مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره چهاردهم، شمارهٔ ۵، شهریور ۱۳۹۱، صفحه ۶۳-۵۶

مقاله تحقیقی

# بررسی شیوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف OXA Type نوع OXA-2 وOXA-10 و اینتگرون کلاس یک در اسینتوباکتر بومانی ایزوله شده از بیماران شهر تبریز با روش PCR

اعظم رحیم زاده (MSc)[۱]، صفر فرج نیا (PhD)[۲و۳*]، احمدعلی پور بابائی (PhD)[۴]، خلیل انصارین (MD)[۲]،
محمد رضا ذوالفقاری (PhD)[۱]، نوشین مسعودی (MSc)[۳]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم
۲- مرکز تحقیقات بیماریهای سل و ریه دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۳- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۴- گروه خاک شناسی، دانشگاه تهران

دریافت: ۹۰/۹/۱۲، اصلاح: ۹۰/۱۱/۱۹، پذیرش: ۹۱/۲/۱۳

## خلاصه

**سابقه و هدف:** اسینتوباکتر جزء باکتری‌های گرم منفی، هوازی، غیر تخمیری به صورت کوکسی یا کوکوباسیل است که به عنوان پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی به تعداد زیادی از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم است. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) تیپهای OXA-2 وOXA-10 و اینتگرون کلاس یک در سویه‌های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضا شهر تبریز می باشد.

**مواد و روشها:** این مطالعه مقطعی بر روی ۱۰۰ نمونه اسینتوباکتربومانی که طی سالهای ۸۹-۸۸ از بیماران بستری در بیمارستان امام رضا تبریز جداسازی شده بودند، انجام شد. تست‌های افتراقی و بیوشیمیایی برای شناسایی ایزوله ها انجام و سپس الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. جهت تایید تولید ESBL در ارگانسیم های غربالی از روش Combined Disc استفاده شد و جهت تعیین حضور ژنهای OXA-2 ، OXA-10 و INT-1 در ایزوله ها، نمونه DNA باکتریها استخراج گردیده و با روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته ها:** نتایج بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها نشان داد که بیشترین مقاومت به ترتیب در برابر آنتی بیوتیک‌های Cefiexim، Ceftizoxim وticarcilin (۱۰۰٪) بوده در حالیکه بیشترین حساسیت به ترتیب در برابرآنتی بیوتیک‌های polymixinB (۸۴٪)، colistin(۷۷٪) و refampin (۷۳٪) مشاهده گردید. نتایج PCR نشان داد از میان ۶۰ ایزوله ESBL مثبت، ژن OXA-2 در ۷ مورد ( ۱۱/۶٪) و OXA-10 در ۵ مورد (۸/۳٪) مثبت بودند. بررسی از نظر وجود ژن اینتگرون کلاس یک نشان داد که ۷۳٪ کل ایزوله‌ها دارای ژن INT-1 می باشند.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشانگر فراوانی ESBL های تیپ OXA-2 و OXA-10 و اینتگرون های کلاس I در ایزوله های اسینتوباکتربومانی مورد بررسی بود. بنابراین اتخاذ تدابیر مناسب جهت پیشگیری از انتشار سویه های مقاوم ضروری بنظر می رسد.

**واژه های کلیدی: اسینتوباکتر بومانئی، بتالاکتاماز های وسیع الطیف، OXA-2، OXA-10 و INT-1.**

## مقدمه

اسینتوباکتر جزء باکتری های گرم منفی، غیر تخمیری، هوازی اجباری و به صورت کوکسی یا کوکوباسیل است که عموماً در خاک، آب و فاضلاب یافت می شود (۲و۱). اسینتوباکتر بومانی نسبت به انواعی از آنتی بیوتیک ها داری مقاومت ذاتی بوده و بعنوان یکی از مهمترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و باکتریمی در بیمارستان ها در نقاط مختلف دنیا شناخته شده است(۳). یکی از مشکلات موجود در مورد اسینتوباکتر بومانی ظهور سویه های با مقاومت چند داروئی است که به کلاسهای مختلف آنتی بیوتیک ها نظیر b-lactam ها، aminoglycoside ها و fluoroquinolone ها مقاومند (۴). این مقاومتها اغلب با واسطه ژنهایی صورت می گیرد که بر روی عناصر ژنتیکی متحرک مثل ترانسپوزون ها و اینتگرون ها قرار داشته و به سادگی در میان باکتری ها انتشار می یابند (۵). آنزیمهای بتالاکتاماز بر اساس ساختار اولیه شان در ۴ کلاس A-D طبقه بندی می شوند (۶) بتالاکتامازها وسیع الطیف (Extended -Spectrum β-Lactamases, ESBL) شامل گروه A و دسته ای از بتالاکتامازهای D هستند که موجب هیدرولیز سفالوسپورین های نسل اول، دوم،

