Original Paper

Antimicrobial resistance and prevalence of Metallo-β-lactamase genes *IMP*-1, *VIM*-1 and class 1 integron in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Fatemeh Namvar (B.Sc), M.Sc Student in Genetic, Department of Biology, Arsanjan Branch, Islamic Azad University, Arsanjan, Iran.
ORCID ID: 0000-0002-9160-2159

***Marjan Shaheli (Ph.D)**, **Corresponding Author**, Assistant Professor, Department of Biology, Arsanjan Branch, Islamic Azad University, Arsanjan, Iran. **E-mail: shaheli87@yahoo.com**
ORCID ID: 0000-0003-2177-9642

Abbasali Rezaeian (Ph.D), Assistant Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
ORCID ID: 0000-0003-3284-4788

Abstract

Background and Objective: The ever-increasing resistance to beta-lactame antibiotic in opportunistic *Pseudomonas aeruginosa* bacteria considered as one of the important factors of death of hospital-acquired infections. This study was performed for determine the antibiotic resistance and prevalence of *IMP*-1 and *VIM*-1 metallo-beta-lactamase and integron class I genes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods: In this descriptive-analytical study, 200 *Pseudomonas spp.* isolates from blood, urine, ulcer, eye and sputum infections were collected from Arsanjan hospital in Fars province in south –west of Iran during April-September 2016. After confirmation genus of bacterial by biochemical and 16S rRNA tests, and isolation of *Pseudomonas aeruginosa* by specific primer of *lasI* Gene, antibiotic susceptibility was done according to diffusion disk assay and CLSI procedure, the presence of bla*VIM*, bla*IMP* and *Int-1* genes were determined by PCR.

Results: The results of phenotypic and genotypic tests led to the isolation of 107 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* that the highest resistance with (79.38%) for cefepime and the lowest resistance with (13.08%) for tobramycin. Out of 107 isolates, 10 (9.35%) isolates were carrying class1 Integron,19 (17/76%) isolates carrying *IMP* gene, 23 (21.5%) isolates carrying *VIM* gene, 4 (3.74%) isolates carrying *IMP* gene and integron class1, 11 (10.28%) isolates carrying *VIM* gene, and class1 intgron, 15 (14.02%) isolates carrying both *IMP*, *VIM* and 12 (11.22%) isolates simultaneously were carrying each three genes, *VIM*, *IMP* and class1 integron. 13 (12.15%) isolates did not have none of these three genes, *VIM*, *IMP*, class1 integron.

Conclusion: The results showed increased multidrug resistance and simultaneous presence of one or two *IMP*, *VIM* and Int-1 genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains. Int-1 has the ability to transduce resistance genes and create resistant populations.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Metallo-beta-lactamase, Class1 integron, *IMP* gene, *VIM* gene

Received 3 Oct 2018 **Revised** 21 Jan 2019 **Accepted** 19 May 2019

Cite this article as: Fatemeh Namvar, Marjan Shaheli, Abasali Rezaeian. [Antimicrobial resistance and prevalence of Metallo-β-lactamase genes *IMP*-1, *VIM*-1 and class 1 integron in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*]. J Gorgan Univ Med Sci. 2020 Winter; 21(4): 86-92. [Article in Persian]

تحقیقی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شیوع ژن‌های متالوبتالاکتامازهای *IMP*-1 ، *VIM*-1 و اینتگرون کلاس یک در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*

فاطمه نامور، دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک، گروه زیست شناسی، واحد ارسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ارسنجان، ایران. ORCID ID: 0000-0002-9160-2159
*** دکتر مرجان شاه ایلی**، استادیار، گروه زیست شناسی، واحد ارسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ارسنجان، ایران. ORCID ID: 0000-0003-2177-9642
دکتر عباسعلی رضائیان، استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. ORCID ID: 0000-0003-3284-4788

چکیده

زمینه و هدف: *روند رو به افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، در باکتری فرصت طلب سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل مهم مرگ و میر ناشی از عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و شیوع ژن های متالوبتالاکتامازهای IMP-1 ، VIM-1 و اینتگرون کلاس یک در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا انجام شد.*

روش بررسی: *این مطالعه توصیفی تحلیلی روی ۲۰۰ جدایه مشکوک به جنس سودوموناس از عفونت های خون، ادرار، زخم، چشم و خلط در بیمارستان ارسنجان در استان فارس طی فروردین لغایت شهریور سال ۱۳۹۵ انجام شد. پس از تایید جنس باکتری با تست های بیوشیمیایی و روش مولکولی 16S rRNA و جداسازی گونه سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن las I ، حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن طبق معیار CLSI تعیین گردید. حضور ژن‌های VIM ،IMP (Imipenem) (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase) و Int-1 (اینتگرون کلاس ۱) توسط روش PCR بررسی گردید.*

