

## Prevalence of class I, II and III integrons in the antibiotic-resistant isolates of *A. baumannii* detected from patients hospitalized in medical centers of Shahrekord

Nourbakhsh F<sup>1\*</sup>, Nourbakhsh V<sup>2</sup>, Jafakesh M<sup>2</sup>

1- PhD Student of Toxicology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, I. R. Iran.

2- Hazrat Fatemeh Zahra (SA) Hospital, Depending on the Treatment and Management of Social Security in Isfahan, Isfahan, I. R. Iran.

Received January 12, 2016; Accepted June 2, 2016

### Abstract:

**Background:** *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic and gram-negative coccobacillus. This opportunistic pathogen infectivity, especially in the intensive care units of hospitals is extensive worldwide. Due to the incremental pattern of antibiotic resistance, this study was carried out to track the Class I, II and III integrons in *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized cases in medical centers (Shahrekord, Iran).

**Materials and Methods:** In this cross-sectional study *A. baumannii* isolates (n=100) detected from hospitalized patients in various wards of hospitals and health centers of Shahrekord in first six months of 2015 and antibiotic resistance pattern were determined by disk diffusion method. The presence of genes coding class I, II and III integrons were investigated using M-PCR method.

**Results:** Among the 100 *A. baumannii* studied isolates, the highest and the least resistance was seen for the of Cefepime (89%), Ciprofloxacin (95.4%) Ceftazidime (91.3%); and Chloramphenicol (3.7%) and Nitrofurantoin (2.9%) antibiotics, respectively. The frequency of Class I, II and III integrons was 100%, 44% and 3%, respectively.

**Conclusions:** The high incidence of integron classes among *A. baumannii* strains reflects the special roles of integrons in the acquisition pattern of multiple antibiotic resistance from isolates. Thus, providing the precautionary measures to prevent arbitrary use of antibiotics is suggested.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, Antibiotic resistance, Integrons

\* Corresponding Author.

Email: Nourbakhshf951@mums.ac.ir

Tel: 0098 930 096 9377

Fax: 0098 383 336 1064

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2016; Vol. 20, No 5, Pages 461-468

Please cite this article as: Nourbakhsh F, Nourbakhsh V, Jafakesh M. Prevalence of class I, II and III integrons in the antibiotic-resistant isolates of *A. baumannii* detected from patients hospitalized in medical centers of Shahrekord. *Feyz* 2016; 20(5): 461-8.

# بررسی شیوع اینتگرون‌های کلاس I، II و III در ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک آسیتوباکتر بومانی جداسازی شده از بیماران بستری در مراکز درمانی شهرکرد

فهمیه نوربخش<sup>۱\*</sup>، وجیهه نوربخش<sup>۲</sup>، محمد تقی جفاکش<sup>۲</sup>

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** آسیتوباکتر بومانی یکی از کوکوباسیلی‌های فرصت طلب و گرم منفی است. این پاتوژن فرصت طلب در سراسر جهان، به‌خصوص در بخش مراقبت‌های ویژه عفونت‌زایی گسترده‌ای دارد. با توجه به افزایش الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مطالعه حاضر جهت ردیابی اینتگرون‌های کلاس I، II و III در ایزوله‌های آسیتوباکتر بومانی جداسازی شده از مراکز درمانی شهرکرد انجام گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مقطعی توصیفی ۱۰۰ ایزوله آسیتوباکتر بومانی از بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها و مراکز درمانی شهرکرد در نیمه اول سال ۱۳۹۴ جداسازی شده و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی تمامی آنها به روش انتشار دیسک تعیین گردید. حضور ژن‌های کد کننده اینتگرون‌های کلاس I، II و III با استفاده از روش M-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** از بین ۱۰۰ ایزوله آسیتوباکتر بومانی مورد بررسی، بیش‌ترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفیم با فراوانی ۸۹ درصد، سیپروفلوکساسین با فراوانی ۹۵/۴ درصد و سفنازیدیم ۹۱/۳ درصد و کم‌ترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل ۳/۷ درصد و نیتروفوراتونین ۲/۹ درصد مشاهده شد. فراوانی اینتگرون‌های کلاس I، ۲ و ۳ به ترتیب ۱۰۰، ۴۴ و ۳ درصد بود.

