مجلـه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـگاه علـــوم پزشـکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۲, شماره‌ی ۹۴, آذر و دی ۱۳۹۳, صفحات ۱۱۱ تا ۱۱۹

فراوانی اینتگرون‌های کلاس I و II در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* مولد متالوبتالاکتاماز

ناهید کرامتی[۱]، دکتر حبیب ضیغمی[۲]، دکتر فخری حقی[۲]

نویسنده‌ی مسوول: زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده‌ی پزشکی، گروه میکروب شناسی zeighami@zums.ac.ir

دریافت: ۹۲/۹/۱۶ پذیرش: ۹۳/۱/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی است. شیوع سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مولد MBL از مشکلات عمده در درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم محسوب می‌شود. هدف از تحقیق حاضر تعیین فراوانی اینتگرون‌های کلاس I و II در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مولد متالوبتالاکتاماز جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های شهر زنجان بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه‌ی توصیفی مقطعی، ۱۲۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های بالینی مختلف از بیمارستان‌های شهر زنجان طی سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۱ جمع آوری شد. به منظور تایید ایزوله‌ها از تست‌های بیوشیمیایی استفاده و سپس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها نسبت به ۷ آنتی‌بیوتیک با روش دیسک دیفیوژن بر اساس استانداردهای CLSI تعیین گردید. جهت بررسی وجود آنزیم‌های MBL از روش فنوتیپی DDST استفاده و حضور ژن‌های intI1 ، intI2، bla_{VIM} و bla_{GIM} با روش PCR ردیابی شد.*

یافته‌ها: *در این مطالعه‌ی بیشترین و کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌ترتیب مربوط به سفوتاکسیم در ۵۲ ایزوله (۴۳/۳ درصد) و آمیکاسین در ۲۶ ایزوله (۲۱/۶ درصد) بود. از ۱۲۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا، ۳۵ ایزوله (۲۹درصد) مقاوم به ایمی‌پنم بودند. از ۳۵ ایزوله مولد MBL، ۳۲ (۹۱ درصد) ایزوله حامل ژن intI1، ۳ (۹درصد) ایزوله حامل ژن intI2 و ۶ (۱۷درصد) ایزوله حامل ژن bla_{VIM} بود. سویه واجد ژن bla_{GIM} یافت نشد. همچنین هر ۳ ایزوله intI2 مثبت، حامل ژن‌های intI1 و bla_{VIM} نیز بودند.*

نتیجه گیری: *نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده‌ی شیوع بالای اینتگرون کلاس I در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای مولد MBL بود. باتوجه به نقش اینتگرون‌ها در انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، شناسایی و پیشگیری از انتشار این عناصر ضروری به‌نظر می‌رسد.*

واژگان کلیدی: *اینتگرون، سودوموناس آئروژینوزا، متالوبتالاکتاماز*

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باسیل گرم منفی غیر تخمیری است که به ندرت در میزبان طبیعی عامل عفونت بوده و در اکثر موارد به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب مطرح است (۱). مطالعات نشان می‌دهد میزان مرگ و میری که به واسطه‌ی باکتریمی ایجاد شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* رخ می‌دهد، در حدود ۳۴ درصد است (۲). ریشه کن نمودن عفونت‌های ایجاد شده توسط این ارگانیسم به‌دلیل نیازهای تغذیه‌ای کم، مقاومت به محدوده‌ی دمایی وسیع و همچنین

