 تا 21 ، تابستان 1390

فراوانی اینتگرون های کلاس 2 در سویه های سالمونلا انتریکا جداسازی شده از تهران

رضا رنجبر[1]، علی ناغونی*[2]

1. باکتری شناس پزشکی، دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)
2.کارشناس ارشد زیست شناسی گرایش میکروبیولوژی، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

* نشانی برای مکاتبه: کرج، انتهای رجائی شهر، تقاطع بلوار موذن و استقلال، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، باشگاه پژوهشگران جوان، تلفن: 02614405459، alinaghoni@gmail.com

دریافت مقاله: اسفند هشتاد و نه پذیرش برای چاپ: اردیبهشت نود

چکیده

سابقه و هدف: *مقاومت سویه های سالمونلا انتریکا نسبت به آنتی بیوتیک ها در حال افزایش می باشد. هدف از انجام این تحقیق، تعیین فراوانی اینتگرون های کلاس 2 و شناسایی رابطه بین حضور اینتگرون های کلاس 2 و وجود مقاومت های آنتی بیوتیکی در سویه های سالمونلا انتریکا جدا شده از تهران می باشد.*

روش کار: *ایزوله های سالمونلا از بیمارستان های مختلف شهر تهران در طی سال های 88-1386 جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفتند. این ایزوله ها با استفاده از تست های بیوشیمیایی و سرولوژیک تعیین هویت گردیدند. حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های جداسازی شده مطابق با روش استاندارد توصیه شده از طرف CLSI تعیین گردیدند. حضور اینتگرون های کلاس 2 توسط روش PCR در ایزوله های سالمونلا مورد مطالعه قرار گرفت.*

یافته ها: *در مجموع 138 ایزوله سالمونلا جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفتند. از این تعداد نه ایزوله (6/5٪) واجد اینتگرون کلاس 2 با طول 2/16 کیلو جفت باز بودند. تمامی ایزوله های واجد اینتگرون دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی بودند.*

نتیجه گیری: *اینتگرون های کلاس 2 به میزان بسیار کمی در بین ایزوله های سالمونلا انتریکای جداسازی شده از تهران وجود دارند ولی همین میزان کم بیشتر از حدی است که سایر محققین در مطالعات خود گزارش کرده اند. همچنین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در بین ایزوله های سالمونلا بسیار بالا بوده و تعداد زیادی از ایزوله های جداسازی شده دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی بوده اند که این می تواند یک هشدار به جامعه بهداشتی باشد.*

واژگان کلیدی: ***اینتگرون کلاس 2، سالمونلا انتریکا، مقاومت آنتی بیوتیکی***

مقدمه

ظهور و گسترش مقاومت های آنتی بیوتیکی در باکتری ها به یک مشکل جهانی تبدیل شده است(1). مقاومت های آنتی بیوتیکی می تواند از طریق موتاسیون های نقطه ای در ژنوم باکتری ها، کاهش نفوذ آنتی بیوتیک ها از دیواره سلولی، غیر فعـال سازی آنزیماتیک آنتی بیوتیک ها، مکانیسم Efflux pump برای خارج کردن آنتی بیوتیک ها، تغییر جایگاه هدف آنتی بیوتیک و یا بوسیله انتقال افقی عناصر ژنتیکی که حاوی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی می باشند، رُخ دهد(2). گسترش مقاومت های آنتی بیوتیکی از طریق انتقال افقی ژن ها، منجر به ظهور سریع مقاومت های آنتی بیوتیکی در بین باکتری ها شده است. کسب ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی می تواند از طریق عناصر ژنتیکی متحرک به مانند پلاسمید ها، ترانسپوزون ها و اینتگرون ها صورت بپذیرد(3).

مقاومت سویه های سالمونلا انتریکا نسبت به ترکیبات ضد میکروبی در حال افزایش می باشد و یکی از علل این افزایش ناشی از حمل و انتقال افقی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی از طریق ساختار های اینتگرونی است(4). اینتگرون های کلاس 1 و 2 بطور گسترده در بین باکتری های گرم منفی از جمله سروتیپ های مختلف سالمونلا انتریکا مشاهده شده اند(5 و 6).