**نتیجه‌گیری:** شیوع بالای اینتگرون‌ها در میان سویه‌های آسیتوباکتر بومانی نشان‌دهنده نقش ویژه آنها در اکتساب مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه توسط این ایزوله‌ها می‌باشد. لذا، اعمال اقدامات پیشگیرانه جهت جلوگیری از مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری است.

**واژگان کلیدی:** آسیتوباکتر بومانی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، اینتگرون

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۵، صفحات ۴۶۸-۴۶۱

## مقدمه

انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های آسیتوباکتر بومانی از طریق انتقال ژن‌های عامل مقاومت، مهم‌ترین عامل ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌های بالینی می‌باشد. بسیاری از عوامل ژنتیکی شامل پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها، فاژها و اینتگرون‌ها مسئول انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های آسیتوباکتر بومانی می‌باشند [۴]. امروزه آسیتوباکتر بومانی به اکثر عوامل ضد میکروبی بالینی از جمله آمینوگلیکوزیدها، فلوروکوئینولون‌ها، بتا-لاکتام‌ها و سفالوسپورین‌ها مقاومت نشان داده است؛ به همین دلیل انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان آن مشکل می‌باشد [۵]. مصرف خودسرانه و بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ویژه در درمان‌های قبلی بیمار به‌عنوان عامل اصلی در کسب ژن‌های مقاومت گزارش شده است. بسیاری از عناصر ژنتیکی متحرک مثل پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها، فاژها و اینتگرون‌ها مسئول انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی‌اند. مطالعات اخیر نشان داده است که اینتگرون‌ها نقش مهمی در انتشار ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط‌های کلینیکی ایفا می‌کنند. اینتگرون‌ها عناصر ژنتیکی هستند که شامل تعدادی ژن و محل ویژه الحاق برای سیستم نوترکیبی است که آنها را قادر می‌سازد تا کاست‌های ژنی متحرک را به دست آورند. در ساختار کلی اینتگرون‌ها، ژن‌های مقاومت روی کاست‌های ژنی مشخص قرار دارند که به‌خاطر قابلیت اتصال این کاست‌ها در مجموعه‌های اینتگرونی، طی فرآیند نوترکیبی

آسیتوباکتر بومانی کوکوباسیلی گرم منفی، غیرمتحرک، هوازی اجباری، اکسیداز منفی، کپسول‌دار، فاقد اسپور و غیرتخمیر کننده می‌باشد. این باکتری یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های فرصت طلب در سراسر جهان، به‌ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌ها به‌حساب می‌آید که به‌طور وسیعی در حال گسترش و کسب مقاومت‌های چندگانه می‌باشد. باکتری مذکور توانایی ایجاد عفونت‌های مختلف از جمله سپتی‌سمی، عفونت دستگاه ادراری، مننژیت بیمارستانی، عفونت زخم، باکتری می، عفونت پوست و بافت نرم و پنومونی با مرگ‌ومیر بالا را دارد. سرعت بالای کسب ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و گسترش شدید این عامل باکتریایی کنترل و ریشه‌کنی این پاتوژن را دشوار ساخته است [۱-۳].

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری تخصصی سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

<sup>۲</sup> کارشناس پرستاری، بیمارستان حضرت فاطمه زهرا (س)، وابسته به مدیریت درمان و تامین اجتماعی استان اصفهان

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد پرستاری، بیمارستان حضرت فاطمه زهرا (س)، وابسته به مدیریت درمان و تامین اجتماعی استان اصفهان

## \* نشانی نویسنده مسئول:

گروه سم شناسی و فارماکودینامی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تلفن: ۰۹۶۹۳۷۷۰۰۹۳۰۰ دپوئیس: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۶۴

پست الکترونیک: Nourbakhshf951@mums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۲۲ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۵/۳/۱۳

این واکنش نشان‌گر وجود *اسیتوباکتر بومانی* در کلونی‌های مورد مطالعه بود. در نهایت ایزوله‌های مورد تایید در محیط پیتون واتر واجد ۳۰ درصد گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۶-۱۱].

#### تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی ساخت شرکت پادتن طب-ایران، بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) و با استفاده از روش انتشار دیسک (Kirby-Bauer) در محیط مولر هیتون آگار مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است از سویه استاندارد *اشریشیاکلی* ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی کیفیت آنتی‌بیوگرام و سویه استاندارد *اسیتوباکتر بومانی* ATCC 19606 به عنوان کنترل مثبت کیفیت آنتی‌بیوگرام استفاده گردید. آنتی‌بیوتیک‌های تست شده شامل: تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سپیروفلوکساسین (۳۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۳/۷۵/۱/۲۵ میکروگرم)، توپراماسین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، سفیم (۳۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، جنتاماسین (۱۰ میکروگرم)، ریفامپین (۵ میکروگرم)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم)، تری‌متوپریم (۵ میکروگرم)، لوفلوکساسین (۵ میکروگرم- گرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، نیتروفور-انتوتین (۳۰۰ میکروگرم)، آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم) و اریترو-مایسین (۱۵ میکروگرم) بودند. در این روش سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شده و روی محیط مولر هیتون آگار تلقیح گردید. پس از گذاشتن دیسک‌ها در محیط کشت و کشت ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد، قطر هاله عدم رشد برای هر آنتی‌بیوتیک اندازه گیری شد و در نهایت مطابق با دستورالعمل مربوطه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها ثبت و بررسی گردید [۱۲].

#### بررسی حضور اینتگرون‌ها

در سال‌های اخیر نقش اینتگرون‌ها به عنوان عناصر ژنتیکی متحرک در انتقال افقی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشخص شده است. اینتگرون‌ها عناصری هستند که می‌توانند در پلاسمیدها، کرو-موزوم‌ها و یا ترانسپوزون‌ها جای گیرند. این عناصر از جمله فاکتورهای دخیل در توسعه مقاومت‌های چندگانه بوده و همانند پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها جز مولفه‌های ژنتیکی متحرک در کسب و انتشار عوامل مقاومت می‌باشند. پنج کلاس مختلف از اینتگرون-

اختصاصی در جایگاه، انتقال ژن مقاومت صورت می‌گیرد. تنها سه کلاس اینتگرون امروزه به طور وسیع مطالعه شده‌اند و از نظر کلینیکی حائز اهمیت می‌باشند که تحت عنوان اینتگرون‌های کلاس I، II و III نامگذاری می‌شوند [۸-۶]. برای تشخیص حضور اینتگرون‌های کلاس II، محققین به طور معمول از دو ناحیه ژنی به- عنوان نواحی هدف برای شناسایی در باکتری‌ها استفاده می‌کنند. یکی از این نواحی، ناحیه حضور ژنوم آنزیم اینتگراز است که جهت بررسی اینتگرون‌های کلاس I و II در نمونه و همچنین تشخیص آن کاربرد دارد. یکی دیگر از نواحی مورد بررسی ناحیه Variable region است [۱۱-۹]. مطالعه حاضر با هدف ردیابی اینتگرون‌های کلاس I، II، III در ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی در مراکز درمانی شهرکرد و ارتباط آن با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری طرح‌ریزی و اجرا شده است.

