مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره چهارم (پیاپی ۲۹) زمستان ۱۳۹۵
صفحات ۳۰۶-۲۹۷

Original Article

بررسی شیوع ژن‌های *int1*، *sul1*، *aadA2* و *aadB* در سویه های *اسینتوباکتر بامانی* جدا شده از نمونه‌های بالینی در تهران

فرزانه حسینی[۱]، زهرا سلیمی زاده*[۲]، میترا صالحی[۱]

[۱]استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، [۲] کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

چکیده

سابقه و هدف: *اسینتوباکتر بامانی* یک کوکوباسیل گرم منفی می‌باشد که به طور فزاینده‌ای به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی گزارش می شود. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی اینتگرون کلاس ۱ و ژن های کد کننده آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزید ها تیپ های *aadA2* و *aadB* در میان سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۳۳ نمونه از *اسینتوباکتر بامانی* جدا شده از بیماران مراجعه کننده به دو بیمارستان بقیه الله الاعظم (عج) و شهید مدرس تهران انجام گردید. مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و مطابق با دستورالعمل CLSI تعیین شد. حضور ژن‌های *int-1*، *sul1*، *aadA2* و *aadB* در سویه‌های بالینی با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: فراوانی ژن‌های *intI1*، *sul1*، *aadA2* و *aadB* در سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* به ترتیب معادل ۵۱/۵، ۵۱/۵، ۲۴/۲ و ۳۶/۴ درصد گزارش شد. در این مطالعه تمامی سویه‌ها دارای مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی بودند و بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمپی‌سیلین، پنی‌سیلین، سفیکسیم، سفالوتین، سفتیزوکسیم، نالیدیکسیک‌اسید، کلیندامایسین، کلرامفنیکل، سولفومتاکسازول-تری‌متوپریم و استرپتومایسین (۱۰۰٪) وجود داشت. همچنین کمترین میزان مقاومت در آنتی بیوتیک های جنتامایسین (۶۶/۷ درصد) و تتراسایکلین (۶۹/۷ درصد) مشاهده گردید.

نتیجه گیری: ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون کلاس ۱ و مقاومت به یک آنتی بیوتیک وجود داشت. با این حال، این ارتباط در بسیاری از سویه‌ها که مقاومت به بقیه آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دادند قابل توجه نیست. این یافته حاکی از این است که علاوه بر اینتگرون‌ها، دیگر عوامل ایجاد کننده مقاومت مانند ترانسپوزون و پلاسمید نیز ممکن است در ایجاد مقاومت نقش داشته باشند.

واژگان کلیدی: *اسینتوباکتر بامانی*، اینتگرون کلاس ۱، مقاومت آنتی بیوتیکی.

دریافت مقاله: اسفند ماه ۹۴ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ماه ۹۵

مقدمه

اسینتوباکترها (*Acinetobacter*) جزء باکتری‌های گرم منفی، هوازی، غیر تخمیری به صورت کوکسی یا کوکوباسیل است که عموما در خاک، آب و فاضلاب یافت می‌شود (۱ و ۲). نیازمندی غذایی این باکتری پیچیده نبوده و به راحتی بر روی محیط‌های غذایی معمول رشد می‌کند. برخی از این باکتری‌ها قادر به زنده ماندن بر روی تجهیزات درمانی مختلف و حتی برروی پوست انسان سالم هستند. *اسینتوباکتر بامانی* (*Acinetobacter baumannii*) در سال‌های اخیر نقش فزاینده‌ای در عفونت‌های بیمارستانی داشته و به صورت گسترده‌ای موجب عفونت در بیماران بستری به ویژه در بخش‌های جراحی، سوختگی و ICU می‌شود. یکی از مشکلات

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۲۸۲۷۹۲۴۴ پست الکترونیک: salimizadeh.zahra@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

موجود در مورد *اسینتوباکتر بامانی* ظهور سویه‌های با مقاومت چندگانه داروئی است که به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون‌ها مقاومند (۳ و ٤). تا سال‌های اخیر تصور می‌شد که انتقال مقاومت به آنتی‌بیوتیک ها در باکتری ها عمدتا به طریق هم یوغی و ترانسداکشن توسط پلاسمیدها، فاژها وترانسپوزون های حمل کننده ژن‌های مقاومت صورت می‌گیرد.

اما در سال ۱۹۸۹، هال (Hall) و استوکس (Stokes) مکانیسم دیگری از انتقال ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک را شناسایی کردند که توسط عناصری به نام اینتگرون انجام می‌شود (۵). اینتگرون‌ها، می‌توانند در درون پلاسمید، کروموزوم و یا ترانسپوزون‌ها وارد شوند. این عناصر از جمله عوامل موثر در توسعه مقاومت‌های چندگانه دارویی هستند (٦).

