

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

اعظم رحیم زاده (MSc)<sup>۱</sup>، صفر فرج نیا (PhD)<sup>۲\*۳</sup>، احمدعلی پور بابائی (PhD)<sup>۴</sup>، خلیل انصارین (MD)<sup>۵</sup>

محمد رضا ذوالفقاری (PhD)<sup>۱</sup>، نوشین مسعودی (MSc)<sup>۳</sup>

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

### خلاصه

**سابقه و هدف:** اسینتوباکتر جزء باکتری‌های گرم منفی، هوایی، 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 سویه‌های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضا شهر تبریز می‌باشد.

**مواد و روشهای:** این مطالعه مقطعی بر روی ۱۰۰ نمونه اسینتوباکتر بومانی که طی سالهای ۸۸-۸۹ 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 دیفیوژن تعیین شد. جهت تایید تولید ESBL در ارگانسیم‌های غربالی از روش Combined Disc استفاده شد و جهت تعیین حضور ژنهای INT-1 و OXA-10 و OXA-2 مثبت بودند. بررسی از نظر وجود ژن اینتگرون کلاس یک 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 Ceftizoxim (۱۰۰٪)، ticarcilin (۷۷٪)، colistin (۸۴٪)، polymyxinB (۷۷٪) و refampin (۷۳٪) مشاهده گردید. نتایج PCR نشان داد از میان ۶۰ ایزوله ESBL مثبت، ژن 2 در ۷ مورد (۱۱٪) و ۱۰-OXA در ۵ مورد (۸٪) مثبت بودند. بررسی از نظر وجود ژن اینتگرون کلاس یک نشان داد که ۷۳٪ کل ایزوله‌ها دارای ژن INT-1 می‌باشند.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان‌گر فراوانی ESBL های تیپ 2-OXA و 10-OXA و اینتگرون های کلاس I در ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی مورد بررسی بود. بنابراین اتخاذ تدبیر مناسب جهت پیشگیری از انتشار سویه‌های مقاوم ضروری بنظر می‌رسد.

**واژه‌های کلیدی:** اسینتوباکتر بومانی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، 2-OXA، 10-OXA و INT-1

### مقدمه

اسینتوباکتر جزء باکتری‌های گرم منفی، غیر تخمیری، هوایی اجباری و به صورت کوکسی یا کوکوباسیل است که عموماً در خاک، آب و فاضلاب یافت می‌شود (۱). اسینتوباکتر بومانی نسبت به انواعی از آنتی بیوتیک‌ها داری مقاومت ذاتی بوده و بعنوان یکی از مهمترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و باکتریمی در بیمارستان‌ها در نقاط مختلف دنیا شناخته شده است (۲). یکی از مشکلات موجود در مورد اسینتوباکتر بومانی ظهور سویه‌های با مقاومت چند داروئی است که به کلاسه‌های مختلف آنتی بیوتیک‌ها نظیر b-lactam،

fluoroquinolone ها و aminoglycoside ها و fluoroquinolone ها مقاومند (۳). این مقاومتها اغلب با واسطه ژنهایی صورت می‌گیرد که بر روی عناصر ژنتیکی متحرك مثل تانسپوزون ها و اینتگرون ها قرار داشته و به سادگی در میان باکتری‌ها انتشار می‌یابند (۴). آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامز بر اساس ساختار اولیه شان در ۴ کلاس A-D Extended طبقه‌بندی می‌شوند (۵) بتالاکتامازها وسیع الطیف (-) شامل گروه A و دسته‌ای از بتالاکتامازهای D هستند که موجب هیدرولیز سفالوسپورین‌های نسل اول، دوم،

□ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۹۰/۱۸ مرکز تحقیقات بیماریهای سل و ریه دانشگاه علوم پزشکی تبریز می‌باشد.

\* مسئول مقاله:

نمونه های بالینی مختلف شامل تراشه، خلط، ادرار، خون، کشت زخم، مایع آسیت، مایع پلور، کاتری، 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 آکار 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 دیبلوکوکسی های گرم منفی با تست اکسیداز بررسی شدند. در مرحله بعد نمونه های اکسیداز منفی با استفاده از تست های بیوشیمیابی، مانند حرکت، تست سیترات و کشت بروی محیط (Oxidativd) حاوی قند گلوكز و رشد در دمای ۴۲-۴۴ درجه Fermenpapive, OF سانتیگراد بررسی شده و تعیین هویت قطعی انجام شد.

**بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزووله ها:** از تمام نمونه های بدست آمده تست آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفوژن آکار 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 سوپ استریل در کنار شعله از سوسپانسیون باکتری برداشت نموده و بر سطح محیط کشت مولرھیتون آکار 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.<sup>(۹)</sup>

**آنتی بیوتیک های مورد استفاده:** در این مطالعه ۲۵ دیسک مختلف آنتی بیوتیک (Mast و پادتن طب) شامل آنتی بیوتیک های تتراسیکلین (۳۰ µgr)، سفتازیدیم (۳۰ µgr)، سفترياکسون (۳۰ µgr)، سفالکسین (۳۰ µgr)، سپروفلوکساسین (۳۰ µgr)، کوتريموکسازول (۲۵ µgr)، کاناامیسین (۳۰ µgr)، تیکارسلین (۱۰ µgr+۷۵)، پلی میکسین B (۳۰ µgr)، توبرامايسین (۱۰ µgr)، کلرامفینیکل (۳۰ µgr)، نورفلوکساسین (۱۰ µgr)، افلوکساسین (۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ µgr)، جنتامیسین (۱۰ µgr)، آمپی سیلین (۱۰ µgr)، کاربین سیلین (۱۰۰ µgr)، ریفارپین (۵ µgr)، کولیستین (۱۱ µgr)، سفکسیم (۵ µgr)، سفوتاکسیم (۳۰ µgr)، سفالوتین (۳۰ µgr)، سفتازیوکسیم (۳۰ µgr)، در مقابل روش Combined Disc Test: جهت انجام این تست، باکتری ها بر روی محیط مولر هیتتون کشت داده شده و دیسک سفوتاکسیم (۳۰ µgr)، در مقابل دیسک ترکیبی سفوتاکسیم - کلاولانیک اسید (۱۰ µg+۳۰ µg)، همچنین دیسک های سفتازیدیم، سپیم و سفترياکسون 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 مشتب شدن تست و تایید نهایی تولید ESBL در نظر گرفته شد.

**استخراج DNA:** برای استخراج DNA از روش فنل کلروفرم استفاده شد که ابتدا ایزووله ها را در محیط (Luria Bertani, LB) (مایع به مدت یک شب کشت داده و پس از سانتریفیوژ باکتری ها در بافر لیز کننده حاوی SDS- Protease 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 سانتریفیوژ شد. مایع رویی به لوله اپندرف جدید منتقل و DNA موجود در نمونه با استفاده از ایزوپروپانول

سوم و مونویاکتان 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 (۱۰). ESBL های تیپ ۲ OXA-10 و OXA-2 جز گروه D (ESBL) امبلر طبقه بندی می شوند (۹) و ژن های رمز کننده این آنزیم ها (ESBL) ممکن است روی کروموزوم، پلاسمید، ترانسپوزن 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 متدائل در ایزووله 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 (۱۱-۱۳).

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 تهران انجام دادند، تمام ایزووله های اسینتوباکتر بومانی به آنتی بیوتیک های ساده. در مطالعه ای که Shahcheraghi و همکارانش انجام دادند بیشتر سویه های اسینتوباکتر به سفترياکسون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفکسیم مقاومت بالایی داشتند ولی ۸۵٪ 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 چنگ عراق و افغانستان صورت گرفت گرفت گیش از ۸۰٪ ایزووله ها نسبت به سفالوسپرینهای با طیف وسیع و ۲۰٪ به ایمی پنم مقاوم بودند (۱۶). در مطالعه Akan در بیمارستان این سینای آنکارا، میزان مقاومت نسبت به ایمی پنم ۵۶٪، سپروفلوکساسین ۷۴٪، جنتامیسین ۷۸٪ و کوتريموکسازول 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 ایزووله های اسینتوباکتر 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 OXA-2 ESBL های تیپ ۱۰ 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 ایزووله اسینتوباکتر بومانی که از