یافته‌ها: *نتایج تست‌های فنوتیپی و ژنوتیپی منجر به جداسازی ۱۰۷ جدایه سودوموناس آئروژینوزا گردید. جمعیت مورد مطالعه بیشترین مقاومت را با ۷۹/۳۸ درصد به سفپیم و کمترین مقاومت را با ۱۳/۰۸ درصد به توبرامایسین نشان دادند. ۱۰جدایه (۹/۳۵ درصد) حامل Int-1، ۱۹ جدایه (۱۷/۷٦ درصد) حامل ژن IMP، ۲۳جدایه (۲۱/۵ درصد) حامل ژن VIM، ٤ جدایه (۳/۷٤ درصد) حامل ژن IMP و Int-1، ۱۱ جدایه (۱۰/۲۸ درصد) حامل ژن VIM و Int-1، ۱۵ جدایه (۱٤/۰۲ درصد) حامل هر دو ژنIMP و VIM، ۱۲ جدایه (۱۱/۲۲ درصد) به‌طور همزمان حامل هر سه ژن بودند. ۱۳ جدایه (۱۲/۱۵ درصد) نیز هیچ یک از ژن‌های را نداشتند.*

نتیجه‌گیری: *نتایج نشان دهنده افزایش مقاومت دارویی چندگانه و وجود همزمان یک یا دو ژن IMP ، VIM و Int-1 در سویه های سودوموناس آئروژینوزا است. Int-1 قدرت جابجایی ژن‌های مقاومت‌زا را داشته و باعث ایجاد جمعیت‌های مقاوم می‌شود.*

کلید واژه‌ها: *سودوموناس آئروژینوزا ، متالوبتالاکتاماز ، اینتگرون کلاس ۱ ، ژن IMP ، ژن VIM*

* نویسنده مسؤول : دکتر مرجان شاه ایلی ، پست الکترونیکی shaheli87@yahoo.com
نشانی : استان فارس، شهرستان ارسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، تلفن ۰۷۱-۴۳۵۲۳۹۰۹، نمابر ۴۳۵۲۲۴۸۳
وصول مقاله: ۱۳۹۷/۷/۱۱ ، اصلاح نهایی: ۱۳۹۷/۱۱/۱ ، پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۲/۲۹

مقدمه

باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) باسیل گرم منفی هوازی و متحرک ازخانواده سودوموناداسه‌ها است که به سبب ایجاد عفونت‌های فرصت طلب به‌ویژه در بیماران سوختگی و بیماران بخش مراقبت‌های ویژه، عفونت‌های ادراری، باکتریمی ها، بیماری سیستیک فیبروزیس از اهمیت زیادی برخوردار است. مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها درمان این عفونت‌ها را مشکل کرده است (۱و۲). مقاومت کروموزومی *سودوموناس آئروژینوزا* در نتیجه جهش های خود به خودی در ژن‌های کنترلی باکتری ایجاد می شود. مقاومت خارج کروموزومی با تبادل ژن ها بین جدایه های باکتریایی از طریق جابجایی قطعات DNA کسب می‌شود (۳). Hall و Coli دو دانشمندی بودند که در سال ۱۹۹۵ به وجود عناصری به نام اینتگرون که تبادل ژن‌های مقاومتی را انجام می‌دهند؛ پی بردند (۴). اینتگرون ها عناصر متحرکی هستند که ژن های مقاومتی در ساختار آنها بر روی یک یا چندین کاست ژنی قرار می گیرند. این عناصر قادرند در جریان نوترکیبی با اتصال به مجموعه های اینتگرونی باعث انتقال ژن های اینتگرونی شوند. کسب این نوع مقاومت‌های ژنتیکی از طریق مکانیسم‌هایی از جمله تولید آنزیم‌های تخریب کننده داروها، منجر به تخریب داروهای فعال و مقاومت میکروارگانیسم در برابر داروهای ضد میکروبی می شود (۵). از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است. این آنزیم ها با اتصالات کوالانسی و هیدرولیز پیوندهای آمیدی حلقه‌های بتالاکتام، آنتی‌بیوتیک‌ها را تجزیه وغیرفعال می کنند (۶). طبق طبقه‌بندی آمبلر، کلاس B بتالاکتامازها،

متالوبتالاکتامازهای نیازمند به روی (Zn^{+2}) هستند و در جنس‌های *سراشیا* و *سودوموناس* گزارش شده‌اند. متالوبتالاکتامازهای زیرکلاس B1 شامل آنزیم‌های (Imipenem) *IMP*، *VIM* (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase) و SIM است. آل‌های مقاومتی این آنزیم‌ها روی Int-1 (اینتگرون کلاس ۱) قرار دارند و بر دامنه وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سفالوسپورین‌های وسیع الطیف، پنی‌سیلین‌ها، کاربا‌پنم‌ها اثر می‌گذارند (۹-۷). ژن *IMP* در سال ۱۹۸۸در سویه‌های *سودوموناس* شناسایی شد (۱۰). وجود ژن *VIM* اولین بار در سال ۱۹۹۷ در ایتالیا از جدایه‌های *سودوموناس* گزارش گردید (۱۱).

