مجلـه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـگاه علـــوم پزشـکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۲, شمـاره‌ی ۹٤, آذر و دی ۱۳۹۳, صفحـــات ۷۲ تا ۸۲

بررسی ارتباط الگوهای مقاومت دارویی و وجود اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ در میان باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های صفرا در بیماران دارای اختلالات دستگاه صفراوی

الهه تاج الدین[۱]، دکتر مسعود آل بویه[۲]، دکتر امیرهوشنگ محمد علیزاده[۳]، دکتر محمد رضا زالی[۳]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماری‌های دستگاه گوارش masoud.alebouyeh@gmail.com

دریافت: ۹۲/۸/۲۵ پذیرش: ۹۳/۳/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: *هدف از این مطالعه شناسایی باکتری‌های مرتبط با بیماری‌های دستگاه صفراوی و بررسی ارتباط حضور اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ در آن ها با الگوهای مقاومت دارویی است.*

روش بررسی: *نمونه‌های صفرای بیماران صفراوی تحت کلانژیوپانکراتوگرافی از نظر حضور باکتری و الگوی مقاومت دارویی توسط روش بیوشیمیایی و انتشار دیسک بررسی گردیدند. به‌منظور تعیین حضور ژن‌های intI1، intI2، و intI3 در DNA ژنومی و پلاسمیدی این جدایه‌ها، از PCR استفاده گردید.*

یافته‌ها: *از میان ۱۰۲ نمونه‌ی صفرا، ٤۱/۲ درصد نمونه ها کشت مثبت بودند. باکتری‌های جدا شده شامل اشرشیاکلی (۳۵/۵ درصد)، انتروکوکوس (۱۹/٤ درصد)، کلبسیلا پنومونیه (۱۷/۷٤ درصد)، سودوموناس آئروژینوزا (۱۷/۷٤ درصد)، آسینتوباکتر (٦/٤۵ درصد)، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس (۱/٦ درصد) و استرپتوکوکوس‌ها (۱/٦ درصد) بود. تمامی جدایه‌ها به آموکسی سیلین- کلاولونیک اسید مقاوم بودند و ۸۷/۵ درصد آن‌ها الگوی مقاومت چندگانه را نشان دادند. انتشار اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ در بین جدایه‌ها به‌ترتیب در اشرشیاکلی ۵۹/۰۹ درصد و ۵۰ درصد، سودوموناس ائروژینوزا ۸۱/۸۱ درصد و ٤۵/٤۵ درصد، کلبسیلا پنومونیه ٦۳/٦ درصد و ۲۷/۲۷ درصد و آسینتوباکتر بومانی ۱۰۰ درصد و ۱۰۰ درصد بود. این نتایج همچنین حضور اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ را بر روی پلاسمیدهای استخراج شده و وجود ارتباط معنادار میان اینتگرون کلاس ۱ و مقاومت به سیپروفلوکساسین و جنتامایسین را نشان دادند.*

نتیجه‌گیری: *فراوانی بالای اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ در میان جدایه‌های صفراوی و ارتباط آن‌ها با افزایش فنوتیپ مقاومت آنتی بیوتیکی پیشنهاد کننده‌ی نقش صفرا به‌عنوان عامل انتخابی باکتری‌های کد کننده‌ی این عناصر است.*

واژگان کلیدی: اینتگرون، عفونت صفراوی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی؛ مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماری‌های دستگاه گوارش، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۲- دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماری‌های دستگاه گوارش، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳- فوق تخصص گوارش و کبد، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد

مقدمه

مجرای صفراوی در انسان عموما استریل می‌باشد (۱). صفرا دارای ترکیباتی از جمله پروتئین‌ها، یون‌ها، رنگدانه‌ها، کلسترول و نمک‌های صفراوی مختلف می‌باشد که می‌تواند بدین طریق علاوه بر هضم اسیدهای چرب در حفاظت در برابر باکتری‌های بیماری‌زا نیز نقش داشته باشد. وجود میکروارگانیسم‌ها در صفرای انسان می‌تواند نشانه‌ای از وجود یک مشکل بالینی باشد که در اغلب موارد با بیماری کوله سیستیت، کلانژیت و سنگ‌های صفراوی مرتبط است (۲). حضور گونه‌های باکتریایی فلور روده شامل گونه‌های *اشرشیاکلی، استرپتوکوکوس و انتروکوکوس، انتروباکتر، کلبسیلا، سودوموناس، پروتئوس* و باکتری‌های بی‌هوازی مانند *کلستریدیا و باکترویید‌س‌ها* در صفرای بیماران مبتلا به این بیماری‌های صفراوی نشان دهنده‌ی اهمیت این باکتری‌ها در بروز این نوع بیماری‌ها است (۳). در بیماری‌های مختلف صفراوی، درمان‌های کمکی مانند درمان آنتی‌بیوتیکی، درناژ صفراوی و یا جراحی از راهکارهای موثر در بهبود علایم بالینی محسوب می‌گردند. باکتری‌های نفوذ یافته به سیستم صفراوی تحت شرایط جریان عادی صفرا اهمیت بالینی چندانی ندارند ولی بعد از انسداد مجرای صفراوی، باکتری‌های موجود در صفرا تکثیر می‌یابند و فشارهای صفراوی را افزایش می‌دهند. این باکتری‌ها می‌توانند وارد گردش خون شده، باعث عفونت‌های سیستمیک شوند. وجود درصد بالای عفونت‌های مخلوط و حضور باکتری‌های مقاوم به درمان در این اندام به‌عنوان یک مشکل درمانی درنظر گرفته می‌شود (4). شناسایی میکروارگانیسم‌های دخیل در ایجاد این بیماری‌ها و ارزیابی وضعیت مقاومت دارویی آن‌ها می‌تواند کمک شایانی به پزشکان جهت تشخیص عوارض بیماری یا کنترل آن‌ها نماید. انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین گونه‌های مختلف باکتریایی می‌تواند با عناصر ژنتیکی، مانند ترانسپوزون‌ها و پلاسمیدها مرتبط باشد. اینتگرون‌ها به‌عنوان عناصر ژنتیکی حاوی مارکرهای ژنی شناخته می‌شوند که از سیستم نوترکیبی اختصاصی جایگاه، که دخیل در شناسایی و الحاق کاست‌های ژنی متحرک از جمله ژن‌های مقاومت دارویی می‌باشد، تشکیل یافته‌اند (5). این عناصر می‌توانند از طریق پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها بین جنس‌ها و گونه‌های مختلف باکتریایی منتقل شوند. اینتگرون‌ها بر اساس ژن‌های موجود بر روی ژن اینتگراز به چهار کلاس intI1 ,intI2, intI3, intI4 تقسیم شده اند (6). بیش از ۷۰ ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی مختلف بر روی سه کلاس اینتگرون شناخته شده است که از این میان اینتگرون کلاس ۱ دارای بیشترین تنوع ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی است و پراکندگی میزبانی بالاتری دارد. اینتگرون کلاس ۱ اغلب ژن مقاومت به سولفونامیدها (*Sull*) را حمل می‌کند، اینتگرون کلاس ۲ دارای ژن‌های مقاومتی *dfrA1, sat2* و *aadA1* که بر روی ترانسپوزن ۷ قرار دارند، می‌باشد و اینتگرون کلاس ۳ دارای ژن‌های متالوبتالاکتاماز می‌باشد (7). در این تحقیق، با توجه به گزارشات محدودی که در کشور در رابطه با نقش باکتری‌ها در بروز بیماری‌های صفراوی وجود دارد، بررسی فراوانی عوامل باکتریایی مقاوم به دارو در نمونه‌ی صفرای مبتلایان به کوله سیستیت، کوله لیتیازیس، سنگ کیسه صفرا، و کلانژیت و همچنین شناسایی حضور اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ به‌عنوان عوامل ژنتیکی احتمالی کد کننده‌ی این مقاومت در میان آن‌ها مورد هدف قرار داده شده است.

روش بررسی

نمونه‌گیری و کشت: در این مطالعه‌ی توصیفی، ۱۰۲ بیمار مبتلا به التهاب مجاری صفراوی، سنگ‌های کیسه صفرا و مجاری صفراوی و سایر نارسایی‌های مرتبط با دستگاه صفراوی طی مدت ۱ سال (۱۳۸۹ تا ۱۳۹۰) در بیمارستان آیت الله طالقانی به‌صورت تصادفی تحت نمونه‌گیری مایع صفراوی قرارگرفته شدند. میزان حداقل دو میلی‌لیتر صفرا از

هر بیمار، طی اندوسکوپی کلانژیوپانکراتوگرافی برگشتی (ERCP) جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها سپس در ظرف استریل جمع‌آوری و بلافاصله به آزمایشگاه ارسال شدند. تمامی نمونه‌ها برای بررسی میکروب‌شناسی در محیط‌های بلاد آگار و مک کانکی آگار تحت شرایط هوازی در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شدند. تعیین هویت باکتری‌های جدا شده با کمک آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد برای باکتری‌های گرم منفی (شامل آزمون بررسی حرکت، مصرف سیترات، تخمیر قند گلوکز، اندول، لیزین دکربوکسیلاز) و باکتری‌های گرم مثبت (شامل مصرف مانیتول، واکنش کوآگولاز و DNAase برای گونه‌های استافیلوکوکوس و مصرف بایل، مقاومت به نمک، الگوی همولیز، تجزیه‌ی اسکولین و سایر آزمون‌های تخصصی برای گونه‌های استرپتوکوکوس و انتروکوکوس) انجام گرفت (۸).

تعیین الگوی مقاومت دارویی: بررسی الگوی مقاومت دارویی باکتری‌های جدا شده به روش انتشار از دیسک توسط دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی جنتامایسین، آموکسی‌سیلین، ایمی‌پنم، اعضای سفالوسپورین‌ها، آزیترومایسین و فلوئوروکوئینولون‌ها (شرکت پادتن طب، ایران) در محیط مولر هینتون آگار با استفاده از راهنمای استاندارد آزمایشگاه‌های بالینی (CLSI) انجام شد (۹). جدایه‌های دارای الگوی مقاومتی علیه سه و بیش از سه خانواده‌ی دارویی مختلف به‌عنوان جدایه‌های دارای مقاومت چنددارویی (MDR) درنظر گرفته شدند (۱۰).

تخلیص DNA و بررسی حضور اینتگرون‌ها: DNA جدایه‌های باکتری‌های تحت مطالعه جهت شناسایی کلاس اینتگرون‌ها به روش Boiling استخراج شد (۱۱). همچنین جهت تشخیص حضور این اینتگرون‌ها بر روی پلاسمید از تمام جدایه‌های مورد بررسی با روش Miniprep استخراج پلاسمید انجام شد (۱۲). پلاسمیدهای استخراج شده توسط الکتروفورز، روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مشاهده شدند. تکثیر ژن اینتگراز از DNA ژنومی و پلاسمیدی با روش PCR انجام گرفت (جدول ۱).