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

۲- دکترای تخصصی میکروب شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

مقاومت نسبت به مواد ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها دشوار است (۳). کارباپنم‌ها از قوی‌ترین و مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که برای درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مورد استفاده قرار می‌گرفت، اما مصرف بی‌رویه‌ی این داروها منجر به ظهور سویه‌های مقاوم به کارباپنم شده است (۴). یکی از مکانیسم‌های غیر فعال کردن آنتی‌بیوتیک‌ها، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است که به‌عنوان شایع‌ترین مکانیسم مقاومت باکتریایی مطرح می‌باشد (۵). این آنزیم‌ها از طریق هیدرولیز هسته‌ی مرکزی در آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام باعث غیر فعال شدن آن‌ها می‌گردند (۶). بتالاکتامازها به دو صورت مولکولی (Ambler) و عملکردی (Bush-Jacoby-Medeiros) طبقه‌بندی می‌شوند. متالوبتالاکتامازها (MBL) در کلاس B از طبقه‌بندی Ambler و گروه ۳ از طبقه‌بندی Bush قرار دارند که جهت فعالیت خود به کاتیون‌های دو ظرفیتی روی نیاز دارند. این آنزیم‌ها قادر به هیدرولیز تمامی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به جز منوباکتام‌ها (آزترئونام) می‌باشند و وجود آن‌ها مشکل بالینی عمده‌ای محسوب می‌شود. *سودوموناس آئروژینوزای* مولد متالوبتالاکتاماز، نخستین بار در ژاپن در سال ۱۹۹۱ شناسایی و پس از آن نیز در بسیاری از کشورها گزارش شده‌است (۷). خانواده‌های متعددی از آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز در بین سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* شناسایی شده که شامل IMP,VIM,SPM,GIM,SIM,AIM KHM, و NDM می‌باشد (۸). آنزیم‌های VIM و IMP شایع‌ترین آنزیم‌های متالوبتالاکتامازی هستند که در سراسر جهان شناسایی شده‌اند (۹). ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی معمولا توسط عناصر ژنتیکی متحرکی به نام اینتگرون‌ها حمل می‌شوند (۱۰). چهار کلاس متمایز از اینتگرون‌ها شناسایی شده که هر یک واجد ژن اینتگر از اختصاصی می‌باشند (۱۱). در این میان اغلب اینتگرون‌های مقاومتی، متعلق به اینتگرون‌های کلاس I می‌باشند. به‌دلیل اینکه ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز اغلب بر روی عناصر ژنتیکی متحرک مانند اینتگرون‌ها واقع شده‌اند، به راحتی بین سویه‌های مختلف باکتریایی انتقال می‌یابند (۱۲). هدف از این مطالعه تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های *intI1*، *intI2*، bla_{VIM} و bla_{GIM} در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های شهر زنجان بود.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی توصیفی مقطعی، ۱۲۰ ایزوله‌ی *سودوموناس آئروژینوزا* از نمونه‌های بالینی مختلف شامل ادرار، خون، ترشحات تنفسی، مدفوع، تراشه، بافت و ترشحات گوش طی مدت ۱۲ماه (اردیبهشت ۱۳۹۱ لغایت خرداد ۱۳۹۲) از بیمارستان‌های آیت الله‌موسوی، ولیعصر، امام حسین و شهید بهشتی شهر زنجان جمع‌آوری شد. به‌منظور تایید ایزوله‌ها، تست‌های بیوشیمیایی افتراقی انجام و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها به‌روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Baur) تعیین شد (۱۳). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده محصول شرکت MAST انگلستان و به شرح زیر بودند: آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، آزترئونام (۳۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم). پس از انجام دیسک دیفیوژن، قطر هاله‌ی عدم رشد در اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن با توجه به استانداردهای CLSI بررسی و گزارش گردید (۱۴). جهت تشخیص فنوتیپی سویه‌های مولد MBL از روش DDST (Double Disk Synergy Test) استفاده شد (۱۵). ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم با استفاده از دیسک‌های ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم) به تنهایی و ایمی‌پنم همراه با EDTA (۱۰ و ۳۰ میکروگرم) در مولر هینتون آگار مورد