برای تشخیص سویه‌های *سودوموناس* مولد ژن‌های متالوبتالاکتاماز (MBL)، PCR به عنوان یک روش حساس و سریع توصیه می‌شود (۲). استفاده از نشانگرهای اولیگونوکلئوتیدی ویژه ژن ۱۶S rRNA بهترین انتخاب برای شناسایی باکتری‌ها بر اساس ویژگی‌های فیلوژنتیکی است (۱۲). این ژن‌ها دارای توالی بازهای آلی بسیار محافظت شده‌ای هستند که برای زنده ماندن موجودات الزامی است (۱۳). افزایش شیوع باکتری‌های مولد بتالاکتاماز به‌دلیل انتقال این ژن‌ها توسط اینتگرون‌های کلاس ۱ به سایر باکتری‌ها از دلایل ناموفق بودن درمان با آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و اپیدمی عفونت‌های بیمارستانی و مرگ و میر ناشی از این عفونت‌ها است (۶و۱۱و۱۴). این مطالعه به منظور تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و شیوع ژن‌های متالوبتالاکتامازهای *IMP*-1، *VIM*-1 و اینتگرون کلاس یک در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی تحلیلی روی ۲۰۰ جدایه مشکوک به جنس *سودوموناس* از عفونت‌های خون، ادرار، زخم، چشم و خلط در بیمارستان ارسنجان در استان فارس طی فروردین لغایت شهریور سال ۱۳۹۵ انجام شد. نمونه‌ها با رضایت افراد شرکت کننده در مطالعه وارد گردید.

شناسایی فنوتیپی: ابتدا نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت آگار خوندار، *سودوموناس* P و *سودوموناس* F (ساخت شرکت مرک آلمان) کشت داده شدند. محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. کلنی‌هایی که مشخصاتی همچون بوی شبیه انگور، رنگدانه‌های سبز و یا آبی و ظاهری شیشه‌ای داشتند؛ انتخاب و از آنها کشت خالص تهیه شد. سپس از تست‌های فنوتیپی اکسیداز، OF، رشد در محیط های کشت TSI، تست سیترات، اوره‌آز، SIM (اندول، H_2S و تحرک) ساخت شرکت مرک آلمان و رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد برای شناسایی جنس *سودوموناس* استفاده شد (۶).

استخراج DNA با استفاده از جوشاندن: دراین مرحله پس از قرار دادن ۲ الی ۳ کلنی از باکتری در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و ورتکس (Labnet فرانسه) میکروتیوپ ها، نمونه‌ها در آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Hettich آلمان) شدند. محلول رویی رسوب که حاوی DNA باکتری بود؛ جداسازی و غلظت DNA با دستگاه نانودراپ (Thermofisher آمریکا) اندازه‌گیری شد. میکروتیوب‌ها برای آزمایشات بعدی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲).

تایید جنس *سودوموناس* با استفاده از ۱۶S rRNA: برای شناسایی مولکولی جنس *سودوموناس* از آزمون PCR (Eppendorf آلمان) و پرایمر اختصاصی ۱۶S rRNA و از پرایمر اختصاصی ژن lasI برای جداسازی گونه *سودوموناس آئروژینوزا* ساخت شرکت کروموژن کره جنوبی از سایر گونه‌ها، طبق برنامه دمایی جدول یک استفاده

جدول ۱ : برنامه دمایی پرایمرهای مورد استفاده

	S rRNA-F ۱۶ S rRNA-R ۱۶	lasI-F lasI-R	int1-F int1-R	blaVIM-1-F blaVIM-1-R	blaIMP-1-F blaIMP-1-R
primer	5′ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT3 5′TATTACCGCGGCTGCTGGC3′	ATGATCGTACAAATTGGTCGG GTCATGAAACCGCCAGTC	CAGTGGACATAAGCCTGTTC CCCGAGGCATAGACTGTA	TATGGAGCAGCAACGATGT AAAAGTCCCGCTCCAACGA	CTACCGCAGCAGAGTCTTTG ACCAGTTTTGCCTTACCAT
Primary Denaturation	۹۴ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه	۹۵ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه	۹۴ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه	۹۴ درجه سانتی گراد ۳ دقیقه	۹۵ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه
Denaturation	۹۴ درجه سانتی گراد ۴۵ ثانیه	۹۵ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه	۹۴ درجه سانتی گراد یک دقیقه	۹۴ درجه سانتی گراد یک دقیقه	۹۵ درجه سانتی گراد یک دقیقه
Annealing	۵۷/۵ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه	۵۸ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه	۶۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه	۵۵ درجه سانتی گراد یک دقیقه	۵۴ درجه سانتی گراد ۴۰ ثانیه
Extension	۷۲ درجه سانتی گراد یک دقیقه	۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی گراد یک دقیقه	۷۲ درجه سانتی گراد ۲ دقیقه	۷۲ درجه سانتی گراد یک دقیقه
Final Extension	۷۲ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه	۷۲ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه	۷۲ درجه سانتی گراد ۱۰ دقیقه	۷۲ درجه سانتی گراد ۷ دقیقه	۷۲ درجه سانتی گراد ۱۰ دقیقه
Product Length	۱۹۸	۶۰۷	۱۶۰	۹۲۰	۵۸۷
Cycle	۳۰	۳۰	۳۰	۳۵	۳۰
Reference	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹

شد. لازم به ذکر است که در تمام مراحل آزمایش سویه استاندارد *سودوموناس* ATCC۳۷۸۵۳ استفاده گردید.

