

آنالیز مولکولی کلاس‌های مختلف اینتگرون در سویه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* با استفاده از روش Multiplex-PCR

آتوسا رشیدی، غلامعلی مرادلی*

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۰۹

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۵/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: حضور اینتگرون‌های کلاس I، II و III در *پسودوموناس آئروژینوزا* با مقاومت دارویی چندگانه، نگرانی‌های فراوانی را در کلینیک ایجاد کرده است. این مطالعه باهدف بررسی فراوانی اینتگرون کلاس I، II و III در ایزوله‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی - مقطعی، ۶۰ ایزوله *پسودوموناس آئروژینوزا* از آزمایشگاه میکروبی‌شناسی بیمارستان حضرت رسول (ص)، تهران به دست آمد. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار در ژل و بر اساس دستورالعمل CLSI و بر روی محیط مولر هینتون آگار برای آنتی‌بیوتیکی انجام گردید. همچنین DNA ژنومیک سویه‌ها با استفاده از کیت استخراج و M-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *intI*، *intII* و *intIII* انجام گردید.

نتایج: بیشترین میزان مقاومت در سویه‌های واجد اینتگرون بوده، به‌طوری‌که تمامی سویه‌ها به آموکسی سیلین (۹۶٪/۱۶) مقاوم بوده‌اند. نتایج نشان داد تمامی ۶۰ سویه تحت مطالعه دارای مقاومت کامل (۱۰۰٪) به آمیکاسین بودند. بیشترین توزیع فراوانی مربوط به ژن *intI* با ۴۰٪ و کمترین فراوانی ژن *intIII* به میزان ۱۶٪/۶ گزارش شد. ژن *intIII* در هیچ‌یک از نمونه‌های مورد بررسی شناسایی نگردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع بالای اینتگرون کلاس I در ایزوله‌های مقاوم *پسودوموناس آئروژینوزا* و ارتباط آن با الگوهای مختلف مقاومت دارویی، اعمال راهکارهای مناسب کنترل عفونت و درمان در بیمارستان‌های مورد مطالعه برای جلوگیری از انتشار بیشتر آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: ژن‌های اینتگرون کلاس I، II، III، *پسودوموناس آئروژینوزا*، Multiplex-PCR.

مقدمه

است. اکثر ژن‌های کد کننده این آنزیم‌ها توسط عناصر متحرک ژنتیکی (Mobile Genetic Elements-MGE) مانند پلاسمید، ترانسپوزون‌ها و باکتریوفازها حمل می‌شوند. اینتگرون‌ها انواعی از MGE می‌باشند که قادر به حمل و گسترش ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان این باکتری‌ها هستند و انتقال افقی آن‌ها در بین باکتری‌ها یکی از مهم‌ترین راه‌های انتشار ژن‌های مقاومت و به وجود آمدن سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR) است (۳). تا به امروز چهار کلاس مختلف از اینتگرون‌های کد کننده مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها شناسایی شده‌اند که هر کلاس واجد اینتگراز خاص خود است. بیشتر اینتگرون‌های شناخته‌شده به کلاس ۱ تعلق دارند و حاوی ژن *sulI* می‌باشند (۴). کلاس ۳ اینتگرون‌ها در ترانسپوزون‌های Tn-7 قرار دارند و کلاس ۳ اینتگرون واجد ژن‌های Metallo-beta-lactamase است. تمام اینتگرون‌هایی که تا به امروز شناسایی شده‌اند دارای سه عنصر ضروری زیر برای وارد کردن ژن‌های خارجی می‌باشند:

پسودوموناس آئروژینوزا به‌طور وسیعی در طبیعت انتشار داشته و پاتوزن فرصت طلبی است که در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی، نوتروپنیک، سوختگی و بیماران دارای کاتتر عامل ایجاد بیماری است. درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری به سبب مقاومت بالایی که به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها دارد مشکل است (۱). این باکتری به‌عنوان دومین عامل عفونت‌های سوختگی و سومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی است (۲). مکانیسم‌های مختلفی جهت بروز مقاومت در این باکتری نسبت به داروهای ضد میکروبی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به؛ تغییر یا کاهش نفوذپذیری میکروب به داروها، پمپ افلاکس یا تراوشی، تغییر در گیرنده داروها، دستیابی به مسیرهای متابولیک فرعی و تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده داروها را نام برد که مهم‌ترین مکانیسم، تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده داروها