بررسی قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، افزایش قطر هاله‌ی عدم رشد به اندازه ۷ میلی‌متر یا بیشتر در اطراف دیسک ایمی‌پنم همراه با EDTA در مقایسه با دیسک ایمی‌پنم بیانگر تولید MBL بود. از سویه‌ی استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* 27853 ATCC به‌عنوان کنترل مثبت و از سویه‌ی استاندارد *اشریشیاکلی* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. با توجه به پلاسمیدی بودن ژن‌های مورد مطالعه (۱۶)، جهت استخراج DNA پلاسمیدی سویه‌های MBL مثبت، از کیت استخراج پلاسمید (Bioneer, Korea) استفاده شد. از سویه‌های حامل ژن‌های *intI1*، *intI2*، bla_{VIM} و bla_{GIM} به‌عنوان کنترل مثبت (تهیه شده از بخش میکروب‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس و انستیتو پاستور ایران) جهت انجام PCR استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix(۲x) Fermentas، ۱ میکرولیتر پرایمر، ۱۰ پیکومول از هر کدام، ۲ میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۵۰ میکروگرم و ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر (Nuclease Free) تحت برنامه‌ی دمایی ترموسایکلر انجام شد (جدول ۱). توالی پرایمرهای به‌کار رفته در جدول ۱ ارایه شده است (۱۸و ۱۷). جهت ازیابی محصولات PCR، الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد.

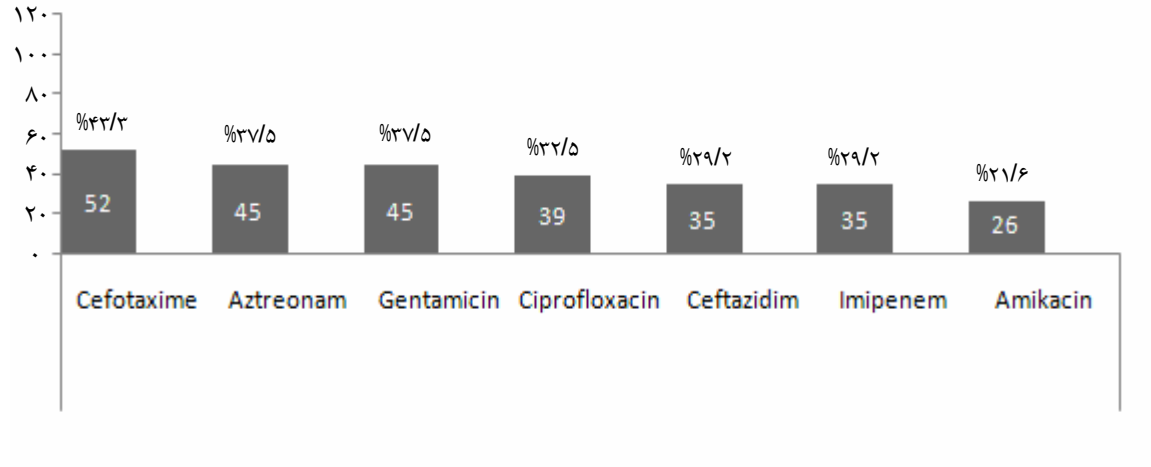
جدول ۱: توالی پرایمرها و دماهای مورد استفاده در آزمون PCR ژن‌های intI1، intI2، bla_{VIM} و bla_{GIM}

Cycle	Final extention	Primary extention	Annealing	Secondary denaturation	Primary denaturation	Reference	Fragment Length	Sequences	Gene
۳۰	72˚C 10min	72˚C 1min	52˚C 1min	94˚C 50s	94˚C 5min	17	390bp	5'-GATGGTGTTTGGTCGCATA-3'	bla_{VIM}-F
								5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'	bla_{VIM} -R
۳۰	72˚C 8min	72˚C 50s	52˚C 40s	94˚C 30s	94˚C 5min	17	477bp	5'-TCGACACACCTTGGTCTGAA-3'	bla_{GIM} -F
								5'-AACTTCCAACTTTGCCATGC-3'	bla_{GIM} -R
۳۰	72˚C 10min	72˚C 1min	62˚C 50sec	94˚C 1min	94˚C 5min	18	160bp	5'-CAGTGGACATAAGCCTGTTC-3'	*intI1*-F
								5'-CCCGAGGCATAGACTGTA-3'	*int1*-R
۳۰	72˚C 10min	72˚C 1min	62˚C 50sec	94˚C 1min	94˚C 5min	18	787bp	5'-CACGGATATGCGACAAAAAG-3'	*intI2*-F
								GATGACAACGAGTGACGAAATG-5'-3'	*intI2*-R