تا کنون، ۹ کلاس اینتگرون شناسایی شده است که در این بین، اینتگرون کلاس ۱ در میان سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* شایع‌تر می‌باشد (۷). کاست های ژنی مختلف در این کلاس، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، آمینوگلیکوزید، کلرامفنیکل، تری متوپریم، اریترومایسین، دیگر آنتی بیوتیک ها و ضدعفونی کننده‌های چهارتایی آمونیومی و سولفونامیدها را ایجاد می کنند (۸). این ساختار حاوی دو ناحیه ثابت ´3 و ´5 است و کاست های ژنی بین دو ناحیه حفاظت شده قرار می گیرند.

در انتهای ´5-CS ژن *intI1* و پروموترهای P1 و P2 به منظور بیان کاست ها قرار گرفته‌اند (P_{ant}) P1 پروموتر اصلی است و P2 معمولا غیر فعال می باشد. ناحیه attI در انتهای بخش ´5 بین پروموتر Pc خود و اولین کاست ژنی قرار گرفته است و دو جایگاه شناسایی برای *IntI1* دارد. در انتهای ´3-CS ژن *sull* کدکننده مقاومت به سولفونامید است و یک نسخه ناقص ژن مقاومت به شوینده‌ها شامل *qacE* و *qacE1* و چهارچوب خوانش باز به نام *orf5* قرار دارد که پروتئین‌هایی با عملکرد ناشناخته را کد می‌کند (۹ و ۱۰).

وجود ژن‌های کد کننده آنزیم‌های تغییر دهنده‌ی آمینوگلیکوزیدها در اینتگرون‌های کلاس ۱ دارای مقاومت چندگانه دارویی در *اسینتوباکتر بامانی* بسیار متداول است.

آمینوگلیکوزیدها به طور گسترده ای برای درمان عفونت های ایجاد شده توسط *اسینتوباکتر بامانی* مورد استفاده قرار می گیرند، هرچند که تعداد سویه های مقاوم گزارش شده در سال های اخیر افزایش یافته است.

مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در *اسینتوباکتر بامانی* عمدتا توسط آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها ایجاد می شود که شامل سه گروه آنزیمی آمینوگلیکوزید استیل-ترانسفرازها، آمینوگلیکوزید فسفوترانسفرازها و آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفرازها(آمینوگلیکوزید آدنیل ترانسفراز) می باشند (۱۱).

ژن های کدکننده آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها اغلب بر روی پلاسمید یا ترانسپوزون ها واقع شده اند، که انتشار سریع آن‌ها را در طیف گسترده ای از گونه های باکتریایی فراهم می سازد (۱۲ و ۱۳).

ژن *aadA2* آمینوگلیکوزید آدنیل-ترانسفرازی را کد میکند که باعث مقاومت به استرپتومایسین و اسپکتینومایسین می شود (١٤)، اما ژن *aadB* کد کننده آمینوگلیکوزید آدنیل ترانسفرازی است که موجب مقاومت به جنتامیسین، توبرامایسین و کانامایسین می شود (۱۵).

میزان شیوع اینتگرون کلاس ۱ در جدایه های *اسینتو باکتر بامانی* در بررسی های مختلف در سراسر دنیا متفاوت است و از ١٤٪ تا ٩٢٪ متغیر است. در مطالعات گذشته مشاهده شده که اغلب سویه های اینتگرون مثبت *اسینتوباکتر بامانی* نسبت به ترکیبات آمینوگلیکوزیدها مقاوم بودند. این امر احتمالا به دلیل حضور تعداد زیادی از کاست های ژنی است که باعث مقاومت به آمینوگلیکوزید ها می شود (۱۸-١٦).

هدف از این مطالعه ارزیابی شیوع ژن *intI1* *sul1* *aadA2* و *aadB* در میان جدایه های بالینی *اسینتوباکتر بامانی* بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه: این مطالعه به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ٨٤ نمونه بالینی مختلف شامل تراشه، خلط، ادرار، خون، کشت زخم، مایع آسیت و سوختگی جمع آوری شده از دو بیمارستان بقیه الله الاعظم (عج) و

Archive of SID

www.SID.ir

بیمارستان شهید مدرس در تهران انجام گردید.

ب) کشت نمونه‌ها: نمونه‌های بالینی پس از انتقال به آزمایشگاه بر روی محیط مک کانکی آگار و بلاد آگار (مرک، آلمان) کشت و پلیت‌ها در حرارت ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. در صورت مشاهده رشد، پس از رنگ آمیزی گرم و مشاهده کوکسی‌ها و دیپلوکوکسی‌های گرم منفی با تست اکسیداز بررسی شدند. در مرحله بعد نمونه‌های اکسیداز منفی با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی، مانند تست حرکت، تست سیترات و کشت بر روی محیط OF حاوی قند گلوکز (مرک، آلمان) و رشد در دمای ۴۴-۴۲ درجه سلیسیوس ارزیابی گردید (۱۹).

