

اینتگرون‌ها و نقش آن‌ها در بروز مقاومت آنتی بیوتیکی

• دکتر حبیب ضیغمی

استادیار باکتری شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
زنجان، رئیس اداره امور آزمایشگاه‌های استان زنجان

zeighami@zums.ac.ir

• دکتر فخری حقی

استادیار باکتری شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
زنجان، رئیس اداره امور آزمایشگاه‌های استان زنجان

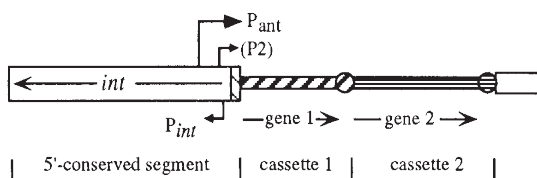
کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان

چکیده: در ابتدا تصور می‌شد که انتقال ژن‌های مقاومتی در باکتری‌ها، عمدتاً از طریق کونژوگاسیون و ترانسداکشن توسط پلاسمیدها، فاژها و ترانسپوزون‌ها صورت می‌گیرد، اما در سال ۱۹۹۵ دو دانشمند به نام‌های Colli و Hall مکانیسم دیگری از انتقال ژن‌های مقاومتی را شناسایی کردند که توسط عناصری به نام اینتگرون انجام می‌شد. اینتگرون‌ها المنت‌های ژنتیکی متحرکی هستند که با قرارگیری در پلاسمیدها، کروموزوم‌ها و ترانسپوزون‌ها، ژن‌های مقاومتی را در حالی که در داخل کاست‌های ژنی قرار دارند حمل و جا به جا می‌کنند. انتقال افقی اینتگرون‌ها به عنوان موفق‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاومتی و پیدایش گونه‌هایی با مقاومت چندگانه (MDR) مطرح می‌باشد. با توجه به این که ژن‌های مقاومت بر روی اینتگرون‌ها قرار دارند و می‌توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند، لذا این امر اهمیت شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومتی را ضروری می‌نماید.

کلمات کلیدی: اینتگرون، ژن‌های مقاومتی، کاست‌های ژنی

قرار گیرند در حالی که سوپر اینتگرون‌ها بر روی بازوی بلند کروموزوم قرار داشته و کاست‌های ژنی با اعمال متفاوتی را حمل می‌کنند.

از نظر ساختاری تمامی اینتگرون‌ها از سه جزء اصلی شامل انتهای '۵' حفاظت شده، انتهای '۳' حفاظت شده و یک ناحیه مرکزی متغیر بین ناحیه '۳' و '۵' تشکیل شده‌اند. اجزای ضروری ناحیه '۵' تمام اینتگرون‌ها شامل (i) ژن اینتگراز (IntI) که سایت نو ترکیب اختصاصی را کد می‌کند. (ii) سایت گیرنده attI که به وسیله اینتگراز شناسایی می‌شود و در مجاورت ژن IntI قرار گرفته است (iii) توالی پروموتور شامل Pc و Pint که به ترتیب برای بیان ژن‌های موجود در کاست ژنی که در اینتگرون ادغام شده و بیان اینتگراز می‌باشند (۱) (شکل ۱).



شکل ۱- ناحیه '۵' حفاظت شده

ناحیه '۳' اینتگرون‌ها واجد سه ساختار متفاوت است که در کلاس‌های اینتگرون متفاوت می‌باشد. تا کنون بیش از ۹ کلاس از اینتگرون‌ها بر اساس تفاوت‌های موجود در ژن اینتگراز در باکتری‌های گرم منفی شناسایی شده است، اما تنها ۴ کلاس اصلی در ارتباط با ایزوله‌های کلینیکی

مقدمه

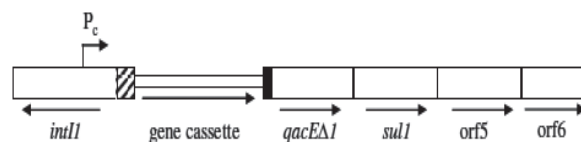
اینتگرون‌ها به دو گروه اصلی شامل اینتگرون‌های مقاومتی^۱ و سوپر اینتگرون‌ها^۲ تقسیم می‌شوند. اینتگرون‌های مقاومتی اساساً کاست‌های ژنی که منجر به مقاومت علیه آنتی بیوتیک‌ها و دزانتفکتان‌ها می‌شود را حمل می‌نمایند و می‌توانند بر روی کروموزوم یا پلاسمید

- 1- Resistance Integrons (RI)
- 2- Super Integrons (SI)

مطرح می‌باشد. که اینتگرون‌های کلاس I و متعاقب آن اینتگرون‌های کلاس II به عنوان شایع ترین کلاس‌ها در بین ایزوله‌های کلینیکی مطرح می‌باشند (۲).

اینتگرون‌های کلاس I

اینتگرون‌های کلاس I، اولین بار توسط Stokes و Hall در سال ۱۹۸۹ کشف شدند (۳) و بیش از ۴۰ ژن مقاومتی در ارتباط با مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها، کلرانفیکل، ماکرولیدها، سولفانامیدها، ضد عفونی کننده‌ها و دزائفکتان‌ها را حمل می‌نمایند (۴). این دسته از اینتگرون‌ها به طور گسترده‌ای در سویه‌های گرم منفی و به طور اندمیک در سویه‌های گرم مثبت شامل استفیلوکوکوس، کورینه باکتریوم، آئروکوکوس و بریوی باکتریوم یافت می‌شوند. از جمله باکتری‌های گرم منفی می‌توان به سیتروباکتر، کمپیلوباکتر، بورخوردلیا، سراشیا، شیگلا، سالمونلا، آلكالیجنز، آئروموناس، اسیتوباکتر، کلبسیلا، سودوموناس، اشیشیا و ویبریو اشاره کرد. انتهای ۳' در اینتگرون‌های کلاس I از ۲۳۸۴ جفت باز و از ۵ جزء به قرار زیر تشکیل شده است: ۱- ژن *qacEΔ1* که برای مقاومت به ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی و دزائفکتانت‌ها کد شده ۲- ژن *sul1* که برای مقاومت به سولفانامید کد گذاری شده است ۳- *orf 5-3*، هیچ عملکرد شناخته شده‌ای نداشته اما برخی شباهت‌ها را به پرومیسین استیل ترانسفراز موجود در استرپتومایسس آلبونیر^۱ نشان می‌دهد، که این امر حاکی از این است که با مکانیسم استیل ترانسفراز منجر به مقاومت به آنتی بیوتیک پرومیسین می‌گردد ۴- *orf 6-4* نیز برای پروتئین با عملکرد ناشناخته کد شده است و ۵- ژن‌های *tni* که منجر به ترانسپوزیشن ناقص می‌گردند (۵). (شکل ۲)