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۹۰/۱۸ مرکز تحقیقات بیماریهای سل و ریه دانشگاه علوم پزشکی تبریز می باشد.
* مسئول مقاله:
آدرس: تبریز، خیابان دانشگاه، مجتمع تحقیق و توسعه، آزمایشگاه بیولوژی مولکولی، تلفن: ۳۳۶۳۲۳۴-۰۴۱۱
e-mail: farajnias@tbzmed.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

سوم و مونوباکتام شده اما توسط مهار کننده های بتالاکتامازها از جمله کلاولانیک اسید مهار و از پلاسمیدهای کد کننده خانواده TEM , SHV و OXA منشا می گیرند (۸و۷). ESBL های تیپ OXA-2 و OXA-10 جز گروه D امبلر طبقه بندی می شوند (۹) و ژن های رمز کننده این آنزیم ها (ESBL) ممکن است روی کروموزوم، پلاسمید، ترانسپوزون باکتریایی و همچنین بر روی اینتگرون ها یافت شوند (۱۰). اینتگرون ها از جمله فاکتورهای دخیل در توسعه مقاومت های چند گانه بوده و همانند پلاسمید ها و ترانسپوزن ها جز مولفه های ژنتیکی متحرک در کسب و انتشار عوامل مقاومت می باشند. پنج کلاس مختلف از اینتگرون ها شناسایی شده اند که اینتگرون های کلاس I به طور متداول در ایزوله های بالینی باسیل های گرم منفی از جمله اسینتوباکتر بومانی یافت شده و منجر به انتشار مقاومت چند گانه آنتی بیوتیکی و مشکلات جدی درمانی در سراسر جهان گردیده است (۱۳-۱۱).

مطالعات مختلف نشان داده اند که ژن های بتالاکتامازی و اینتگرون ها نقش مهمی در ایجاد و انتقال مقاومت های آنتی بیوتیکی ایفا می کنند. این امر بویژه تهدیدی برای بیماران بستری و افراد با سیستم ایمنی ضعیف محسوب می شود. در مطالعه ای که Sadeghi fard و همکاران در سه بیمارستان شهر تهران انجام دادند، تمام ایزولـه های اسینتوباکتر بومانی به آنتی بیوتیک های بتالاکتام از جمله سفتیزوکسیم، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، ازترونام، مروپنم، سفیکسیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم مقاوم و تمام ایزوله ها به کلیستین و ۸۴/۸٪ سویه ها به پلی میکسین B حساس بودند (۱۴). در مطالعه ای که Shahcheraghi و همکارانش انجام دادند بیشتر سویه های اسینتوباکتر به سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفکسیم مقاومت بالایی داشتند ولی ۹۵/۸٪ سویه ها به کلیستین حساس بودند (۱۵). در مطالعه Hujer و همکاران که بر روی ۷۵ سویه اسینتوباکتر جدا شده از بیماران نظامی و غیر نظامی جنگ عراق و افغانستان صورت گرفت بیش از ۸۰٪ ایزوله ها نسبت به سفالوسپورینهای با طیف وسیع و ۲۰٪ به ایمی پنم مقاوم بودند (۱۶). در مطالعه Akan در بیمارستان ابن سینای آنکارا، میزان مقاومت نسبت به ایمی پنم ۵۶/۶٪، سیپروفلوکساسین ۷۴٪، جنتامایسین ۷۸٪ و کوتریموکسازول ۸۲/۳٪ گزارش شده است (۱۷). این مطالعات نشانگر تفاوت در نوع و میزان شیوع مکانیسم های مقاومت داروئی در مناطق مختلف می باشد. البته مصرف بی رویه و نامناسب آنتی بیوتیک ها از عوامل تاثیر گذار بر انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی می باشد. در واقع بروز مقاومت می تواند به دلیل استفاده زیاد و نادرست از آنتی بیوتیک ها در بسیاری از واحد های کلینیکی باشد (۱۸).

متاسفانه مطالعات در مورد شیوع ژن های مقاومت نظیر OXA-2 و OXA-10 در ایزوله های اسینتوباکتربومانی کم بوده و اطلاعات دقیقی در مورد میزان کلی مقاومت این باکتری در ایران در دسترس نمی باشد. این مطالعه به منظور بررسی میزان شیوع ژن های INT-1 و ESBL های تیپ OXA-2 و OXA-10 در بیمارستان امام رضا تبریز انجام شد.

## مواد و روشها

**جامعه مورد بررسی و نمونه ها:** این مطالعه مقطعی طی یک دوره ۶ ماهه از مهر تا اسفند ۸۹ انجام گرفت، تعداد ۱۰۰ ایزوله اسینتوباکتربومانی که از نمونه های بالینی مختلف شامل تراشه، خلط، ادرار، خون، کشت زخم، مایع آسیت، مایع پلور، کاتتر، مایع نخاع و از بخش های بالینی مختلف بیمارستان امام رضا شهر تبریز جداسازی شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند.