* نویسنده مسئول: غلامعلی مرادلی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
Email: moradli.mic@gmail.com

کلنی‌های رشد یافته مشکوک به *پسودوموناس آئروژینوزا* از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نظیر؛ رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، حرکت، سیترات، TSI، اندول، متیل رد و ووگس پروسکوئر (MR-VP)، اوره آز، تست OF (اکسیداسیون-تخمیر)، رشد در ۴۲ درجه سلسیوس و تولید پیگمان در محیط ستریمرید آگار (مرک، آلمان) استفاده شد. سویه‌های تعیین هویت شده تا زمان انجام آزمایش‌ها در محیط تریپتیک سوی براث (TSB) (مرک، آلمان) حاوی ۲۰٪ گلیسرول و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. در تمام مراحل این مطالعه از سویه رفرانس *پسودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 به‌عنوان سویه کنترل مثبت استفاده شد. پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) و با استفاده از روش انتشار از دیسک برای آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین (5 µg)، مروپنم (10 µg)، ایمی پنم (10 µg)، سفالوتین (30 µg)، جنتامیسین (10 µg)، آمیکاسین (30 µg)، سفتازیدیم (30 µg)، سفوتاکسیم (30 µg)، آموکسی سیلین (25 µg) آزترونام (30 µg)، کاربنی سیلین (100 µg)، لووفلوکساسین (5 µg)، کوتریموکسازول (25 µg) و پیپراسیلین/تازوباکتام (100/10 µg) بر اساس دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاه و بالینی (CLSI) (۹) بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد.

DNA سلولی با استفاده از کیت DNA سیناژن (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF) استخراج گردید. تست M-PCR برای شناسایی ژن‌های *Int1* و *Int2* با استاندارد آزمایشگاه و بالینی (CLSI) (۹) بر روی محیط

ژن *intI* که آنزیم اینتگراز را کد می‌کند، *attI* site که محل قرارگیری ژن خارجی است، *Pc* که پروموتور است و محل صحیح شروع رونویسی را برای آنزیم رونویسی مشخص می‌کند، اینتگرون‌های کلاس I معمولاً در باکتری‌های گرم منفی به‌ویژه انتروباکتریاسه وجود دارند (۵ و ۶). اینتگرون‌های کلاس II مشابه به اینتگرون‌های کلاس I می‌باشند. آن‌ها دارای ژن اینتگراز (*intI2*)، یک جایگاه نوترکیبی (*attI2*) و کاست‌های ژنی بوده اما در قسمت 3'-CS خود فاقد ژن *sulI* است (۷). اینتگرون‌های کلاس III در ترانسپوزونی قرار دارند که روی پلاسمید بوده اما هنوز ویژگی‌های پلاسمید فوق مشخص نگردیده است (۱۱). دکتر رجب نیا و همکاران در بابل به بررسی فراوانی کلاس‌های اینتگرون در سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* پرداختند و مشخص نمودند که کلاس ۱ اینتگرون فراوان‌ترین تایپ اینتگرون در سویه‌های تحت مطالعه است. این محققین اظهار کردند که نقش این ژن‌های قابل انتقال در بروز سویه‌های مقاوم حائز اهمیت است (۸). این مطالعه باهدف بررسی فراوانی اینتگرون کلاس I، II و III در ایزوله‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* به روش Multiplex-PCR انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی در طی یک بازه زمانی ده‌ماهه از ابتدای اردیبهشت ۱۳۹۴ لغایت انتهای دی ۱۳۹۴ انجام شد، تعداد ۶۰ نمونه *پسودوموناس آئروژینوزا* از آزمایشگاه بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص) به دست آمد. به‌منظور تائید

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام ژن	توالی اولیگونوکلوئوتیدی (۵'→۳')	طول قطعه (bp)
<i>Int1</i>	F=5'-CAGTGGACATAAGCCTGTTC-3' R=5'-CCCGAGGCATAGACTGTA-3'	۱۶۰
<i>Int2</i>	F=5'-CACGGATATGCGACAAAAAGGT-3' R=5'-GTAGCAAACGAGTGACGAAATG-3'	۷۸۸
<i>Int3</i>	F=5'-GCCTCCGGCAGCGACTTTTCAG-3' R=5'-ACGGATCTGCCAACCTGAC-3'	۹۷۹