جدول ۱: ترادف پرایمرهای عمومی به کار رفته در PCR

کلاس اینتگرون‌ها	توالی پرایمرها	دمای آنالینگ(°C)	محصول PCR (bp)
اینتگرون کلاس۱	F- 5′-GGCATCCAAGCAAGC-3′ R- 5′-AAGCAGACTTGACCTGAT3	٦٠	Variable
اینتگرون کلاس ۲	F- 5′- CACGGATATGCGACAAAAAGGT-3′ R- 5′-GTAGCAAACGAGTGACGAAATG-3′	٦٠	٧٨٩
اینتگرون کلاس ۳	F- 5′-AGTGGGTGGCGAATGAGTG-3′ R- 5′-TGTTCTTGTATCGGCAGGTG-3′	٦٠	٦٠٠

یافته ها

فراوانی عفونت باکتریایی صفرا در میان نمونه‌های تحت مطالعه: از مجموع ۱۰۲ نمونه صفراوی جمع‌آوری شده در بین بیماران مبتلا به اختلالات صفراوی، ٤٢ نمونه آلودگی باکتریایی را نشان دادند (٤١/١٧ درصد). آلودگی باکتریایی با دو و سه جنس مختلف باکتریایی به ترتیب در میان ١٤ (٣٣/٣٣ درصد) و ٢ (٤/٧٦ درصد) نمونه از نمونه‌های آلوده دیده شد. بیشترین عوامل باکتریایی شناسایی شده شامل جدایه‌های *اشرشیاکلی* (٣٥/٥ درصد)، *انتروکوکوس* (١٩/٤ درصد)، *کلبسیلا پنومونیه* (١٧/٧٤ درصد)،

سودوموناس ائروژینوزا (۱۷/۷٤ درصد)، *آسینتوباکتربومانی* (٦/٤٥ درصد)، *استرپتوکوکوس* (۱/٦ درصد) و *استافیلوکوکوس* (۱/٦ درصد) بود.

درصد فراوانی مقاومت دارویی و الگوی مقاومتی چندگانه: نتایج حاصل شده از بررسی مقاومت دارویی در میان جدایه‌های باکتریایی موید حضور سویه‌های با مقاومت دارویی چندگانه (MDR) بود. این فراوانی به‌ترتیب در مورد جدایه‌های *اشرشیاکلی*، *کلبسیلاپنومونیه*، *آسینتوباکتربومانی*، *انتروکوکوس* و *سودوموناس* معادل ۹۵/۵، ٦۳/٦۳، ۱۰۰، ۲۵، و ۱۰۰ درصد بود.

همانگونه که در جدول ۱ و ۲ دیده می‌شود، تمامی جدایه‌های *اشرشیاکلی*، *کلبسیلاپنومونیه*، *آسینتوباکتربومانی* و *سودوموناس* مقاومت ۱۰۰ درصد به آموکسی‌سیلین کلاولونیک اسید داشتند. درصد فراوانی و الگوی مقاومت دارویی جدایه‌های انتروکوکوس در نمونه‌های صفراوی در جدول ۳ بیان شده است. در جدایه‌های *اشرشیاکلی* مقاومت بالایی به سفالوسپورین‌های نسل ٤ و کینولون‌ها دیده شد و تمام جدایه‌های *آسینتوباکتر* به سفالوسپورین‌های نسل ۳ و ٤ مقاومت کامل نشان دادند (۱۰۰ درصد). در جدایه‌های *سودوموناس و کلبسیلا پنومونیه* در مورد اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها به‌جز سفالوسپورین‌های نسل ۳ و ٤ الگوی مقاومتی نسبتا مشابهی دیده شد. کمترین سطح مقاومت به فلوروکینولون‌ها مربوط به جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* بود، در حالی‌که سایر جدایه‌ها دارای مقاومت نسبتا بالایی علیه این دسته از داروها بودند. مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در میان این جدایه‌ها کمتر از سایر داروها تعیین گردید. نتایج آنتی‌بیوگرام این جدایه‌ها در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱: درصد فراوانی و الگوی مقاومت دارویی جدایه‌های مختلف باکتریایی در نمونه‌های صفراوی

جدایه باکتریایی [a] (N)	درصد فراوانی مقاومت دارویی (%) N [a]											
	IMP	NA	AMC	GM	MEN	FOX	LOM	CTX	CA	TOB	FEP	CP
اشرشیا کلی (۲۲)	۱۷ (۷۲/۷۲)	۱۹ (۸۶/۳۶)	۲۲ (۱۰۰)	۸ (۳۶/۳۶)	۱۵ (۶۸/۱۸)	۱۴ (۶۳/۶۳)	۱۶ (۷۲/۷۲)	۱۹ (۸۶/۳۶)	۱۷ (۷۲/۲۵)	۱۱ (۵۰)	۱۹ (۸۶/۳۶)	۱۰ (۴۵/۴۵)
سودوموناس ائروژینوزا (۱۱)	۰	۹ (۸۱/۸۱)	۱۱ (۱۰۰)	۰	۶ (۵۴/۵۴)	۱۱ (۱۰۰)	۳ (۲۷/۲۷)	۱۱ (۱۰۰)	۲ (۱۸/۱۸)	۰	۱۱ (۱۰۰)	۰
کلبسیلا پنومونیه (۱۱)	۰	۱ (۹/۰۹)	۱۱ (۱۰۰)	۰	۷ (۶۳/۶۳)	۵ (۴۵/۴۵)	۱ (۹/۰۹)	۲ (۱۸/۱۸)	۵ (۴۵/۴۵)	۱ (۹/۰۹)	۲ (۱۸/۱۸)	۱ (۹/۰۹)
اسنیتوباکتر (٤)	۳ (۷۵)	۳ (۷۵)	۴ (۱۰۰)	۱ (۲۵)	۴ (۱۰۰)	۴ (۱۰۰)	۴ (۱۰۰)	۴ (۱۰۰)	۴ (۱۰۰)	۱ (۲۵)	۴ (۱۰۰)	۳ (۷۵)