#### مواد و روش‌ها

##### جداسازی و شناسایی باکتری

در این مطالعه تعداد ۱۰۰ ایزوله *اسیتوباکتر بومانی* از عفونت‌های مختلف انسانی شامل زخم‌های چرکی (۵)، عفونت‌های خونی (۲۷)، عفونت‌های ادراری (۱۴)، عفونت‌های تنفسی (۱۸)، کاتتر (۲۰)، زخم بستر (۱۳)، خلط (۲) و مننژیت (۱) از بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های شهر شهرکرد طی دوره زمانی ۳ ماهه (نیمه اول سال ۱۳۹۴) جداسازی و به آزمایشگاه منتقل شدند. این ایزوله‌ها در آزمایشگاه بیمارستان‌های مربوطه با تست‌های رایج میکروبیولوژی و بیوشیمیایی نظیر IMVIC، اوره-آز، TSI، OF، MRVP، SIM، کاتالاز و اکسیداز و رشد در ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد تایید شده بودند [۱۲]. به منظور تایید قطعی ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* در ایزوله‌های مورد مطالعه از آزمایش PCR در حضور زوج پرایمرهای مورد تایید (با ردیابی ژن *16S-23S ribosomal DNA*) استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۱۰۰ میکرومول dNTP mix، ۱ واحد آنزیم پلی‌مراز (فرمتاز،- لیتوانی)، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R و ۲ میکرولیتر از DNA مربوط به هر ایزوله تنظیم گردید. برنامه حرارتی مورد استفاده در این مرحله شامل یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه بود. وجود قطعه bp ۲۰۸ تکثیر یافته در

جهت اجرای برنامه‌های کنترل عفونت و هم‌چنین مقاومت آنتی بیوتیکی و ممانعت از انتشار عفونت‌های ناشی از این ارگانسیم را ضروری می‌نماید [۱۴]. جهت بررسی حضور اینتگرون‌های کلاس I, II و III در ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* مورد مطالعه از زوج پرایمرهای معرفی شده در جدول شماره ۱ به روش M-PCR استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۲۰۰ میکرومول dNTP mix، ۰/۵ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلی‌مراز و ۲/۵ میکرولیتر از DNA مربوط به هر نمونه انجام گردید. [۱۷]. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه [۱۸].

ها شناسایی شده‌اند که اینتگرون‌های کلاس I به‌طور متداول در ایزوله‌های بالینی باسیل‌های گرم منفی از جمله *اسیتوباکتر بومانی* یافت شده و منجر به انتشار مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی و مشکلات جدی درمانی در سراسر جهان گردیده است. بیشتر بررسی‌ها اینتگرون‌ها را همراه با مقاومت‌های چندارویی در *اسیتوباکتر بومانی* گزارش می‌کنند و حضور اینتگرون‌ها در *اسیتوباکتر بومانی* عامل انتقال افقی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه آمینوگلیکوزیدها و کلرامفنیکل و هم‌چنین بیان‌گر مقاومت چندارویی و شیوع آن‌ها است [۱۳]. بنابراین، یک ارتباط قوی بین حمل اینتگرون و افزایش مقاومت به تعدادی از کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی وجود دارد. با توجه به اینکه ژن‌های مقاومت روی اینتگرون‌ها قرار دارند که می‌توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند و مقاومت را در بیمارستان یا دیگر محیط‌های درمانی منتشر نمایند، لذا این امر اهمیت شناسایی این نوع از ژن‌های مقاوت آنتی‌بیوتیکی را دو چندان کرده و تعیین شیوع این ژن‌ها

جدول شماره ۱- زوج پرایمرهای مورد استفاده جهت جداسازی ژن‌های اینتگرون در مطالعه حاضر

اندازه (bp)	توالی نوکلئوتیدی	ژن‌های اینتگرون
۱۶۰	F: CAG TGG ACA TAA GCC TGT TC R: CCC GAC GCA TAG ACT GTA	کلاس I
۲۸۸	F: TTG CGA GTA TCC ATA ACC TG R: TTA CCT GCA CTG GAT TAA GC	کلاس II
۱۰۴۱	F: GCC TCC GGC AGC GAC TTT CAG R: ACG GAT CTG CCA AAC CTG ACT	کلاس III