شکل ۲: ساختار اینتگرون کلاس I

اینتگرون‌های کلاس II

متعاقب اینتگرون‌های کلاس I، اینتگرون‌های کلاس II شیوع بالایی را در ایزوله‌های بالینی در باکتری‌های گرم منفی نشان می‌دهد. اسیتوباکتر، شیگلا، سالمونلا از جمله باکتری‌های گرم منفی هستند که واجد این دسته از اینتگرون‌ها می‌باشند. انتهای ۳' در اینتگرون‌های کلاس II شامل ژن‌های ترانسپوزیشن (*tni*) و ژن‌های *resolvase* (*res*) می‌باشد، همچنین حاوی ۹ *orfs* بوده که پروتئین‌هایی را با عملکرد ناشناخته کد می‌کنند. این دسته از کلاس‌ها در ترانسپوزون‌های *Tn7* و ترانسپوزون‌های وابسته یافت شده است (۶). کاست‌های ژنی موجود در این دسته از کلاس‌ها عمدتاً در ارتباط با مقاومت‌های مختلف مثل استرپتومایسین، اسپکتینومایسین و تری متوپریم می‌باشند. ژن اینتگراز در اینتگرون‌های کلاس II در حدود ۴۶٪ مشابه ژن اینتگراز در اینتگرون‌های کلاس I می‌باشد. یکی از مهم ترین تفاوت‌هایی که بین اینتگرازهای اینتگرون کلاس I و II مطرح می‌باشد این است که ژن اینتگراز در اینتگرون‌های کلاس II (*IntI2*)، توسط کدون‌های پایان (*TAA*) زود متوقف شده، در نتیجه منجر به غیر فعال شدن ۱۷۸ اسید آمینه و متعاقب آن سنتز پروتئین می‌شود، از این جهت ژن اینتگراز در اینتگرون‌های کلاس II، در جا به جا کردن کاست‌های ژنی نسبت به اینتگرون‌های کلاس I ناتوان تر می‌باشند. اما جهش در کدون‌های پایان منجر به فعالیت دوباره اسیدهای آمینه ذکر شده و متعاقب آن فعالیت ژن اینتگراز نیز می‌گردد (۷). البته اخیراً یک ژن اینتگراز فعال در این دسته از کلاس‌ها توسط Marquez و همکارانش در سویه از اشیشیا کلی شناسایی شده است، که محتوی دو کاست ژنی شامل *dfra* بوده که مقاومت به تری متوپریم را کد می‌کند و همچنین به عنوان یک لپوپروتئین پپتیداز نیز مطرح می‌باشد (۸).

اینتگرون‌های کلاس III

اینتگرون‌های کلاس III برای اولین بار توسط Arakawa و همکارانش در سال ۱۹۹۶ در ژاپن شناسایی گردید. این دسته از اینتگرون‌ها به ندرت در نمونه‌های بالینی وجود

1- *Streptomyces albonier*



با هیچ کدام از المنت‌های متحرک ژنتیکی مرتبط نبوده در نتیجه قابلیت تحرک و جابه‌جایی ندارند. سوپر اینتگرون‌ها محدود به خانواده ویبریوناسه نبوده بلکه در بین خانواده‌های *Xanthomonads* و *Pseudomonadas* نیز مطرح می‌باشند. همچنین در باکتری‌هایی نظیر

Geobactersulfurreducens, *Listonella pelagia*, *Nitrosomonas europaea*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas stutzeri*, *Shewanella putrefaciens*, *Treponema denticol*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio cholera*, *Vibrio fischerii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Xanthomonas campestris*

نیز شناسایی شده‌اند. اکثریت ارگانسیم‌های ذکر شده متعلق به خانواده بتا پروتئوباکتیریا بوده که در نمونه‌های زیست محیطی مانند خاک، رسوبات، بیوفیلم و به طور کلی در غیرپاتوژن‌ها یافت می‌شوند. در حال حاضر یک سوپر اینتگرون واجد سه ویژگی می‌باشد ۱- کاست‌های مرتبط با سایت *attC*، رادر ویبریو کلرا (*VCRs* (*vibrio cholera repeat*) می‌گویند. این تکرارها در سایر باکتری‌های واجد اینتگرون‌های کلاس IV نیز به این ترتیب نامیده می‌شوند. ۲- به دلیل زیاد بودن تعداد کاست‌ها و دور بودن کاست‌ها از پروموتور، عمدتاً کاست‌های ژنی موجود در این دسته از اینتگرون‌ها در ساختار خود واجد توالی پروموتور مجزا می‌باشند. ۳- کاست‌های SI در ویبریو کلرا، زیر گروهی از ژن‌های اینتگراز کلاس I می‌باشند که این امر حاکی از تشابه اینتگراز کلاس I با سوپر اینتگرون‌های ویبریو کلرا می‌باشد (۱۳-۱۵).