[a] *N: تعداد هر جدایه در نمونه های بالینی. IMP، ایمی پنم؛ AMC، آموکسی سیلین کلاولونیک اسید؛ GM، جنتامایسین؛ TOB، توبرامایسین؛ FOX، سفوکسیتین؛ CTX، سفوتاکسیم؛ FEP، سفپیم؛ NA، نالیدیکسیک اسید؛ CA، سفتازیدیم؛ CP، سیپروفلوکساسین؛ LOM، لومی فلوکساسین؛ MEN، مروپنم.*

بررسی فراوانی اینتگرون‌ها در میان جدایه‌های بالینی: انتشار اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ در بین جدایه‌ها به‌ترتیب شامل *اشرشیاکلی* (۵۹/۰۹ و 50 درصد)، *سودوموناس ائروژینوزا* (۸۱/۸۱ و ٤۵/٤۵ درصد)، *کلبسیلاپنومونیه* (٦۳/٦ و ۲۷/۲۷ درصد)، *آسینتوباکتر بومانی* (۱۰۰ و ۱۰۰ درصد) و *انتروکوکوس* (صفر درصد) بود. همچنین در هیچ کدام از باکتری‌های جدا شده اینتگرون کلاس ۳ شناسایی نشد. حضور همزمان هر دو اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ در ۱۰

جدایه‌ی *اشرشیاکلی* (۴۵/۴۵ درصد)، ۳ جدایه *کلبسیلاپنومونیه* (۲۷/۲۷ درصد)، ٤ جدایه‌ی *آسینتوباکتربومانی* (۱۰۰ درصد) و ٤ جدایه‌ی *سودوموناس* ائروژینوزا (۳٦/۳٦ درصد) مشاهده گردید.

بررسی حضور اینتگرون‌ها بر روی پلاسمید: نتایج تکثیر نواحی ژنی مربوط به اینتگرون کلاس ۱ و ۲ بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از این جدایه‌ها موید حضور آن‌ها به‌ترتیب در میان جدایه‌های *اشرشیاکلی* (۳٦/۳٦ و ٤/٥٤ درصد)، *سودوموناس* (صفر و ۴۵/۴۵ درصد)، *کلبسیلاپنومونیه* (صفر و ۱۸/۱۸ درصد)، و *آسینتوباکتربومانی* (صفر و ۷۵ درصد بود.

نتایج بررسی ارتباط آماری: بررسی آماری نتایج الگوهای مقاومت دارویی و فراوانی اینتگرون‌های تحت بررسی در این جدایه‌ها بیانگر وجود ارتباط معنادار میان حضور اینتگرون کلاس ۱ و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و جنتامایسین تنها در سویه‌های *اشرشیاکلی* بود $P<0/0001$. در مورد مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و حضور اینتگرون کلاس ۱ و۲ ارتباط معنی‌داری در میان این جدایه‌ها دیده نشد.

جدول ۲: فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ارتباط با اینتگرون کلاس ۱ و ۲ در سویه‌های جدا شده از صفرا

کلاس اینتگرون	اشرشیاکلی		سودوموناس ائروژینوزا		کلبسیلا پنومونیه		اسنیتوباکتر	
	کلاس ۱	کلاس ۲ (%)	کلاس ۱	کلاس ۲ (%)	کلاس ۱	کلاس۲ (%)	کلاس ۱	کلاس ۲ (%)
آنتی بیوتیک								
IMP	۷۶/۹	۲۷/۷	۰	۰	۰	۰	۷۵	۷۵
NA	۸۴/۶	۸۱/۸	۷۷/۸	۸۰	۱۴/۳	۰	۷۵	۷۵
AMC	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
GM	۵۳/۸	۵۴/۵	۰	۰	۰	۰	۲۵	۲۵
MEN	۶۹/۲	۶۳/۶	۴۴/۴	۶۰	۷۱/۴	۶۶/۷	۱۰۰	۱۰۰
FOX	۶۱/۵	۷۲/۷	۱۰۰	۱۰۰	۵۷/۱	۳۳/۳	۱۰۰	۱۰۰
LOM	۶۱/۵	۶۳/۶	۲۲/۲	۲۰	۱۴/۳	۰	۱۰۰	۱۰۰
CTX	۸۴/۶	۸۱/۸	۱۰۰	۱۰۰	۲۸/۶	۳۳/۳	۱۰۰	۱۰۰
CA	۷۶/۹	۷۲/۷	۱۱/۱	۲۰	۵۷/۱	۳۳/۳	۱۰۰	۱۰۰
TOB	۶۱/۵	۶۳/۶	۰	۰	۰	۳۳/۳	۲۵	۲۵
FEP	۸۴/۶	۸۱/۸	۱۰۰	۱۰۰	۲۸/۶	۳۳/۳	۱۰۰	۱۰۰
CP	۳۰/۸	۲۷/۳	۰	۰	۱۴/۳	۰	۷۵	۷۵

IMP، ایمی پنم؛ NA، نالیدیکسیک اسید؛ AMC، آموکسی سیلین کلاولونیک اسید؛ GM، جنتامایسین؛ MEN، مروپنم؛ FOX، سفوکسیتین؛ LOM، لومی فلوکساسین؛ CTX ، سفوتاکسیم؛ CA ، سفتازیدیم؛ TOB، توبرامایسین؛ FEP، سفپیم؛ CP سیپروفلوکساسین.