اینتگرون ها عناصر ژنتیکی می باشند که توانایی وارد کردن ژن های خارجی را، مثل ژن مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک،) در ساختار خود دارند. تمام اینتگرون هایی که تا به امروز شناسایی شده اند دارای سه عنصر ضروری زیر برای وارد کردن ژن های خارجی می باشند:

(الف) ژن intI که آنزیم اینتگراز را کد می کند. این اینتگراز متعلق به خانواده تیروزین-ریکامبیناز می باشد و سبب وارد شدن ژن خارجی به ساختار اینتگرون می شود، (ب) attI site که محل قرار گیری ژن خارجی می باشد و ژن های مقاومت در این مکان وارد می شوند و (ج) P_c که پروموتور می باشد و محل شروع صحیح رونویسی را برای آنزیم رونویسی مشخص می کند و سبب بیان صحیح ژن های وارد شده در ساختار اینتگرون می شود (7). بر اساس توالی کد کننده آنزیم اینتگراز تاکنون پنج کلاس از اینتگرون ها شناسایی شده اند. این اینتگرون های در گسترش مقاومت های آنتی بیوتیکی در بین باکتری ها نقش دارند(7).

از آنجائیکه در تحقیقات انجام شده، بروز همزمان مقاومت به چند دارو در باکتری های روده ای با وجود اینتگرون ها در ارتباط بوده است (2و5و8) لذا هدف از انجام این تحقیق، تعیین فراوانی اینتگرون های کلاس 2 و شناسایی رابطه بین حضور اینتگرون های کلاس 2 و وجود مقاومت های آنتی بیوتیکی چندگانه سویه های سالمونلا انتریکا جدا شده از تهران می باشد.

رو ش کار

این تحقیق، یک مطالعه توصیفی بوده و جامعه آماری آن را نمونه های بدست آمده از بیماران مراجعه کننده به مرکز طبی کودکان و بیمارستان بقیه الله (عج) در طی سال های 88-1386 تشکیل می دهند.

نمونه های بالینی از جمله مدفوع و خون از بیماران مشکوک به عفونت با سالمونلا گرفته می شد. نمونه مدفوع بیماران بلافاصله پس از نمونه گیری به محیط کشت سلنیت F منتقل می گردید. نمونه ها به مدت حداکثر 6 ساعت در این محیط نگهداری می شدند. سپس به محیط های کشت انتخابی به مانند سالمونلا – شیگلا آگار (SS) انتقال یافته و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس قرار داده می شدند.

نمونه های خون نیز ابتدا در محیط های دی فازیک کشت داده شده و سپس به محیط های انتخابی انتقال داده می شدند. در روز بعد کلونی های مشکوک به سالمونلا جداسازی می شدند و سپس توسط تست های بیوشیمیایی استاندارد نظیر انتقال بر روی محیط Triple sugar iron agar (TSI)، Simmons' citrate agar، اوره و MRVP broth و غیره مورد شناسایی قرار می گرفتند. پس از انجام آزمون های افتراقی مذکور آزمون سروتایپینگ با آنتی سرم های ساخت شرکت بهار افشان و کوشا فراور گیتی انجام می پذیرفت.

بدین منظور از باکتری مورد آزمایش سوسپانسیون یکنواختی در سرم فیزیولوژی تهیه کردیم و ابتدا یک قطره از سوسپانسون را با یک قطره آنتی سرم روی لام شیشه ای مخلوط کردیم. ایجاد آگلوتیناسیون قابل مشاهده با چشم غیر مسلح پس از یک تا دو دقیقه تست مثبت را نشان می دهد.

دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده در این تحقیق شامل آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (AM 10 µg) سفالوتین (CF 10 µg) سفتریاکسون (CRO، 30 µg) ، سفتازیدیم (CAZ، 30 µg) ، ایمیپنم (IPM ،10 µg)، جنتامایسین (GM، 10 µg) سیپروفلوکساسین (CP ،5 µg) ، تتراسایکلین (TE، 30 µg)، داکسی سایکلین (D، 30 µg)، کلرامفنیکل (C، 30µg)و سولفامتاکسازول-تری متوپریم (1/25 µg + SXT 23/75) بودند. آزمون آنتی بیوگرام با استفاده از سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی و مقایسه کدورت آن با استاندارد نیم مک فارلند انجام گردید (کدورت لوله نیم مک فارلند برابر، کدورت تعداد تقریبی $1/5\times10^8$ CFU ml^{-1} سلول می باشد). سوسپانسیون تهیه شده به وسیله سواب استریل پنبه ای بر روی محیط مولر هینتون آگار ساخت کارخانه مرک آلمان به صورت متراکم کشت داده شد، سپس دیسک های آنتی بیوتیکی با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفتند. محیط ها به مدت 24-18 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شدند. سپس قطر منطقه ممانعت از رشد به وسیله خط کش اندازه گیری شد و مقاومت و یا حساسیت باکتری با استفاده از جدول استاندارد CLSI مشخص گردید (9). در این مطالعه از میکروارگانیسم اشرشیا کلی ATCC 25922 به عنوان کنترل در انجام آزمایش استفاده شد.