کاست‌های ژنی

کاست‌های ژنی^۱ در ناحیه بین^۳ و^۵ اینتگرون‌ها به صورت تصادفی ادغام می‌شوند. این کاست‌ها، عناصر ژنی متحرکی هستند که شامل یک یا چند ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را کد می‌کنند و نیز یک توالی *attC* داشته که مکان نوترکیبی اختصاصی اینتگراز است و به عنوان عناصر ۵۹ بازی^۲ نیز شناخته می‌شوند. کاست‌های ژنی فاقد توالی پروموتور در

دارند، ولی اخیراً در نمونه‌های کلینیکی نظیر سودوموناس آئروژینوزا، سراسیا مارسنس، سودوموناس پوتیدا و کلسیلا پنومونیه در ژاپن، پرتغال و کانادا یافت شده است (۹). انتهای^۳ در اینتگرون‌های کلاس III مشابه اینتگرون‌های کلاس I بوده و شامل ۱- ژن *orf 5, 6-3 sul1-2 qacEΔ1* می‌باشند و تنها تفاوتشان در فقدان ژن‌های ترانسپوزیشن در اینتگرون‌های کلاس III می‌باشد. در این دسته از کلاس‌ها، چندین کاست ژنی شامل *bla Imp-1*، کدکننده آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز و *aacA4*، کدکننده ژن مقاومت به آمینوگلیکوزیدها (توبرامایسین)، وجود دارد (۱۰). که برای اولین بار از کشور ژاپن شناسایی شدند. کاست *aacA4* ابتدا در اینتگرون‌های کلاس I یافت شد اما کاست ژنی *bla Imp-1* برای اولین بار در اینتگرون کلاس III شناخته شده است و امروزه به واسطه نوترکیبی گسترده‌ای که بین اینتگرون‌های کلاس I و III رخ داده است، این ژن در اینتگرون‌های کلاس I نیز شناسایی شد و به طور گسترده‌ای در جهان منتشر گردید (۱۱، ۱۲).

سوپر اینتگرون‌ها

واژه سوپر اینتگرون اولین بار توسط Mazel و همکارانش در سال ۱۹۹۸ نامگذاری گردید. در واقع اینتگرون‌های کلاس IV همان سوپر اینتگرون‌ها هستند که برای اولین بار در کروموزوم کوچک ویبریو کلرا شناسایی شدند. سایز بازی این دسته از اینتگرون‌ها بزرگ و در حدود ۱۲۶ kb بوده و حداقل حاوی ۱۷۸ کاست ژنی می‌باشند، که تعدادی از آنان در ارتباط با آمینوگلیکوزید فسفوترانسفراز، توکسین‌ها، RNA متیل ترانسفراز و DNA گلیکولاز می‌باشند. برخلاف سه کلاس از اینتگرون‌های شرح داده شده، کاست‌های ژنی سوپر اینتگرون‌ها هیچ مقاومت آنتی‌بیوتیکی را کد نمی‌کنند بلکه بیشتر در ارتباط با تکامل ژنومی مانند متابولیسم، تغییرات DNA و عملکردهای انطباقی می‌باشند. اخیراً دو کاست ژنی مقاومتی شامل *dfvr1* و *CARB4* در ارتباط با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در ویبریو کلرا شناسایی شده است، ولی سایر کاست‌ها در ارتباط با مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطرح نمی‌باشند. این اینتگرون‌ها

1-Gene Cassettes
2-Element 59bp

انواع آنتی بیوتیک‌ها شامل استریتومایسین، اسپکتینومایسین، جنتامایسین و مقاومت به آنتی بیوتیک‌های جدیدتری مثل کارباپنم‌ها را می‌توانند انتقال دهند. اخیراً ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را نیز حمل می‌کنند.

در نتیجه استفاده از این آنتی بیوتیک‌ها بسیار محدود شده است (۱۸). در مورد مبداء و ریشه پیدایش کاست‌های ژنی اطلاعاتی در دسترس نمی‌باشد، بنابر یک فرضیه آن‌ها از نسخه برداری معکوس mRNA منشأ گرفته‌اند.

در سال‌های اخیر کاست‌های ژنی ایزوله شده از نمونه‌های محیطی، ORF‌هایی با سایر عملکردها از جمله فسفوسرین فسفاتاز و متیل ترانسفراز را نشان داده که این امر فراوانی اینتگرون‌ها را در محیط زیست نیز نشان می‌دهد.

ساختار خود می‌باشند، در نتیجه بیان کاست‌های ژنی وابسته به کاست‌های ژنی موجود در ساختار اینتگرون‌ها می‌باشد، چون اینتگرون‌ها واجد توالی‌های پروموتور هستند می‌توانند ژن‌های موجود در کاست‌های ژنی را بیان کنند، بنابراین اینتگرون‌ها هم به عنوان وکتور بیان ژن و هم به عنوان یک سیستم کلونینگ طبیعی عمل می‌کنند (۱۶). کاست‌های ژنی به دو حالت آزاد حلقوی شکل و ادغام شده در مکان attI اینتگرون می‌توانند وجود داشته باشند، بنابراین همه اینتگرون‌ها الزاماً حاوی کاست ژنی نیستند. اما چنانچه کاست مزبور در آن‌ها ادغام شود، در این حالت به عنوان قسمتی از اینتگرون محسوب خواهند شد. بیش از ۱۳۰ کاست ژنی مقاومتی متعاقب نوترکیبی بین توالی attI انتهای ۵' و توالی attc عنصر ۵۹ بازی (59be) به درون اینتگرون‌ها می‌تواند وارد شوند (۱۷) (جدول شماره ۱). کاست‌های ژنی مقاومت به