شده از شرکت سیناکلون (تهران، ایران) انجام شد (جدول ۱) (۱۰). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی مول در لیتر MgCl₂، ۰/۵ واحد آنزیم Taq و ۵۰

نمونه‌های به‌دست‌آمده، تمامی آن‌ها بر روی محیط بلاد آگار و مک کانکی (مرک، آلمان) کشت داده و پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت از نظر تشکیل کلنی و رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور تائید

سویه‌ها به ایمی پنم حساس بودند. این نتایج نشان داد که کارباپنم‌ها (ایمی پنم و مروپنم) به عنوان گزینه درمانی در درمان عفونت‌های ناشی از این سویه‌های حائز اهمیت هستند. نتایج نشان داد که میزان مقاومت به ایمی پنم، مروپنم، سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم، لووفلوکساسین، کوتریموکسازول، سفتازیدیم، آزترونام، کاربنی سیلین، پیراسیلین/تازوباکتام در سویه‌های حامل اینتگرون به مراتب بیشتر از سویه‌های فاقد اینتگرون است. با توجه به نتایج به دست آمده از مجموع نمونه بالینی ژن‌های *intII* در هیچ یک از نمونه‌ها شناسایی نگردید (جدول ۳). مطابق جدول ۳ بیشترین توزیع فراوانی مربوط به ژن *intI* با ۴۰٪ بوده و فراوانی ژن *intIII* به میزان ۱۶/۶٪ گزارش شده است. همچنین حضور هم‌زمان *intI* و *intIII* در ۱۰ سویه (۱۶/۶٪) بود. ژن *intII* در هیچ کدام از

نانوگرم DNA الگو است. واکنش مالتی پلکس PCR در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد. یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس (دناتوراسیون اولیه) سپس ۳۵ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله اتصال ۶۰ ثانیه در ۶۰ درجه سلسیوس و مرحله طویل شدن ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و نهایتاً یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس. محصولات PCR از نظر حضور ژن‌های موردنظر با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شدند.

نتایج

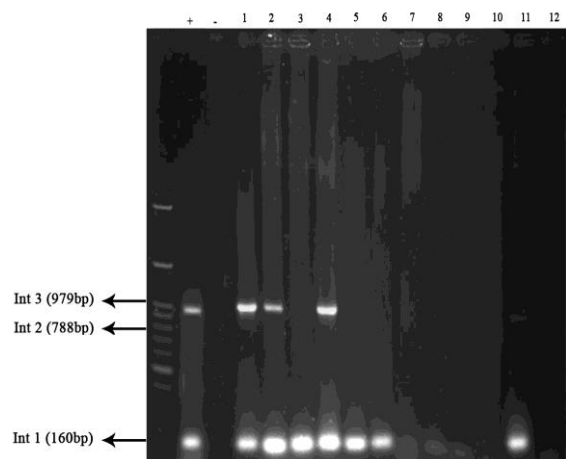
بررسی میزان مقاومت ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه با استفاده از روش انتشار از دیسک نشان داد که

جدول ۲- الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های پseudomonas آئروژینوزا

