www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 59, No. 1 P: 26-34
Mar-Apr 2016

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۵۹، شماره ۱
فروردین-اردیبهشت ۹۵، صفحه ۲۶-۳۴

مقاله اصلی

بررسی شیوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف OXA-2 و OXA-10 در سویه های اسینتوباکتر ایزوله شده از بیماران شهر زاهدان

تاریخ دریافت: ۹٤/۱۰/۲٦- تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۲/۱۳

[۱] محمد بکاییان
[۲] شهرام شهرکی*
[۳] جان محمد رئیسی
[۴] فرزانه محمدزاده رستمی

۱-دانشیار بیماری های عفونی و گرمسیری، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری ، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۲- استادیار بیماری های عفونی و گرمسیری، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری ، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۳،۴- کارشناس ارشد، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

* مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
تلفن: ۰۹۱۵۱۴۱۱۳۳۹
Email: shahram17ir@yahoo.com

خلاصه

مقدمه

مهم ترین عامل مقاومت به آنتی بیوتیک های خانواده بتالاکتام در اسینتوباکترها، تولید آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) می باشد و OXA یکی از شایع ترین این آنزیم ها است. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) تیپهای OXA-2 و OXA-10 در سویه های اسینتوباکتر جدا شده از بیماران شهر زاهدان می باشد.

روش کار

این مطالعه توصیفی مقطعی بر ۱۰۰ نمونه اسینتوباکتر که طی سالهای ۹۲-۹۳ از بیماران در شهر زاهدان جداسازی شده بودند، انجام شد. تست های 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 در ایزوله ها، نمونه DNA باکتریها استخراج گردیده و با روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. اطلاعات با نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

نتایج بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها نشان داد که بیشترین مقاومت به ترتیب در برابر آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، اگزاسیلین(۱۰۰٪)و سفوتاکسیم ، سفکسیم (۹۹٪) بوده در حالی که بیشترین حساسیت در برابر آنتی بیوتیک کولسیتین (۹۳٪)مشاهده گردید. نتایج PCR نشان داد از میان۲۴ ایزوله ESBL مثبت، ژن OXA-2 در ۵ مورد (۲۰/۸٪) و OXA-10 در ۴ مورد (۱۶/۶۶٪) مثبت بودند.

نتیجه گیری

در این مطالعه، سویه های اسینتوباکتر به آنتی بیوتیکهای مختلف مقاومت بالا یی داشتند .با توجه به اهمیت این باکتری در عفونت های بیمارستانی اعمال اقداماتی در جهت جلوگیری از پراکندگی این باکتری ضروری می باشد و نتایج این مطالعه نشانگر فراوانی ESBL های تیپ OXA-2 و OXA-10 در ایزوله های اسینتوباکتر مورد بررسی بود. بنابراین اتخاذ تدابیر مناسب جهت پیشگیری از انتشار سویه های مقاوم ضروری بنظر می رسد.

کلمات کلیدی: اسینتوباکتر ، مقاومت آنتی بیوتیکی ، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، OXA-2 ،OXA-10 ، زاهدان

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

مقدمه

گونه های اسینتوباکتر، کوکوباسیل های گرم منفی، غیر تخمیری و هوازی بوده که به طور وسیعی در محیط بیمارستان پراکنده و پاتوژنهای مهم فرصت طلب و مسئول عفونت های بیمارستانی مختلفی میباشند(۱). در سال های گذشته گونه های اسینتوباکتر نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها مقاوم گردیده انداسینتوباکترها توانایی زیادی برای توسعه سریع مقاومت آنتی بیوتیکی داشته که منجر به مقاومت چند دارویی شده است (۲،۳).

یکی از مشکلات موجود در مورد اسینتو باکتر ها ظهور سویه های با مقاومت چند دارویی است که به کلاس های مختلف آنتی بیوتیکی مانند β-lactamها ،aminoglycosideها و fluoroquinoloneها مقاومند(۴). بتالاکتامازها آنزیم هایی هستند که حلقه بتالاکتام را باز کرده و آنتی بیوتیک را غیر فعال می سازند.(۶و۵) طبق تقسیم بندی آمبلر بتالاکتامازها بر اساس ساختار اولیه شان به۴ دستهَ (A تا D) تقسیم بندی می شوند.بتالاکتامازهای نوع A،CوD سرین بتالاکتامازبوده و نوع B، متالوبتالاکتاماز است. فراوانی انواع AوC بیشتر از دو نوع دیگر می باشد کلاس A: باعث هیدرولیز پنی سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌شود.

کلاس B: متالوبتالاکتامازهای وابسته به روی (zn) می‌باشد که قادر به هیدرولیز کارباپنم‌ها بوده و در باکتری‌هایی مانند *سراشیامارسسنس* و *سودوموناس آئروژینوزا* گزارش شده‌اند. کلاس B بر اساس تفاوت آمینواسیدی که در جایگاه فعال این آنزیم‌ها وجود دارد به ۳ زیر کلاس B_1، B_2، B_3 تقسیم می‌شود

کلاس C: که از آنها می‌توان به Ampc بتالاکتامازها اشاره نمود که توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌ها و سفومایسین‌ها را دارند . کلاس D: بتالاکتامازهایی با قدرت هیدرولیز فراوان مثل OXA[1] بر علیه کلوکسازین ها و اکساسیلین‌ها هستند(۷).

بتالاکتامازها بر اساس طیف سوبسترا وپاسخ به مهار کننده،به گروه های عملکردی مختلفی دسته بندی می شوند (۸). بتالاکتاماز وسیع الطیف یا (ESBLs)[2] شامل گروه A و دسته ای از بتالاکتامازهای Dهستند که موجب هیدرولیز سفالسپورین های نسل اول،دوم،سوم و مونوباکتام شده اما توسط مهارکننده های بتالاکتامازها از جمله کلاولانیک اسید مهار و از پلاسمید های کد کننده خانواده SHV، TEMو OXA منشا می گیرند(۹،۱۰). تا به امروز بیش از ۱۵۰ نوع ESBLs متفاوت شناسایی شده است (۱۱). ESBLهای تیپ OXA-2و OXA-10جزو گروه D امبلر طبقه بندی می شوند(۱۲).

آنزیم های OXA دسته ای از آنزیم های بتالاکتاماز هستند که آنتی بیوتیک های خانواده اگزاسیلین را هیدرولیز می کنند. اخیرا این آنزیم ها به فراوانی در بین سویه های مختلف باکتری اسینتوباکتر انتشار یافته اند. این آنزیم ها همچنین توانایی هیدرولیز آنتی بیوتیک های خانواده کارباپنم را نیز دارند. با توجه به اینکه این آنتی بیوتیک ها از جمله آنتی بیوتیک های کارامد برای درمان عفونت های حاصل از این عفونت ها می باشند لذا مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ها خطری بزرگ محسوب می شود (۱۳).

با توجه به اهمیت اسینتو باکتر در ایجاد عفونت های بیمارستانی و اهمیت بتالاکتامازها در ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتامی وبا توجه به اینکه تا کنون مطالعه ای در این زمینه در شهرستان زاهدان صورت نگرفته بود، هدف از این مطالعه استفاده از آزمون PCR فراوانی ژن های OXA-2 و OXA-10 را در سویه های اسینتوباکتر جدا شده از بیماران در شهر زاهدان است.

روش کار

در این مطالعه مقطعی توصیفی در مجموع ۱۰۰ نمونه از نمونه های بالینی مختلف که طی دی ماه ۹۱ تا تیر ماه ۹۲ از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های خاتم الانبیاء (ص)، علی بن ابیطالب (ع) و بوعلی شهر زاهدان جمع آوری شدند. از این بین ۱۰۰ نمونه، ۴۵ نمونه (۴۵٪) از بیماران بیمارستان خاتم الانبیاء (ص)، ۵۳ نمونه (۵۳٪) از بیماران بیمارستان علی ابن ابیطالب (ع) و ۲ نمونه (۲٪) از بیماران بیمارستان بوعلی جداسازی شد. معیار خروج افراد از مطالعه عدم مثبت شدن کشت باکتریایی آن است.

[1] Oxacillinase
[2] Extended Spectrum β-Lactamases

نمونه های بالینی پس از انتقال به آزمایشگاه بر محیط مک کانکی و بلاد آگار کشت داده شد و پلیت ها در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند. در صورت مشاهده رشد، پس از رنگ آمیزی و مشاهده کوکوباسیل 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 بر روی محیط OF حاوی قندگلوکز و رشد در دمای ۴۲-۴۴ درجه سانتیگراد بررسی شده و تعیین هویت قطعی انجام شد.