بررسی فراوانی اینتگرون‌های کلاس ۱ و ژن‌های مقاومت متالوبتالاکتامازی کلاس B: پس از تأیید گونه *سودوموناس آئروژینوزا* به روش فنوتیپی و ژنوتیپی، حضور ژن‌های bla*VIM*-1 ، bla*IMP*-1 و اینتگرون کلاس ۱ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تهیه شده از شرکت کروموژن کره جنوبی و برنامه دمایی جدول یک بررسی شدند.

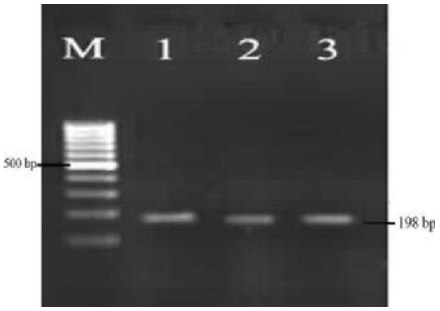
آزمون PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با ترکیب ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر، ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس تهیه شده از شرکت آمپلیکون کشور دانمارک، ۲ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای پیش روو پیرواز شرکت کروموژن کره جنوبی با غلظت ۱۰ پیکومول و ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده انجام شد. پس از انجام PCR محصول به دست آمده بر روی ژل یک درصد و با ولتاژ ۹۵ به مدت ۵۰ دقیقه الکتروفورز گردید و سپس باندهای تشکیل شده با استفاده از دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفتند (۲).

بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن: برای *سودوموناس*‌هایی که با استفاده از پرایمر اختصاصی 16S rRNA مورد تایید قرار گرفتند؛ به روش دیسک دیفیوژن (کربی- بائر) تست آنتی‌بیوگرام گذاشته شد (۶). الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی براساس دستوالعمل CLSI و با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی پیپراسیلین (۱۰۰µg)، اگزاسیلین (۱۰ µg)، تیکارسیلین (۷۵ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، سفپیم (۳۰ µg)، آزترونام (۳۰ µg)، ایمی‌پنم (۱۰ µg)، مروپنم (۱۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، توبرامایسین (۱۰ µg) و سیپروفلوکساسین (۵µg) تهیه شده از شرکت پادتن طب (تهران- ایران) انجام شد. سپس الگوی مقاومت MDR (Multidrug resistance) مورد بررسی قرار گرفت (۱۵و۱۶). سویه‌هایی که به بیش از ۳ کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاومت نشان دهند؛ شامل سویه‌های MDR محسوب می‌شوند (۱۷). این دسته از سویه‌ها به‌دلیل این که دارای تنوعی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی هستند؛ نسبت به سایر سویه‌ها خطرناک‌ترند. در این پژوهش از ۱۲ آنتی‌بیوتیک در قالب ۶ کلاس آنتی‌بیوتیکی استفاده شد.

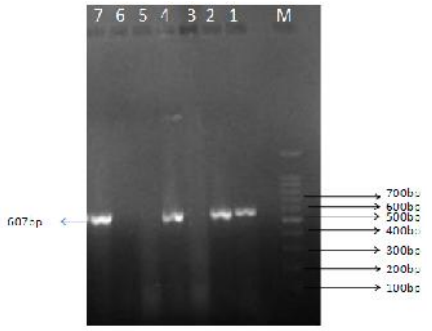
آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-18 و آزمون کای‌اسکوئر و One sample T test در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

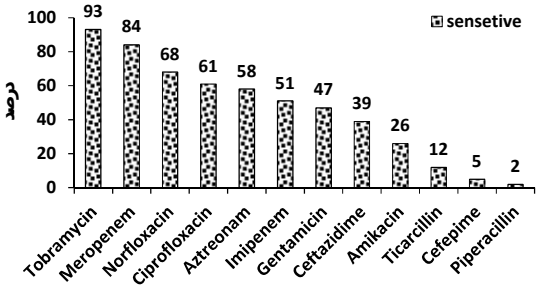
از تعداد ۲۰۰ نمونه مورد مطالعه، تعداد ۱۶۵ نمونه جنس *سودوموناس* جداسازی گردید (شکل یک). نتایج حاصل از ژن lasI نشان داد که از ۱۶۵جدایه *سودوموناس*، ۱۰۷مورد متعلق به گونه آئروژینوزا بوده است (شکل ۲).