Gene cassette	Encoded protein
β-Lactam resistance	
<i>bla</i> _{CEF-1}	Extended-spectrum β-lactamase
<i>bla</i> _{GES-1}	Extended-spectrum β-lactamase
<i>bla</i> _{GES-2}	Extended-spectrum β-lactamase
<i>bla</i> _{TBC-1}	Extended-spectrum β-lactamase
<i>bla</i> _{TBC-2}	Extended-spectrum β-lactamase
<i>bla</i> _{IMP-2}	Carbapenemase
<i>bla</i> _{IMP-3}	Carbapenemase
<i>bla</i> _{IMP-4}	Carbapenemase
<i>bla</i> _{IMP-6}	Carbapenemase
<i>bla</i> _{IMP-7}	Carbapenemase
<i>bla</i> _{VEB-1}	Extended-spectrum β-lactamase
<i>bla</i> _{VIM-1}	Carbapenemase
<i>bla</i> _{VIM-2}	Carbapenemase
<i>bla</i> _{VIM-3}	Carbapenemase
<i>oxa</i> -10/ <i>aadA</i> 1	Extended-spectrum β-lactamase/adenyltransferase
<i>oxa</i> -11	Extended-spectrum β-lactamase
<i>oxa</i> -13	Extended-spectrum β-lactamase
<i>oxa</i> -15	Extended-spectrum β-lactamase
<i>oxa</i> -16	Extended-spectrum β-lactamase
<i>oxa</i> -17	Extended-spectrum β-lactamase
<i>oxa</i> -18	Extended-spectrum β-lactamase
<i>oxa</i> -19	Extended-spectrum β-lactamase
<i>oxa</i> -28	Extended-spectrum β-lactamase
<i>oxa</i> -31	Extended-spectrum β-lactamase
<i>oxa</i> -32	Extended-spectrum β-lactamase
Aminoglycoside resistance	
<i>aadA</i> 4	Adenyltransferase
<i>aadA</i> 5	Adenyltransferase
<i>aadA</i> 6	Adenyltransferase
<i>aadA</i> 8	Adenyltransferase
<i>aadA</i> 10	Adenyltransferase
<i>aac</i> (3)-Ib/ <i>aac</i> (6')-Ib	Acetyltransferase
<i>aac</i> 29a	Acetyltransferase
<i>aac</i> 29b	Acetyltransferase
<i>aacA</i> 1b/ <i>orfG</i>	Acetyltransferase
<i>ant</i> (3'')-II- <i>aac</i> (6')-IIa	Adenyltransferase/ acetyltransferase
<i>aphA</i> 15	Phosphotransferase
Chloramphenicol resistance	
<i>cmiA</i> 4	
<i>cmiA</i> 5	Efflux pump
Rifampicin resistance	
<i>arr</i> -2	ADP-ribosylation
Trimethoprim resistance	
<i>dfr</i> 13	Dihydrofolate reductase
<i>dfr</i> 17	Dihydrofolate reductase
<i>dfrA</i> 17	Dihydrofolate reductase
Quaternary ammonium compound resistance	
<i>qacF</i>	Efflux pump
<i>qacI</i>	Efflux pump
Quinolone resistance	
<i>qnr</i>	Unknown
Other	
Group II intron	Maturase-reverse transcriptase
Open reading frames	
<i>orf</i> 0	Unknown
<i>orf</i> X	Unknown
<i>orf</i> X'	Unknown
<i>orf</i> i'	Unknown
<i>orf</i> ii'	Unknown
<i>orf</i> iii'	Unknown

جدول شماره ۱: کاست‌های ژنی موجود در اینتگرون‌ها



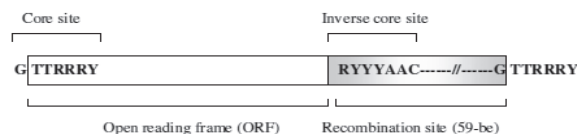
عناصر 59bp بر اساس اندازه به گروه‌های متفاوتی طبقه بندی می‌شوند که اولین و بزرگ‌ترین گروه شامل ۱۲ عضو بوده که وابسته به ژن‌های *aacA*، *aadA*، *aadB*، *CatB3*، *orfD* (Iia) می‌باشد. عوامل موجود در این ژن‌ها فقط در چند باز از هم متفاوت هستند (۲۰). این عناصر در تمامی کاست‌ها وجود داشته و وابسته به ژن درون هر دسته از کاست‌های ژنی می‌باشند، در نتیجه در مواردی در بین کاست‌ها متفاوت هستند.

سایت نوترکیب اختصاصی^۳

سایت نوترکیب اختصاصی بر اساس اسید آمینه و خصوصیات بیوشیمیایی به دو خانواده، شامل خانواده سرینی و خانواده تیروزین تقسیم می‌شود. این دو خانواده به طور جداگانه‌ای از یکدیگر تکامل یافته اند و از لحاظ ساختار و توالی پروتئینی کاملاً از یکدیگر متمایز می‌باشند، در نتیجه مکانیسم‌های نوترکیبی در این دو خانواده از هم متفاوت است. به عنوان مثال اینتگرون‌های کد کننده اینتگراز (*IntI*) توسط خانواده تیروزینی نوترکیبی خود را انجام می‌دهند. خانواده تیروزین یا خانواده اینتگراز در تعدادی از فرآیندها شامل ادغام، برداشت و بازآرایی مورد استفاده قرار گرفته و معمولاً از ۴۰۰-۳۰۰ اسید آمینه و از یک ناحیه N ترمینال متغیر و یک ناحیه کاتالیتیکی (C ترمینال) تشکیل شده است. همچنین واجد دو ناحیه کوچک حفاظت شده شامل *boxI* و *boxII* (به ترتیب از ۲۵ و ۴۰ اسید آمینه) و سه ناحیه R (Arg 280)، H (His 277) و Tyr 312) نیز می‌باشند که ناحیه Histidin تنها ناحیه حفاظت شده‌ای است که در ۹۵ درصد از این خانواده وجود دارد. ناحیه R و H-x-x-R و تتراد Y بخش کاتالیتیکی (C ترمینال) این خانواده را سنتز می‌کنند، ناحیه R (Arginine) در ایجاد ثبات و پایداری، نقش داشته و ناحیه H (Histidin) به عنوان یک باز عمومی مطرح بوده که منجر به دریافت پروتون پس از حمله تیروزین می‌گردد، همچنین ناحیه Y (Tyrosine) به واسطه استریله