جهت انجام تست آنتی‌بیوگرام ابتدا سوسپانسیون باکتریایی معادل غلظت نیم مک‌فارلند تهیه شد. به این صورت که چندکلنی خالص *آسینتوباکتر*را در لوله‌های ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل تلقیح کرده، سپس لوله‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا به کدورت مورد نظر برسند (کدورت معادل نیم مک فارلند). در مرحله بعد به کمک سواپ پنبه‌ای استریل بر روی محیط مولرهینتون‌آگار کشت داده و پس از گذشت چند دقیقه ، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بر آن قرار گرفتند و در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه گردید. قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه‌گیری و تفسیر آن با توجه به استانداردهای(CLSI) [1] انجام گرفت و بر حسب قطر هاله عدم رشد، ایزوله‌ها به ۳ گروه حساس، حد متوسط و مقاوم تقسیم‌بندی شدند.

حساسیت سویه های میکروبی به روش کربی باوئر [2] بااستفاده از دیسک های سیپروفلوکساسین (5µg)، سفتازیدیم (30µg)، سفتریاکسون (30µg)، سفوتاکسیم (30µg)، جنتامایسین (10µg)، آمپی سلین(۱۰µg)،کولیستین(۱۱۰µg)، سفکسیم(۵ µg)، ایمی پنم(10µg)، اگزا سیلین (1 µg)، آزترونام (30µg) مورد سنجش قرار گرفت (۱۴). در هر یک از سنجش های حساسیت از اسینتوباکتر ATCC 19606 به عنوان کنترل کیفی تهیه و استفاده شد(۱۴). مقاومت همزمان به حداقل ۳ کلاس آنتی بیوتیکی به عنوان MDR در نظر گرفته شد(۱۵). جدایه ها توسط تست تاییدی تولید ESBL به روش دیسک ترکیبی (Combination Disk) با استفاده از دیسک های سفتازیدیم (30µg) و سفتازیدیم (30µg) /کلاولانیک اسید(10µg)، سفوتاکسیم (30µg) و سفوتاکسیم (30µg) /کلاولانیک اسید (10µg) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج طبق توصیه CLSI تفسیر گردید بدین صورت که اگر قطر هاله ممانعت از رشد دیسک ترکیبی معادل A≥5mm در مقایسه با قطر هاله ممانعت از رشد دیسک به تنهایی باشد ESBL مثبت در نظر گرفته شد(۱۵).

جهت استخراج DNA باکتری از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد .به این منظور چندین کلنی خالص باکتری در 5ml محیط کشت TSB (Tryptone Soya Broth) تلقیح و به مدت ۲۰ ساعت در انکوباتور شیکر دار ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت بعد از آن 1.5ml از محیط TSB در لوله های اپندورف ریخته شد و با دور 1800×gبه مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد مایع رویی کاملا تخلیه و رسوب با حدود ۰/۵ سی سی آب مقطر دیونیزه به خوبی ورتکس گردید محلول حاصل حدود ۱۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفت در پایان ۱۰ دقیقه در دور 1800×g سانتریفیوژ شد .محلول رویی به میکروتیوب منتقل و درب آن را بسته و تا زمان استفاده برای انجام PCR در فریزر -20ºC نگهداری نمودیم.

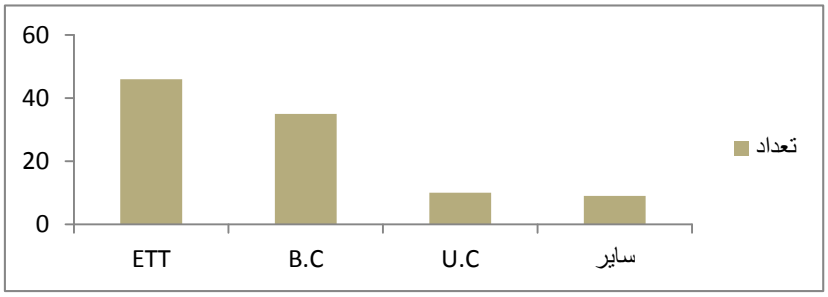
برای انجام PCR در این مطالعه از PCR PreMix ساخت شرکت BIONEER کره جنوبی استفاده شد. این میکروتیوب ها برای انجام PCR در حجم 20µl طراحی شده اند و حاوی مواد لازم برای انجام PCR به استثنای پرایمر، DNA الگو و آب مقطر به صورت لیوفیلیزه می باشند. برای انجام PCR، آب دوبار تقطیر شده، 1 µl پرایمر و DNA الگو را به میکروتیوپ‌های PreMix اضافه شد. توالی پرایمرهای مورد نیاز برای شناسایی ژن های OXA به شرکت تکاپوزیست (BIONEER کره جنوبی) جهت سنتز سفارش داده شده و پرایمر ها خریداری شد. توالی و اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

برنامه ترموسایکلر برای تکثیر ژن OXA-10 شامل: دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، سیکل اصلی با ۳۸ بار