شکل ۱ : نتیجه انجام PCR برای شناسایی حضور ژن 16S rRNA روی ژل آگارز یک درصد
M: مارکر، ۲-۱ : نمونه‌های مثبت ، ۳ : کنترل مثبت



شکل ۲ : نتیجه انجام PCR برای شناسایی حضور ژن lasI روی ژل آگارز یک درصد
M: مارکر، ۱: کنترل مثبت، ۲، ٤، ۷ : نمونه‌های مثبت



نمودار ۱ : حساسیت به آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه

با توجه به نمودار یک، نتایج تست آنتی‌بیوگرام نشان داد که در جمعیت *سودوموناس آئروژینوزا*های مورد مطالعه، بیشترین حساسیت نسبت به توبرامایسین در ۹۳ جدایه (۸۶/۹۲ درصد) و مروپنم در ۸۴ جدایه (۷۸/۵ درصد) و کمترین حساسیت مربوط به پیپراسیلین در ۲جدایه (۱/۹ درصد) بوده است.

با توجه به جدول ۲، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم و پیپراسیلین در جمعیت مورد مطالعه رابطه آماری معنی داری را از خود نشان دادند (P<۰/۰۵).

بین برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها روابط آماری معنی‌دار از لحاظ همزمانی بروز مقاومت در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد. به‌عنوان مثال بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی پیپراسیلین با آنتی‌بیوتیک‌هایی همچون تیکارسیلین، سفپیم و آمیکاسین رابطه همزمانی در جامعه میکروبی مورد مطالعه دیده شد. پس از آنالیز سویه های مقاوم مشخص گردید که صرفاً ۴/۶۷ درصد جدایه های *سودوموناس* جز گروه MDR نبودند.

جدول ۲ : معنی‌دار بودن مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا

	آنتی بیوتیک	p-value
کلاس ۱	Piperacllin	۰/۰۰۱ *
	Ticarcillin	۰/۰۶۹
کلاس ۲	Ceftazidime	۰/۸۰۱
	Cefepime	۰/۰۰۱ *
کلاس ۳	Imipenem	۰/۱۶٤
	Meropenem	۰/۲۳۳
کلاس ٤	Amikacin	۰/۲۰۳
	Gentamicin	۰/۵۰۱
	Tobramycin	۰/۱۱۲
کلاس ۵	Ciprofloxacin	۰/۶۲۱
	Norfloxacin	۰/۱۰۸
کلاس ٦	Aztreonam	۰/٤۳٤

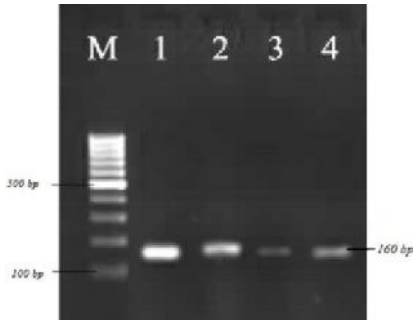
P< ۰/۰۵ *

نتایج بررسی فراوانی ژن اینتگرون کلاس۱ نشان داد که از ۱۰۷ جدایه *سودوموناس* فقط ۳۷جدایه (۳۴/۵۸ درصد) حامل این ژن بوده‌اند (شکل ۳). همچنین نتایج بررسی فراوانی ژن‌های *IMP* و *VIM* نشان داد که به ترتیب ۵۴ جدایه (۵۰/۴۷ درصد)و ۵۷ جدایه (۵۳/۲۷ درصد) حامل ژن‌های یاد شده بوده‌اند (شکل‌های ۴و۵).

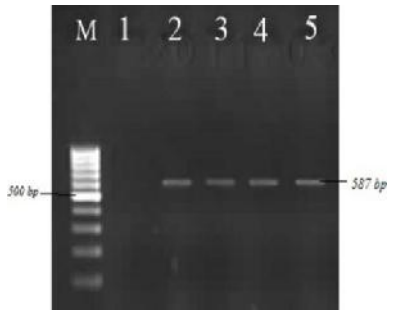
۴ جدایه (۳/۷۴ درصد) حامل ژن *IMP* و *Int-1*، ۱۱ جدایه (۱۰/۲۸ درصد) حامل ژن *VIM* و *Int-1*، ۱۵ جدایه (۱۴/۰۲ درصد) حامل هر دو ژن *IMP* و *VIM*، ۱۲ جدایه (۱۱/۲۲ درصد) به‌طور همزمان حامل هر دو ژن *IMP* و *VIM* و *Int-1* بودند. ۱۳ جدایه (۱۲/۱۵ درصد) حامل هیچیک از ژن‌های *VIM*، *IMP* و *Int-1* نبودند.