یافته‌ها

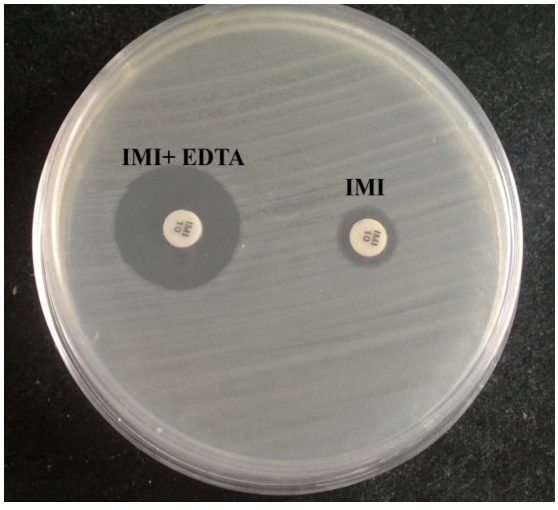
از ۱۲۰ ایزوله‌ی *سودوموناس آئروژینوزای* جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی، ۳۹ (۳۵ درصد) ایزوله مربوط به نمونه‌های ادرار، ۳۳ (۲۷ درصد) ایزوله مربوط به خون، ۲۱ (۱۷ درصد) ایزوله مربوط به ترشحات تنفسی، ۱۰ (۸ درصد) ایزوله مربوط به مدفوع و ۱۷ (۱۴ درصد) ایزوله مربوط به زخم، بافت و ترشحات گوش بود. از نمونه‌های بالینی مورد بررسی، ۵۱ (۴۳ درصد) نمونه مربوط به جنس مذکر و ۶۹ (۵۷ درصد) نمونه مربوط به جنس مونث بودند. بیشترین و کمترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به سفوتاکسیم در ۵۲ ایزوله (۴۳/۳ درصد) و آمیکاسین در ۲۶ ایزوله (۲۱/۶ درصد) بود. میزان مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها به شرح ذیل بود: مقاومت به ایمی‌پنم در ۳۵ ایزوله (۲۹/۲ درصد)، سفتازیدیم در ۳۵ ایزوله (۲۹/۲ درصد)، آزترئونام در ۴۵ ایزوله

(۳۷/۵ درصد)، جنتامایسین در ۴۵ ایزوله (۳۷/۵ درصد) و سیپروفلوکساسین در ۳۹ ایزوله (۳۲/۵ درصد) (نمودار ۱).