**کشت و جداسازی:** نمونه های بالینی پس از انتقال به آزمایشگاه بر روی محیط مکانیکی و بلاد آگار کشت داده شده و سپس پلیت ها در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند. در صورت مشاهده رشد، پس از رنگ آمیزی و مشاهده کوکسی ها و دیپلوکوکسی های گرم منفی با تست اکسیداز بررسی شدند. در مرحله بعد نمونه های اکسیداز منفی با استفاده از تست های بیوشیمیایی، مانند حرکت، تست سیترات و کشت بروی محیط (Oxidativd Fermenpapive, OF) حاوی قند گلوکز و رشد در دمای ۴۴-۴۲ درجه سانتیگراد بررسی شده و تعیین هویت قطعی انجام شد.

**بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها:** از تمام نمونه های بدست آمده تست آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفوژن آگار با متد Kirby & Bauer انجام گردید. که برای این کار ابتدا از کلنی های جدا شده، یک سوسپانسیون بر اساس استاندار ۰/۵ مک فارلند تهیه و با سواپ استریل در کنار شعله از سوسپانسیون باکتری برداشت نموده و بر سطح محیط کشت مولرهینتون آگار کشت متراکم انجام داده و سپس دیسک های آنتی بیوتیکی با پنس استریل روی سطح پلیت قرار گرفت، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه، تشکیل یا عدم تشکیل منطقه رشد و بر اساس جدول استاندارد (Clinical and laboratory standards jnstitute, CLSI) نتایج تفسیر شد (۹).

**آنتی بیوتیک های مورد استفاده:** در این مطالعه ۲۵ دیسک مختلف آنتی بیوتیک (Mast و پادتن طب) شامل آنتی بیوتیک‌های تتراسیکلین (۳۰µgr)، سفتازیدیم (۳۰µgr)، سفتریاکسون (۳۰µgr)، سفالکسین (۳۰µgr)، سیپروفلوکساسین (۳۰µgr)، کوتریموکسازول (۲۵µgr)، کانامایسین (۳۰µgr)، تیکارسیلین (۷۵+ ۱۰µ gr)، پلی میکسین B (۳۰۰µgr)، توبرامایسین (۱۰µgr)، کلرامفنیکل (۳۰µgr)، نورفلوکساسین (۱۰µgr)، افلوکساسین (۵میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰µgr)، جنتامیسین (۱۰µgr)، آمپی سیلین(۱۰µgr)، کاربنی سیلین (۱۰۰µgr)، ریفامپین (۵µgr)، کولیستین (۱۱۰µgr)، سفکسیم (۵µgr)، سفوتاکسیم (۳۰µgr)، سفالوتین(۳۰µgr)، سفتیزوکسیم (۳۰µgr) استفاده گردید.

**روش Combined Disc Test:** جهت انجام این تست، باکتری‌ها بر روی محیط مولر هینتون کشت داده شده و دیسک سفوتاکسیم (۳۰µg)، در مقابل دیسک ترکیبی سفوتاکسیم - کلاولانیک اسید (۳۰µg+۱۰ µg) همچنین دیسک‌های سفتازیدیم، سفپیم وسفتریاکسون در مقابل دیسک ترکیبی آن ها با کلاولانیک اسید قرار داده شد. پلیت ها به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شده و افزایش هاله در اطراف دیسک ترکیبی با کلاولانیک اسید به عنوان مثبت شدن تست و تایید نهایی تولید ESBL در نظر گرفته شد.

**استخراج DNA:** برای استخراج DNA از روش فنل کلروفرم استفاده شد که ابتدا ایزوله ها را در محیط (Luria Bertani, LB) مایع به مدت یک شب کشت داده و پس از سانتریفوژ باکتری ها در بافر لیز کننده حاوی SDS- Proteinase K حل و به مدت ۳ ساعت در ۴۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در مرحله بعد هم حجم سوسپانسیون فوق از مخلوط فنل و کلروفرم (۱:۱) اضافه و پس از مخلوط شدن به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی به لوله اپندرف جدید منتقل و DNA موجود در نمونه با استفاده از ایزوپروپانل

Archive of SID
www.SID.ir

رسوب داده شده و پس از شستشو با الکل ۷۰٪ و خشک شدن، در آب مقطر حل گردید.