ژنوم ایزوله های سالمونلا با استفاده از روش فنل-کلروفرم-ایزوآمیلیک الکل استخراج شدند و برای بررسی حضور اینتگرون های کلاس 2 با استفاده از روش PCR مورد مطالعه قرار گرفتند. پرایمر های مورد استفاده در این مطالعه در جدول 1 نمایش داده شده اند. شرایط تکثیر ژن مورد نظر با استفاده از شرایط توصیه شده توسط سایر محققین در دستگاه Mastercycler gradient ساخت شرکت Eppendorf صورت پذیرفت (11و12). تمام محصولات PCR بعد از رنگ آمیزی ژل ها توسط ایتیدیوم برماید مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول 1. پرایمر های مورد استفاده در این مطالعه

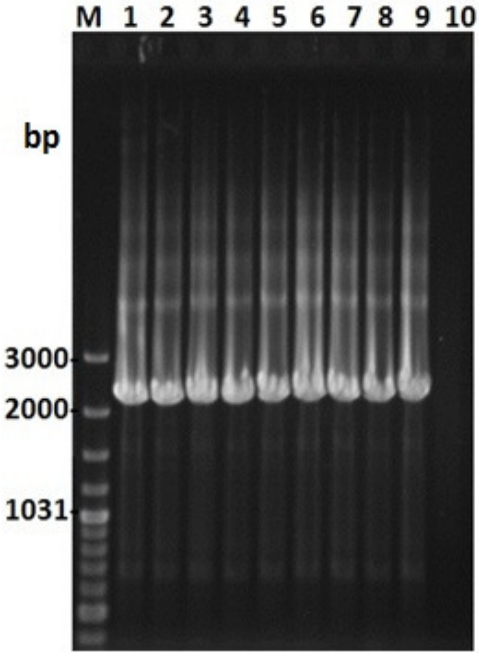
نام پرایمر ها	ترادف سکانس پرایمر (5´→3´)	ناحیه هدف	دمای ذوب (سلسیوس)	منبع
hep74	5′-CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA-3′	ناحیه متغییر اینتگرون	85	(10)
hep51	5′-GATGCCATCGCAAGTACGAG-3′		65/6	(10)

یافته ها

در مجموع 138 سویه سالمونلا انتریکا در این تحقیق جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفتند. از کل بیماران تشخیص داده شده، 73 مورد (52/9 درصد) مذکر و 65 مورد (47/1 درصد) مؤنث بودند. درصد بالایی (85٪) از نمونه ها مدفوعی و بقیه مربوط به خون بودند.

بررسی های سرولوژیک با آنتی سرم های سالمونلا نشان داد که 54 (39/1٪) ایزوله ها متعلق به سروگروه C سالمونلا، 24 (17/4٪) متعلق به سروگروه B سالمونلا، 57 (41/3٪) متعلق به سروگروه D سالمونلا و بقیه متعلق به سایر سروگروه های سالمونلا از جمله E و G بودند. حدود 85 درصد از سویه های سالمونلا انتریکا جداسازی شده حداقل به یک آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند و 68٪ از سویه ها دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی بودند.

آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که 93 ایزوله 67/4٪ به داکسی سایکلین، 70 ایزوله 50/7٪ به تتراسایکلین، 28 ایزوله 20/3٪ به سولفاماتاکسازول-تری متوپریم، 22 ایزوله 16٪ به آمپی سیلین، 18 ایزوله 13٪ به کلرامفنیکل، 6 ایزوله (4/3٪) به سفتازیدیم، 6 ایزوله (4/3٪) به سفتریاکسون، 6 ایزوله (4/3٪) به سفالوتین مقاوم بودند. هیچکدام از ایزوله ها نسبت به جنتامایسین، ایمیپنم و سیپروفلوکساسین مقاومتی نشان ندادند. نه ایزوله (6/5٪) واجد اینتگرون کلاس 2 با طول 2/16 کیلو جفت باز بودند. (شکل 1). اینتگرون کلاس 2 در دو سروتیپ اینفنتیس (6 مورد) و تیفی موریوم (3 مورد) یافت شدند. تمامی ایزوله های واجد اینتگرون دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی بودند.