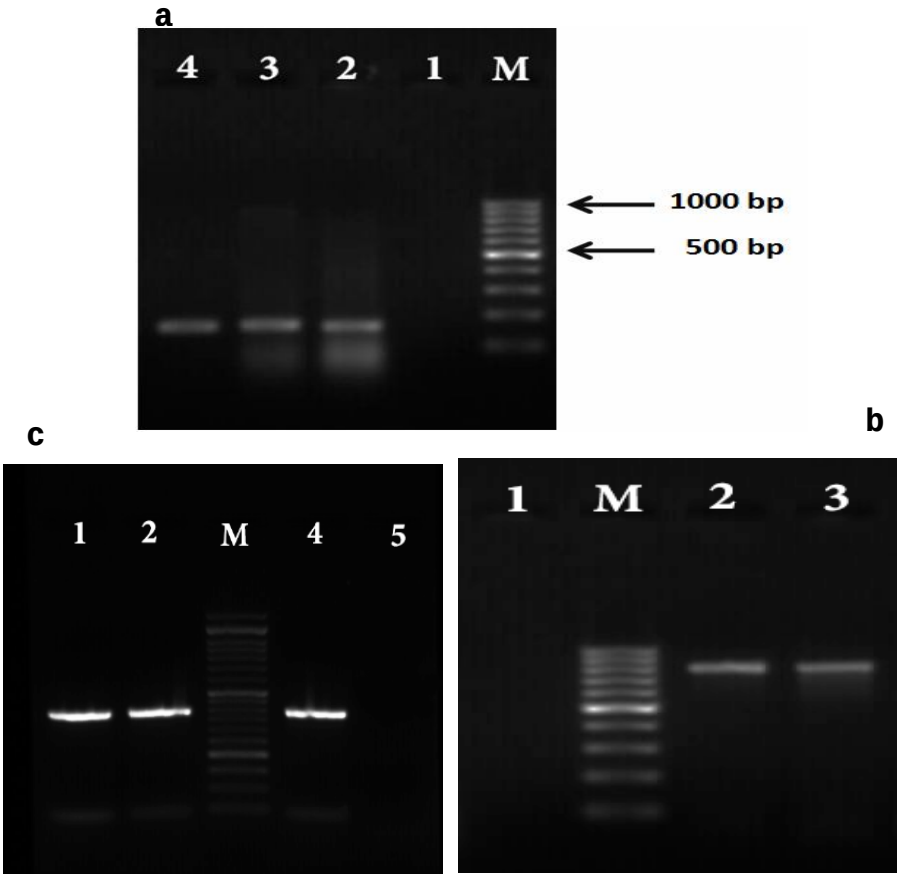


نمودار ۱: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی

نتایج بررسی فنوتیپی به روش دیسک ترکیبی نشان داد که از ۱۲۰ ایزوله‌ی *سودوموناس آئروژینوزا*، ۳۵ (۲۹ درصد) ایزوله مولد متالوبتالاکتاماز بودند (شکل ۱). در بین ایزوله‌های مولد متالوبتالاکتاماز، ۳۹ (۳۳درصد) ایزوله مربوط به نمونه‌های ادرار، ۳۳ (۲۷درصد) ایزوله مربوط به خون، ۲۱ (۱۸ درصد) ایزوله مربوط به ترشحات تنفسی، ۱۰ (۸ درصد) ایزوله مربوط به مدفوع و ۱۷ (۱۴ درصد) ایزوله مربوط به زخم، بافت و ترشحات گوش بود. از ۳۵ ایزوله‌ی *سودوموناس آئروژینوزای* مولد متالوبتالاکتاماز، ۳۲ (۹۱ درصد) ایزوله حامل ژن ***intI1***، ۳ (۹ درصد) ایزوله حامل ژن ***intI2*** و ۶ ایزوله (۱۷ درصد) حامل ژن bla_{VIM} بود (شکل ۲). سویه واجد ژن bla_{GIM} یافت نشد. تمامی ۶ ایزوله bla_{VIM} مثبت حامل ژن ***intI*** بودند و ایزوله‌های (۳ ایزوله) ***intI2*** مثبت نیز، به‌طور همزمان حامل ژن‌های ***intI1*** و bla_{VIM} بودند.



شکل ۱: تست تاییدی فنوتیپی جهت شناسایی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مولد MBL_S



شکل ۲: الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR ژن‌های intI1، intI2 و bla_{VIM}. a: الکتروفورز ژن intI1، M مارکر 100bp، 1 نمونه‌ی کنترل منفی، 2 و 3 نمونه‌های بالینی مثبت، 4 کنترل مثبت (160bp). b: الکتروفورز ژن intI2، M مارکر 100bp، 1 نمونه‌ی کنترل منفی، 2 نمونه‌ی کنترل مثبت (787bp) و 3 نمونه‌ی بالینی مثبت c: الکتروفورز ژن bla_{VIM}، M مارکر 50bp، 1 نمونه‌ی کنترل مثبت (390bp)، 2 و 4 نمونه‌های بالینی مثبت، 5 نمونه‌ی کنترل منفی

