

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

اعظم رحیم زاده (MSc)^۱، صفر فرج نیا (PhD)^{۲*}، احمدعلی پور بابائی (PhD)^۳، خلیل انصارین (MD)^۴

محمد رضا ذوالفقاری (PhD)^۱، نوشین مسعودی (MSc)^۲

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: اسپنتوباکتر 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 و OXA-10 و اینتگرون کلاس یک در سوبه‌های اسپنتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضا شهر تبریز می باشد.

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

یافته‌ها: نتایج بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها نشان داد که بیشترین مقاومت به ترتیب در برابر آنتی بیوتیک‌های Cefixim، Cefixim، ticarcilin و (۱۰۰٪) بوده در حالیکه بیشترین حساسیت به ترتیب در برابر آنتی بیوتیک‌های polymyxinB (۸۴٪)، colistin (۷۷٪) و refampin (۷۳٪) مشاهده گردید. نتایج PCR نشان داد از میان ۶۰ ایزوله ESBL مثبت، 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 اسپنتوباکتر بومانی مورد بررسی بود. بنابراین اتخاذ تدابیر مناسب جهت پیشگیری از انتشار سوبه های مقاوم ضروری بنظر می رسد.

واژه های کلیدی: اسپنتوباکتر بومانی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، OXA-2، OXA-10 و INT-1.

مقدمه

اسپنتوباکتر جزء باکتری‌های گرم منفی، هوازی اجباری و به صورت کوکسی یا کوکوباسیل است که عموماً در خاک، آب و فاضلاب یافت می شود (۱،۲). اسپنتوباکتر بومانی نسبت به انواعی از آنتی بیوتیک ها دارای مقاومت ذاتی بوده و بعنوان یکی از مهمترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و باکتری می در بیمارستان ها در نقاط مختلف دنیا شناخته شده است (۳). یکی از مشکلات موجود در مورد اسپنتوباکتر بومانی ظهور سوبه های با مقاومت چند دارویی است که به کلاسهای مختلف آنتی بیوتیک ها نظیر b-lactam ها،

aminoglycoside ها و fluoroquinolone ها مقاومت (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: ۰۴۱۱-۳۳۶۳۲۳۴

e-mail: farajnia@tbzmed.ac.ir

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 ۲۴-۴۸ 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 سترات و کشت بروی محیط (Oxidativd Fermentative, 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 دیفوزن آگار با متد Kirby & Bauer انجام گردید. که برای این کار ابتدا از کلنی های جدا شده، یک سوسپانسیون بر اساس استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه و با سوآب استریل در کنار شعله از سوسپانسیون باکتری برداشت نموده و بر سطح محیط کشت مولر هیتون 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 institute, CLSI) نتایج تفسیر شد (۹).

آنتی بیوتیک های مورد استفاده: در این مطالعه ۲۵ دیسک مختلف آنتی بیوتیک (Mast و پادتن طب) شامل آنتی بیوتیک های تتراسیکلین (۳۰μg)، سفنازیدیم (۳۰μg)، سفتریاکسون (۳۰μg)، سفالکسین (۳۰μg)، سیپروفلوکساسین (۳۰μg)، کوتریموکسازول (۲۵μg)، کانامایسین (۳۰μg)، تیکارسلین (۷۵μg + ۱۰μg)، پلی میکسین B (۳۰۰μg)، توپراماسین (۱۰μg)، کلرامفنیکل (۳۰μg)، نورفلوکساسین (۱۰μg)، افلوکساسین (۵میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰μg)، جنتامیسین (۱۰μg)، آمپی سیلین (۱۰μg)، کاربنی سیلین (۱۰۰μg)، ریفامپین (۵μg)، کولستین (۱۱۰μg)، سفکسیم (۵μg)، سفوتاکسیم (۳۰μg)، سفالوتین (۳۰μg)، سفتریوکسیم (۳۰μg) استفاده گردید.

روش Combined Disc Test: جهت انجام این تست، باکتری ها بر روی محیط مولر هیتون کشت داده شده و دیسک سفوتاکسیم (۳۰μg)، در مقابل دیسک ترکیبی سفوتاکسیم - کلاولانیک اسید (۳۰μg + ۱۰μg) همچنین دیسک های سفنازیدیم، سفپیم و سفتریاکسون 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