جدول ۳: درصد فراوانی و الگوی مقاومت دارویی جدایه‌های انتروکوکوس در نمونه‌های صفراوی

انتروکوکوس	V	Tei	C	Syn	Lz	NI	E	CP	AMP	IPM	GM	TE
انتوکک فکالیس	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
انترکک فسیوم	۲ (۱۸/۲)	۱ (۹/۱)	۱ (۹/۱)	۰	۰	۲(۱۸/۲)	۳(۲۷/۳)	۲(۱۸/۲)	۳(۲۷/۳)	۰	۳(۲۷/۳)	۳(۲۷/۳)
کل	۱۶/۷	۸/۳	۸/۳	۰	۰	۱۶/۷	۲۵	۱۶/۷	۲۵	۰	۲۵	۲۵

IMP، ایمی پنم؛ Tei ، تیکوپلانین ؛ GM، جنتامایسین؛ C ، کلرامفنیکل ؛ Syn ، کوئینوپریستین - دالفوپریستین ؛ Lz، لینزولید؛ NI، نیتروفورانتوئین؛ E، اریترومایسین؛ AMP، آمپی‌سیلین؛ CP، سیپروفلوکساسین؛ TE، تتراسیکلین ؛

بحث

بیماری‌های صفراوی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مرتبط با دستگاه گوارش در سنین بزرگسالی محسوب می‌گردد. گزارش‌های اندکی در رابطه با نقش باکتری‌ها و الگوهای مقاومت دارویی آن‌ها در ایجاد بیماری‌های صفراوی در ایران وجود دارد. شناسایی باکتری‌ها و تعیین میزان حساسیت یا مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌تواند در انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب جهت درمان عفونت‌های حاصله و جلوگیری از ایجاد عوارض توسط آن‌ها کمک نماید. نتایج حاصل از این تحقیق آلودگی بالایی از عفونت‌های باکتریایی را در نمونه‌های صفراوی نشان داد. این میزان آلودگی در کشورهایی هم چون پاکستان معادل ۳٦ درصد (۱۳)، اردن ۲۰ درصد (۱٤) و در هلند معادل ۲۲ درصد تعیین گردیده است. فراوان‌ترین باکتری‌های جدا شده از این بیماران را اعضای خانواده انتروباکتریاسه شامل می‌شوند (۱۵). به‌طور مشابهی در مطالعات ستار و همکارانش در پاکستان (۱۳) آلودگی به *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا* به‌ترتیب ٤۷/۲ و ۲۵ درصد، در مطالعه دن هود و همکاران در هلند (۱۵) آلودگی به *اشرشیاکلی* ٦٦ درصد، در مطالعه Harbi و همکارانش (۱٦) ۲۸/۱ درصد، و در مطالعه‌ی سعادتی و همکارانش این آلودگی ٥٤/۸ درصد گزارش شد (۱۷). انگلسیم و همکارانش *انتروکوکوس فکالیس* را مسوول بیشترین موارد عفونت‌های مجاری صفراوی بیان نمودند (۱)، در حالی که ازتورک و همکارانش (۱۸) تنوع باکتریایی بالاتری از اعضای انتروباکتریاسه را در نمونه‌های بیماران صفراوی خود نشان داده بودند. احتمالا علت تشابه جدایه‌های باکتریایی مسوول، دخیل بودن فلور میکروبی روده در عفونت بیماری‌های مجاری صفراوی می‌باشد. در این مطالعه باکتری‌های دیگری مانند *انتروکوکوس*، *کلبسیلاپنومونیه*، *سودوموناس‌ائروژینوزا*، *آسنیتوباکتر*، *استرپتوکوکوس* و *استافیلوکوکوس* از بیماران صفراوی جدا شدند که فراوانی آن‌ها مشابه مطالعات دیگران است. میزان عفونت مونوباکتریال و پلی‌میکروبیال در نمونه‌های کشت مثبت در این مطالعه به‌ترتیب ٦۱/۹ و ۳۸/۱ درصد بودند. در یک مطالعه نیز از مجموع ۱۲۵ بیمار ۱٦/۲ درصد بیماران عفونت پلی‌میکروبیال داشتند (۱۹). محافزاه و همکاران این میزان آلودگی را در مورد عفونت‌های پلی‌میکروبیال ۱۷/۲ درصد تخمین زدند (۱٤). در مطالعه‌ی داوودآبادی و همکارانش در سال ۹۰ که در ایران انجام شد عفونت پلی‌میکروبیال گزارش نگردید (۲۰). مقاومت دارویی مشکل عظیمی در سراسر جهان است که می‌تواند یک عامل مهم در گسترش عفونت باشد. ممکن است استفاده بالینی از آنتی‌بیوتیک‌ها بروز سویه‌های MDR و انتقال ژن را افزایش دهند که این می‌تواند یک تهدید جدی باشد (۲۱). در این مطالعه جدایه‌های گرم منفی مقاومت بیش از ۷۰ درصد به سفالوسپورین‌های نسل ۳ و بیش از ۵۰ درصد به بعضی کینولون‌ها داشتند؛ میزان مقاومت به ونکومایسین نیز در جدایه‌های *انتروکوکوس* ۱٦/۷ درصد تعیین گردید. نتایج آنتی‌بیوگرام در این مطالعه موید وجود حساسیت دارویی بالا در تمام جدایه‌ها به آمینوگلیکوزیدها بود، بنابراین آمینوگلیکوزیدهامی‌توانند برای درمان این بیماران مورد توجه قرار گیرند. مقاومت به فلوروکینولون‌ها و سفالوسپورین‌های نسل دوم، سوم و چهارم در اغلب جدایه‌های مطالعه حاضر مشاهده گردید در حالی‌که در مطالعه‌ی و ستار همکارانش تمامی جدایه‌های گرم منفی جدا شده از نمونه‌های صفرا به سفالوسپورین‌های نسل ۲ و کینولون‌ها حساس بودند (۱۳). در مطالعه‌ی انگلسبم و همکارانش نیز تمامی جدایه‌ها به سفالوسپورین‌های نسل ۳ و ٤، *فلوروکینولون‌ها* و آمینوگلیکوزیدها حساسیت بالایی داشتند (۱). همچنین در مطالعه‌ی موذنی و همکاران در ایران تمامی جدایه‌ها حساسیت بالا به *فلوروکینولون‌ها* و آمینوگلیکوزیدها را نشان