بحث

در مطالعه‌ی اخیر که بر روی ۱۲۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* صورت گرفت، بیشترین درصد مقاومت مربوط به سفوتاکسیم در ۵۲ ایزوله (۴۳/۳ درصد) و کمترین میزان مربوط به آمیکاسین در ۲۶ ایزوله (۲۱/۶ درصد) بود. در مطالعه‌ی کلانتر و همکارانش در کردستان، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، سفوتاکسیم، جنتامایسین، آمیکاسین به‌ترتیب ۹۶، ۸۸، ۵۴، ۵۲ درصد بود (۱۹)، در حالی‌که در مطالعه‌ی ما میزان مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به‌طور چشمگیری پایین می‌باشد، اما سویه‌های مولد MBL در هر دو مطالعه تقریبا یکسان (زنجان ۲۹/۲، کردستان ۲۲ درصد) بودند. در مقایسه با تحقیق حاضر، مطالعه‌ی پونسوک در کشور تایلند، افزایش قابل توجهی را در میزان مقاومت سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* نشان می‌دهد، به‌طوری‌که میزان مقاومت نسبت به آمیکاسین ۹۲/۱ درصد، سفتازیدیم ۹۶ درصد، جنتامایسین ۹۵ درصد و سیپروفلوکساسین ۹۹ درصد بود (۲۰). در مطالعه‌ی حاضر ۳۵ ایزوله (۲۹/۲ درصد) مولد متالوبتالاکتاماز شناسایی شد که

این میزان در تحقیق گومز و همکاران طی سال ۲۰۱۰ در برزیل ۳۴/۵ درصد گزارش شد (۲۱). همچنین در بررسی که در سال ۲۰۰۸ در هند صورت گرفت ۲۰/۸ درصد از ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مولد MBL بودند (۲۲). اختلاف مشاهده شده در نتایج، می‌تواند مربوط به منطقه‌ی جغرافیایی، سویه‌ی باکتری و تفاوت در الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها باشد.

جهت بررسی ژن‌های متالوبتالاکتامازی و اینتگرون‌های کلاس یک و دو در ایزوله‌های مولد MBL (۳۵ ایزوله)، PCR انجام شد. ۶ ایزوله (۱۷ درصد) حامل ژن bla_{VIM} بود؛ درحالی‌که سویه‌ی حاوی ژن bla_{GIM} مشاهده نشد. مطالعه‌ای در کشور تایوان در سال ۲۰۰۸ جهت بررسی ژن‌های bla_{SIM}،bla_{IMP}، bla_{VIM}، bla_{SPM} و bla_{GIM} صورت گرفت. بالاترین درصد شیوع مربوط به ژن‌های $bla_{VIM\ 2,3,11}$ بود، اما ژن‌های bla_{GIM} , bla_{SPM} , bla_{SIM} یافت نشد (۲۳). در مطالعه‌ی اخیر نیز آنزیم bla_{VIM} بیشترین میزان شیوع را داشت و ژن bla_{GIM} نیز مشاهده نشد. در مطالعه‌ای که توسط ریبو و همکاران بر روی ۳۰۰۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزای* جمع‌آوری شده صورت گرفت، تنها ۸ ایزوله مولد MBL شناسایی شد. پنج ایزوله از نوع bla_{GIM-1}، در دو ایزوله از نوع bla_{VIM-1} و در یک ایزوله نیز از نوع bla_{VIM-16} بود (۲۴). ریسک فاکتورهای متعددی در افزایش باکتری‌های مولد MBL مطرح می‌باشد. از جمله این فاکتورها می‌توان به طولانی بودن مدت زمان بستری شدن در بیمارستان، مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها، سابقه جراحی و کاربرد غیرمنطقی و ناکافی درمان‌های ضد میکروبی اشاره کرد. میزان شیوع اینتگرون‌های کلاس I و II در این مطالعه به‌ترتیب ۳۲ ایزوله (۹۱ درصد) و ۳ ایزوله (۹ درصد) بود. این میزان در مطالعه خسروی و همکاران ۹۴/۷ و ۵/۳ درصد گزارش شد که با نتایج ما همخوانی داشت. همچنین ۵۶/۲ درصد ایزوله‌ها حامل ژن bla_{VIM} بودند (۲۵). در سال ۲۰۱۰ مارتیمنز در اسپانیا میزان شیوع اینتگرون‌های کلاس I در ایزوله‌های کلینیکی *سودوموناس آئروژینوزا* را ۴۶/۴ درصد گزارش نمود (۲۶). همچنین بررسی یوسفی و همکاران در شهر ارومیه بر روی ۹۳ ایزوله (۵۸/۱ درصد) مقاوم به ایمی‌پنم نشان داد ۹۰ ایزوله (۵۶/۳ درصد) حامل اینتگرون کلاس I بودند (۲۷)، اما ایزوله‌های حاوی اینتگرون‌های کلاس I در مطالعه‌ی ما ۹۱ درصد بود. میزان شیوع اینتگرون‌های کلاس I در مطالعه‌ای که در گیلان توسط نیکوکار و همکاران بین سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۱ صورت گرفت، ۴۳ درصد بود (۲۸)، که نسبت به نتایج ما (۹۱ درصد)، ۴۸ درصد کمتر می‌باشد. مقایسه‌ی نتایج حاصل از تحقیقات دهه اخیر نشان دهنده افزایش شیوع ژن‌های متالوبتالاکتاماز و همچنین اینتگرون‌های حامل ژن‌های مقاومتی در سویه‌های ایزوله شده در مناطق مختلف جهان دارد.