**تکثیر ژن های $bla_{OXA}$ و INT-1 به روش PCR:** DNA استخراج شده از سویه های اسینتوباکتر بومانی به همراه پرایمرهای مربوط به ژنها (تهیه شده از شرکت MWG آلمان) در واکنش PCR وارد گردیدند (جدول شماره ۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل۲۲ میکرولیتر Master mix، ng ۱۰۰ (در حجم ۱ میکرولیتر) DNA استخراج شده، ۱۰ پیکو مولار از هر یک از پرایمرها و ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq بود. برنامه دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن OXA-10 شامل: دناتوراسیون اولیه (initial denaturation) ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، سیکل اصلی با ۳۸ بار تکرار شامل: دناتوراسیون (denaturation) در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱دقیقه، اتصال پرایمرها (annealing) ۵۵ درجه به مدت ۱دقیقه، تکثیر(extension) ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیرنهایی (final extension) ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود. برنامه PCR برای ژنهای OXA- 2 و INT-1 مشابه برنامه فوق بوده با این تفاوت که اتصال پرایمرها (annealing) برای OXA- 2 در ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر (extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و برای ژن INT-1 اتصال پرایمر ها (annealing) در ۵۸ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر (extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه بود. محصولات PCR در ژل آگاروز ۱٪ با ولتاژ ۹۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شده پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) در دستگاه Gel Document باندهای مربوطه مشاهده و عکس برداری شدند. جهت تعیین اندازه محصول PCR از سایز مارکر 1kb DNA Ladder (شرکت Fermentase) استفاده شد.

**جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژن های $bla_{OXA}$ و INT-1**

| پرایمر | توالی نوکلئوتیدی پرایمر | درجه حرارت اتصال | اندازه باند |
|---|---|---|---|
| OXA-10-F | 5'-TATCGCGTGTCTTTCGAGTA-3' | 55 °C | 774 bp |
| OXA-10-R | 5'-TTAGCCACCAATGATGCC-3' | | |
| OXA-2-F | 5'- AAGAAACGCTACTCGCCTGC -3' | 60 °C | 485 bp |
| OXA-2-R | 5'- CCACTCAACCCATCCTACCC -3' | | |
| INT-1-F | 5'-GGTGTGGCGGGCTTCGTG-3' | 58 °C | 456 bp |
| INT-1-R | 5'-GCATCCTCGGTTTTCTGG-3' | | |

## یافته ها

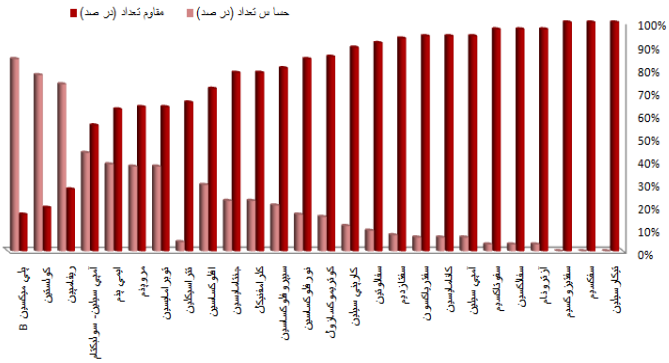
در این مطالعه از ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه ۷۲ نفر (۷۲٪) مذکر و ۲۸ نفر (۲۸٪) مونث بودند. از نظر سنی بیماران حداقل دارای سن ۱۴سال و حداکثر ۸۷ سال و میانگین سنی ۶±۵۲ سال بود. از نظر بخش بستری بخش ICU مغز با ۱۷٪ و بخش اورولوژی و اورژانس عفونی با ۱٪ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان جداسازی اسینتوباکتر بومانی را داشتند.

**جداسازی اولیه باکتری:** ۱۰۰ ایزوله اسینتوباکتر بومانی مورد استفاده با استفاده از تست های بیوشیمیایی استاندارد مورد بررسی و تائید قرار گرفتند که از جمله این تست ها، توانایی استفاده از سیترات به عنوان تنها منبع کربن، اکسید نمودن گلوکز در محیط (اکسید تیوفرمنتانید) OF، اکسیداز منفی، اندول منفی، سولفید هیدروژن منفی، لیزین دکربوکسیلاز منفی، قدرت تحرک و رشد بر روی محیط مکانیکی آگار در حرارت ۴۲ درجه سانتیگراد و ONPG منفی بودند. از مجموع ۱۰۰ ایزوله اسینتوباکتربومانی مورد بررسی، تراشه (۳۷٪)، ادرار (۲۱٪)، خلط (۹٪)، خون (۷٪)، کاتتر (۶٪)، شستشوی برونش (۶٪)، کشت زخم (۵٪)، نمونه آبسه (۳٪)، مایع پلور (۲٪)، مایع آسیت (۲٪) و مایع مغزی- نخاعی (۲٪) گزارش گردید.

**نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها:** بررسی ها نشان داد که در میان ایزوله های مورد بررسی بیشترین مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌های Cefiexim (۱۰۰٪)، Ceftizoxim (۱۰۰٪) و ticarcilin (۱۰۰٪) بود در حالیکه بیشترین حساسیت به ترتیب در برابر آنتی بیوتیک‌های polymixinB (۸۴٪)، colistin (۷۷٪) و rifampin (۷۳٪) مشاهده گردید (نمودار شماره ۱).

**نتایج روش Combined Disc Test:** از میان ۱۰۰ ایزوله اسینتوباکتربومانی، ۶۰ ایزوله با این روش به عنوان ESBL مثبت تایید گردیدند (شکل ۱).

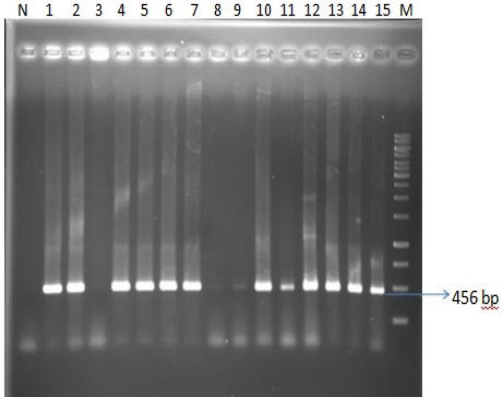
**نتایج تکثیر ژن های $bla_{OXA}$ و INT-1 به روش PCR:** تکثیر قطعه مربوط به ژن INT-1 با PCR در ۷۳٪ برای ژن OXA-10 در ۸/۳٪ و برای ژن OXA-2 در ۱۱/۶٪ مثبت گردیده و منجر به تولید محصولات در اندازه های مورد نظر شد که در الکتروفورز بر روی ژل آگاروز به صورت باندی در محدوده bp ۴۵۶، برای ژن INT-1، bp ۷۷۴ برای ژن OXA-10 و ۴۸۵bp برای ژن OXA-2 آشکار گردیدند (شکل ۴-۲). کلیه موارد مثبت OXA-10 و OXA-2 دارای ژن INT-1 نیز بودند.




**نمودار ۱. نتایج ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضا شهر تبریز در سال ۸۹**

**شکل ۱. نتایج Combined Disc در روی محیط کشت مولرهینتون آگار**

www.SID.ir

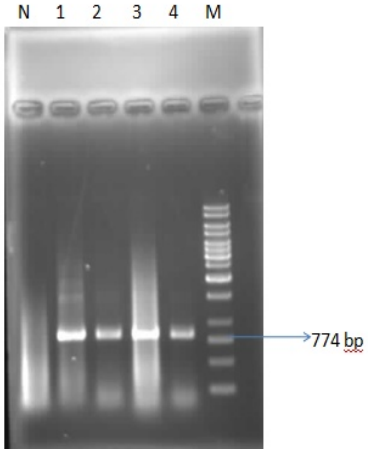



**شکل ۲. نتایج PCR ژن INT-1 سویه های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضا شهر تبریز در سال ۸۹**

NO DNA : N  M : سایز مارکر 1 kb ladder

۱۵-۱۰، ۷-۴،۲،۱: ایزوله های اسینتوباکتر بومانی دارای ژن INT-1

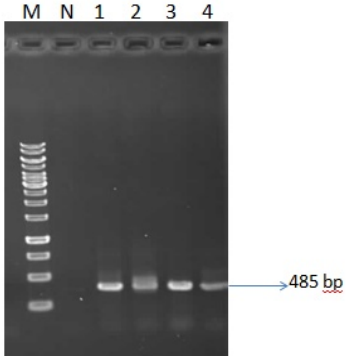
۹،۸،۳: ایزوله های اسینتوباکتر بومانی فاقد ژن INT-1