دادند (۲۲). فراوانی جدایه‌های MDR در جدایه‌های *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* در مطالعه‌ی حاضر به‌ترتیب ۹٤/۵ و ۴۵/۵ درصد تعیین گردید که بسیار بالاتر از میزان گزارش شده توسط ملز همکارانش بود (۱۸ و صفر درصد) (۲۳). فراوانی فنوتیپ مقاومتی MDR در مورد اغلب جدایه‌ها در مطالعه‌ی حاضر بسیار مشابه فراوانی گزارش شده در جدایه‌های باکتریایی به‌دست آمده از استنت مجرای صفراوی بیماران در ترکیه است (۲٤). فراوانی بالای مقاومت دارویی در میان جدایه‌های تحت بررسی پیشنهاد کننده حضور مکانیسم‌های مقاومت دارویی قابل انتقال در میان آن‌ها بود. اینتگرون‌ها می‌توانند به‌عنوان یکی از علل افزایش مقاومت دارویی در این جدایه‌ها مطرح باشند. تاکنون گزارشی از حضور کلاس‌های مختلف اینتگرونی در جدایه‌های صفراوی ارایه نشده است. در مطالعه‌ی حاضر شیوع اینتگرون کلاس ۱ و ۲ در جدایه‌های *اشرشیاکلی* و *کلیسیلا پنومونیه* (۱۰۰ و ۵۰ درصد) مشاهده شد. در مطالعه‌ی هک سون یو و همکارانش انتشار اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ در باکتری *اشرشیاکلی* در بیماران با عفونت ادراری به‌ترتیب ٥٤، ۵ و صفر درصد گزارش شده بود (۲۵). حضور بالاتر اینتگرون کلاس ۲ در نمونه‌های استخراج شده‌ی پلاسمیدی در این جدایه‌ها نشانگر انتقال پذیری بالای آن توسط پلاسمید می‌باشد.

در مطالعه‌ای که در تایلند طی سال‌های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۸ بر روی سویه‌های *سودوموناس* و *آسینتوباکتر* انجام شده بود، اینتگرون کلاس ۱ در *سودوموناس* ٦۹/۳ درصد و در *آسینتوباکتر* ۳۱/۸ درصد گزارش گردید، ولی اینتگرون ۲ و ۳ در هیچ کدام از سویه‌ها یافت نشد (۲٦). حضور اینتگرون کلاس ۱ در جدایه‌های *سودوموناس ائروژینوزا* در یک مطالعه‌ی اخیر در ایران معادل ٤۳ درصد در کل جدایه‌ها و ٦۹ درصد در جدایه‌های MDR گزارش شده بود (۲۷). در مطالعه‌ای که در بین سال‌های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۵ در چین بر روی باکتری *سودوموناس* جدا شده از تخت بیماران انجام شده بود، ٤۵/۸ درصد اینتگرون کلاس ۱ و ۱۹/۵ درصد اینتگرون کلاس ۲ و ۲/٥٤ درصد هر دو کلاس ۱ و ۲ یافت شدند (۲۸)، که بسیار پایین‌تر از این میزان در ایران است. فراوانی بالای اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ مشاهده شده در جدایه‌های آسینتوباکتر در مطالعه‌ی حاضر، توسط سایر مطالعات اخیر صورت گرفته در ایران تایید می‌گردد. میرنژاد و همکاران فراوانی اینتگرون کلاس ۱ و ۲ را در جدایه‌های آسینتوباکتر به‌ترتیب ٤۲ و ۸۲ درصد گزارش نمودند (۲۳). پیمانی و همکاران این فراوانی را در مورد اینتگرون کلاس ۱ در جدایه‌های MDR معادل ۹۲/۵ درصد تعیین نمودند (۲۹). در مطالعه‌ی دیگری که در ایران بر روی این باکتری انجام شده بود ۵۸ درصد جدایه‌های آسینتوباکتر دارای اینتگرون کلاس ۱ و ۱٤ درصد دارای اینتگرون کلاس ۲ و ۹ درصد دارای هر دو کلاس ۱ و۲ بودند (۳۰). حضور اینتگرون کلاس ۳ در هیچ یک از این مطالعات گزارش نشده بود. اینتگرون‌ها می‌توانند چندین ژن مقاومت دارویی را به‌طور همزمان حمل نمایند. در مطالعه‌ی وایت و همکارانش در سال ۱۹۹۸- ۱۹۹۹ که در استرالیا روی سویه‌های مختلف اعضای انترباکتریاسه انجام شد، بین حضور اینتگرون‌ها و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، تری‌متوپریم، جنتامایسین، کانامایسین، و توبرامایسین ارتباط معنی‌داری از لحاظ آماری گزارش گردید (۳۱) که می‌تواند دلیلی بر حضور ژن‌های مقاومت به این داروها در این اینتگرون‌ها باشد. وجود ارتباط معنادار مشاهده شده در مطالعه‌ی حاضر میان حضور اینتگرون کلاس ۱ و مقاومت به جنتامایسین و کینولون‌ها به‌طور مشابهی به‌ترتیب در مطالعه خاتسا و همکاران (۳۲) و مویچ و همکاران (۳۳) در سویه‌های مختلف *اشرشیاکلی* نشان داده شده بود. وجود الگوهای مقاومت دارویی در برخی از سویه‌های فاقد اینتگرون در مطالعه حاضر نشانگر وجود سایر مکانیسم‌های مقاومتی به‌غیر از اینتگرون‌ها در آن‌ها می‌باشد. انجام مطالعات دقیق‌تر بر روی ماهیت این اینتگرون‌ها و سایر مکانیسم‌های مقاومتی