نتیجه گیری

در سال‌های اخیر ظهور روز افزون ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای مولد آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز، درمان عفونت‌های ناشی از این ایزوله‌ها را با مشکلی عمده مواجه ساخته است. لذا شناسایی روتین ایزوله‌های مولد متالوبتالاکتاماز در آزمایشگاه‌ها و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب جهت جلوگیری از انتقال این عوامل بین سویه‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد. در این مطالعه، با توجه به میزان پایین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آمیکاسین توصیه می‌شود از این آنتی‌بیوتیک جهت درمان عفونت‌های *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده شود.

References

1- Kohlenberg A, Weitzel-Kage D, van der Linden P, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a surgical intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2010;74: 350-7.

2- Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-β-lactamase, in a tertiary care center in cali, Colombia. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 5094-101.

3- Siegel RE. Emerging gram-negative antibiotic resistance: daunting challenges, declining sensitivities and dire consequences. *Respir Care*. 2008; 53: 471-79.

4- Siarkou V, Vitti D, Protonotariou E. Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant *bla* VIM-17 metallo-β-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53:1325-30.

5- Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin VS, Nematzadeh Sh. PER, CTX-M, TEM and SHV beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Tehran, Iran. *Iranian J Med Sci*. 2010; 13: 111-18.

6- Singh R, Saxena A, Singh H. Identification of group specific motifs in beta-lactamase family of proteins. *J biomed sci*. 2009; 16: 109-15.

7- Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, Mcclure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 3129-35.

8- Toleman MA, Vinodh H, Sekar U, Kamat V, Walsh TR. Bla VIM-2-harboring integrons isolated in India, Russia, and the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 39 conserved sequences. *Antimicrob Agents Chemother*.2007; 51: 2636-38.

9- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007, 20:440-58.

10- Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol*. 1995; 15: 593-600.

11- Collis CM, Hall RM. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol*. 1992; 174: 1574-85.

12- Bennett PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 1999; 43: 1-4.

13- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 15th informational supplement (M100-s15). NCCLS, Wayne, Pa. 2005.

14- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21th informational supplement. *CLSI document M100-S21*. 2011; Vol. 31 No.1

15- Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-ß-lactamase- producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and

Acinetobacter spp. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 3798-801.

16- Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, et al. Metallo-beta-lactamases in clinical Pseudomonas isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 2224-8.

17- Srephen H, Gillespie DM, Timothy DM. Antibiotic resistance protocols. Second editation. Springer Publication. 2010.