**شکل ۳. نتایج PCR ژن OXA-10 سویه های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضا شهر تبریز در سال ۸۹.**

NO DNA : N  M : سایز مارکر 1 kb ladder

۴،۳،۲،۱: ایزوله های اسینتوباکتر بومانی دارای ژن OXA-10




**شکل ۴. نتایج PCR ژن OXA-2 سویه های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضا شهر تبریز در سال ۸۹**

NO DNA : N  M : سایز مارکر 1 kb ladder

۴،۳،۲،۱: ایزوله های اسینتوباکتر بومانی دارای ژن OXA-2

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه بیشترین میزان ایزوله های اسینتوباکتر بومانی از تراشه (۳۷٪) و ادرار (۲۱٪) و کمترین میزان آن مربوط به مایع مغزی- نخاعی (۲٪) بود. بررسی طول مدت بستری و میزان جداسازی اسینتوباکتر از بیماران نشان داد که ارتباط معنی داری بین مدت بستری در بیمارستان و ابتلا به عفونت اسینتوباکتر وجود داشت. بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داد که ۸۴٪ سویه ها به پلی میکسین B، ۷۷٪ به کلیستین و ۷۳٪ به ریفامپین حساس بودند، اما همه سویه ها در برابر تیکارسیلین، سفکسیم و سفتیزوکسیم مقاوم بودند. این یافته ها با مطالعات قبلی تاحد زیادی سازگاری دارد. در مطالعه Sadeghi Fard و همکارانش تمام ایزولـه های اسینتوباکتر بومانی به بیشتر آنتی بیوتیک های از جمله سفتیزوکسیم، سفتازیدیم، سفـوتاکسیم، ازتـرونام، مـروپنم، سفیـکسیم، سفتـریاکسـون، سفوتاکسیم مقاوم و تمام ایزوله ها به کلیستین و ۸۴/۸٪ سویه ها به پلی میکسین B حساس بودند (۱۴). همچنین در بررسی Shahcheraghi و همکارانش بیشتر سویه ها به سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفکسیم مقاومت بالایی داشتند ولی ۹۵/۸٪ سویه به کلیستین حساس بودند (۱۵). در این مطالعه ۷۷٪ سویه ها به کلیستین حساس بودند که نشانگر افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به مطالعات قبلی در ایران می باشد. در مطالعه Hujer و همکاران بیش از ۸۰٪ ایزوله ها نسبت به سفالوسپورین ها با طیف وسیع و ۲۰٪ به ایمی پنم مقاوم بودند (۱۶) در حالیکه در مطالعه ما مقاومت به ایمی پنم بیش از ۶۲٪ بود که متاسفانه بیانگر شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در کشور ما می باشد که این امر می تواند به دلیل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها باشد.

در مطالعه ای که توسط Akan بروی تعداد ۲۷۷ ایزوله اسینتوباکتر بومانی در بیمارستان ابن سینای آنکارا در ترکیه انجام شد، میزان مقاومت نسبت به ایمـی پنم ۵۶/۶٪، سیپروفلوکساسین ۷۴٪، جنتامایسین ۷۸٪ و کوتریموکسـازول ۸۲/۳٪ گزارش شده است (۱۷) این در صدها در مطالعه ما به ترتیـب ۶۲، ۸۰، ۷۸ و ۸۵٪ بودند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تولید ESBL از لحـاظ فنـوتیپی در ۶۰٪ ایزوله های مورد بررسی مثبت بود. این یافته نشانگر انتشار بالای مقاومت از نـوع ESBL در سویه های اسینتوباکتر بومانی مـورد بررسـی مـی باشـد. بررسـی بـا PCR نشـان داد کـه از میـان ۶۰ ایزولـه ESBL مثبـت، ژن OXA-10 در (۸/۳٪) موارد و ژن OXA-2 در (۱۱/۶٪) مثبت ایزوله ها بودند.

بتالاکتامازهای تیپ OXA که به اگز اسیلینازها نیز مشهور هستند گروهی از ESBL ها هستند که باکتری را به آمپی سیلین و سفالوتین مقاوم می کنند و با فعالیت هیدرولیتیکی بالا در مقابل اگساسیلین و کلوگساسیلین تمایز می یابند (۲۰و۱۹). تاکنون ۱۴۲ تیپ از این نوع آنزیم ها گزارش شده است (۲۱). اکثر یافته ها در زمینه ESBL های تیپ OXA از نمونه های سودوموناس آئروجنوزای جداسازی شده از کشورهای ترکیه و فرانسه به دست آمده است که از این یافته ها می توان به ۱۲ نوع ESBL که از منشا OXA-10 یا OXA-2 توسط جانشینی آمینواسیدی مشتق شده است، اشاره کرد (۲۲). ولی متأسفانه بررسی های زیادی در مورد شیوع ژن OXA-10 و OXA-2 در اسینتوباکتر وجود ندارد. اغلب ژن های اگساسیلینازها روی ترانسپوزون، پلاسمید و یا روی اینتگرون واقع شده اند که سبب انتشار جهانی آن ها گردیده است (۲۰و۸). این عناصر در اسینتوباکتر بومانی عامل انتقال افقی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی می باشند (۲۳). انتقال افقی اینتگرون ها موفق ترین راه انتشار ژن های مقاومت و