در این جدایه‌ها می‌تواند راهکارهای درمانی و کنترلی بهتری را در آینده فراهم آورد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه موید فراوانی بالای عفونت‌های باکتریایی در مبتلایان به بیماری‌های صفراوی است. همزمانی حضور چندین گونه باکتریایی عرضه کننده‌ی الگوهای مقاومتی چندگانه در این بیماران اهمیت توجه جدی پزشکان به کنترل این عفونت‌ها و طراحی الگوهای جدید درمانی جهت درمان این بیماران را گوشزد می‌نماید. شیوع بالای پاتوژن‌های روده‌ای گرم مثبت و گرم منفی حامل پلاسمیدهای کد کننده‌ی کلاس‌های مختلف اینتگرونی عرضه کننده‌ی الگوهای پرخطر مقاومت دارویی، نقش مهم عفونت‌های مجاری صفراوی به واسطه‌ی فلور میکروبی دستگاه گوارش را در این بیماران پیشنهاد می نماید. همچنین فراوانی بالای اینتگرون های کلاس ۱ و ۲ در میان این جدایه‌ها و ارتباط آن‌ها با افزایش فنوتیپ مقاومت آنتی‌بیوتیکی پیشنهاد کننده‌ی نقش صفرا به عنوان عامل انتخابی باکتری‌های کد کننده‌ی این عناصر است.

References

1- Englesbe MJ, Dawes LG. Resistant pathogens in biliary obstruction: importance of cultures to guide antibiotic therapy. *HPB* (Oxford). 2005; 7: 144-8.

2- Yusoff IF, Barkun JS, Barkun AN. Diagnosis and management of cholecystitis and cholangitis. *Gastroenterol Clin North Am.* 2003; 32: 1145-68.

3- Asai K, Watanabe M, Kusachi S, et al. Bacteriological analysis of bile in acute cholecystitis according to the Tokyo guidelines. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2012; 19: 476-86.

4- Hazrah P, Oahn KTH, Tewari M, et al. The frequency of live bacteria in gallstones. *HPB* (Oxford). 2004; 6: 28-32.

5- Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10: 272-88.

6- Léon G, Roy PH. Excision and integration of cassettes by an integron integrase of *Nitrosomonas europaea. J Bacteriol.* 2003; 185: 2036-41.

7- Shibata N, Doi Y, Yamane K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-β-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 5407-13.

8- Manual of clinical microbiology. 7th Edition. Murray P, Baron E, Pfaller M. 2005, ASM Press.

9- Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.

10- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 268-81.

11- Queipo-Ortuño MI, De Dios Colmenero J, Macias M, Jose Bravo M, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15: 293-96.

12- Lezin G, Kosaka Y, Yost H J, Kuehn MR. A one-step miniprep for the isolation of plasmid DNA and lambda phage particles. *PLoS ONE*. 2011; 6: e23457

13- Sattar I, Aziz A, Rasul S, Mehmood Z, Khan A. Frequency of infection in cholelithiasis. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP*. 2007; 17: 48-50.

14- Mahafzah AM, Daradkeh SS. Profile and predictors of bile infection in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. *Saudi Med J*. 2009; 30: 1044-8.

15- Hoed PT, Boelhouwer RU, Veen HF, Hop WC, Bruining HA. Infections and bacteriological data after laparoscopic and open gallbladder surgery. *J Hosp Infect*. 1998; 39: 27-37.

16- Al Harbi M, Osoba AO, Mowallid A, Al-Ahmadi K. Tract microflora in Saudi patients with cholelithiasis. *Trop Med Int Health*. 2001; 6: 570-75.