[1] Clinical and Laboratory Standard Institue
[2] Kirby Bauer

جدول ۱- توالی و اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده

Gene type	Primer	Sequences (5 to 3)	درجه حرارت اتصال	Product size(bp)
OXA-2	OXA-2-F	AAGAAACGCTACTCGCCTGC	۶۰	Bla oxa-2 485bp
	OXA-2-R	CCACTCAACCCATCCTACCC		
OXA-10	OXA-10-F	TATCGCGTGTCTTTCGSGTA	۵۵	Blaoxa-10 774bp
	OXA-10-R	TTAGCCACCAATGATGCC		



نمودار ۱- توزیع فراوانی نوع نمونه ها

Endotracheal tube (ETT), Blood culture (BC), urine culture (UC)

تکرار شامل: دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه ،اتصال پرایمرها ۵۵درجه به مدت ۱ دقیقه ،تکثیر ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بود (۱۶). برنامه PCR برای ژن OXA-2 مشابه برنامه فوق بوده با این تفاوت که اتصال پرایمرها برای OXA-2 در ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه بود(۱۷). در نهایت به منظور الکتروفورز محصولات PCR از ژل آگاروز ۲٪ ساخت شرکت MERCK آلمان استفاده شد. پس از جمع آوری داده ها، نتایج حاصل در نرم افزار SPSS وارد شد و یافته ها در قالب جداول آماری ارائه شد.

نتایج

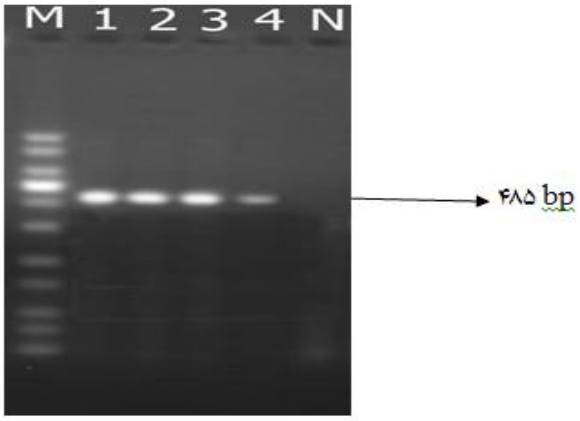
از بین این ۱۰۰ نمونه، از بیماران بیمارستان خاتم الانبیاء (ص) ۴۵ نمونه (۴۵٪) ، از بیماران بیمارستان علی ابن ابیطالب (ع) ۵۳ نمونه (۵۳٪) و ۲ نمونه از سایر بیمارستان ها جداسازی شد . ۴۶ نمونه از ETT (لوله تراشه) ، ۳۵ نمونه از کشت خون، ۱۰ نمونه از کشت ادرار و ۹ نمونه از سایر قسمت ها و بیشتر نمونه ها از بخش ICU ۸۳ نمونه و ۱۷ نمونه از دیگر بخش ها جدا گردید.

حساسیت سویه های میکروبی به روش کربی باوئر بر اساس معیار منتشر شده در موسسه استانداردهای آزمایشگاهی وبالینی (CLSI) به روش انتشار در دیسک مورد سنجش قرار گرفت و نتایج آزمون دیسک آگار دیفیوژن در جدول ۲ نمایش داده شده است.

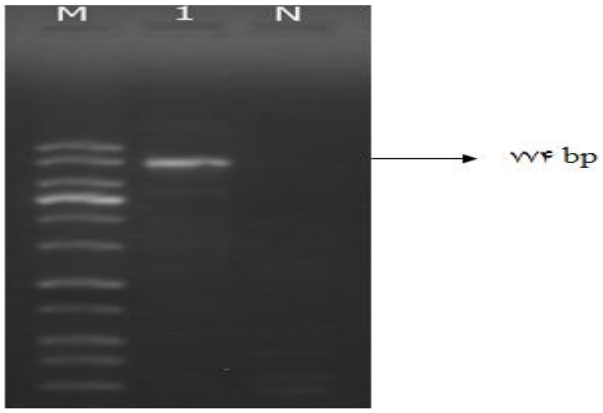
توزیع فراوانی سویه های اسینتوباکتر مولد ESBLs به تفکیک بیمارستان های مورد مطالعه و بخش های بیمارستانی مشخص شد.۲۴٪ نمونه ها ESBLs مثبت بودند که از۴۵ نمونه بیمارستان خاتم (ص) یک نمونه ESBLs مثبت بود (۲/۲٪) و از ۵۳ نمونه بیمارستان علی ابن ابیطالب (ع) ۲۱ نمونه ESBLs مثبت بود