ج) حساسیت آنتی‌بیوتیکی: تعیین حساسیت به روش آگار دیسک دیفیوژن استاندارد (Kirby-Bauer) انجام گردید. برای انجام آزمایش سوسپانسیونی از کلنی‌های باکتری معادل لوله ۰/۵ مک فارلند تهیه و پس از آغشته کردن سوآپ استریل با سوسپانسیون، به خوبی بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) پخش گردید. پس از قرار دادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر روی پلیت قطر هاله عدم رشد باکتری پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه سلیسیوس اندازه‌گیری و نتایج برای هر آنتی‌بیوتیک بر اساس جدول استاندارد CLSI ثبت شد (۲۰). آنتی‌بیوتیک‌های (شرکت پادتن طب) مورد بررسی شامل آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، سفیکسیم (۵ میکروگرم)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم)، نالیدیکسیک‌اسید (۳۰ میکروگرم)، کاربنی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، تری‌متوپریم-سولفومتاکسازول (۲۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، نورفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم) و تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم) بودند.

د) استخراج DNA: ژنوم تمام جدایه های *اسینتوباکتر بامانی* با استفاده از کیت (DNA Extraction Kit, MBST, Iran) استخراج گردید.

ه) واکنش زنجیره ای پلی مراز: به منظور تکثیر ژن های *intI1*، *sul1*، *aadB* و *aadA2* از پرایمرهای یاد شده در جدول ۱ استفاده گردید. واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۸ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۵/۲ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر dNTPs، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر از DNA الگو و ۵/۰ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase بود.

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، ساخت آلمان) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۳، ۵۵، ۵۵ و ۵۰ درجه سلیسیوس به مدت ۶۰ ثانیه (به ترتیب برای ژن های *intI1*، *sul1*، *aadB*، *aadA2*)، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۲۳-۲۱). محصولات PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفتند.

و) آنالیز آماری: به منظور بررسی ارتباط میان الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژنوتیپ اینتگرون مثبت از

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش.

نام پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال	اندازه (bp)	منبع
intI1	F: 5′-ACGAGCGCAAGGTTTCGGT-3' R: 5′-AAAGGTCTGGTCATACATG-3′	۵۳	۵۶۵	(۲۱)
sul1	F: 5′-TCACCGAGGACTCCTTCTT-3′ R: 5′-AATATCGGGATAGAGCGCA-3′	۵۵	۳۱۷	(۲۲)
aadB	F: 5′-ATGGACACAACGCAGGTCGC-3′ R: 5′-TTAGGCCGCATATCGCGACC-3′	۵۵	۵۳۴	(۲۳)
aadA2	F: 5′-TGTTGGTTACTGTGGCCGTA-3′ R: 5′-GATCTCGCCTTTCACAAAGC-3′	۵۰	۶۲۳	(۲۲)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: ارتباط بین الگوی آنتی‌بیوتیکی و اینتگرون در سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی*.

آنتی‌بیوتیک	حساسیت آنتی بیوتیکی		سویه‌های اینتگرون مثبت		سویه‌های اینتگرون منفی		P value
	(تعداد) ٪ مقاومت	(تعداد) ٪ حساسیت	(تعداد) ٪ مقاومت	(تعداد) ٪ حساسیت	(تعداد) ٪ مقاومت	(تعداد) ٪ حساسیت	
جنتامایسین	٦٦/٧ (٢٢)	٣٦/٤ (٩)	٨٢/٣ (١٤)	١٧/٧ (٣)	٥٠ (٨)	٥٠ (٨)	<٠/٠٥
آمیکاسین	٧٨/٨ (٢٦)	٢١/٢ (٧)	٨٨/٢ (١٥)	١١/٨ (٢)	٦٨/٧ (١١)	٣١/٣ (٥)	٠/١٧١
استرپتومایسین	٩٧ (٣٢)	٣ (١)	١٠٠ (١٧)	٠	٩٣/٧ (١٥)	٦/٣ (١)	٠/٤٤٣
تتراسایکلین	٦٩/٧ (٢٣)	٢١/٢ (٧)	٨٨/٢ (١٥)	١١/٨ (٢)	٥٠ (٨)	٥٠ (٨)	٠/٧٧٥
کاربنی سلین	٩٧ (٣٢)	٣ (١)	١٠٠ (١٧)	٠	٩٣/٧ (١٥)	٦/٣ (١)	٠/٤٤٣
سیپروفلوکساسین	٩٣/٣ (٣١)	٦/١ (٢)	١٠٠ (١٧)	٠	٨٧/٥ (١٤)	١٢/٥ (٢)	٠/٦٧٩
نورفلوکساسین	٩٣/٣ (٣١)	٦/١ (٢)	١٠٠ (١٧)	٠	٨٧/٥ (١٤)	١٢/٥ (٢)	٠/٦٧٩

نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای استفاده شد. همچنین مرز معنی داری در P<٠/٠٥ قرار داده شد.