Archive of SID
www.SID.ir

پیدایش گونه هایی با مقاومت چندگانه (multi- drug resistant =MDR) است. نشان داده شده است که اغلب گونه های جدا شده از بیماران و محیط بیمارستان با ویژگی مقاومت چندگانه، دارای ژن اینتگرون کلاس I هستند (۲۴). در این بررسی غربال سویه ها برای ژن INT-1 با PCR نشان داد که این ژن در ۷۳٪ کل ایزوله ها مثبت بود. در بررسی Gomacb و همکارانش از ۳۶ ایزوله اسینتوباکتر بومانی، ۱۶ ایزوله (۴۴٪) حاوی اینتگرون کلاس I بودند (۲۵). در بررسی Huang و همکارانش ۷۱/۳۷٪ ایزوله ها حاوی اینتگرون کلاس I بودند (۱۳). در بررسی دیگری که در تایوان توسط Lin و همکارانش انجام شده از ۱۳۴ ایزوله اسینتوباکتر ۷۳ ایزوله (۵۴/۵٪) حاوی اینتگرون کلاس I بودند (۲۳). مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعات دیگر حاکی از شیوع نسبتا بالاتر اینتگرون در ایزوله های مطالعه ما می باشد. همچنین نتایج این مطالعه نشان می دهد که ایزوله هایی که حاوی اینتگرون بودند مقاومت آنتی بیوتیکی بالایی را نسبت به ایزوله هایی که فاقد اینتگرون هستند از خود نشان می دهند و انتقال افقی ژن های مقاومت وسیله ای مهم برای افزایش انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در محیط بیمارستان می باشد (۲۳).

نتایج این مطالعه نشانگر شیوع بالای اسینتوباکتر در بیماران بوده و این باکتری به عنوان یکی از عوامل بروز عفونت های بیمارستانی با پتانسیل ایجاد مقاومت نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیکها مطرح می باشد. فراوانی ژن اینتگرون کلاس یک در سویه های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بستری بالا می باشد و با توجه به اینکه ژن های مقاومت مثل OXA-2 و OXA-10 بر روی عناصر ژنتیکی متحرک مثل اینتگرون ها قرار دارند، می توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند. لذا شناسایی این نوع از ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی از اهمیت بالایی برخوردار بوده و شناسایی و تعیین شیوع این ژن ها جهت اجرای برنامه های کنترل عفونت و ممانعت از انتشار سویه های مقاوم ضروری می باشد.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریه دانشگاه علوم پزشکی تبریز که امکان اجرای تحقیق فوق را فراهم نمودند تقدیر و تشکر می گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

# Detection of Prevalence of OXA-2 and OXA-10 Type ESBL and Class I Integron among Acinetobacter Bumanii Strains Isolated from Patients of Tabriz City (Iran) by PCR Technique

**A. Rahimzadeh (MSc) [1], S. Farajnia (PhD) [2,3*], A.A. Pourbabaee (PhD)[4], Kh. Ansarin (MD)[2], M.R. Zolfaghari (PhD) [1], N. Masoudi (MSc)[3]**

1. Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
2. Tuberculosis and Lung Disease Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
3. Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4. Department of Soil Science, University of Tehran, Tehran, Iran

**J Babol Univ Med Sci; 14(5); Sep 2012; pp: 56-63.**

**Received: Dec 3rd 2011, Revised: Feb 8th 2012, Accepted: May 2nd 2012.**

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Acinetobacter (A.) baumannii is a gram-negative non-fermentative coccobacilli with increasing relevance in a variety of hospital-acquired infections. The aim of this study was to determine the frequency of bla-OXA-2 and bla-OXA-10 resistance genes and class I Integron among Acinetobacter baumannii strains isolated from patients referred to Imam Reza hospital of Tabriz city, Iran.

**METHODS:** This cross-sectional descriptive study was carried out on 100 Acinetobacter baumannii isolated from patients referred to Imam Reza hospital of Tabriz, Iran in 2009-2010. The isolates were identified using standard biochemical and microbiological tests. ESBL production was determined in isolates by Combined Disc test. The presence of bla-OXA-10, bla-OXA-2 and INT-1 genes in clinical isolates was investigated by PCR technique.

**FINDINGS:** The results of antimicrobial sensitivity tests revealed that the highest resistance was against cefixime (100%), ceftizoxime (100%) and ticaracilin (100%), whereas the highest susceptibility was observed for polymyxin B (84%), colistin (77%) and rifampin (73%). Combined Disc Test showed that 60% of isolated were ESBL producer among them 7 cases (11.6%) were positive for bla-OXA-2 and 5 cases (8.3%) for bla-OXA-10 genes. Screening for INT-1 genes demonstrated that 73% of isolates were positive for Int-1 insertion sequence.

**CONCLUSION:** The results of this study showed the presence of OXA-2 and OXA-10 type ESBLs and class I integron genes among drug resistant Acinetobacter strains that reminding the necessity of preventive measures for inhibiting dissemination of these resistant isolates.

**KEY WORDS:** *Acinetobacter baumannii, Extended-spectrum beta-lactamase, Bla-OXA-2, Bla-OXA-10, INT-1.*

***Corresponding Author;**
**Address:** Cellular Biology Laboratory, Research and Development Center, Daneshgah St., Tabriz, Iran
**Tel:** +98 611 3332036
**E-mail:** farajnias@tbzmed.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

## References

1. Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, et al. New insights into acinetobacter baumannii pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. Genes Dev 2007;21(5):601-14.