جدول۲- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های آسینتوباکتر جدا شده از بیماران

آنتی بیوتیک	تعداد سویه های حساس (٪)	تعداد سویه های نیمه حساس(٪)	تعداد سویه های مقاوم (٪)
سیپروفلوکساسین	۲۱	۲	۷۷
سفتازیدیم	۱۲	۵	۸۳
سفتریاکسون	۱	۲	۹۷
سفوتاکسیم	۱	۰	۹۹
جنتامایسین	۳۰	۰	۷۰
آمپی سیلین	۰	۰	۱۰۰
کولسیتین	۹۳	۰	۷
سفکسیم	۱	۰	۹۹
ایمی پنم	۲۳	۰	۷۷
اگزاسیلین	۰	۰	۱۰۰
آزترونام	۲۳	۳	۷٤



شکل ۱- تصویر الگوی الکتروفورزی محصولات PCR ژن OXA-2



شکل ۲- تصویر الگوی الکتروفورزی محصولات PCR ژن OXA-10

(۳۹,۶٪) و از سایر بیمارستانها ۲ نمونه گرفته شده بود که هر دو ESBLs مثبت بودند (۱۰۰٪) . ۷۶ ٪ نمونه ها MDR که ۴۲ نمونه از بیمارستان خاتم الانبیاء (ص) و ۳۴ نمونه از بیمارستان علی ابن ابیطالب (ع) بودند.

نتایج حاصل از آزمون PCR برای یافتن ژن OXA-2 در بین سویه های مولد ESBLs نشان داد که این ژن در ۵ سویه وجود داشت و ۱۹ سویه هم فاقد این ژن بودند. شکل ۱ تصویر الگوی الکتروفورزی محصولات PCR ژن OXA-2 را نشان می دهد. نمونه N فاقد DNA ، نمونه M مارکر و نمونه های ۱ و ۲ و ۳ و ۴ نمونه های مثبت از نظر وجود ژن OXA-2 می باشند.

الکتروفورز محصولات PCR ژن *OXA-10* نشان داد که ۴سویه از بین ۲۴ سویه مولد ESBLs حامل این ژن بودند.و۲ سویه حامل هر دو ژن OXA-2 و OXA-10 بودند. شکل ۲ تصویر الگوی الکتروفورزی محصولات PCR ژن *OXA-10* را نشان می دهد.

۶۴ ٪ نمونه ها به تمام آنتی بیوتیک ها بجز کلستین مقاوم بودند و ۱۲٪ آنها به کولستین و جنتامایسین حساس و به بقیه آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند و ۹۵ ٪ آنها در بخش ICU و ۵ ٪ آنها از دیگر بخش های بیمارستانی جداسازی شدند.

بحث

اسینتوباکتر یک باکتری فرصت طلب است که در افراد با نقص ایمنی بستری در محیط های بیمارستانی بخصوص در بخشهای مراقبت ویژه(ICU)، سوختگی وجراحی عفونتهای شدید ایجاد می کند(۴). از جمله آنتی بیوتیک های مورد استفاده در درمان عفو نت های ناشی از این باکتری ، آنتی بیوتیک های خانواده بتالاکتام است که مطالعات انجام شده در سال های اخیر نشان دهنده ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیکها است .مکانیسم های مختلفی در ایجاد این مقاومت نقش دارند که مهم ترین آنها تولید آنزیم های بتالاکتاماز بخصوص بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) توسط این باکتری است(۱۸). نتایج ما نشان داد که ۲۴ ٪ از سویه های آسینتوباکتر جدا شده از بیماران شهر زاهدان اعم از بستری و سرپایی مولد بتالاکتاماز های وسیع الطیف بودند و تمام ایزوله ها نسبت به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و اگزاسیلین مقاوم بوده اند (۱۰۰ ٪ مقاوم) و بنابراین، این آنتی بیوتیک ها گزینه مناسبی برای درمان عفونت های حاصل از این باکتری نمی باشند.ومقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای سفو تاکسیم (۹۹٪) ، سفکسیم (۹۹٪) ، سفتریاکسون (۹۷٪) ، سفتازیدیم (۸۳٪) ، سیپروفلوکساسین (۷۷٪) ، ایمی پنم (۷۷٪)، آزترونام (۷۴٪) و جنتامایسین (۷۰٪) بود. ایزوله های اسینتوباکتر کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به آنتی بیوتیک کولیستین (۷٪) داشته اند؛ که این امر نشان دهنده ارزش بالای این آنتی بیوتیک در درمان عفونت های حاصل از باکتری های گرم منفی می باشد هر چند امروزه در برخی نقاط دنیا مقاومت به این آنتی بیوتیک شایع شده است. ۷۶٪ ایزوله ها MDR بودند که ۶۴٪ آنها به تمام آنتی بیوتیکها بجز کلیستین مقاوم بودند