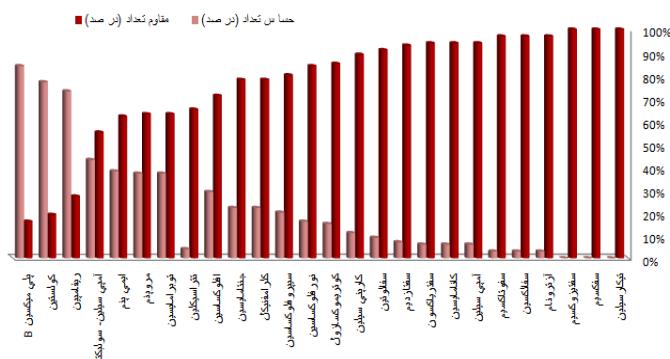
نمودن گلوكز در محیط (اکسید تیوفرمانتانید) OF، اکسیداز منفی، اندول منفی، سولفید هیدروژن منفی، لیزین دکربوکسیلاز منفی، قدرت تحرک و رشد بر روی محیط مکانیکی آکار در حرارت ۴۲ درجه سانتیگراد و ONPG منفی بودند. از مجموع ۱۰۰ ایزوله اسپیتووباکتروبومانی مورد بررسی، تراشه (٪۳۷)، ادرار (٪۲۱)، خلط (٪۹)، خون (٪۷)، کاتتر (٪۶)، شستشوی برونش (٪۶)، کشت زخم (٪۵)، نمونه آبese (٪۳)، مایع پلور (٪۲)، مایع آسیت (٪۲) و مایع مغزی- نخاعی (٪۲).  
گذاش. گردید.

نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها: بررسی ها نشان داد که در میان ایزوله های مورب بررسی بیشترین مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های Cefixime (۱۰۰٪)، Ceftizoxim (۱۰۰٪) و ticarcillin (۱۰۰٪) بود در حالیکه بیشترین حساسیت به ترتیب در برابر آنتی بیوتیک های polymyxinB (۸۴٪)، colistin (۷۷٪) و rifampin (۷۳٪) مشاهده گردید (نمودار شماره ۱).

**نتایج روش Combined Disc Test:** از میان ۱۰۰ ایزوله اسینتو باکتریومانی،

۶۰. ایزوله با این روش به عنوان ESBL مثبت تایید گردیدند (شکل ۱).

نتایج تکثیر ژن های bla<sub>OXA</sub> 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٪ مشیت گردیده و منجر به تولید محصولات در اندازه های مورد نظر شد که در الکتروفورز بر روی ژل آگاروز به صورت باندی در محدوده ۴۵۶ bp، برای ژن INT-1 ۷۷۶ bp برای ژن OXA-10 و OXA-2، ۴۸۵bp برای ژن OXA-2 آشکار گردیدند (شکل ۲-۴). کلیه موارد مشیت OXA-2 و OXA-10 دارای ژن INT-1 نیز بودند.



نودار 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 مولر هینتون آگار

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

تکثیر ژن های bla<sub>OXA</sub> و INT-1 به روش PCR استخراج شده از سویه های اسپینوتابکتر 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 شامل ۲۲ میکرولیتر Master mix و ۱ میکرولیتر ng DNA استخراج شده، ۱۰ پیکو مولار از هر یک از (در حجم ۱ میکرولیتر) پرایمرهای 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) ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرهای extension) ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، تکثیر (annealing) 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 ۲ OXA-1 و INT-1 مشابه بود. برنامه فوق بوده با این تفاوت که اتصال پرایمرهای annealing) 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 پرایمرهای extension) در ۵۸ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر (annealing) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه بود. محصولات PCR در ژل آکاروز ۱٪ با ولتاژ ۹۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شده پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم برومواید (۰.۵ میکروگرم بر میلی لیتر) در دستگاه Gel Document Bandehای PCR از مربوطه مشاهده و عکس برداری شدند. جهت تعیین اندازه محصول PCR از سایز مارک 1kb DNA Ladder (Fermentase شرکت PCR استفاده شد.

## جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر

## ژن های bla<sub>OXA</sub> و INT-1

اندازه باند	درجه حرارت اتصال	توالي نوكليوتيدی پرایمر	پرایمر
OXA-10-F	5'-TATCGCGTGTCTTCGAGTA-3'	55 °C	774 bp
OXA-10-R	5'-TTAGGCCACCAATGATGCC-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٪) مذکور و ۲۸ نفر (۲۸٪) مونث بودند. از نظر سنی بیماران حداقل دارای سن ۱۴ سال و حداً کثر ۸۷ سال و میانگین سنی  $52 \pm 6$  سال بود. از نظر بخش بستره بخش ICU مغز با ۱۷٪ و بخش اورولوژی و اورژانس عفونی با ۱٪ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان جداسازی استیتوپاکتور هومانی را داشتند.