یافته ها

در این مطالعه ۳۳ نمونه *اسینتوباکتر بامانی* از ۸٤ نمونه (۳۹/۲٪) جداسازی گردید. تمام ۳۳ جدایه‌ای که به عنوان *اسینتوباکتر بامانی* مشخص گردیدند، الگوی بیوشیمیایی مشابهی داشتند. ویژگی‌های بیوشیمیایی آنها شامل توانایی استفاده از سیترات به عنوان تنها منبع کربن، اکسید نمودن گلوکز در محیط OF، اکسیداز منفی، سولفید هیدروژن منفی، لیزین دکربوکسیلاز منفی، قدرت تحرک و رشد بر روی محیط مک کانکی آگار در حرارت ٤۲ درجه سلسیوس و اندول منفی بودند.

نتایج بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه ها نشان داد که تمامی سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، پنی‌سیلین، سفکسیم، سفالوتین، سفتیزوکسیم، نالیدیکسیک‌اسید، کلیندامایسین، کلرامفنیکل، سولفومتاکسازول-تری‌متوپریم و استرپتومایسین کاملا مقاوم (۱۰۰٪) هستند. بیشترین حساسیت در برابر آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و تتراسایکلین مشاهده گردید (جدول ۲). در صورتی که جدایه‌های *اسینتوباکتر بامانی* حداقل به ۳ کلاس آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند، به عنوان سویه دارای مقاومت چندگانه (Multi drug resistance=MDR) معرفی شدند (۲٤).

تمامی سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* مورد پژوهش دارای مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی بودند. نتایج PCR نشان داد که ۱۷ سویه از ۳۳ سویه (۵۱/۵ درصد) دارای ژن اینتگرون کلاس ۱ بودند. در این مطالعه ژن *sul1* در ۱۷ سویه از ۳۳ سویه (۵۱/۵ درصد)، ژن *aadA2* در ۸ سویه از ۳۳ سویه (۲٤/۲ درصد) و ژن *aadB* در ۲۲ سویه از ۳۳ سویه (۳٦/٤ درصد) *اسینتوباکتر بامانی* حضور داشتند. در این مطالعه ارتباط وجود اینتگرون‌ها با حساسیت به آنتی‌بیوتیک در سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲).

نتایج نشان داد که بین حضور اینتگرون کلاس ۱ و مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ارتباط معنی وجود دارد، به طوری که سویه‌های دارای اینتگرون کلاس ۱ نسبت به سویه‌های فاقد اینتگرون مقاومت بیشتری نسبت به این آنتی بیوتیک داشتند. در مورد سایر آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی نیز در سویه‌های دارای اینتگرون کلاس یک مقاومت بالاتری مشاهده شد اما از نظر آماری ارتباط معنی داری مشاهده نشد.

بحث

اسینتوباکتر بامانی از عوامل رایج عفونت‌های بیمارستانی است که به دلیل مقاومت ذاتی می تواند مدت زمان زیادی در محیط بیمارستان زنده بماند (۲۵). امروزه گسترش ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از طریق ساختارهای اینتگرونی با ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی چندگانه، به مشکل مهمی در درمان عفونت‌های حاصل از *اسینتوباکتر*ها تبدیل شده‌اند (۲٦).

یافته‌های این مطالعه همانند مطالعات بایوگا (Bayuga) و جاشی (Joshi) نشان داد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دلیل

Archive of SID
www.SID.ir

مصرف بی رویه داروها در سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* به صورت جدی در حال افزایش است. به طوری که ۱۰۰٪ جدایه های *اسینتوباکتر بامانی* مورد بررسی در این مطالعه، فنوتیپ مقاومت به چند دارو (MDR) را دارا بودند.

محققین یاد شده در مطالعات خود میزان جداسازی سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به چند دارو را حدود ٤٥٪ تا ٧٥٪ گزارش کردند (۲۷ و ۲۸). رهبر (Rahbar) و همکاران در سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰٦ در ایران نشان دادند که سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* درصد بالایی از مقاومت را نسبت به سفتریاکسون ۹۰/۹٪، سفتازیدیم ۸٤/۱٪، آمیکاسین ۸۵/۲٪ و سیپروفلوکساسین ۹۰/۹٪ نشان می دهند (۲۹).