و۱۲٪ آنها به کلیستین وجنتامایسین حساس و به بقیه آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند . الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها همچنین نشان داد که این یافته ها با مطالعات قبلی تا حد زیادی سازگاری دارد. درمطالعه ی هوجر[1] و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام دادند ۸۹٪ ایزوله ها MDR بوده که ۹۰٪ آنها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (۲۲) .در مطالعه داش[2] در سال ۲۰۱۳ در بیمارستان های آموزشی هند ۱۳۷ سویه اسینتوباکتر بومانی را مورد بررسی قرار دادند که ۷۴٪ MDR و همه ایزوله ها ۱۰۰٪ حساس به کلستین بودند (۲۳).و در این مطالعه ۷۶٪ MDR و ۹۳٪ ایزوله ها حساس به کلستین بودند .طی مطالعه ای که سینهان[3] و همکارانش در سال ۲۰۱۳ بر روی ۱۴۰ سویه اسینتوباکتر بومانی جدا شده از ICU در هند انجام دادند ۸۷٪ از سویه ها MDRبودند (۲۴) .چاری[4] و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تونس سویه های اسینتوباکتر از لحاظ مقاومت به ایمی پنم و کلیستین مورد بررسی قرار دادند که ۱۴,۲٪ از ایزوله ها به ایمی پنم و ۱۰۰٪ به کلستین حساس بودند (۲۵). گلبداک[5] و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی ۷۵ سویه اسینتو باکتر بومانی در ترکیه مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم ۸۹٪ ایمی پنم ۹۷٪، جنتاماسین ۶۶٪ سیپروفلوکساسین ۹۷,۳٪ گزارش کردند(۲۶).و در مطالعه ما به ترتیب ۸۳٪ ، ۷۷٪ ، ۷۰٪ و ۷۷٪ می باشد . همچنین در بررسی شاهچراغچی و همکارانش بیشتر سویه ها به سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفکسیم مقاومت بالایی داشتند ولی ۹۵/۸٪ سویه به کلسیتین حساس بودند (۲۷). در مطالعه ی رحیم زاده و همکاران در تبریز ۷۷٪ سویه ها به کلیستین حساس بودند(۲۸). در این مطالعه ۷٪ سویه ها به کلسیتین مقاوم بوده که با مطالعات قبلی در ایران همخوانی دارد. و در مطالعه رحیم زاده مقاومت به ایمی پنم بیش از ۶۲٪ بود(۲۸) در حالیکه در مطالعه ما مقاومت به ایمی پنم ۷۷٪ گزارش شده است که نشانگر افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به مطالعات قبلی می باشد که این امر می تواند به دلیل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها باشد. در مطالعه ی مجتبی ساده و همکاران درسال ۱۳۹۲در بخش‌های ویژه بیمارستان‌های منتخب تهران انجام گرفت . از ۵۸۸ نمونه جمع آوری شده، ۱۳۱ (۲۲/۳) گونه اسینتوباکتربومانی MDR با ترتیب فراوانی ژن‌های blaCTX (4/19%) و blaTEM (2/3%) مشاهده گردید(۳۰). در مطالعه ی عباس نظری مقدم و همکاران که به بررسی فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز PER و VEB در اسینتوباکتر بومانی ایزوله شده از بیماران شهر تهران در سال ۱۳۹۳ پرداختند نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که بیشترین مقاومت به ترتیب مربوط به پادزیست های آمیکاسین و سفی پیم و کمترین مقاومت مربوط به پادزیست پلی میکسین B بود. میزان مقاومت چند دارویی در این سویه ها حدود ۷۰ % بود (۳۱).