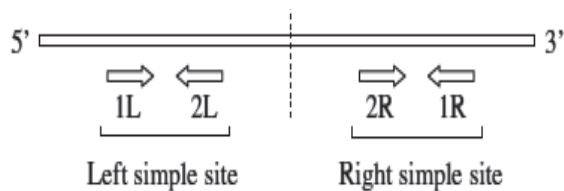
ساختار کاست‌های ژنی

کاست‌های ژنی از کروموزوم منشا گرفته و از یک چارچوب باز خواندن (ORF) و یک عامل 59bp یا *attc* که به عنوان جایگاه ویژه نوترکیبی مطرح می‌باشد، تشکیل شده است. (شکل شماره ۳)



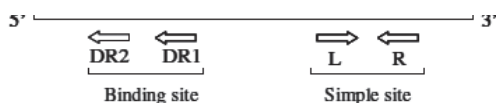
شکل شماره ۳: ساختار یک کاست ژنی

در مرزهای کاست‌های ژنی نواحی مرکزی وجود داشته که از یک سکانس حفاظت شده شامل GTTRRRY (بیانگر عمل نوترکیبی است) تشکیل شده‌اند. عناصر 59be (*attc*)، علیرغم این که واجد سایزهای متفاوتی بین ۱۴۱-۵۷ جفت باز هستند، اما دارای یکسری خصوصیات مشترک می‌باشند. این عناصر واجد نواحی مرکزی^۱ (CS) با توالی GTTRRRY و نواحی مرکزی معکوس^۲ (ICS) با توالی RYYAAC می‌باشند. تمام عناصر ۵۹ بازی، دارای یک محور مرکزی متقارن در ساختار خود بوده که در دو طرف این محور تقارن، دو سایت ساده شناخته شده در سمت چپ و راست به ترتیب در ICS و CS وجود داشته که جهت قرار گیری سایت‌های ذکر شده در خلاف جهت یکدیگر می‌باشد که این مساله منجر به ایجاد ساختارهای سنجاق سری در المنت 59bp می‌گردد (شکل شماره ۴)



شکل شماره ۴: ساختار یک المنت 59bp

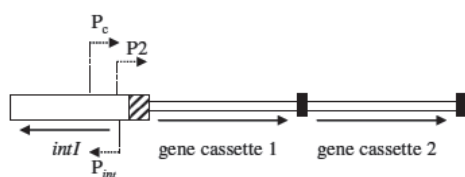
- 1-Core Site
- 2-Inverse Core Site
- 3-Site-Specific Recombinase



شکل شماره ۵: ساختار attI در اینتگرون ها

بیان کاست‌های ژنی

کاست‌های ژنی شناخته شده به طور معمول فاقد توالی پروموتور مجزا در ساختار خود بوده در نتیجه بیانشان وابسته به بیان اینتگرون‌ها می‌باشند. در ساختار یک اینتگرون در ناحیه ۵' دو نوع پروموتور شامل پروموتور معمولی (PC=P1) و پروموتور اینتگراز (Pint) وجود دارد که به ترتیب منجر به بیان کاست‌های ژنی و بیان ژن اینتگراز می‌شوند. پروموتور PC در بالا دست ناحیه attI قرار گرفته است که در اینتگرون‌های کلاس I چهار نوع از آن شناسایی شده است. این چهار نوع از لحاظ قدرت بیان با هم متفاوت هستند و شامل PCw (weak)، PCs (strong) و PCh1 (hybrid1) و PCm2 (hybrid2) می‌باشند. این دسته از پروموتورها بیست تاخوردگی داشته و از لحاظ استحکام بسیار از یکدیگر متفاوت می‌باشند، همچنین اخیراً یک پروموتور ثانویه به نام P2 در اینتگرون‌های کلاس I شناسایی شده که در بیان کاست‌های ژنی نیز موثر می‌باشد. این پروموتور در ۱۱۹ جفت بازی پایین دست پروموتور PC قرار دارد و متعاقب افزایش سه باز گوانین (G) در بین ناحیه ۱۰- و ۳۵- ایجاد می‌گردد، در نتیجه نوکلئوتیدهای موجود در بین این ناحیه از ۱۴ نوکلئوتید به ۱۷ نوکلئوتید افزایش می‌یابد. این پروموتور زمانی شروع به فعالیت می‌کند که پروموتور PC به درستی فعالیت نکند در این مواقع مسئول ۹۰٪ از کل فعالیت بیان کاست‌ها را بر عهده دارد (شکل شماره ۶). (۲۵، ۲۴، ۱۶)



شکل شماره ۶: پروموتورهای موجود در اینتگرون‌های کلاس I

- 1- Cleavage
- 2- Lambda Phage Integrase
- 3- Integration
- 4-Excision

کردن گروه‌های فسفوریل منجر به شکافتن DNA تک رشته‌ای در سایت‌های نوترکیبی attI و attC می‌گردد. اخیراً یک ناحیه جدید شامل Lys171 نیز شناسایی شده که به شدت حفاظت شده بوده و منجر به انتقال یک مولکول پروتون به ناحیه ۵' هیدروکسیل در طی واکنش شکافتن^۱ می‌شود. بهترین عضو این خانواده شامل اینتگراز فاژ لامبدا^۲ بوده که منجر به ادغام^۳ و برداشت^۴ کاست‌های ژنی بین ژنوم فاژ و کروموزوم باکتریایی می‌گردد. از دیگر اعضاء این خانواده می‌توان به پروتئین Cre از فاژ P1 اشاره کرد که باعث نگهداری و حفاظت ژنوم فاژ در وضعیت لیزوژنیک می‌شود. همچنین می‌توان به XerC/XerD ریکامیناز که منجر به ایجاد دایمرهای کروموزومی و پروتئین مخمری Flp که با معکوس کردن DNA در طول پروسه همانند سازی منجر به کنترل تعداد کپی نامبرها می‌گردد نیز اشاره کرد (۲۳-۲۰).