17- Saadati K. Microbial agents in acute cholecystitis and its effective antibiotics in hospitalized patients in Zanjan Shafieyeh hospital during. 1996-2001. 2003; 11: 41-44.

18- Öztrurk A, Bozkurtoglu H, Kaya C, Tan N, Çaskurlu H, Akinci ÖF. Bacteriologic analysis of bile in cholecystectomy patients. *The New Journal of Medicine*. 2012; 29: 43-46.

19- Ballal M, Jyothi KN, Antony B, Arun C, Prabhu T, Shivananda PG. Bacteriological spectrum of cholocystitis and its antibiogram. *Indian J Med Microbiol*. 2001; 19: 212-4.

20- Davoodabadi A, Abdolrahim-Kashi E, Sadeghpour A, Saffari M, Moravveji A, Evaluating the results of bile culture and antibiogram in cholecystectomized patients hospitalized in Kashan Shahid-Beheshti hospital during 2010-2012. *J Kashan Univ Med Sci*. 2012; 16: 476-82.

21- Melzer M, Toner R, Lacey S, Bettany EG. Biliary tract infection and bacteraemia: presentation, structural abnormalities, causative organisms and clinical outcomes. *Rait Postgrad Med J*. 2007; 83: 773-76.

22- Moazeni-Bistgani M, Imani R. Bile bacteria of patients with cholelithiasis and theirs antibiogram. *Acta Medica Iranica*, 2013; 51: 779-83.

23- Mirnejad R, Mostofi S, Masjedian F, Fooladi AA. Antibiotic resistance and carriage class 1 and 2 integrons in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Tehran, Iran. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013; 3: 140-5.

24- Demirbag AE, Karademir A, Parlak E, Şen S, Karahan M, Kayaalp C, Şahin B. Multidrug resistance of isolated microorganisms in occluded bile duct stents. 2007; 18: 33-40.

25- Yu HS, Lee JC, Kang HY, et al. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among

Escherichia coli isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 5429-33.

26- Poonsuk K, Tribuddharat C, Chuanchuen R.Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical isolates. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2012; 43: 376-84.

27- Nikokar I, Tishayar A, Flakiyan Z, et al. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from burn patients in Guilan, Iran. *Iran J Microbiol*. 2013; 5: 36-41.

28- Zhenbo Xu2, Lin Li, Mark E, Shirtliff MJ, et al. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in southern China. 2008; 10.

29- Peymani A, Farajnia S, Nahaei MR, et al. Prevalence of class 1 integron among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, northwest of Iran. *Pol J Microbiol*. 2012; 61: 57-60.

30- Taherikalani M, Maleki A, Sadeghifard N, et al. Dissemination of class 1, 2 and 3 integrons among different multidrug resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran hospitals, Iran. *Pol J Microbiol.* 2011; 60: 169-74.

31- White PA, Mciver C J, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents Chemother*. 2001; 2658-2661.

32- Khaitsa ML, Oloya J, Doetkott D, Kegode R. Antimicrobial resistance and association with class 1 integrons in *Escherichia coli* isolated from turkey meat products. *J Food Prot*. 2008; 71: 1679-84.

33- Mooij MJ, Schouten I, Vos G, et al. Class 1 integrons in ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strains from two Dutch hospitals. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11: 898-902.

Relationship between Antibiotic Resistance Patterns and Existence of Class 1, 2 and 3 Integrons in Bacterial Isolates from Human Bile Samples in Patients with Biliary Tract Disorders

Tajeddin E[1], Alebouyeh M[2,3], Mohammad Alizadeh AH[3], Zali MR[3]

[1]Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[2]Basic and Molecular Epidemiology of Gastrointestinal Disorders Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[3]Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Alebouyeh M, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, and Basic and Molecular Epidemiology of Gastrointestinal Disorders Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

E-mail: masoud.alebouyeh@gmail.com

Received: 16 Nov 2013 **Accepted:** 1 Jun 2014

Background and Objective: The aim of this study was to detect bacteria associated with biliary tract diseases and relationship between their class 1, 2 and 3 integrons and antibiotic resistance patterns.

Materials and Methods: Bile samples of biliary patients undergoing cholangiopancreatography were examined for the presence of bacteria and antibiotic resistance patterns using biochemical tests and disk diffusion method. PCR was used for detection of the presence of integrase genes *intI1*, *intI2*, and *intI3* in total DNA and plasmid extracts of these bacterial isolates.

Results: Out of 102 bile samples, 41.2% were positive by culture. The isolated bacteria belonged to *E. coli* (35.5%), *Enterococcus spp*. (19.4%), *Klebsiella pneumoniae* (17.74%), *Pseudomonas aeruginosa* (17.74%), *Acinetobacter spp.* (6.45%) and *Staphylococcus epidermidis* (1.6%). All isolates were resistant to amoxiclav and 87.5% of the isolates showed multidrug resistance (MDR) pattern. *intI1*and *intI2* were found in *E. coli* (59.09%, 50%), *P. aeruginosa* (81.81%, 45.45%), *K. pneumonia* (63.6%, 27.27%) and *Acinetobacter spp.* (100%, 100 %), respectively. These results showed the presence of class 1 and 2 integrons on the extracted plasmids and indicated a significant association between class 1 integron and resistance to gentamicin and ciprofloxacin.

Conclusion: High frequency of class 1 and 2 integrons among the bile isolates and their association with increased antimicrobial resistance phenotypes suggests bile components as selective agents for bacterial strains encoding these elements.

Keywords: Integrons, Bile infection, Antimicrobial resistance