شکل 1. آزمایش PCR جهت تشخیص اینتگرون های کلاس 2 در نمونه های بالینی. نمونه های مثبت واجد اینتگرون کلاس 2 (ستون ها 9-1) و ستون شماره 10 مربوط به یکی از ایزوله های بالینی فاقد اینتگرون کلاس 2 می باشد (نمونه منفی). ستون M مربوط به مارکر مولکول (100 bp) می باشد.

بحث

امروزه گسترش ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی از طریق ساختار های اینتگرونی به یک مشکل مهم در درمان عفونت های حاصل از باکتری های بیماری زا تبدیل شده است. همچنین ظهور مقاومت های آنتی بیوتیکی چندگانه به یک پدیده معمول در کشور های در حال توسعه تبدیل گشته است(11و13).

در طی چند دهه گذشته سروتیپ های مختلف سالمونلا بطور فزاینده ای نسبت به آنتی بیوتیک های رایج مقاوم شده اند(14) و ظهور مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی در سالمونلا نسبت به آنتی بیوتیک های مؤثر، به یک مسئله بهداشتی نگران کننده برای مسئولین بهداشتی در کشورهای در حال توسعه مبدل گردیده است(15).

نتایج ما حاکی از این بود که میزان بالای (68٪) از ایزوله های سالمونلا انتریکا دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی بودند، و این بیش از میزانی بود که سایر محققین در مطالعات خود گزارش داده بودند. مطالعاتی که در کشور های کره جنوبی و پرتغال انجام گرفته بودند به ترتیب میزان مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی را 65/9٪ و 21٪ گزارش کردند(5و16).

نتایج تست حساسیت دارویی نشان داد که جنتامایسین، ایمیپنم و سیپروفلوکساسین آنتی بیوتیک های حساس نسبت به سالمونلا های مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاه (In vitro) را دارا بودند و در صورتیکه اندیکاسیون دارویی وجود داشته باشد، این آنتی بیوتیک ها قابلیت استفاده در درمان عفونت های ناشی از این باکتری ها را خواهند داشت. از این بین سیپروفلوکساسین آنتی بیوتیکی است که امروزه به طور گسترده در درمان عفونت های حاصل از سالمونلا مورد استفاده قرار می گیرد و نتایج حاصل از این تحقیق نشان از اثر بخشی خوب این آنتی بیوتیک بر روی ایزوله های سالمونلا انتریکای جداسازی شده از تهران را می دهد.

اینتگرون ها یکی از راه های گسترش مقاومت های چندگانه آنتی بیوتیکی هستند(17). در تحقیق حاضر، اینتگرون کلاس 2 در 9 ایزوله (6/5٪) از 138 ایزوله سالمونلا مورد شناسایی قرار گرفتند. در مطالعات قبلی نیز که در نقاط دیگر دنیا صورت گرفته است، میزان حضور اینتگرون های کلاس 2 کمتر از این مطالعه گزارش شده است. جین و همکاران در مطالعه ی که در سال 2009 بر روی 834 ایزوله سالمونلا در هونگ کونگ انجام دادند، دریافتند که 105 ایزوله یعنی 13٪ واجد اینتگرون کلاس 1 بودند، و در هیچ یک از ایزوله ها، حضور اینتگرون کلاس 2 را گزارش نکردند(18).

تاکنون فقط شش ژن مقاومت مختلف در رابطه با اینتگرون های کلاس 2 مورد شناسایی قرار گرفته اند و این درحالی است که بیش از 80 ژن مختلف مقاومت برای اینتگرون های کلاس 1 مورد شناسایی قرار گرفته اند که مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف را به باکتری ها اعطا می کنند(7و19و20). این کاهش در تنوع ممکن است به دلیل این حقیقت باشد که ژن کد کننده آنزیم اینتگراز در اینتگرون کلاس 2 دارای موتاسیون Nonsense در کدون 179 می باشد و این پدیده سبب تولید پروتئینی ناقص می شود (7و21). از طرفی دیگر intI2 بسیار اختصاصی تر و محدود تر از intI1 در وارد کردن ژن خارجی به ساختار اینتگرونی در ناحیه attI عمل می کند(21).