ایزوله‌های فاقد اینتگرون			ایزوله‌های واجد اینتگرون			تفسیر CLSI
مقاوم (R)	نیمه حساس (I)	حساس (S)	مقاوم (R)	نیمه حساس (I)	حساس (S)	
۱۱ (۱۸/۳)٪	۰ (۰/۰)٪	۴۹ (۸۱/۶)٪	۲۱ (۳۵)٪	۷ (۱۱/۶)٪	۳۲ (۵۳/۳)٪	ایمی پنم
۱۰ (۱۶/۶)٪	۳ (۵)٪	۴۷ (۷۸/۳)٪	۱۹ (۳۱/۶)٪	۹ (۱۵)٪	۳۲ (۵۳/۳)٪	مروپنم
۱۸ (۳۰)٪	۰ (۰/۰)٪	۴۲ (۷۰)٪	۱۵ (۲۵)٪	۶ (۱۰)٪	۳۹ (۶۵)٪	جنتامایسین
۲۹ (۴۸/۳)٪	۲ (۳/۳)٪	۲۹ (۴۸/۳)٪	۳۳ (۵۵)٪	۰ (۰/۰)٪	۲۷ (۴۵)٪	سیپروفلوکساسین
۵۳ (۸۸/۳)٪	۳ (۵)٪	۴ (۶/۶)٪	۵۸ (۹۶/۶)٪	۱ (۱/۶)٪	۱ (۱/۶)٪	آموکسی سیلین
۶۰ (۱۰۰)٪	۰ (۰/۰)٪	۰ (۰/۰)٪	۶۰ (۱۰۰)٪	۰ (۰/۰)٪	۰ (۰/۰)٪	آمیکاسین
۲۹ (۴۸/۳)٪	۶ (۱۰)٪	۲۵ (۴۱/۶)٪	۳۱ (۵۱/۶)٪	۰ (۰/۰)٪	۲۹ (۴۸/۳)٪	سفتازیدیم
۲۹ (۴۸/۳)٪	۱۲ (۲۰)٪	۱۹ (۳۱/۶)٪	۳۴ (۵۶/۶)٪	۰ (۰/۰)٪	۲۶ (۴۳/۳)٪	سفوتاکسیم
۳۳ (۵۵)٪	۴ (۶/۶)٪	۲۳ (۳۸/۳)٪	۳۹ (۶۵)٪	۰ (۰/۰)٪	۲۱ (۳۵)٪	سفالوتین
۲۲ (۳۶/۶)٪	۱۱ (۱۸/۳)٪	۲۷ (۴۵)٪	۲۹ (۴۸/۳)٪	۱۲ (۲۰)٪	۲۲ (۳۶/۶)٪	آزترونام
۳۵ (۵۸/۳)٪	۶ (۱۰)٪	۱۹ (۳۱/۶)٪	۴۲ (۷۰)٪	۰ (۰/۰)٪	۱۸ (۳۰)٪	کاربنی سیلین
۳۵ (۵۸/۳)٪	۰ (۰/۰)٪	۲۵ (۴۱/۶)٪	۴۱ (۶۸/۳)٪	۰ (۰/۰)٪	۱۹ (۳۱/۶)٪	لووفلوکساسین
۳۲ (۵۳/۳)٪	۳ (۵)٪	۲۵ (۴۱/۶)٪	۳۶ (۶۰)٪	۱ (۱/۶)٪	۲۳ (۳۸/۳)٪	کوتریموکسازول
۱۷ (۲۸/۳)٪	۰ (۰/۰)٪	۴۳ (۷۱/۶)٪	۴۳ (۷۱/۶)٪	۰ (۰/۰)٪	۱۷ (۲۸/۳)٪	پیراسیلین/تازوباکتام

سویه‌ها یافت نشد. نتیجه آزمایش M-PCR بر روی تعدادی از جدایه‌های مثبت در شکل ۱ نشان داده شده است.

بیشترین و کمترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به آمیکاسین و مروپنم (۱۰۰٪) و (۱۶/۶٪) بود (جدول ۲). همچنین ۸۱/۶٪



شکل ۱- نتیجه آزمایش M-PCR بر روی تعدادی از جدایه‌های مثبت، به ترتیب از چپ به راست: مارکر DNA Plus marker ۱۰۰ bp، + کنترل منفی مثبت (پseudomonas آئروژینوزا ATCC 27853)، - کنترل منفی (Klebsiella pneumoniae ATCC 13883)، ژن *int1* با طول باند 160 bp، ژن *int2* با طول باند 788 bp، ژن *int3* با طول باند 979 bp می‌باشند.