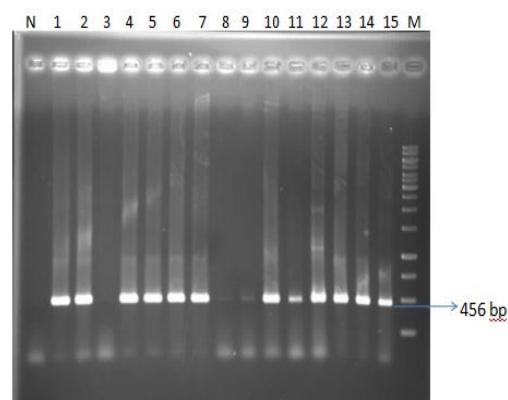
**جداسازی اولیه باکتری:** ۱۰۰ آیزوله اسپیتوبیاکتر بومانی مورد استفاده با استفاده از تست های پیوژنیمایی استاندارد مورد بررسی و تائید قرار گرفتند که از جمله این تست ها، تئانایی، استفاده از سیستمات به عنوان، تنها منبع کریز، اکسید

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه بیشترین میزان ایزوله های اسینتوباکتر بومانی از تراشه (۳۷٪) و ادار (۲۱٪) و کمترین میزان آن مریوط 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 ریفارمپین حساس بودند، اما همه سویه ها در برابر تیکارسیلین، سفکسیم و سفینزوکسیم مقاوم بودند. این یافته ها با مطالعات قبلی تا حد زیادی سازگاری دارد. در مطالعه Sadeghi Fard و همکارانش تمام ایزوله های اسینتوباکتر بومانی به بیشتر آنتی بیوتیک های از جمله سفینزوکسیم، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، ازترونام، مژرونپم، 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، 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 اینمی پنم مقاوم بودند (۱۶) در حالیکه در مطالعه ما مقاومت به اینمی 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 اسینتوباکتر بومانی در بیمارستان این سینای آنکارا در ترکیه انجام شد، میزان مقاومت نسبت به اینمی پنم %۵۶/۶، سپیروفلوکسازین %۷۴، جنتامایسین %۷۸ و کوتربیوموکسازول %۸۲/۳ گزارش شده است (۱۷) این در صدها در مطالعه ما به ترتیب %۶۰، %۸۰ 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 اسینتوباکتر 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.

بالتاکتاماژهای تیپ OXA که به اکر اسیلینازها نیز مشهور هستند گروهی از ESBL ها هستند که باکتری را به آمپی سیلین و سفالوپین مقاوم می کنند و با فعالیت هیدرولیتیکی بالا در مقابل اگسالسیلین و کلوگاسالسیلین تمایز می یابند (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 سودomonas آفروجنوزای جداسازی شده از کشورهای ترکیه و فرانسه به دست آمده است که از OXA-2 و OXA-10 از نوع ESBL که از منشا OXA-2 یا OXA-10 متأسفانه بررسی های زیادی در مورد شیوع ژن OXA-10 و OXA-2 در اسینتوباکتر وجود ندارد. اغلب ژن های اگسالسیلینازها روی ترانسپوزون، پلاسمید و یا روی اینتگرون واقع شده اند که سبب انتشار جهانی آن ها گردیده است (۲۲). 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



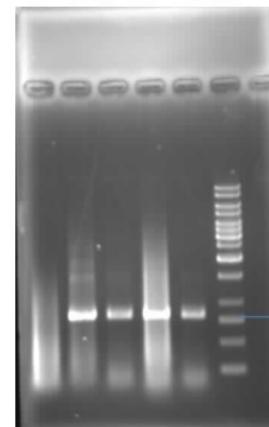
شکل ۲. نتایج PCR ژن INT-1 سویه های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضا شهر تبریز در سال ۸۹

M : سایز مارکر N : NO DNA

۱۰-۱۵: ایزوله های اسینتوباکتر بومانی دارای ژن INT-1

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

N 1 2 3 4 M

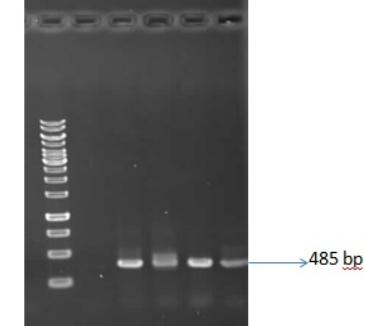


شکل ۳. نتایج PCR ژن OXA-10 سویه های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضا شهر تبریز در سال ۸۹