(attI) Specific Site

اینتگرازهای کلاس I (IntI1) سه جایگاه نوترکیبی شامل attI، attC و Secondary Site را می‌تواند شناسایی کنند، که در هر سه این جایگاه‌ها یک Binding domain و یک Consensus Sequences وجود دارد. سایت attI در انتهای ناحیه ۵' حفاظت شده از اینتگرون قرار داشته و برخلاف سکانس‌های 59bp سکانس‌های attI خیلی متنوع می‌باشد. این سایت از ساختار مشابه توالی‌های مرکزی شامل R و L که در جهت مخالف یکدیگر قرار دارند و از دو توالی تکراری مستقیم شامل DR1 و DR2 تشکیل شده است که در بالا دست ناحیه مرکزی قرار گرفته است (شکل شماره ۵). توالی تکراری مستقیم DR1 به عنوان سایت اتصال مطرح بوده که برای عمل نوترکیبی ضروری می‌باشد در حالی که توالی تکراری مستقیم DR2 برای عملکرد بهتر نوترکیبی مناسب بوده و به عنوان یک سایت ضروری مطرح نمی‌باشد (۲۴).



تمام کاست‌های ژنی در یک جهت مشابه قرار دارند (گاهی مواقع کاست‌های ژنی در جهت مخالف اینتگره می‌شوند) و تماماً در جهت *intI* می‌باشند. در حدود کمتر از ۱۰ باز در ناحیه ۵' (در مرزهای کاست‌های ژنی) به عنوان اولین کدون راه انداز شناخته می‌شود. رونویسی از ابتدای کاست آغاز شده و پایان آن در بخش المنت ۵۹ بازی می‌باشد. در انتهای این عناصر توالی‌های تکراری معکوس وجود داشته که منجر به ایجاد ساختارهای سنجاق سری می‌شود. این ساختارها به عنوان یک تضعیف کننده^۱ در رونویسی عمل کرده و منجر به توقف رونویسی در کاست ژنی می‌گردد، همچنین رونویسی از طریق ایجاد سیگنال و ایجاد برش در نوکلئوتیدهای رونویسی شونده نیز می‌تواند متوقف گردد. پس به طور کلی فاصله کاست‌های ژنی از پروموتور در سطح بیان ژن موثر می‌باشد، به طوری که هر چه کاست‌های ژنی به ناحیه ۳' نزدیک تر و از پروموتور دورتر باشد کمتر بیان می‌شوند. در بیشتر کاست‌های ژنی ناحیه شروع ترجمه (TIR) شامل کدون آغاز (AUG) و توالی شاین دالگو می‌باشد. گاهی اوقات کاست‌های ژنی فاقد ناحیه TIR می‌باشند که در این مواقع ترجمه آنان وابسته به ترجمه ناحیه‌ای به نام (SD) ORF11 می‌باشد. این ناحیه در نزدیکی سایت *attI* قرار دارد و در بیان کاست‌های ژنی که فاقد ناحیه TIR هستند موثر می‌باشند. اخیراً کاست‌های ژنی یافت شده است که خود واجد یک پروموتور ضعیف بوده و بیانشان وابسته به پروموتور PC اینتگرون نمی‌باشد که از آن جمله می‌توان به خانواده *cmlA* شامل *cmlA1*، *cmlA2*، *cmlA4*، و *cmlA5* اشاره کرد که ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کلرانفینیکل را حمل می‌نمایند. کاست‌های ژنی واجد ژن مقاومت به آمونیموم چهار ظرفیتی نیز حاوی یک پروموتور ضعیف برای بیان می‌باشند (۲۴).

نو ترکیبی کاست‌های ژنی

ژن *IntI* به عنوان یک عضو از خانواده اینتگراز روی ناحیه ۵' یک اینتگرون جای دارد و به عنوان کاتالیزور برای برش، خروج و اینتگره شدن کاست‌های ژنوم در

هنگام نو ترکیبی ضروری می‌باشد. این ژن پنج واکنش نو ترکیبی مختلف را می‌تواند انجام دهد. سه واکنش نو ترکیبی مختلف بین سایت‌های نو ترکیبی معمولی یعنی $attI \times attI \times 59bp \times 59bp$ می‌تواند رخ دهد. دو واکنش نو ترکیبی دیگر بین سایت‌های غیر اختصاصی ثانویه، بین پنتانوکلئوتید (با توالی (GWTMW) و یک *attI* (attI \times GWTMW) و یا با $59bp$ (GWTMW \times 59bp) می‌تواند انجام شود. موثرترین و کارآمدترین واکنش بین سایت *attI* و یک کاست ژنی مرتبط با $59bp$ بوده که منجر به ورود کاست و پس از آن واکنش بین $59bp \times 59bp$ که منجر به خروج کاست و در آخر واکنش بین *attI* \times *attI* مطرح می‌باشد. در بین دو واکنش نو ترکیبی بین سایت‌های غیر اختصاصی ثانویه، ابتدا $59bp$ و سپس *attI* به طور کارآمد و موثرتر می‌باشد (۲۶). کاست‌های ژنی به شکل اینتگره در اینتگرون یا در محل غیر اختصاصی ثانویه و یا به شکل مولکول‌های آزاد حلقوی می‌توانند وجود داشته باشند و هنگامی که به شکل مولکول آزاد حلقوی هستند می‌توانند از یک مکان به مکان دیگر حرکت کنند و از طریق نو ترکیبی بین *attI* و عناصر $59bp$ می‌توانند به طور اختصاصی در جایگاه *attI* یک اینتگرون وارد شوند. تا به امروز، بیش از ۱۰۰ آنزیم *IntI* شناسایی شده است که تنها حدود ۱۰ درصد باکتری‌ها، ژن‌های کد کننده این آنزیم‌ها را در خود حمل می‌کنند. از جمله این آنزیم‌ها می‌توان به *IntI1*، *IntI179E*، *IntI3*، *SonIntIA*، *NeuIntIA* و *VchIntIA* اشاره کرد. هنوز به خوبی معلوم نشده است که چرا برخی از این آنزیم‌ها به آسانی کاست‌های ژنی را شناسایی می‌کنند، در حالی که برخی دیگر به طور ضعیف بوده و یا اصلاً توانایی شناسایی کاست‌ها را ندارند. آنزیم *IntI* همچون سایر عضوهای خانواده تیروزین ریکامیناز از توپوایزومراز I برای شکستن، اسیدهای نوکلئوتیک استفاده می‌کند. واکنش نو ترکیبی بین سایت *attI* و رشته پایین از سایت *attc* انجام می‌شود. ابتدا دو مونومر از آنزیم اینتگراز به هر مولکول DNA تک رشته‌ای متصل می‌گردد، سپس هر مونومر به واسطه ناحیه Y (تیروزین)