در مطالعه پیت[6] در هند میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، جنتامایسین، به ترتیب ۷۴/۱٪،۷۰/۱۲٪، گزارش شده است(۱۵). در حالیکه در مطالعه حاضر مقاومت ۸۳٪ ،۷۰٪ می باشد. در مطالعه ای که توسط اکان[7] بر ۲۷۷ ایزوله اسینتوباکتر بومانی در بیمارستان ابن سینای آنکارا در ترکیه انجام شد، میزان مقاومت نسبت به ایمی پنم ۵۶/۶٪، سیپروفلوکساسین ۷۴٪ ، جنتامایسین ۷۸٪ گزارش شده است (۱۴) این درصدها در مطالعه ما به ترتیب ۷۷، ۷۷ و ۷۰ بودند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تولید ESBL از لحاظ فنوتیپی در ۲۴٪ ایزوله های مورد بررسی مثبت بود این یافته نشانگر انتشار مقاومت از نوع ESBL در سویه های اسینتوباکتر مورد بررسی می باشد. بررسی ما با PCR نشان داد از میان ۲۴ ایزوله ESBL مثبت ، ژن OXA-2 در ۵ مورد (20.8) و ژن OXA-10 در ۴ مورد (۱۶/۶۶٪) مثبت ایزوله ها بودند. بر اساس مطالعه رحیم زاده و همکاران از میان ۶۰ ایزوله ESBL مثبت ژن OXA-2 در ۷ مورد (۱۱/۸٪) و ژن OXA-10در ۵ مورد (۸/۳٪) مثبت بودند(۲۸). بتالاکتامازهای تیپ OXA که به اگزاسیلیناز نیز مشهور هستند گروهی از ESBL ها هستند که باکتری را به آمپی سیلین و سفالوتین مقاوم می کنند و با فعالیت هیدرولیکی بالا در مقابل اگساسیلین و کلوگساسیلین تمایز می یابند(۱۹و۲۰). تا کنون ۱۴۲تیپ از این

[1] Hujer
[2] Dashm
[3] Sinhan
[4] Chaaria
[5] gulbadakh
[6] Pitk
[7] Akan

نوع آنزیم ها گزارش شده است(۲۰). اکثر یافته ها در زمینه ESBL های تیپ OXA از نمونه سودوموناس آئروجینوزای جداسازی شده از کشورهای ترکیه و فرانسه به دست آمده است که از این یافته ها می توان یه ۱۲ نوع ESBL که از منشا OXA-10 یا OXA-2 توسط جانشینی آمینواسیدی مشتق شده است، اشاره کرد(۲۹). ولی متاسفانه بررسی های زیادی در مورد شیوع ژن OXA-2 و OXA-10 در اسینتوباکتر وجود ندارد. این باکتری به عنوان یکی از عوامل بروز عفونت های بیمارستانی با پتانسیل ایجاد مقاومت نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیکها مطرح می باشد. 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(۲۸) 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.

References

1. Wang H, Guo P, Sun H, Wang H, Yang Q, Chen M, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant Acinetobacter spp. from Chinese hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:4022-٤٠٢8.
2. Coelho J, Woodford N, Turton J, Livermore DM. Multiresistant acinetobacter in the UK: how big a threat? J Hosp Infect 2004; 58:167-١٦9.
3. Bergogne Berezin E, Towner KJ. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9:148–١65.
4. Bou G, Cervero G, Domingues MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. Charactrization of a basocomial outbreak caused by a multiresistant acinetabacter baumannii strain with a carbapenem –hydrolyzing enzyme: high level carbapenem resistance in A.baumannii is not due solely to yhe presense of b-lactamase. J Clin Microbiol 2000; 38:3299-3305.
5. Lye DC, KWa AL, Chlebicki P. World health Day 2011: Antimicrobal Resistance and practical Solutions Ann Acard Med Singapore 2011; 40:156-152.
6. Jacoby GA, Munos-Price LS. The new betalactamases. N Engl J Med 2005; 352:380-391.
7. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. J Antimicrob Chemother 2005; 55:1050-1051.
8. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1211-1233.
9. Bradford PA .Extended –spectrum beta-lactamases in the 21 st century :characterization ,epidemiology,and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14;933-951.
10. Jacoby GA,Munoz-Price LS .The new B-lactamases.N Engl J Med 2005; 352:380-391.
11. Bradford PA. Extended-spectrum β-lactamase in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14:933-951.
12. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in gram-negative bactria pathognes. Int J Med Microbiol 2010; 300:371-379.
13. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, et al. Analysis antibiotic resistance genes in multidrug-resistant Acinetobacter sp.Isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Bush. Critic Care 2010; 14:224.
14. Akan OA. Antibiotic resistance of Acinetobacter baumannii isolate: data from Ibni Sina hospital for the year 2002. Mikrobiyol Bul 2003; 37:241-246.
15. Pit K, Saha R. Multidrug-resistant acinetobacter infection and their susceptibility patterns in a tertiary care hospital. J Niger Med 2012; 53:126-128.
16. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, et al. Distribution of bla(TEM), bla(SHV), bla(CTX-M) genes among clinical isolates of Klebsiella pneumoniae at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. Microb Drug Resist 2010; 16:49-53.
17. Lee SG, Jeong SH, Lee H, Kim CK, Lee Y, Koh E, et al. Spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases among bloodstream isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from a Korean hospital. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 63:76-80.