نتایج تحقیق حاضر در مورد آمیکاسین (۸٦٪) و سیپروفلوکساسین (۹۳٪) با یافته آنها سازگاری دارد. به طوری که این سویه به سفالوسپورین‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر کاملاً مقاوم بود.

مطالعه امینی (Amini) و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که تمامی سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* نسبت به سفالوتین و سولفومتاکسازول-تری‌متوپریم و کاربنی‌سیلین مقاومت کامل (۱۰۰٪) دارند و نسبت به تتراسایکلین ۹۵/٤، جنتامایسین ۹۱/۵ و آمیکاسین ۸۵/٤ درصد مقاومت داشتند. نتایج بررسی حاضر در مورد مقاومت به سفالوتین و سولفومتاکسازول-تری‌متوپریم با نتایج محققان یاد شده مطابقت دارد و نسبت به کاربنی سیلین ۹۷، تتراسایکلین ٦۹/۷، جنتامایسین ٦٦/۷ و آمیکاسین ۷۸/۸ درصد مقاومت مشاهده شد (۳۰). انتقال افقی اینتگرون‌ها موفق‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاومت و پیدایش گونه‌هایی با مقاومت چند گانه است. نشان داده شده است که اغلب گونه‌های جدا شده از بیماران و محیط بیمارستان با ویژگی مقاومت چندگانه، دارای ژن اینتگرون کلاس ۱ هستند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد جدایه‌هایی که حاوی اینتگرون بودند مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالاتری نسبت به جدایه‌هایی که فاقد اینتگرون هستند از خود نشان می‌دهند. به طوری که بین حضور اینتگرون کلاس ۱ و مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ارتباط معنی داری از لحاظ آماری وجود داشت. در مورد آنتی‌بیوتیک‌های دیگر نیز در سویه‌های اینتگرون مثبت مقاومت بالاتری مشاهده شد. اما به لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. این امر ممکن است به دلیل حضور سایر کلاس‌های اینتگرون باشد که در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار نگرفت و یا مقاومت حاصل می تواند از راه‌های مختلف از جمله نقص در آنزیم‌های اتولیتیک در دیواره سلولی و یا تحت کنترل پلاسمید و یا ترانسپوزون به دست آمده باشد.

در مطالعه گو (Gu) و همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز ارتباط معنی‌داری میان حضور اینتگرون و مقاومت نسبت به جنتامایسین مشاهده شد (۳۱). تورتن (Turton) و همکاران نشان دادند که در غربالگری اینتگرون‌ها واکنش PCR مورد استفاده برای شناسایی ژن اینتگراز مزایای بیشتری نسبت به PCR کاست اینتگرون دارد. زیرا برای ارائه یک محصول کوچک طراحی شده و به راحتی تکثیر می شود و انجام PCR به منظور تشخیص ژن اینتگراز، قابل اعتماد و آسان است (۳۲). در مطالعه حاضر، همانند مطالعات تورتن (Turton) و لاری (Lari) و همکاران از ژن اینتگراز به منظور شناسایی اینتگرون‌های کلاس ۱ استفاده شد (۱۷).

در این بررسی غربال سویه‌ها برای ژن *intI1* نشان داد که این ژن در ۵۱/۵ درصد جدایه‌ها وجود دارد. پلی (Ploy) و همکاران در سال ۱۹۹۹، با استفاده از PCR ژن اینتگراز، میزان نمونه‌هایی که حاوی ژن *intI1* بودند را ۱٦ مورد از ۲۰ جدایه (۸۰٪) گزارش کردند (۳۳).

در بررسی که در سال ۲۰۰٤ توسط ریبرا (Ribera) و همکاران در اسپانیا انجام شد از ٦۹ جدایه *اسینتوباکتر بامانی*، ۱۹ جدایه (۲۷/۵٪) حاوی اینتگرون ۱ بودند (۳٤). در بررسی که در سال ۲۰۰۸ توسط ایکس یو (Xu) و همکاران در جنوب چین انجام شد از ۱۲۲ جدایه *اسینتوباکتر بامانی*، ۵۳ جدایه (٤۳٪) حاوی اینتگرون ۱ بودند (۳۵). در مطالعه لاری (Lari) و همکاران در سال ۲۰۱۱ در ایران میزان شیوع اینتگرون کلاس ۱ در سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی*، ۱٤/۷ درصد بود (۱۷).

در مطالعه پیمانی (Peymani) و همکاران در سال ۲۰۱۲ کلاس

Archive of SID

www.SID.ir

۱ اینتگرون در ۹۲/۵ درصد از جدایه های MDR/*سینتوباکتر بامانی* مشاهده شد (۱۸).