18- Yan H, Li L, Zong M, Jahangir Alam M, Shinoda S, Shi L. Occurrence and characteristics of class I and II integrons in clinical bacterial isolates from patient in South China. *J Health Sci*. 2010; 56; 442-50.

19- Kalntar E, Torabi V, Salimizand H, et al. First survey of metallo-beta-lactamases producers in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a referral burn center kurdistan province. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2012; 7: 23-26.

20- Poonsuk K, Tribuddharat C, Rungtip C. Class 1 integrons in *Psudomonas aeruginosa* and *Acintobacter baumannii* isolated from clinical isolates. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2012; 376-48.

21- Gomes FMR, Caiaffa-Filho HH, Burattin MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian university hospital. *Clin Sci*. 2010; 65: 825-29.

22- Varaiya A, Kulkarni N, Kulkarni M, Bhalekar P, Dogra J. Incidence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in ICU patients. *Indian J Med Res*. 2008; 127: 398-402.

23- Camargo CH, Nascimento AB, Mondelli AL, Montelli AC, Sadatsune T. Detection of SPM and IMP metallo-β-lactamases in clinical specimens of *Pseudomonas aeruginosa* from a Brazilian public tertiary hospital. *Braz J Infect Dis.* 2011; 15: 478-81.

24- Rieber H, Frontzek A, von Baum H, Pfeifer Y. Emergence of metallo- β -lactamases GIM-1 and VIM in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in North Rhine- Westphalia, Germany. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 57: 1-2.

25- Khosravi Y, Tee Tay S, Vadivelu J. Analysis of integrons and associated gene cassettes of metallo- β -lactamase-positive *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia. *J Med Microiol*. 2011; 60: 988-94.

26- Martinez L, Lopez-Jimenez L, Fuste E. Class1integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa. Int J Antimicrob Agant*. 2011; 2: 113-19.

27- Yousefi S, Nahaei MR, Farajnia S, et al. Class 1 integron and imipenem resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence and antibiotic susceptibility. *Iran J Microbiol.* 2010; 2: 113-119.

28- 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.

Frequency of Class I and II Integrons in Metalobetalactamase Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*

Keramati N[1], Zeighami H[1], Haghi F[1]

[1]Dept. of Microbiology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding Author: Zeighami H, Dept. of Microbiology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

E_mail: zeighami@zums.ac.ir

Received: 7 Dec 2013 **Accepted:** 13 Apr 2014

Background and Objective: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic nosocomial pathogen. Evidence suggests that the incidence of enzyme-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* Metalo Beta Lactamases (MBL) is a major problem in the treatment of infections caused by this organism. The aim of this study was to investigate the frequency of class I and II integrons among metalobetalactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples from Zanjan hospitals.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 120 *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical specimens were collected from Zanjan hospitals in 2012-2013. After verifying isolates by biochemical tests, antibiotic susceptibility testing (Kirby-Baur method) was performed according to CLSI guidelines against 7 antibiotics. The DDST was then carried out for detection of MBLs. Finally, the presence of *IntI1*, *IntI2*, bla_{VIM} and bla_{GIM} genes was determined by PCR.

Results: In our study, the highest and the lowest resistant patterns were related to Cefotaxime and Amikacin with 43.3% and 21.6%, respectively. Of 120 isolates, the metallo- beta-lactamase was detected in 35 (29%) isolates. According to results, the frequency of *intI1*, *intI2*, bla_{VIM} genes in MBL producers were 32(91%), 3(9%), and 6(17%), respectively, but no bla_{GIM} positive isolate was detected. Also all of *IntI2* positive isolates carried *IntI1* and bla_{VIM}, simultaneously.

Conclusion: The results of this study indicate high frequency of class I integron gene among MBL producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Due to the importance of integrons in dissemination of antibiotic resistance genes, detection and prevention of these elements are necessary.

Keywords: Integron, Mtallo-beta-lactamase, Pseudomonas aeruginosa