بررسی نتایج حضور همزمان ژن‌های مقاومتی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده نشان داد که بین مقاومت به سفتازیدیم و حضور همزمان ژن*Int-1* به تنهایی و سه ژن *Int-1/IMP/VIM*، سفپیم و حضور همزمان ژن *VIM* به تنهایی و سه ژن *Int-1/IMP/VIM* و همچنین تیکارسیلین و حضور همزمان دو ژن *VIM* /*Int-1* روابط معنی‌داری شکل گرفته است (P<۰/۰۵).

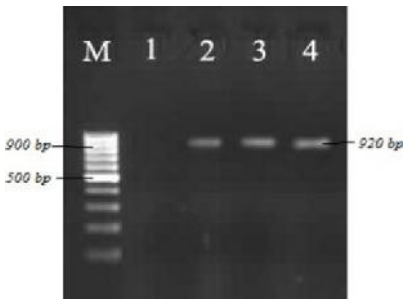
علی‌رغم حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، برخی از سویه‌ها واجد ژن‌های مربوطه بودند. به‌طوری که یک جدایه به تیکارسیلین، ۲ جدایه به پیپراسیلین، ۵جدایه به سفپیم و ۳۹ جدایه به سفتازیدیم حساس بودند. با این وجود ژن مقاومت زا را درون خود داشتند.



شکل ۳ : نتیجه انجام PCR برای شناسایی حضور ژن Int-1 روی ژل آگارز یک درصد
M: مارکر، ۳-۱ : نمونه‌های مثبت ، ۳ : کنترل مثبت



شکل ٤ : نتیجه انجام PCR برای شناسایی حضور ژن IMP-1 روی ژل آگارز یک درصد
M: مارکر، ۱ : نمونه منفی، ٤-۲ : نمونه مثبت، ۵ : کنترل مثبت



شکل ۵ : نتیجه انجام PCR برای شناسایی حضور ژن VIM-1 روی ژل آگارز یک درصد
M: مارکر، ۱ : نمونه منفی، ۳-۲ : نمونه مثبت، ٤ : کنترل مثبت

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که به‌دلیل مقاومت بالا نسبت پیپراسیلین و سفپیم این دو دارو نمی‌توانند به عنوان داروی ضدسودوموناس *آئروژینوزا* مطرح شوند. همچنین تاثیر سفتازیدیم، آمیکاسین و تیکارسیلین روی *سودوموناس آئروژینوزا* کاهش یافته و در آینده‌ای نزدیک از لیست داروهای ضد *سودوموناس آئروژینوزا* حذف خواهند شد. میزان مقاومت به توبرامایسین و مروپنم در مقایسه با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها کمتر بوده و می‌توان امید داشت که این دو دارو در درمان عفونت های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* موثر باشند.

مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها یکی ازعوامل شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در دنیا است. طولانی شدن مدت درمان بیماران بستری و افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام وسیع الطیف، انتشار باکتری‌های مولد MBL را در پی خواهد داشت. دشواری درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌های حامل متالوبتالاکتامازها به دلیل ایجاد مقاومت چندگانه دارویی، منجر به افزایش مرگ و میر می‌گردد. آنزیم‌های بتالاکتامازی که بیشتر در باکتری‌های اسینتوباکتر و *سودوموناس* دیده می‌شوند؛ می‌توانند تمام آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام را هیدرولیز کنند. از دیگر علل نگرانی‌ها، قرار گیری ژن‌های متالوبتالاکتامازی روی عناصر قابل انتقال ژنتیکی مانند اینتگرون‌ها است که زمینه انتقال ژن این آنزیم‌ها به باکتری‌هایی مانند *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا* را فراهم می‌کند (۱۱).

در مطالعات انجام شده توسط کهن تاب و همکاران (۱۸)، نیکوکار و همکاران (۱۹) و فاضلی و همکاران (۲۰) میزان MDR نسبت به سویه های مورد مطالعه به ترتیب ۱۹/۷ درصد، ۲۶/۷ درصد و ۷۷/۲ درصد گزارش شده است. در مطالعه حاضر فقط ۴/۶۷ درصد از ۱۰۷ ایزوله *سودوموناس آئروژینوز* جز گروه MDR محاسبه نشدند که این موضوع دلالت بر تنوع مقاومت به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی دارد و گویای آن است که عفونت‌های حاصل از هر سویه‌ای می‌تواند فرآیند درمانی متفاوتی را طی کند. در نتیجه در عفونت‌های مشابه ممکن است تجویز دارو برای یک عفونت موثر و برای عفونت دیگر کارایی نداشته باشد.