در بررسی که در سال ۲۰۱۳ در ایران توسط مسجدیان (Masjedian) و همکاران انجام شد میزان شیوع اینتگرون کلاس ۱ در سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* ٤٢ درصد بود (٣٦). اما در مطالعه اسداللهی (Asadollahi) و همکاران در سال ۲۰۱۲ در ایران میزان شیوع اینتگرون کلاس ۱ در سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی*، ٥٦/٥ درصد بود که نتایج مطالعه حاضر با نتایج آن‌ها سازگاری داشت (۳۷).

ژن *sul1* مقاومت به سولفونامید را کد می کند. در این مطالعه تمام سویه‌هایی که دارای اینتگرون کلاس ۱ بودند ژن *sul1* نیز در آن‌ها حضور داشت. این نتایج ، مطابق با نتایج مطالعات قبلی انجام گرفته نشان می دهد که ژن *sul1* به شدت به اینتگرون‌ها وابسته است. ژن *aadA2* مقاومت به استرپتومایسین و اسپکتینومایسین را ایجاد می نماید.

در این مطالعه ژن *aadA2*، در ٢٤/٢ درصد *اسینتوباکتر بامانی* حضور داشت. تمامی سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* که دارای ژن *aadA2* بودند کاملاً به استرپتومایسین مقاوم بودند و سویه‌های فاقد این ژن مقاومت بالایی نسبت به استرپتومایسین نشان دادند که در این مورد احتمالا مکانیسم های دیگری مانند مقاومت پلاسمیدی، ایفلاکس و غیره نقش دارند.

ژن *aadB* موجب مقاومت به کانامایسین و جنتامایسین می‌شود. در این مطالعه ژن *aadB* در ٣٦/٤ درصد *اسینتوباکتر بامانی* حضور داشت. تمامی سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* دارای ژن *aadB* نسبت به جنتامایسین کاملاً مقاوم بودند که می‌تواند نشان دهنده انتقال مقاومت از طریق این ژن باشد.

در این مطالعه تمامی سویه‌های مقاوم به استرپتومایسین و جنتامایسین از نظر وجود ژن *aadB* و *aadA2* مثبت ارزیابی نشدند. این نتیجه بیانگر مکانیسم‌های دیگر در ایجاد مقاومت است.

در مطالعه ای که گو (Gu) و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی *اسینتوباکتر بامانی* انجام دادند، ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزید شامل *aadA1*، *aadA2*، *aadA5*، *aadA6*، *aadB* یافت شد. بیشترین ژن‌های مقاومت شناسایی شده ژن‌های آمینوگلی‌کوزید آدنیلیل ترانسفراز (خانواده *aadA*) بودند که مقاومت به استرپتومایسین و اسپکتینومایسین را ایجاد می‌کنند (۳۱). در مطالعه حاضر ژن *aadB* فراوانی بالاتری از ژن *aadA2* داشت. در مطالعه هوجر (Hujer) و همکاران در سال ۲۰۰٦ بر روی *اسینتوباکتر بامانی* ، فراوانی ژن *aadB* برابر با ٤٨ درصد و فراوانی ژن *aadA1* ۳۹ درصد بود (۲۳).

در مطالعه خلعت آبادی (Khalat abadi) و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی *اسینتوباکتر*، فراوانی ژن *aadB* ۳/۳ درصد (۳۸) و در مطالعه فرج نیا (Farajnia) و همکاران در سال ۲۰۱٤ فراوانی ژن *aadB* ۱۸/٦ درصد بود (۳). در این مطالعه فراوانی ژن *aadB* ۳٦/٤ درصد بود که از فراوانی مورد مشاهده در مطالعه هوجر (Hujer) پایین تر بود. اما نسبت به نتایج خلعت آبادی (Khalat abadi) و فرج نیا (Farajnia) فراوانی بیشتری مشاهده شد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که ژن های کد کننده آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها از شیوع قابل توجهی در *اسینتوباکتر بامانی* برخوردار هستند. همچنین از آن جایی که میزان مقاومت چند دارویی در ۲ بیمارستان مورد مطالعه ۱۰۰ درصد تعیین گردید، لزوم توجه به معیارهای کنترل عفونت های بیمارستانی احساس می گردد.

یکی از دلایل ایجاد مقاومت چند دارویی در سویه های *اسینتوباکتر بامانی* در محیط بیمارستانی افزایش مصرف آنتی بیوتیک‌ها می باشد. بنابراین کنترل مصرف آنتی بیوتیک، در بیمارستان‌ها نقش مهمی در جلوگیری از ظهور عفونت های ناشی از *اسینتوباکتر بامانی* ایفا می کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دانشجویی است. نویسندگان این مقاله از تمامی افرادی که در انجام این پژوهش همکاری نمودند، کمال تشکر و امتنان را دارند.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Moradi J, Hashemi FB, Bahador A. Antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* in Iran: a systemic review of the published literature. Osong Public Health Res Perspectives. 2015; 6(2): 79-86.