سوم و مونوباکتام شده اما توسط مهار کننده های بتالاکتامازها از جمله کلاولانیک اسید مهار و از پلاسمیدهای کد کننده خانواده TEM, SHV, OXA و منشأ می گیرند (۷۸). ESBL های تیپ OXA-2 و OXA-10 جز گروه D امیلر 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 اسپیتوباکتر 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 ایزوله های اسپیتوباکتر بومانی به آنتی بیوتیک های بتالاکتاماز از جمله سفتریوکسیم، سفنازیدیم، سفوتاکسیم، ازترونام، مروپنم، سفیکسیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم مقاوم و تمام ایزوله ها به کلیستین و ۸۴/۸٪ سوبه ها به پلی میکسین B حساس بودند (۱۴). در مطالعه ای که Shahcheraghi و همکارانش انجام دادند بیشتر سوبه های اسپیتوباکتر به سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفنازیدیم و سفکسیم مقاومت بالایی داشتند ولی ۹۵/۸٪ سوبه ها به کلیستین حساس بودند (۱۵). در مطالعه Hujer و همکاران که بر روی ۷۵ سوبه اسپیتوباکتر 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٪، جنتامیسین ۷۸٪ و کوتریموکسازول ۸۲/۳٪ گزارش شده است (۱۷). این مطالعات نشانگر تفاوت در نوع و میزان شیوع مکانیسم های مقاومت دارویی 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).

متأسفانه مطالعات در مورد شیوع ژن های مقاومت نظیر OXA-2 و OXA-10 در ایزوله های اسپیتوباکتر بومانی 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

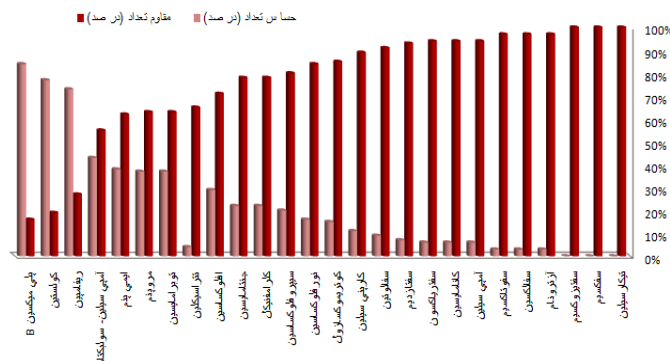
جامعه مورد بررسی و نمونه ها: این مطالعه مقطعی طی یک دوره ۶ ماهه از مهر تا اسفند ۸۹ انجام گرفت، تعداد ۱۰۰ ایزوله اسپیتوباکتر بومانی که از

نمودن گلوکز در محیط (اکسید تیوفرمیتانید) 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 اسیتوباکتریومانی مورد بررسی، تراشه (۳۷٪)، ادرار (۲۱٪)، خلط (۹٪)، خون (۷٪)، کاتتر (۶٪)، شستشوی بروش (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 بیوتیک های Cefixim (۱۰۰٪)، Ceftizoxim (۱۰۰٪) و ticarcilin (۱۰۰٪) بود در حالیکه بیشترین حساسیت به ترتیب در برابر آنتی بیوتیک های polymixinB (۸۴٪)، colistin (۷۷٪) و rifampin (۷۳٪) مشاهده گردید (نمودار شماره ۱).

نتایج روش Combined Disc Test: از میان ۱۰۰ ایزوله اسیتوباکتریومانی، 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 ۸۳٪ 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 باندهای محدوده ۴۵۶ bp، برای ژن INT-1، ۷۷۴ bp، برای ژن OXA-10 و ۴۸۵bp برای ژن OXA-2 آشکار گردیدند (شکل ۲-۴). کلیه موارد مثبت OXA-10 و OXA-2 دارای ژن INT-1 نیز بودند.



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



شکل ۱. نتایج Combined Disc در روی محیط کشت مولر هیتون آگار

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 اسیتوباکتریومانی 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 شامل ۲۲ 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 ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها (annealing) در ۵۵ درجه به مدت ۱ دقیقه، تکثیر (extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی (final extension) در 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 پرایمرها (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 سایز مارکر 1kb DNA Ladder (شرکت Fermentase) استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی پرایمر	اندازه درجه حرارت	
		اتصال	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'-GCATCCTCGGTTTCTGG-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 ۱۴ سال و حداکثر ۸۷ سال و میانگین سنی ۵۲±۶ 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 اسیتوباکتریومانی را داشتند.