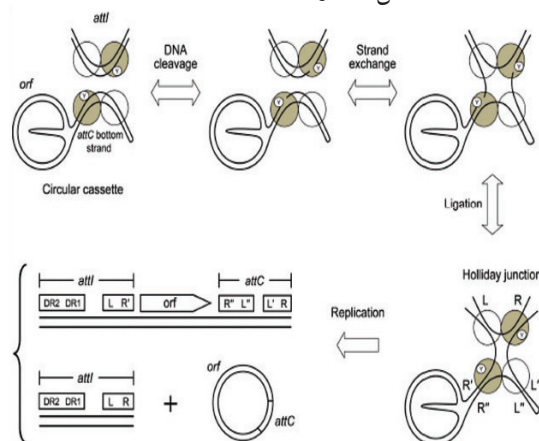
1- attenuator

به کروموزوم انتقال یابند، عکس این انتقال نادر می‌باشد و به ندرت ژن‌های بتالاکتامازی از کروموزوم به پلاسمید منتقل می‌شوند. در خصوص بتالاکتامازها، کاست‌های اینتگرون به طور عمده در سودوموناس آئروژینوزا، اسیتوباکتر بومانی و گونه‌های مختلف ایتروباکتریاسه وجود داشته و حاوی آنزیم‌های بتالاکتاماز کلاس A، B، و D از طبقه بندی Ambler بوده که منجر به ظهور مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به طور گسترده می‌شود (۳۲). تنها ۸ خانواده از آنزیم‌های بتالاکتاماز، تا کنون در ساختار اینتگرون‌های کلاس I و III از مکان‌های جغرافیایی مختلف، جدا شده است که شامل آنزیم‌های خانواده VEB، GES، IBC، CTX-M، PSE، IMP، OXA و VIM می‌باشد (جدول شماره ۵-۳). البته در این خصوص چندین استثناء نیز گزارش شده است. کاهش وجود آنزیم‌های بتالاکتاماز در ساختار اینتگرون‌ها را می‌توان به موارد مختلفی از جمله ناسازگاری ژنتیکی، موقعیت جغرافیایی و فشار انتخاب آنتی‌بیوتیکی نسبت داد.

β -Lactamase	Host species	Origin
VEB-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Vietnam
	<i>Escherichia coli</i>	Vietnam
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France
	<i>Citrobacter freundii</i>	Thailand
VEB-1a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kuwait
VEB-1b	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kuwait
VEB-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Thailand
GES-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	French Guiana
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^a	Portugal
GES-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	South Africa
IBC-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	Greece
IBC-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Greece
CTX-M-2	<i>Salmonella enterica</i>	Argentina
	<i>Proteus mirabilis</i>	Argentina
CTX-M-9	<i>Escherichia coli</i>	Spain
PSE-1	<i>Vibrio cholerae</i>	Thailand

جدول شماره ۳: بتالاکتامازهای کلاس A موجود در اینتگرون‌های کلاس I در گونه‌های مختلف از باکتری‌های گرم منفی
a: گونه‌ای که به طور استثنای در اینتگرون‌های کلاس III وجود دارد.

خود به طور جداگانه‌ای دو رشته DNA را بدون صرف ATP برش می‌دهد، متعاقب ایجاد شکافت، منجر به ایجاد هیدروکسیل آزاد در انتهای ۵' شده و انتهای ۳' با اینتگراز اتصال کوالانسی پیدا می‌کند که این امر منجر به تولید یک فسفوتیروزین می‌گردد. سپس رشته‌های بریده شده با هم جابه‌جا می‌شوند، بدین صورت که انتهای هیدروکسیل آزاد در ناحیه ۵' به انتهای فسفوتیروزین در ناحیه ۳' از رشته مخالف حمله می‌کند که متعاقب آن منجر به تشکیل اتصالات هالیدی می‌گردد. این اتصالات توسط آنزیم‌های سلولی نظیر RuvC انجام می‌شود و چهار شاخه بوده که تنها دو شاخه عمل نو ترکیبی را انجام می‌دهند و دو شاخه باقی مانده شکسته می‌شوند. سپس DNAهای تک رشته‌ای همانند سازی کرده و سه محصول تولید می‌گردد که یکی از آنان حاوی کاست ادغام شده می‌باشد (شکل شماره ۷) (۲۷-۳۱).



شکل شماره ۷: عمل نو ترکیبی توسط ژن اینتگراز

ارتباط اینتگرون‌ها با آنزیم‌های بتالاکتاماز

تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌باشد، که از طریق هیدرولیز هسته مرکزی در آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام باعث غیر فعال شدن آن‌ها می‌گردند. این آنزیم‌ها از طریق ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها می‌توانند از پلاسمیدها



β -Lactamase	Host species	Origin
IMP-1	<i>Serratia marcescens</i> ^a	Japan
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japan
IMP-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Italy
IMP-3	<i>Shigella flexneri</i>	Japan
IMP-4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hong Kong
	<i>Citrobacter youngae</i>	China
IMP-6	<i>Serratia marcescens</i>	Japan
IMP-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Canada
IMP-8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Taiwan
IMP-12	<i>Pseudomonas putida</i>	Italy
VIM-1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Italy
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italy
	<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	Italy
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Greece
VIM-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italy
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Spain

جدول شماره ۴: بتالاکتامازهای کلاس B موجود در اینتگرون‌های کلاس I در گونه‌های مختلف از باکتری‌های گرم منفی.
a: گونه‌ای که به طور استثنا در اینتگرون‌های کلاس III وجود دارد.