2. Tripathi PC, Gajbhiye SR, Agrawal GN. Clinical and antimicrobial profile of *Acinetobacter* spp.: An emerging nosocomial superbug. Adv Biomed Res. 2014; 3(1): 13.

3. Aliakbarzade K, Farajnia S, Nik AK, Zarei F, Tanomand A. Prevalence of aminoglycoside resistance genes in *Acinetobacter baumannii* isolates. Jundishapur J Microbiol. 2014; 7(10): e11924.

4. Bou G, Cerveró G, Dominguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a Multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β-lactamases. J Clin Microbiol. 2000; 38(9): 3299-3305.

5. Peters E, Leverstein-van Hall M, Box A, Verhoef J, Fluit A. Novel gene cassettes and integrons. Antimicrobial Agents Chemother. 2001; 45(10): 2961-2964.

6. 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. Int J Medical Lab. 2015; 2(3): 168-176.

7. Poonsuk K, Tribuddharat C, Chuanchuen R. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical isolates. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2012; 43(2): 376.

8. Huang C, Long Q, Qian K, Fu T, Zhang Z, Liao P. Resistance and integron characterization of *Acinetobacter baumannii* in a teaching hospital in Chongqing, China. New Microbes New Infect. 2015; 8: 103-108.

9. Nardelli M, Scalzo PM, Ramírez MS, Quiroga MP, Cassini MH, Centrón D. Class 1 integrons in environments with different degrees of urbanization. PloS one. 2012; 7(6): e39223.

10. Fluit A, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. Clin Microbiol Infect. 2004; 10(4): 272-288.

11. Mak JK. Integrons, resistance genes and their dissemination (in Gram negative bacteria): School of biotechnology & biomolecular sciences, University of New South Wales. Sydney, Australia; 2009.

12. Stokes Ht, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site specific gene integration functions: integrons. Mol Microbiol. 1989; 3(12): 1669-1683.

13. Odumosu BT, Adeniyi BA, Chandra R. Occurrence of aminoglycoside-modifying enzymes genes (aac (6′)-I and ant (2″)-I) in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. Afr Health Sci. 2015; 15(4): 1277-1281.

Archive of SID

www.SID.ir

14. Quinteira S, Sousa JC, Peixe L. Characterization of In100, a new integron carrying a metallo-β-lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents Chemother. 2005; 49(1): 451-453.

15. Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, Fusté E, Vinuesa T, Martínez J, Viñas M. Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrobial Agents. 2011; 38(5): 398-402.

16. Kamalbeik S, Kouchek M, Baseri Salehi M, Fallah F, Malekan MA, Talaie H. Prevalence of class 2 integrons in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in toxicological ICU patients in Tehran. Iran J Toxicol. 2013; 7(22): 900-906.

17. Rastegar-Lari A, Mohammadi-Barzelighi H, Arjomandzadegan M, Nosrati R, Owlia P. Distribution of class I integron among isolates of *Acinetobacter baumannii* recovered from burn patients. J Med Bacteriol. 2015; 2(1-2): 1-11.

18. Peymani AFS, Nahaei MR, Hasani A, Sohrabi N, Abbasi L, Aznari F. Prevalence of class 1 integron among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, northwest of Iran. Polish J Microbiol. 2012; 61(1): 157.

19. Bergogne-Berezin E, Towner K. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev. 1996; 9(2): 148.

20. Wayne P. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-Third informational supplement: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

21. Xu H, Su Z, Wang S, Dai X, Chen J, Kong F. Four novel resistance integron gene-cassette occurrences in bacterial isolates from Zhenjiang, China. Current Microbiol. 2009; 59(2): 113-117.

22. Randall L, Cooles S, Osborn M, Piddock L, Woodward M. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. J Antimicrobial Chemother. 2004; 53(2): 208-216.

23. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. Antimicrobial Agents Chemother. 2006; 50(12): 4114-4123.

24. Manchanda V, Sanchaita S, Singh N. Multidrug resistant *Acinetobacter*. J Global Infect Dis. 2010; 2(3): 291.

25. Karbasizade V, Heidari L, Jafari R. Detection of OXA-type carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii* isolates from nosocomial infections in Isfahan hospitals, Iran. J Med Bacteriol. 2016; 4(5-6): 31-36.