Martínez و همکاران در سال ۲۰۱۲ برای اولین بار فراوانی ژن بتالاکتاماز *IMP* را در ۲۷۲ جدایه بررسی و میزان آن را ۴/۴ درصد اعلام کردند (۲۱). پیمانی و همکاران در سال ۲۰۱۴ فراوانی سویه‌های مولد *Int-1* را در قزوین و تهران ۵۸درصد (۵)، Toval و همکاران در سال ۲۰۱۵ میزان فراوانی *Int-1* را در کاستاریکا ۷۰درصد (۲۲) و آقامیری و همکاران در سال ۲۰۱۴ فراوانی ژن *VIM* را ۳۳ درصد گزارش نموده‌اند (۲۳). در مطالعه پیمانی و همکاران در سال ۲۰۱۵ ، ۵/۳۵درصد سویه‌ها به‌صورت همزمان حامل ژن‌های *IMP* و *VIM* بودند (۱۰). کرامتی و همکاران در سال ۲۰۱۴، فراوانی سویه‌هایی که حامل ژن *VIM* و *Int-1* بودند را ۱۷درصد گزارش کردند (۲۴). در این پژوهش مشاهده گردید ۳۷ جدایه (۳۴/۵۸ درصد) دارای ژن *Int-1*، ۵۷ جدایه (۵۳/۲۷درصد) دارای ژن *VIM*-1 و ۵۴ جدایه (۵۰/۴۷ درصد) واجد ژن *IMP*-1 بودند. همچنین همانگونه که در قسمت نتایج اشاره گردید، علاوه بر حضور انفرادی هر ژن در سویه‌های مورد مطالعه، بعضاً آنها را به صورت جفتی و یا هرسه را با هم نیز می‌توان دیدکه با نتایج سایر محققین تشابه داشته است (۱۰و۲۴) و همچنین در بعضی از موارد بین مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و حضور همزمان ژن‌های مقاومتی رابطه معنی‌داری شکل گرفته است.

در مطالعه Ohara و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ژاپن، ۴ سویه به روش فنوتیپی منفی و به روش PCR مثبت گزارش شدند (۲۵). در مطالعه ای که توسط شاه چراغی و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد؛ ۳ نمونه از ۱۵ نمونه، علی‌رغم تست فنوتیپی منفی، حاوی ژن *VIM* بودند (۱۴). لازم به ذکر است که بعضاً در روش دیسک دیفیوژن با مواردی برخورد می‌شود که باکتری به آنتی‌بیوتیک بتالاکتام حساس بوده است. در صورتی که همان باکتری به روش PCR ژن‌های بتالاکتاماز را داشته است. این موضوع می‌تواند به مواردی همچون کاهش بیان ژن در برخی سویه‌ها و یا خاموش بودن ژن ارتباط داشته باشد. از طرفی همین سویه‌ها می‌توانند مشکل‌ساز شوند. چون علی‌رغم حساسیت در آزمایشگاه، ممکن است در بدن فرد مریض بسته به شرایط محیطی، ژن‌های مذکور بیان شده و درمان را با مشکل روبرو نماید.

یافته های این پژوهش در مقایسه با سایر تحقیقات نشان داد که جمعیت مورد مطالعه درصد بالاتری از ژن های مقاومتی را درخود جای داده است و بیم آن می‌رود که درآینده ای بسیار نزدیک، کمتر آنتی‌بیوتیکی بتواند عفونت ناشی از این باکتری را خنثی نماید. مسأله زمانی پیچیده‌تر می شود که در مواردی باکتری، علی‌رغم داشتن ژن‌های مقاومتی به تست‌های آنتی بیوگرام حساسیت نشان می دهد. این موضوع گواه آن است که ژن ها در هرمحیطی و تحت هر تنشی بیان نمی شوند. در نتیجه درصورت تجویز دارویی که از طرف آزمایشگاه توصیه شده است؛، ممکن است دارو درمانی جواب ندهد و زندگی بیمار به دلیل عفونت شکل گرفته، در معرض خطر قرار گیرد. از این‌رو پیشنهاد می‌گردد که به صورت دوره‌ای فراوانی ژن‌های مقاومت‌زا مورد بررسی و با نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی مورد مقایسه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان دهنده افزایش مقاومت دارویی چندگانه و وجود همزمان یک یا دو ژن IMP ، VIM و Int-1 در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* است. Int-1 قدرت جابجایی ژن‌های مقاومت‌زا را داشته و باعث ایجاد جمعیت‌های مقاوم می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه (شماره ۱۶۰۳۰۵۰۳۹۴۲۰۱۵) خانم فاطمه نامور برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک از دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان بود. نویسندگان از مسؤولین محترم بیمارستان ارسنجان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان نهایت سپاس خود را اعلام می‌دارند.