2. Munoz Price LS, Weinstein RA. Acinetobacter infection. N Engl J Med 2008;358(12):1271-81.

3. Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II. Attributable mortality of Acinetobacter baumannii infections incritically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. Crit Care 2006;10(2):48- 55.

4. Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant acinetobacter baumannii strain with a carbapenem- hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in A. baumannii is not due solely to the presence of b-lactamase. J Clin Microbiol 2000;38(9): 3299-305.

5. Jin H, Xu XM, Mi ZH, Mou Y, Liu P. Drug-resistant gene based genotyping for Acinetobacter baumannii in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial settings. Chin Med J 2009;122(3):301-6.

6. Helfand MS, Bonomo RA. Beta lactamases: a survey of protein diversity. Curr Drug Tages infect Disord 2003;3(1): 9-23.

7. Bradford PA. Extended- spectrum beta- lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14(4):933-51.

8. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β- lactamases. N Engl J Med 2005;352(4):380-91.

9. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in gram-negative bacteria pathogens. Int J Med Microbiol 2010;300(6):371-9.

10. Rasheed JK, Jay C, Metchock B, et al. Evolution of extended- spectrum β- lactam resistance (SHV-8) in a strain of Escherichia coli during multiple episodes of bacteremia. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(3): 647-653.

11. Ribera A, Vila J, Fernández-Cuenca F, et al. Type 1 integrons in epidemiologically unrelated acinetobacter baumannii isolates collected at Spanish hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(1):364-5.

12. Danel F, Hall LM, Duke B, Gur D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 ß-Lactamase, isolated from Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(6):1362-6.

13. Huang LY, Chen TL, Lu PL, Tsai CA, Cho WL, Chang FY, Fung CP, Siu LK. Dissemination of multidrug-resistant, class 1 integron- carrying acinetobacter baumannii isolates in Taiwan. Clin Microbiol Infect 2008;14(11): 1010-19.

14. Sadeghifard N, Ranjbar R, Ghasemi A, et al. A study of antimicrobial resistance of acinetobacter baumannii and non-acinetobacter baumannii strains isolated from three hospitals in Tehran. J Ilam Univ Med Sci 2006;14(3):29-34. [In Persian]

15. Shahcheraghi F, Akbari Shahmirzadi N, Abbas Alipour Bashash M, Jabbari H, Amir Mozafari N. Detection of $bla_{CTX}$ ,$bla_{TEM}$ beta-lactamase genes in clinical isolates of acinetobacter spp. from selected Tehran hospitals. Iran J Med Microbiol 2009;3(1):1-9. [in Persian]

16. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant acinetobacter sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. Antimicrob Agents Chemother 2006;50(12):4114-23.

17. Akan OA. Antibiotic resistance of Acinetobacter baumannii isolate: data from Ibni Sina hospital for the year 2002. Mikrobiyol Bul 2003;37(4):241- 6.

18. Kasra Kermanshahi R, Kazemi M. Study of Pseudomonas Aeruginosa from nosocomial infection with multi resistance. J Babol Univ Med Sci 2004;6(3):41-5. [in Persian]

Archive of SID

www.SID.ir

19. Gazouli M, Sidorenko SV, Tzelepi E, Kozlova NS, Gladin DP, Tzouvelekis LS. A plasmid-mediated beta-lactamase conferring resistance to cefotaxime in a Salmonella typhimurium clone found in St. Petersburg, Russia. J Antimicrob Chemother 1998;41(1):119-21.

20. Joshi SG, Litake GM, Ghole VS, Niphadkar KB. Plasmid-borne extended-spectrum ß-lactamase in a clinical isolate of Acinetobacter baumannii. J Med Microbiol 2003;52(12):1125-7.

21. Chen HP, Chen TL, Lai CH, et al. Predictors of mortality in Acinetobacter baumannii bacteremia. J Microbiol Immunol Infect 2005;38(2):127-36.

22. Helfand MS, Bonomo RA. Beta lactamases: A survey of protein diversity. Curr Drug Targets Infect Disord 2003;3(1):9-23.

23. Lin MF, Chang KC, Yang CY, et al. Role of integron in antimicrobial susceptibility patterns of Acinetobacter baumannii. Jpn J Infect Dis 2010;63(6):440-3.

24. Molana Z, Ferdosi Shahandashti E, Gharavi S, et al. Molecular investigation of class I integron klebsiella pneumonia isolated from intensive care unit (Shahid Beheshti hospital of Babol; 2010). J Babol Univ Med Sci 2011; 13(6):7-13. [in Persian]

25. Gombac F, Riccio ML, Rossolini GM, et al. Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of Acinetobacter baumannii from Italian hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays. Antimicrob Agents Chemother 2002;46 (11):3665-8.

Archive of SID

www.SID.ir