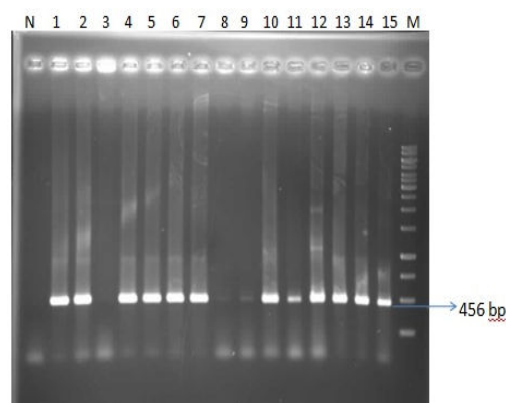
جداسازی اولیه باکتری: ۱۰۰ ایزوله اسیتوباکتریومانی مورد استفاده با استفاده از تست های بیوشیمیایی استاندارد مورد بررسی و تأیید قرار گرفتند که از جمله این تست ها، توانایی استفاده از سیترات به عنوان تنها منبع کربن، اکسید

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه بیشترین میزان ایزوله های اسیتوباکتر 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 اسیتوباکتر از بیماران نشان داد که ارتباط معنی داری بین مدت بستری در بیمارستان و ابتلا به عفونت اسیتوباکتر 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 تیکارسلین، سفکسیم و سفتریзокسیم مقاوم بودند. این یافته ها با مطالعات قبلی تاحد زیادی سازگاری دارد. در مطالعه Sadeghi Fard و همکارانش تمام ایزوله های اسیتوباکتر بومانی به بیشتر آنتی بیوتیک های از جمله سفتریзокسیم، سفنازیدیم، 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). همچنین در بررسی Shahcheraghi و همکارانش بیشتر سویه ها به سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفنازیدیم و سفکسیم مقاوم 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 متأسفانه 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 اسیتوباکتر بومانی در بیمارستان ابن سینا آنکارا در ترکیه انجام شد، میزان مقاومت نسبت به ایمی پنم ۵۶/۶٪، سیپروفلوکساسین ۷۴٪، جنتامایسین ۷۸٪ و کوتریموکسازول ۸۲/۳٪ گزارش شده است (۱۷) این در صدها در مطالعه ما به ترتیب ۶۲، ۸۰، ۷۸ و ۸۵٪ بودند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تولید ESBL از لحاظ فنوتیپی در ۶۰٪ ایزوله های مورد بررسی مثبت بود. این یافته نشانگر انتشار بالای مقاومت از نوع ESBL در سویه های اسیتوباکتر بومانی مورد بررسی می باشد. بررسی با PCR نشان داد که از میان ۶۰ ایزوله ESBL مثبت، ژن OXA-10 در ۸/۳٪ موارد و ژن OXA-2 در ۱۱/۶٪ مثبت ایزوله ها بودند.

بتالاکتامازهای تیپ OXA که به اگزاسیلینازها 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 آگاسیلین و کلگساسیلین تمایز می یابند (۱۹ و ۲۰). 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 آئروجنوای 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 اسیتوباکتر وجود ندارد. اغلب ژن های آگاسیلینازها روی ترانسپوزون، پلاسمید و یا روی اینتگرون واقع شده اند که سبب انتشار جهانی آن ها گردیده است (۲۰ و ۸۰). این عناصر در اسیتوباکتر بومانی عامل انتقال افقی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی می باشند (۲۳). انتقال افقی اینتگرون ها موفق ترین راه انتشار ژن های مقاومت و

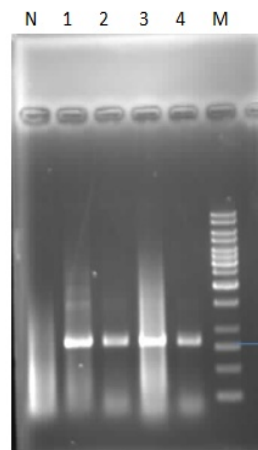


شکل ۲. نتایج PCR ژن INT-1 سویه های اسیتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضا شهر تبریز در سال ۸۹

NO DNA : N 1 kb ladder : M

۱۰-۱۵: ۷-۱۲، ۴-۱: ایزوله های اسیتوباکتر بومانی دارای ژن INT-1

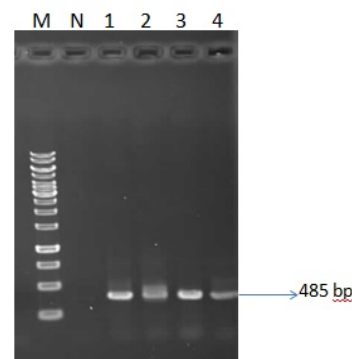
۳، ۸، ۹: ایزوله های اسیتوباکتر بومانی فاقد ژن INT-1



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

NO DNA : N 1 kb ladder : M

۴، ۱۲، ۳، ۴: ایزوله های اسیتوباکتر بومانی دارای ژن OXA-10



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

NO DNA : N 1 kb ladder : M

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

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.

پیدایش گونه هایی با مقاومت چندگانه (MDR= multi- drug resistant) 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).

Detection of Prevalence of OXA-2 and OXA-10 Type ESBL and Class I Integron among *Acinetobacter Baumannii* 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 ticarcillin (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

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 in critically 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 β -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]

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 β -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.