26. Cambray G, Guerout A-M, Mazel D. Integrons. Ann Rev Genetics. 2010; 44: 141-166.

27. Bayuga S, Zeana C, Sahni J, Della-Latta P, El-Sadr W, Larson E. Prevalence and antimicrobial patterns of *Acinetobacter baumannii* on hands and nares of hospital personnel and patients: The

Archive of SID

www.SID.ir

iceberg phenomenon again. Heart & Lung: J Acute Critical Care. 2002; 31(5): 382-390.

28. Joshi SG, Litake GM, Niphadkar KB, Ghole VS. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a teaching hospital. J Infection Chemother. 2003; 9(2): 187-190.

29. Rahbar M, Mehrgan H, Aliakbari NH. Prevalence of antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* in a 1000-bed tertiary care hospital in Tehran, Iran. Indian J Pathol Microbiol. 2010; 53(2): 290.

30. Amini M, Davati A, Golestanifard M. Frequency of nosocomial infections with antibiotic resistant strains of *Acinetobacter* spp. in ICU patients. Iran J Pathol. 2012; 7(4): 241-245.

31. Gu B, Tong M, Zhao W, Liu G, Ning M, Pan S. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. J Clin Microbiol. 2007; 45(1): 241-243.

32. Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Coelho JM, Warner M, Pike R. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. J Clin Microbiol. 2005; 43(7): 3074-3082.

33. Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. Antimicrobial Agents Chemother. 2000; 44(10): 2684-2688.

34. Ribera A, Vila J, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Pascual A, Beceiro A. Type 1 integrons in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates collected at Spanish hospitals. Antimicrobial Agents Chemother. 2004; 48(1): 364-365.

35. Xu X, Kong F, Cheng X, Yan B, Du X, Gai J. Integron gene cassettes in *Acinetobacter* spp. strains from South China. Int J Antimicrobial Agents. 2008; 32(5): 441-445.

36. Mirnejad R, Mostofi S, Masjedian F. Antibiotic resistance and carriage class 1 and 2 integrons in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Tehran, Iran. Asian Pacific J Trop Biomed. 2013; 3(2): 140-145.

37. Asadollahi P, Akbari M, Soroush S, Taherikalani M, Asadollahi K, Sayehmiri K. Antimicrobial resistance patterns and their encoding genes among *Acinetobacter baumannii* strains isolated from burned patients. Burns. 2012; 38(8): 1198-1203.

38. Farahani Kheltabadi R, Moniri R, Shajari GR, Nazem Shirazi MH, Musavi SGA, Ghasemi A, Aghazadeh Sh. Antimicrobial susceptibility patterns and the distribution of resistance genes among *Acinetobacter* species isolated from patients in shahid Beheshti hospital, Kashan. Feyz. 2009; 12(4): 61-67.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 4, January 2017

Original Article

The evaluation of *int1*, *sul1*, *aadA2*, and *aadB* genes frequencies in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran

Farzaneh Hosseini[1], Zahra Salimizadeh[2], Mitra Salehi[1]

[1]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Bioscience, North Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[2]MS.c., Department of Microbiology, Faculty of Bioscience, North Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Acinetobacter baumannii*a is a gram-negative coccobacillus which is increasingly reported as the major cause of nosocomial infections. The aim of this study was to determine the frequency of class I integron, and the prevalence of two important aminoglycoside modifying enzymese genes (*aadA2* and *aadB*) in *A. baumannii* isolates.

Materials & Methods: This cross-sectional study was performed on 33 *A. baumannii* isolated from patients who referred to Baghiatallah Azam and Shahid Modarres Hospitals in Tehran. Antimicrobial susceptibility of isolates was evaluated using disk diffusion method in accordance with CLSI guideline. The presence of *intI1*, *sul1*, *aadA2* and *aadB* genes in clinical isolates was investigated by PCR technique.

Results: The frequency of *intI1*, *sul1*, *aadA2*, and *aadB* genes in *A. baumannii* was observed as 51.5%, 51.5%, 24.2% and 36.4%, respectively. All isolates were multi-drug resistant, and the highest level of antibiotic resistance was shown to ampicillin, cefixime, cephalothin, nalidixic acid, clindamycin, chloramphenicol, sulfamethoxazole-trimethoprim, and streptomycin (100%). Furthermore, the minimum antibiotic resistance was shown to gentamicin (66.7%), and tetracycline (69.7%).

Conclusion: A significant correlation was observed between class 1 integrons, and resistance to one antibiotic. However, this association was not remarkable in several other isolates with antibiotics resistance. This may imply that in addition to integrons, other determinants such as transposons and plasmids may also contribute to resistance.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Integron class 1, Antibiotic resistance.

Correspondence to: Zahra Salimizadeh

Tel: +98 9128279244

E-mail: salimizadeh.zahra@gmail.com

Journal of Microbial World 2017, 9(4): 297-306.

Archive of SID

www.SID.ir