References

1. Hemmati F, Soroori Zanjani R, Haghi F, Zeighami H. [Determination of Antibiotic Resistance Profile and Frequency of Metallo-Beta- Lactamases in Pseudomonas Aeruginosa Isolates]. J Adv Med Biomed Res. 2014; 22 (93) :77-85. [Article in Persian]

2. Doosti M, Ramazani A, Garshasbi M. Identification and Characterization of Metallo-β-Lactamases Producing Pseudomonas aeruginosa Clinical Isolates in University Hospital from Zanjan Province, Iran. Iranian Biomedical Journal. 2013; 17 (3): 129-33. doi: 10.6091/ibj.1107.2013

3. Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. BMJ. 1998 Sep; 317(7159): 657-60. doi: 10.1136/bmj.317.7159.657

4. Zeighami H, Haghi F, Hajiahmadi F. [Integrons and Their role in Antibiotic Resistance]. J Med Lab Diagn. 2014; 5(22): 61-71. [Article in Persian]

5. 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 Univ Med Sci J. 2014; 8(3): 61-69. [Article in Persian]

6. Deyhim B, Bessikhasteh M. [The pattern of antibiotic resistance and MBL production of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical samples from Dr. Ganjavian hospital in Dezful]. Zistfanavari Microbi, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University. 2012; 4(4): 21-28. [Article in Persian]

7. Kazeminezhad B, Bostanmanesh Rad A, Gharib A, Zahedifard S. blaVIM and blaIMP Genes Detection in Isolates of Carbapenem Resistant P. aeruginosa of Hospitalized Patients in Two Hospitals in Iran. Iran J Pathol. 2017; 12(4): 392-96.

8. Sacha P, Wieczorek P, Hauschild T, Zórawski M, Olszańska D, Tryniszewska E. Metallo-beta-lactamases of Pseudomonas aeruginosa--a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. Folia Histochem Cytobiol. 2008; 46(2): 137-42. doi: 10.2478/v10042-008-0020-9

9. Mendiratta DK, Deotale V, Narang P. Metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in a hospital from a rural area. Indian J Med Res. 2005 May; 121(5): 701-3.

10. Peymani A, Naserpour Farivar T, Mohammadi Ghanbarlou M, Najafipour R. Dissemination of Pseudomonas aeruginosa producing bla IMP-1 and bla VIM-1 in Qazvin and Alborz educational hospitals, Iran. Iran J Microbiol. 2015 Dec; 7(6): 302-309.

11. Walsh TR. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. 2005 Nov; 11(Suppl 6): 2-9. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01264.x

12. Ramasamy D, Mishra AK, Lagier JC, Padhmanabhan R, Rossi M, Sentausa E, et al. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. Int J Syst Evol Microbiol. 2014 Feb; 64(Pt 2): 384-91. doi: 10.1099/ijs.0.057091-0

13. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. J Clin Microbiol. 2007 Sep; 45(9): 2761-64. doi: 10.1128/JCM.01228-07

14. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Identification and genetic characterization ofmetallo-beta-lactamase-producing strains of Pseudomonas aeruginosa in Tehran, Iran. New Microbiologica. 2010 Jul; 33(3): 243-8.

15. Patel JB, Patel R, Weinstein MP. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third informational Supplement. M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013 Jan; vol 33. No 1.

16. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, 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 Mar; 18(3): 268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

17. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, 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 Mar; 18(3): 268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

18. Kohanteb J, Dayaghi M, Motazedian M, Ghayumi MA. Comparison of biotyping and antibiotyping of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients with burn wound infection and nosocomial pneumonia in Shiraz, Iran. Pak J Biol Sci. 2007 Jun; 10(11): 1817-22.

19. 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. Iran J Microbiol. 2013 Mar; 5(1): 36-41.

20. Fazeli H, Havaei S, Solgi H, Shokri D, Motallebirad T. Pattern of Antibiotic Resistance in PesudomonasAeruginosa Isolated from Intensive Care Unit, Isfahan, Iran. J Isfahan Med Sch. 2013 Jun; 31(232): 433-38.

21. Martínez T, Vazquez GJ, Aquino EE, Goering RV, Robledo IE. Two novel class I ntegrin arrays containing IMP-18 metallo-β-lactamase gene in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates from Puerto Rico. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(4): 2119-21. doi: 10.1128/AAC.05758-11

22. Toval F, Guzmán-Marte A, Madriz V, Somogyi T, Rodríguez C, García F. Predominance of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates carrying blaIMP and blaVIM metallo-β-lactamases in a major hospital in Costa Rica. J Med Microbiol. 2015 Jan; 64(Pt 1): 37-43. doi: 10.1099/jmm.0.081802-0

23. Aghamiri S, Amirmozafari N, Fallah Mehrabadi J, Fouladtan B, Samadi Kafil H. Antibiotic Resistance Pattern and Evaluation of Metallo-Beta Lactamase Genes Including bla- IMP and bla- VIM Types in Pseudomonas aeruginosa Isolated from Patients in Tehran Hospitals. ISRN Microbiol. 2014 Apr; 2014: 941507. doi: 10.1155/2014/941507

24. Keramati N, Zeighami H, Haghi F. [Frequency of Class I and II Integrons in Metalobetalactamase Producing Clinical Isolates of Pseudomonas Aeruginosa]. J Adv Med Biomed Res. 2014; 22(94): 111-19. [Article in Persian]

25. Ohara M, Kouda S, Onodera M, Fujiue Y, Sasaki M, Kohara T, et al. Molecular characterization of imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa in Hiroshima, Japan. Microbiol Immunol. 2007; 51(3): 271-77.