ژنتیکی متحرک حمل و جا به جا می‌شوند، منجر به انتشار گسترده عوامل مقاومت از یک سویه به سویه دیگر می‌شوند. لذا شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در جهت اجرای برنامه‌های کنترل عفونت و ممانعت از انتشار سویه‌های مقاوم از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد.

β -Lactamase	Host species	Origin
OXA-1	<i>Salmonella enterica</i>	Italy
OXA-5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	South Africa
OXA-9	<i>Enterobacter aerogenes</i>	France
OXA-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vietnam
OXA-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Turkey
OXA-14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Turkey
OXA-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Turkey
OXA-19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France
OXA-20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France
OXA-28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France
OXA-30	<i>Escherichia coli</i>	France

جدول شماره ۵: بتالاکتامازهای کلاس D موجود در اینتگرون‌های کلاس I در گونه‌های مختلف از باکتری‌های گرم منفی.

بحث و نتیجه گیری

در سال‌های اخیر، نقش اینتگرون‌ها به عنوان عناصر ژنتیکی متحرک در انتقال افقی مقاومت آنتی بیوتیکی مشخص شده است. از آنجا که بسیاری از اینتگرون‌ها دارای بیش از یک کاست ژنی مقاومتی هستند و اغلب توسط المنت‌های

References

- 1- Rowe-Magnus DA, Mazel D. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Current opinion in microbiology*. 2001;4(5):565-9.
- 2- Koratzanis E, Souli M, Galani I, Chryssouli Z, Armaganidis A, Giamarellou H. Epidemiology and molecular characterization of metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a university hospital intensive care unit in Greece. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011;38:390-97.
- 3- 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.
- 4- Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy M-C. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*. 2012;3(119):1-14.
- 5- Bissonnette L, Roy P. Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*. 1992;174(4):1248-57.
- 6- Barlow RS, Gobius KS. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;58(6):1133-8.
- 7- Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS microbiology reviews*. 2009;33(4):757-84.
- 8- Simonsen CC, Chen EY, Levinson AD. Identification of the type I trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase specified by the *Escherichia coli* R-plasmid R483: comparison with prokaryotic and eukaryotic dihydrofolate reductases. *Journal of bacteriology*. 1983;155(3):1001-8.
- 9- Correia M, Boavida F, Grosso F, et al. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(9):2838-43.
- 10- Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages J-M, Nordmann P. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(6):1615-20.
- 11- Collis CM, Kim M-J, Partridge SR, Stokes H, Hall RM. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *Journal of bacteriology*. 2002;184(11):3017-26.
- 12- Mendes RE, Castanheira M, Toleman MA, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. Characterization of an integron carrying blaIMP-1 and a new aminoglycoside resistance gene, aac (6')-31, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(7):2611-4.
- 13- Gillings M, Boucher Y, Labbate M, et al. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *Journal of bacteriology*. 2008;190(14):5095-100.
- 14- Centron D, Roy PH. Presence of a group II intron in a multiresistant *Serratia marcescens* strain that harbors three integrons and a novel gene fusion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46:1402-9.
- 15- Brown HJ, Stokes H, Hall RM. The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. *Journal of bacteriology*. 1996;178(15):4429-37.
- 16- Ke X, Gu B, Pan S, Tong M. Epidemiology and molecular mechanism of integron-mediated antibiotic resistance in *Shigella*. *Archives of microbiology*. 2011;193(11):767-74.
- 17- Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Ploncard P, Dychinco B, Davies J, Mazel D. The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 2001;98:652-657.
- 18- Kahlmeter G, Brown D, Goldstein F, et al. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clinical microbiology and infection*. 2006;12(6):501-3.
- 19- Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(7):3403-6.





- 20- Larouche A, Roy PH. Effect of attC structure on cassette excision by integron integrases. *Mobile DNA*. 2011;2(1):3.
- 21- Bouvier M, Demarre G, Mazel D. Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *The EMBO journal*. 2005;24(24):4356-67.
- 22- Grindley ND, Whiteson KL, Rice PA. Mechanisms of Site-Specific Recombination. *Annual Review of Biochemistry*. 2006;75:567-605.
- 23- Krogh BO, Shuman S. Catalytic mechanism of DNA topoisomerase IB. *Molecular cell*. 2000;5(6):1035-41.
- 24- Fluit A, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical microbiology and infection*. 2004;10(4):272-88.
- 25- Rowe-Magnus DA, Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International journal of medical microbiology*. 2002;292(2):115-25.
- 26- Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C, Collis CM, Stokes H, Hall RM. Definition of the attI1 site of class 1 integrons. *Microbiology*. 2000;146(11):2855-64.
- 27- Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 2006;4(8):608-20.
- 28- Biskri L, Bouvier M, Guérout A-M, Boissard S, Mazel D. Comparative study of class 1 integron and *Vibrio cholerae* superintegron integrase activities. *Journal of bacteriology*. 2005;187(5):1740-50.
- 29- Léon G, Roy PH. Excision and integration of cassettes by an integron integrase of *Nitrosomonas europaea*. *Journal of bacteriology*. 2003;185(6):2036-41.
- 30- Drouin F, Mélançon J, Roy PH. The IntI-like tyrosine recombinase of *Shewanella oneidensis* is active as an integron integrase. *Journal of bacteriology*. 2002;184(6):1811-5.
- 31- Collis CM, Kim M-J, Partridge SR, Stokes H, Hall RM. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *Journal of bacteriology*. 2002;184(11):3017-26.
- 32- Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, de Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(9):2598-603.