مراکز درمانی شهرکرد انتخاب شده و از نظر الگوی مقاومت آنتی-بیوتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از تایید قطعی *اسیتوباکتر بومانی* (با ردیابی ژن *16S-23S ribosomal DNA*) در ایزوله-ها، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها به ۱۸ آنتی‌بیوتیک رایج در درمان عفونت‌های انسانی به‌روش انتشار دیسک ساده ارزیابی شد و نتایج نشان داده شده است. تمام ایزوله‌های مورد مطالعه دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (MDR) بودند و در این میان بیش-ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به سپیروفلوکساسین (۹۵/۴ درصد)، سفنازیدیم (۹۱/۳ درصد)، سفپیم (۸۹ درصد) و تتراسایکلین (۸۹/۵ درصد) و کم‌ترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل (۳/۷ درصد) و نیتروفورانتوئین (۲/۹ درصد) مشاهده شد. از آنجایی‌که اینتگرون‌ها از عوامل اصلی اکتساب و انتقال مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها هستند، در این مطالعه به بررسی حضور اینتگرون‌های کلاس I, II و III در ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* پرداخته شد. فراوانی سه کلاس اصلی اینتگرون در ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* مورد مطالعه در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

جهت تکثیر قطعات ژنی کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های اینتگراز مورد مطالعه از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Mastercycler® 5330, GmbH, Germany) استفاده شد. در نهایت جهت ردیابی قطعه ژنی تکثیر یافته در PCR از الکترو-فورز محصول PCR روی ژل آگاروز استفاده گردید. در این مرحله ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR مربوط به هر مرحله از آزمایش در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمتاز، لیتوانی) روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز واجد اتیديوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز و ثبت گردید. داده‌های حاصل از نتایج به‌دست آمده در این مطالعه با نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۶ و با استفاده از آزمون‌های آماری مجذور کای و دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد آنالیز نهایی قرار گرفتند [۲۱-۱۹].

## نتایج

در مطالعه حاضر در مجموع ۱۰۰ ایزوله *اسیتوباکتر بومانی* جدا شده از انواع عفونت‌های بیمارستانی از بیمارستان‌ها و

جدول شماره ۲- فراوانی سه کلاس اصلی اینتگردها در ایزوله‌های اسیتوباکتر بومانی مورد مطالعه

تعداد ایزوله‌های عفونی	اینتگرون کلاس I	اینتگرون کلاس II	اینتگرون کلاس III
زخم (۵)	۵	۵	-
خون (۲۷)	۲۷	۱۳	۲
عفونت‌های ادراری (۱۴)	۱۴	۴	-
تنفسی (۱۸)	۱۸	۱۲	-
کاتر (۲۰)	۲۰	۱۰	-
زخم بستر (۱۳)	۱۳	-	-
منزیت (۱)	۱	-	-
خلط (۲)	۲	-	۱
درصد فراوانی	٪ ۱۰۰	٪ ۴۴	٪ ۳

جدول شماره ۳- درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های

اسیتوباکتر بومانی مورد مطالعه	درصد مقاومت
آنتی‌بیوتیک‌ها	
تتراسایکلین	(۶۶)
سفتازیدیم	(۹۱/۳)
سیپروفلوکساسین	(۹۵/۴)
کوتریموکسازول	(۸۵)
توبرامیسین	(۶۵/۴)
کلرامفنیکل	(۳/۷)
سپم	(۸۹)
آمیکاسین	(۸۷/۶)
جتنامیسین	(۸۸/۲)
ریفامپین	(۲۸)
سفالوتین	(۷۵)
استرپتومایسین	(۴۷)
تری‌متوپریم	(۵۶/۳)
لوفلوکساسین	(۴۸/۳)
ایمی‌پنم	(۸۴/۱)
مروپنم	(۷۸/۹)
نیتروفورانتوین	(۲/۹)
آزیترومایسین	(۸۴/۸)
اریترومایسین	(۸۷/۳)

درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در جدول شماره ۳ ارائه شده است. نتایج حاصل از الگوی مقاومت آنتی-بیوتیکی نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌داری بین حضور اینتگرون کلاس I و تمام ایزوله‌ها با اینتگرون کلاس II و III است. هم-چنین، بین حضور اینتگرون کلاس I و ایزوله‌های جدا شده از خون و کاتر با ایزوله‌های جدا شده از زخم، منزیت و خلط اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد. هم‌چنین، بین حضور اینتگرون کلاس II و ایزوله‌های جدا شده از خون و نمونه‌های تنفسی با سایر ایزوله‌های عفونی اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد. در بررسی‌های آماری اختلاف آماری معنی‌داری بین مقاومت آنتی-بیوتیکی به تتراسایکلین، کوتریموکسازول، سفالوتین و سفیم با سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی وجود دارد. بررسی‌های آماری نشان-دهنده ارتباط آماری معنی‌دار بین حضور اینتگرون کلاس I و II در ایزوله‌های جدا شده از خون و کاتر با مقاومت آنتی‌بیوتیکی این ایزوله‌ها به سفیم، سفالوتین، تتراسایکلین، و کوتریموکسازول می-باشد. بین حضور اینتگرون کلاس I در ایزوله‌های جدا شده از کاتر و اینتگرون کلاس II در ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های تنفسی با مقاومت آنها به سفیم و سفالوتین نیز ارتباط معنی‌داری وجود دارد. ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی اینتگردها در ایزوله‌های اسیتوباکتر بومانی در تصویر شماره ۱ ارائه شده است.

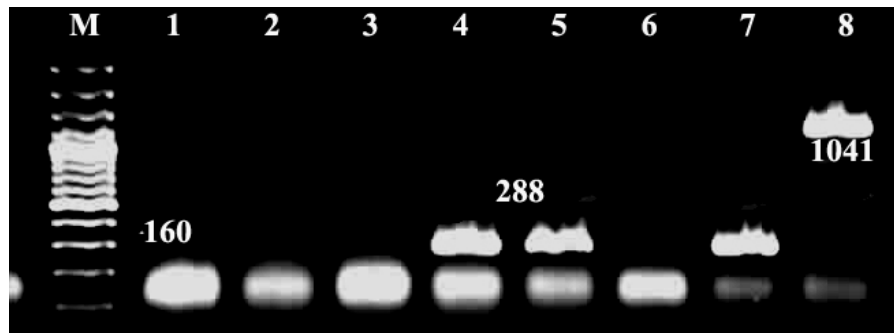
#### بحث

امروزه گسترش ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از طریق ساختارهای اینتگرونی و هم‌چنین ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی چندانکه به‌مشکل مهمی در درمان عفونت‌های حاصل از اسیتو-باکترها تبدیل شده‌اند. در مطالعات مختلف در سراسر دنیا میزان شیوع اینتگردها در سویه‌های اسیتوباکتر بومانی با استفاده از

در این مطالعه حضور اینتگردهای کلاس I, II و III در ایزوله-های اسیتوباکتر بومانی بررسی گردید که نتایج آن ارائه شده است. همان‌گونه که در این نتایج مشهود است اینتگرون کلاس I در تمام ۱۰۰ ایزوله، اینتگرون کلاس II در ۴۴ درصد از ایزوله‌ها و اینتگرون کلاس III تنها در ۳ درصد از ایزوله وجود داشت. در تجزیه و تحلیل آماری نتایج نیز اختلاف معنی‌داری ( $P=0/078$ ) بین حضور اینتگردهای کلاس I و II با اینتگرون کلاس III و نیز بین حضور اینتگرون کلاس III در ایزوله‌های مربوط به نمونه-های خون و خلط با سایر ایزوله‌ها مشاهده شد ( $P=0/0385$ ).

روش‌های مولکولی بسیار متنوع گزارش گردیده که در تمام موارد به شیوع روز افزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشاره دارد.