منشأ نمونه‌ها و اختلاف در الگوهای مصرف آنتی‌بیوتیک در مناطق مختلف را می‌توان از دیگر دلایل این تضادها دانست. آنالیز مولکولی ژن‌های اینتگرون نشان داد که بیشترین کلاس در بین جدایه‌ها، مربوط به اینتگرون کلاس ۱ (*int1*) (۴۰٪) است که با نتایج پیمانی و همکاران (۱۴) در قزوین (سال ۲۰۱۴) (۴۱٪) و نیکوکار و همکاران (۱۵) در سال ۲۰۱۳ (در رشت) منطبق است. Xu و همکاران (سال ۲۰۰۹) (۱۶) در چین نشان دادند که ۴۵/۸٪ از ایزوله‌های بالینی پseudomonas آئروژینوزا از نظر حضور اینتگرون کلاس I مثبت می‌باشند. در مطالعات متناقضی از جمله؛ در تایلند در سال ۲۰۱۲، Poonsuk و همکاران (۱۷) نشان دادند که ۶۹/۳٪ از ایزوله‌ها حاوی اینتگرون کلاس یک بودند و همچنین در چین Chen و همکاران (۱۸) در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که ۳۸٪ از جدایه‌ها دارای کلاس اینتگرون می‌باشند. این تعارض و عدم همخوانی می‌تواند در نتیجه فاصله جغرافیایی، اختلاف در سطح بهداشت منطقه و تغییر الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک است. در مطالعه فعلی هیچ‌کدام از ایزوله‌های تحت مطالعه حامل ژن *int2* و بنابراین کلاس ۲ اینتگرون نبودند و این می‌تواند در نتیجه محدود بودن منشأ نمونه‌ها تنها از یک مرکز درمانی [تنها بیمارستان حضرت رسول

جدول ۳- نتایج حاصل از Multiplex-PCR سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا

تعداد کل نمونه‌ها	۶۰
<i>int1</i>	۴۰٪ (۲۴)
<i>int2</i>	۰٪ (۰)
<i>int3</i>	۱۶٫۶٪ (۱۰)
<i>Int1+int2</i>	۰٪ (۰)
<i>Int1+int3</i>	۱۶٫۶٪ (۱۰)
<i>Int2+int3</i>	۰٪ (۰)
<i>Int1+int2+int3</i>	۰٪ (۰)

بحث و نتیجه گیری

نتایج تست مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعه پیش رو نشان داد که بیشترین و کمترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به آمیکاسین (۱۰۰٪) و مروپنم (۱۶/۶٪) است. نتایج مطالعه ما نشان داد که ایمنی پنم و مروپنم (کارباپنم‌ها) مؤثرترین دارو بر روی ایزوله‌های پseudomonas آئروژینوزا بوده به‌طوری‌که ۴۹ سویه (۸۱/۶٪) به ایمنی پنم و ۴۷ جدایه (۷۸/۳٪) به مروپنم حساس بودند. لذا می‌توان از این آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یک گزینه هدف درمانی جهت بهبود عفونت‌های ناشی از پseudomonas آئروژینوزا بهره برد. میرصالحیان و همکاران (۱۱) در مطالعه‌ای در سال ۱۳۸۹ با بررسی روی ۱۷۰ ایزوله بالینی پseudomonas آئروژینوزای جدا شده از سوختگی، میزان مقاومت به ایمنی پنم را ۵۲٪، آمیکاسین را ۸۱٪ و تیکارسیلین را ۸۴٪ گزارش دادند. میزان بالای مقاومت در مطالعه میرصالحیان (۱۱) نشان دهنده شیوع بیشتر ژن‌های مقاومت در سویه‌های سوختگی نسبت به سایر نمونه‌های بالینی است. همچنین دکتر سروری و همکاران (۱۲) در مطالعه خود نشان دادند که بیشترین و کمترین میزان مقاومت نسبت به سفوتاکسیم (۴۳/۳٪) و آمیکاسین (۲۱/۶٪) بود. گلشنی و همکاران (۱۳) نیز میزان مقاومت سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین ۵۶٪، جنتامایسین ۵۹٪، توبرامایسین ۶۱٪، آمیکاسین ۶۵٪، ایمنی پنم ۵۵٪، سفپیم ۵۵٪، سفزازیدیم ۵۷٪، سفتریاکسون ۶۰٪، سفوتاکسیم ۶۲٪، اگزاسیلین ۱۰۰٪ و پپیراسیلین ۴۸٪ گزارش نمودند. اختلاف در

آزترونام و ایمو پنم مقاومت بالاتری داشته است. در مطالعه پیش رو نیز میزان مقاومت به ایمو پنم، مروپنم، سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم، لووفلوکساسین، کوتریموکسازول، سفتازیدیم، آزترونام، کاربنی سیلین، پیراسیلین/تازوباکتام در سویه‌های حامل اینتگرون به مراتب بیشتر از سویه‌های فاقد اینتگرون است.

نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آمار قابل توجه در ایزوله‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* I حضور اینتگرون کلاس جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های مورد بررسی است. با توجه به رشد بسیار سریع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و به دلیل استفاده بی‌رویه از این داروها به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه نیاز به ارزیابی الگوی مقاومت ارگانسیم‌های بیماری‌زا و به‌ویژه گونه‌های مرتبط با عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان و شناسایی ارگانسیم‌های دارای مقاومت چند دارویی است. مشخص شدن این الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی ویژه هر ناحیه جغرافیایی می‌تواند در جهت برنامه‌ریزی پروتکل درمانی به‌منظور جلوگیری از ظهور و گسترش ارگانسیم‌های مقاوم به چند دارو مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از همکاری آزمایشگاه میکروپزشناسی بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص) و آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

اکرم (ص) باشد. تنها ۱۰ جدایه (۱۶٪/۶) دارای اینتگرون کلاس ۳ بودند و حضور هم‌زمان اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۳ در ۱۰ جدایه (۱۶٪/۶) اثبات شد. تمامی نتایج حاصل از این پژوهش با مطالعه ممتاز و همکاران (۱۹) در سال ۲۰۱۵ در اهواز مغایرت دارد. در مطالعه این محققین از مجموع ۵۱ *پسودوموناس آئروژینوزا* فراوانی ژن‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ اینتگرون به ترتیب برابر ۹۲٪، ۵۲٪ و ۱۷٪ بود. کارگر و همکاران (۲۰) در سال ۲۰۱۴ در جهرم دریافتند که از مجموع ۱۶۴ سویه *شریشیا کلی* تعداد ۷۸٪/۳ دارای اینتگرون کلاس ۱ و ۷۶٪/۸ نیز دارای کلاس ۲ بودند. این محققین برای اولین بار در ایران اینتگرون کلاس ۳ را در سویه‌های *MDR/شریشیا کلی* گزارش نمودند و دریافتند که ۲۹٪/۱ از این سویه دارای اینتگرون کلاس ۳ بودند. علت مغایرت مطالعه کارگر با مطالعه فعلی می‌تواند در نتیجه اختلاف در نوع ایزوله (*شریشیا کلی* در مقایسه با *پسودوموناس آئروژینوزا*) باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان مقاومت در سویه‌های دارای کلاس‌های مختلف اینتگرون به مراتب بالاتر از سویه‌های فاقد اینتگرون است که این نتایج با یافته‌های سایر محققین همخوانی دارد. در مطالعه نیکوکار و همکاران (۱۵) ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون کلاس I و مقاومت به داروهای بتالاکتام از جمله سفتازیدیم و پیراسیلین نشان داده شد. همچنین در مطالعه‌ای که توسط GU و همکاران (۲۱) در سال ۲۰۰۷ انجام شد با بررسی بیشتر الگوی مقاومت دارویی در دو گروه حاوی و فاقد اینتگرون کلاس I مشخص گردید اختلاف معنی‌داری بین حضور اینتگرون و بروز مقاومت دارویی، به‌ویژه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام وجود دارد، به‌طوری‌که ایزوله دارای اینتگرون به‌طور معنی‌داری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پیراسیلین، پیراسیلین - تازوباکتام، سفتازیدیم، سفپیم،

References

1. Qiu D, Eisinger VM, Rowen DW, Yu HD. Regulated proteolysis controls mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(19): 8107-8112.
2. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*. 2000; 2(9):1051-60.
3. Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C. *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients. *Intensive Care Medicine*. 2007; 33(7):1155-61.
4. Deng Y, Bao X, Ji L, Chen L, Liu J, Miao J, et al. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2015; 14(1):45.