M : سایز مارکر N : NO DNA

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

M N 1 2 3 4



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

M : سایز مارکر N : NO DNA

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

نتایج این مطالعه نشانگر شیوع بالای اسیتوباکتر در بیماران بوده و این باکتری به عنوان یکی از عوامل بروز عفونت‌های بیمارستانی با پتانسیل ایجاد مقاومت نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیکها مطرح می‌باشد. فراوانی ژن ایتنگرون کلاس یک در سویه‌های اسیتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بستری بالا می‌باشد و با توجه به اینکه ژن‌های مقاومت مثل 2-OXA و 10-OXA بر روی عناصر ژنتیکی متحرک مثل ایتنگرون‌ها قرار دارند، می‌توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند. لذا شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از اهمیت بالایی برخوردار بوده و شناسایی و تعیین شیوع این ژن‌ها جهت اجرای برنامه‌های کنترل عفونت و ممانعت از انتشار سویه‌های مقاوم ضروری می‌باشد.

### 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 می‌گردد.

پیدایش گونه‌هایی با مقاومت چندگانه (multi-drug resistant =MDR) است. نشان داده شده است که اغلب گونه‌های جدا شده از بیماران و محیط بیمارستان با ویژگی مقاومت چندگانه، دارای ژن ایتنگرون کلاس I هستند (۲۴). در این بررسی غربال سویه‌ها برای ژن INT-1 با PCR نشان داد که این ژن در ۷۳٪ کل ایزووله‌ها مثبت بود. در بررسی Gomacb و همکارانش از ۳۶ ایزووله اسیتوباکتر بومانی، ۱۶ ایزووله (۴۴٪) حاوی ایتنگرون کلاس I بودند (۲۵). در بررسی Huang و همکارانش ۷۱/۳۷٪ ایزووله‌ها حاوی ایتنگرون کلاس I بودند (۱۳). در بررسی دیگری که در تایوان توسط Lin و همکارانش انجام شده از ۱۳۴ ایزووله اسیتوباکتر ۷۳ ایزووله (۵۴٪) حاوی ایتنگرون کلاس I بودند (۲۳). مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعات دیگر حاکی از شیوع نسبتاً بالاتر ایتنگرون در ایزووله‌های مطالعه ما می‌باشد. همچنین نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ایزووله‌هایی که حاوی ایتنگرون بودند مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی را نسبت به ایزووله‌هایی که فاقد ایتنگرون هستند از خود نشان می‌دهند و انتقال افقی ژن‌های مقاومت وسیله‌ای مهم برای افزایش انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط بیمارستان می‌باشد (۲۳).

## 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)<sup>1</sup>, S. Farajnia (PhD)<sup>2,3\*</sup>, A.A. Pourbabae (PhD)<sup>4</sup>, Kh. Ansarin (MD)<sup>2</sup>, M.R. Zolfaghari (PhD)<sup>1</sup>, N. Masoudi (MSc)<sup>3</sup>**

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 3<sup>rd</sup> 2011, Revised: Feb 8<sup>th</sup> 2012, Accepted: May 2<sup>nd</sup> 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

- 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.
- Munoz Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med* 2008;358(12):1271-81.
- 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.
- 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.
- 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.
- Helfand MS, Bonomo RA. Beta lactamases: a survey of protein diversity. *Curr Drug Tages Infect Disord* 2003;3(1): 9-23.
- 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.
- Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β- lactamases. *N Engl J Med* 2005;352(4):380-91.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sadeghfard 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]
- Shahcheraghi F, Akbari Shahmirzadi N, Abbas Alipour Bashash M, Jabbari H, Amir Mozafari N. Detection of bla<sub>CTX</sub>,bla<sub>TEM</sub> beta-lactamase genes in clinical isolates of *acinetobacter* spp. from selected Tehran hospitals. *Iran J Med Microbiol* 2009;3(1):1-9. [in Persian]
- 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.
- Akan OA. Antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* isolate: data from Ibni Sina hospital for the year 2002. *Mikrobiyol Bul* 2003;37(4):241- 6.
- 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.