تصویر شماره ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی اینتگرون‌ها در ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی*



ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون‌های ۲ تا ۸= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۱۶۰ جفت بازی مربوط به ژن *IntI* قطعه ۲۸۸ جفت بازی مربوط به ژن *IntII* و قطعه ۱۰۴۱ جفت بازی مربوط به ژن *IntIII*

۹۳/۳ درصد و پیراسیلین را ۱۰۰ درصد گزارش کردند [۲۵]. در مطالعه انجام شده توسط Aliakbarzadeh و همکاران که در سال ۲۰۱۳ در شهر تبریز انجام شد، ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* جدا شده از بیماران به میزان ۹۴ درصد به کانامایسین، ۸۶ درصد به جنتامایسین، ۸۱ درصد به آمیکاسین و ۶۳ درصد به توبرامایسین مقاوم بودند [۲۶]. نتایج حاصل از مطالعه حاضر ۸۸/۲ درصد مقاومت به جنتامایسین، ۸۷/۶ درصد مقاومت به آمیکاسین و ۶۵/۴ درصد مقاومت به توبرامایسین را نشان می‌دهند. در مطالعه حاضر سه کلاس اصلی اینتگرون‌های I، II و III در ۱۰۰ ایزوله *اسیتوباکتر بومانی* ردیابی شد که اینتگرون کلاس I در تمام ایزوله‌ها، اینتگرون کلاس II در ۴۴ درصد از آن‌ها و ژن اینتگراز III تنها در ۳ درصد از ایزوله‌ها حضور داشت. در مطالعه Mirnejad و همکاران (در سال ۲۰۱۲) در ۸۲ درصد از ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* جدا شده از بیمارستان‌های شهر تهران اینتگرون کلاس II وجود داشت و ارتباط معنی‌داری بین حضور اینتگرون و مقاومت ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، آزترونام، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، اوفلوکساسین و سفنازیدیم مشاهده شد [۲۷]. در بررسی انجام شده توسط محمدی و همکاران فراوانی حضور ژن‌های اینتگرون کلاس I، II و III در ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر همدان به ترتیب ۹۷، ۳۱ و صفر درصد برآورد گردید که در مقایسه با مطالعه حاضر (فراوانی ۳ درصد ژن اینتگرون کلاس III) قابل مقایسه می‌باشد [۲۸]. نتایج حاصل از مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعات مشابه حضور بالای اینتگرون‌ها در ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* نشان می‌دهد؛ به طوری که حتی اینتگرون کلاس III در ایزوله‌های جدا شده از موارد باکتری می و عفونت‌های بالینی

اعضای جنس *اسیتوباکتر* از یک طرف تمایل زیادی به مقاوم شدن به آنتی‌بیوتیک‌ها داشته و به طور ذاتی نسبت به بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند و از طرف دیگر توانایی زیادی در کسب مکانیسم‌های جدید مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارند [۲۲]. پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها از عوامل اصلی و مهم در اکتساب و انتقال مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌شمار می‌آیند. و امروزه گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی از طریق ساختارهای اینتگرونی با ایجاد مقاومت‌های چندگانه آنتی‌بیوتیکی همراه بوده و به یک مشکل جدی در درمان عفونت‌های ناشی از *اسیتوباکترها* تبدیل شده است [۲۳]. از این رو، هدف از این مطالعه بررسی شیوع اینتگرون‌های کلاس I، II و III در ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* جداسازی شده از بیماران بستری در مراکز درمانی شهرکرد قرار گرفت. در مطالعه‌ای مشابه که توسط Momtaz و همکاران (در سال ۲۰۱۵) در دو بیمارستان بزرگ شهر تهران انجام شد، الگوی تقریباً مشابهی با مطالعه حاضر مشاهده شد؛ به طوری که در این مطالعه ۹۰/۹۰ درصد از ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* جدا شده از عفونت‌های بالینی در انسان به تتراسایکلین، ۶۱/۹۸ درصد به تری-متوپریم، ۵۱/۲۳ درصد به کوتریموکسازول و بین ۹/۹۱ تا ۳۱/۴۰ درصد از ایزوله‌ها به ترکیبات آمینوگلیکوزید مقاوم بودند [۲۴]. این مطالعه مشابه با مطالعه حاضر میزان مقاومت به تتراسایکلین، تری‌متوپریم و کوتریموکسازول را بالا گزارش کرده است. Shakibai و همکاران (در سال ۲۰۱۲) در مطالعه انجام شده روی ۵۰ ایزوله *اسیتوباکتر بومانی* جدا شده از بخش مراقبت ویژه یک بیمارستان در استان کرمان میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها را به ایمی‌پنم ۷۳/۳ درصد، سیپروفلوکساسین ۶۶ درصد، پی-پراسیلین-تازوباکتام ۹۳/۳ درصد، آمیکاسین ۵۳/۳ درصد، سفی‌پیم