5. Hussein AI, Ahmed AM, Sato M, Shimamoto T. Characterization of integrons and antimicrobial resistance genes in clinical isolates of Gram-negative bacteria from Palestinian hospitals. *Microbiology and immunology*. 2009; 53(11):595-602.
6. Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, Gobius KS. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004; 48(3):838-42.
7. Schmitz F-J, Hafner D, Geisel R, Follmann P, Kirschke C, Verhoef J, et al. Increased Prevalence of Class I Integrons in *Escherichia coli*, *Klebsiella* Species, and *Enterobacter* Species Isolates over a 7-Year Period in a German University Hospital. *Journal of clinical microbiology*. 2001; 39(10):3724-6.
8. Rajabnia R, Asgharpour F, Shahandashti EF, Khalilian M, Norkhomami S, Moulana Z. Class 1 integron in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different places and devices of ICU in Babol, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2013; 6(2).
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S25. 2015; 35(3): 44-50.
10. Najar Peerayeh S, Karmostaji A. Molecular Identification of Resistance Determinants, Integrons and Genetic Relatedness of Extensively Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated From Hospitals in Tehran, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2015; 8(7): e27021.
11. Mirsalehian A, Nakhjavani F, Bahador A, Jabal ameli F, Bigverdi R, Goli H. Prevalence of MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Tehran University Medical Journal*. 2011; 68(10): 563-569.
12. Hemmati F, Sourouri Zanjani R, Haghi F, Zeighami H. Determination of Antibiotic Resistance Profile and Frequency of Metallo- β -Lactamases in *Pseudomonas Aeruginosa* isolates. *Journal of Zanjan University of Medical Sciences*. 2014; 22(93): 75-85.
13. Golshani Z, Ahadi AM, Sharifzadeh A. Identification and determination of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients admitted to Isfahan hospitals with multiple resistance. *Veterinary laboratory research/medical journal*. 2012; 4(1):119-127. [In Persian]
14. Peymani A, Naserpour Farivar T, Rahimi H, Ranjbar M, Najafipour R. Frequency of class I integron among multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the selected hospitals in Qazvin and Tehran, Iran. *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2014; 8(3):61-69. [in Persian].
15. Nikokar I, Tishayar A, Flakiyan Z, Alijani K, Rehana-Banisaeed S, Hossinpour M, et al. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from burn patients in Guilan, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 2013; 5(1):36-41.
16. Xu Z, Li L, Shirliff ME, Alam MJ, Yamasaki S, Shi L. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in southern China. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; 47(1):230-4.
17. Poonsuk K, Tribuddharat C, Chuanchuen R. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical samples. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2012; 43(2):376-84.
18. Chen J, Su Z, Liu Y, Wang S, Dai X, Li Y, et al. Identification and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang, China. *International Journal of Infectious Diseases*. 2009; 13(6):717-21.
19. Hosseini Pour P, Momtaz H, Serajyan AA, Tajbakhsh E. Investigating Class I, II and III Integrons in Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Hospital Infections in Ahvaz. *International Journal of Medical Laboratory*. 2015; 2(3): 168-176.
20. Kargar M, Mohammadalipour Z, Doosti A, Lorzadeh S, Japoni-Nejad A. High Prevalence of Class 1 to 3 Integrons Among Multidrug-Resistant Diarrheagenic *Escherichia coli* in Southwest of Iran. *Osong Public Health Res Perspect*. 2014; 5(4): 193-198.
21. Gu B, Tong M, Zhao W, Liu G, Ning M, Pan S, et al. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; 45(1):241-3.



Original Article

Molecular Analysis of Various Classes of Integrons in the Clinical *Pseudomonas Aeruginosa* Strains by Multiplex-PCR

Rashidi A, Moradli Gh*

Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

Received: 07 Aug 2016

Accepted: 28 Jan 2017

Abstract

Background & Objective: The presence of classes I, II and III Integrons in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains, has created new concerns in clinics. This study aimed to investigate the prevalence of class I, II and III Integron in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates.

Materials & Methods: In the cross-sectional study, 60 isolates of *P. aeruginosa* were obtained from the microbial-Laboratory of Rasool Akram Hospital in Tehran. Antibiotic susceptibility test was performed by the agar diffusion method based on CLSI guidelines on the Mueller Hinton agar medium. The genomic DNA was extracted using DNA extraction kit and M-PCR was performed for amplification of *intI*, *intII* and *intIII* genes.

Results: The highest resistance rate was in the strains that harbored integron, so that 96.6% of strains were resistant to amoxicillin. The results showed that all 60 strains had resistance (100%) to amikacin. The highest frequency was related to *intI* (40%) and the lowest frequency was related to *intIII* genes (16.6%).

Conclusion: Considering the high prevalence of class I Integron in all *Pseudomonas aeruginosa*-resistant isolates and its relation with different drug resistance patterns, the right solution to infection control and treatment in hospitals is essential to prevent further spread of it.

Keywords: Class I, II, III Integron genes, *Pseudomonas aeruginosa*, Multiplex-PCR

*Corresponding author: Gholamali Moradli, Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
E.mail: moradli.mic@gmail.com