نتیجه گیری

یافته های ما نشان داد که اینتگرون های کلاس 2 به میزان بسیار کمی در بین ایزوله های سالمونلا انتریکای جداسازی شده از تهران وجود دارند ولی همین میزان کم بیشتر از میزانی است که سایر محققین در مطالعات خود گزارش کرده اند. همچنین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در بین ایزوله های سالمونلا بسیار بالا بوده و تعداد زیادی از ایزوله های جداسازی شده دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی بوده اند که این می تواند یک هشدار به جامعه بهداشتی ما باشد. مراقبت و نظارت بر روی مقاومت های آنتی بیوتیکی شامل، غربالگری اینتگرون ها بعنوان یک شاخص و نشانه از کسب و گسترش مقاومت های آنتی بیوتیکی، می تواند بعنوان یک استراتژی مهم در مقابله با مقاومت های آنتی بیوتیکی در این میکروارگانیسم ها باشد.

REFERENCES

1. Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant Salmonella. Immunol Med Microbiol 2005; 43(1):1-11.

2. Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, Harrison LH. Integron-mediated Multidrug Resistance in a Global Collection of Nontyphoidal Salmonella enterica Isolates. Emerg Infect Dis 2009; 15(3):388-396.

3. Chang YC, Shih DY, Wang JY, Yang SS. Molecular characterization of class 1 integrons and antimicrobial resistance in Aeromonas strains from foodborne outbreak-suspect samples and environmental sources in Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 59(2):191-197.

4. Butaye P, Michael GB, Schwarz S, Barrett TJ, Brisabois A, White DG. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi Salmonella serotypes. Microbes Infect 2006; 8(7):1891-1897.

5. Antunes P, Machado J, Peixe L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in Salmonella enterica isolates from different sources in Portugal. J Antimicrob Chemother 2006; 58(2):297-304.

6. Rodríguez I, Martín MC, Mendoza MC, Rodicio MR. Class 1 and 2 integrons in non-prevalent serovars of Salmonella enterica: structure and association with transposons and plasmids. J Antimicrob Chemother 2006; 58(6):1124-1132.

7. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol 2006; 4(8):608-620.

8. Peirano G, Agerso Y, Asrestrup FM, Falavina dos Reis EM, dos Prazeres Rodrigues D. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among Salmonella enterica from Brazil. J Antimicrob Chemother 2006; 58(2):305-309.

9. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 15th Informational Supplement. Approved Standard M100-S15. Wayne, PA 2005; Clinical and Laboratory Standards Institute.

10. White PA, Mclver CJ, Rawilinson WD. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(9):2658-2661.

11. Pai H, Byeon J, Yu S, Lee BK, Kim S. Salmonella enterica serovar typhi strains isolated in Korea containing a Multidrug resistance class 1 integron. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(6):2006-2008.

12. Rodriguez I, Rosario Rodicio M, et al. Large conjugative plasmids from clinical strains of Salmonella enterica serovar virchow contain a class 2 integron in addition to class 1 integrons and several non-integron-associated drug resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(4):1603-1607.

13. Mirza SH, Kariuki S, Mamun KZ, Beeching NJ, Hart CA. Analysis of plasmid and chromosomal DNA of multi-drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi from Asia. J Clin Microbiol 2000; 38:1449-1452.

14. McDermott PF. Antimicrobial resistance in nontyphoidal Salmonellae. In: Aarestrup FM, ed. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. Washington, DC, USA; ASM Press. 2006; PP: 293-314.

15. Parry C. Antimicrobial drug resistance in Salmonella enterica. Curr Opin Infect Dis 2003; 16(5):467-472.

16. Chung YH, Kim SY, Chang YH. Prevalence and antibiotic susceptibility of Salmonella isolated from foods in Korea from 1933 to 2001. J Food Prot 2003; 66(7):1154-1157.

17. Liebert CA, Hall RM, Summers AO. Transposon TN21, flagship of the floating genome. Microbiol Mol Biol Rev 1999; 63(3):507-522.

18. Jin Y, Ling JM. Prevalence of integrons in antibiotic-resistant Salmonella spp. in Hong Kong. Jpn J Infect Dis 2009; 62(6):432-439.

19. Radstrom P, Skold O, Swedberg G, Flensburg J, Roy PH, Sundstrom L. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. J Bacteriol 1994; 176(11):3257-3268.

20. Ramirez MS, Vargas LJ, Cagnoni V, Tokumoto M, Centron D. Class 2 integron with a novel cassette array in a Burkholderia cenocepacia isolate. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(10):4418-4420.

21. Karin Hansson, Lars Sundström, Alex Pelletier, Paul H. Roy. IntI2 Integron Integrase in Tn7. J Bacteriol 2002; 184(6):1712-1721.