18. Stobberingh EE, Arends J, Hoogkamp-Korstanje JA, Goessens WH, Visser MR, Buiting AG, et al. Occurrence of extended-spectrum betalactamases (ESBL) in Dutch hospitals. Infection 1999; 27:348-354.
19. Hamouda A, Amyes SG. Novel gyrA and parC point mutations in two strains of Acinetobacter baumannii resistant to ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother 2004; 54:695-696.
20. Chagas TP, Alves RM, Vallim DC, Seki LM, Campos LC, Asensi MD. Diversity of genotypes in CTX-M-producing Klebsiella pneumoniae isolated in different hospitals in Brazil. Braz J Infect Dis 2011; 15:420-425.
21. 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; 122:301-306.
22. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, 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; 50:4114-4123.
23. Dash M1, Padhi S, Pattnaik S, Mohanty I, Misra P. Frequency, risk factors, and antibiogram of Acinetobacter species isolated from various clinical samples in a tertiary care hospital in Odisha, India. Avicenna J Med 2013; 3:97-102.
24. Sinha N, Agarwal J, Srivastava S, Singh M. Analysis of carbapenem-resistant Acinetobacter from a tertiary care setting in North India. Indian J Med Microbiol 2013-; 31:60-63.
25. Chaari A, Mnif B, Bahloul M, Mahjoubi F, Chtara K, Turki O. Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia: epidemiology, clinical characteristics, and prognosis factors. Int J Infect Dis 2013; 17:e1225-1228.
26. Gulbudak H, Aslan G1, Tezcan S, Ersoz G, Ulger M, Otag F. Investigation of the clonal relationship between nosocomial Acinetobacter baumannii isolates by Rep-PCR. Mikrobiyol Bul 2014; 48:316-3124.
27. Shahcheraghi F, Akbari Shahmirzadi N, Abbas Alipour Bashash M, Jabbari H, Amir Mozafari N. Detection of blaCTX,blaTEM beta-lactamase genes in clinical isolates of acinetobacter spp. from selected Tehran hospitals. Iran J Med Microbiol 2009; 3:1-9. [in Persian].
28. Rahimzadeh A, Farajnia S, Pourbabaee A, Ansarin Kh, Zolfaghari M. 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. J Babol Univ Med Sci 2012; 14:56-63.
29. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, et al. Dissemination of Acinetobacter baumannii clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:2001-2004.

Original Article

Prevalence of OXA-2 and OXA-10 Type ESBL among *Acinetobacter* Strains Isolated from Patients of Zahedan (South Eastern Iran)

Received:Jan 16 2016 - Accepted: Mar 1 2016

[1] Mohammad Bokaian
[2] Shahram Shahraki*
[3] JanMohammad Raeisi
[4] Farzaneh Mohammadzadeh Rostami

1- Associate Professor of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
2- Assistant Professor of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
3,4- Msc, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

** Zahedan -Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran*
Tel : 09151411339
Email: shahram17ir@yahoo.com

Abstract

Introduction: The most important factor in resistance to beta-lactam antibiotics in *Acinetobacter* family is extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and OXA is one of the most common ESBL enzymes. The aim of this study was to determine the frequency of bla-OXA-2 and bla-OXA-10 resistance genes among Acinetobacter strains isolated from patients referred to teaching hospitals of Zahedan city, Iran.

Methods: This cross-sectional descriptive study was carried out on 100 Acinetobacter isolated from patients referred to teaching hospitals of Zahedan, Iran in 2013-2014. 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 and bla-OXA-2 in clinical isolates were investigated by PCR technique.

Results: The results of antimicrobial sensitivity tests revealed that the highest resistance was against ampicillin (100%), oxacillin (100%), cefotaxime and cefexime (99%), whereas the highest susceptibility was observed for colistin (93%). PCR results showed that among the 24 isolates of ESBL positive, OXA-2 gene in 5 cases (20.8%) and OXA-10 in 4 cases (16.66%) were positive.

Conclusion: The results of this study showed the presence of OXA-2 and OXA-10 type ESBLs among drug resistant Acinetobacter strains that reminded the necessity of preventive measures for inhibiting dissemination of these resistant isolates.

Key words: Acinetobacter, Antibiotic resistance, Extended-spectrum beta-lactamase, Bla-OXA-2, Bla-OXA-10, Zahedan

Acknowledgement: There is no conflict of interest.