حامل اینتگرول‌های کلاس I بودند و اینتگرول کلاس II در هیچ-کدام از ایزوله‌ها یافت نشد [۳۴]. علت اختلاف در شیوع اینتگرول‌های کلاس I در دو مطالعه اخیر با مطالعه حاضر و مطالعات مشابه در ایران می‌تواند تفاوت در منطقه جغرافیایی و استفاده صحیح و کنترل شده از آنتی‌بیوتیک‌ها در خارج از ایران باشد.

#### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در مراکز درمانی شهرکرد نیز همانند اکثر مناطق کشور مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی در ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* وجود داشته و تمام ایزوله‌ها دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (MDR) هستند. از طرفی تمام ایزوله‌ها و تقریباً یک‌سوم از آن‌ها به ترتیب واجد اینتگرول‌های کلاس I و II به‌عنوان یکی از دلایل اصلی گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی هستند.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری حوزه محترم معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و پرسنل محترم بیمارستان‌های مورد مطالعه قدردانی می‌نمایند.

#### References:

- [1] Huang L, Sun L, Yan Y. Clonal Spread of Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* ST92 in a Chinese Hospital during a 6-Year Period. *J Microbiol* 2013; 51(1): 113-7.
- [2] Ziglam H, Elahmer O, Amri S, Shareef F, Grera A, Labeeb M, et al. Antimicrobial resistance patterns among *Acinetobacter baumannii* isolated from burn intensive care unit in Tripoli, Libya. *Int Arab J Antimicrob Agents* 2012; 2(3): 1-5.
- [3] Vahdani P, Yaghoubi T, Aminzadeh Z. Hospital acquired antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a 400-Bed hospital in Tehran, Iran. *Int J Prev Med* 2011; 2(3): 127-30.
- [4] Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: Clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39(2): 105-14.
- [5] Nie L, Lv Y, Yuan M, Hu X, Nie T, Yang X, et al. Genetic basis of high level aminoglycoside Resistance in *Acinetobacter baumannii* from Beijing, China. *J Acta Pharmaceutica Sinica B* 2014; 4(4): 259-300.
- [6] Irfan S, Turton JF, Mehraj J, Siddiqui SZ, Haider S, Zafar A, et al. Molecular and epidemiological characterisation of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from public and private sector intensive care units

وجود داشته است. در مطالعه Pymani و همکاران در تبریز اینتگرول کلاس I در ۹۲/۵ درصد از ایزوله‌های MDR/اسیتوباکتر باکتر ردیابی شد [۲۹]. در بررسی Japoni و همکاران فراوانی اینتگرول‌های کلاس I و II در ایزوله‌های *اسیتوباکتر* برابر ۴۷/۷ و ۳/۴ درصد تعیین شد، اما اینتگرول کلاس III یافت نشد [۳۰]. در مطالعه Mirnejad و همکاران (در سال ۲۰۱۳) در تهران ۴۲ درصد از ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* واجد اینتگرول کلاس I و ۸۲ درصد از آن‌ها حامل کلاس II اینتگرول بودند که بر خلاف بسیاری از مطالعات انجام شده در کشور و مطالعه حاضر فراوانی اینتگرول کلاس II را بیشتر گزارش داده است؛ همان‌گونه که در قسمت الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ذکر شد، در مورد اینتگرول‌ها نیز نوع نمونه بالینی و منطقه جغرافیایی مورد مطالعه در شیوع اینتگرول‌ها حتی در یک کشور موثر خواهد بود [۳۱]. در مطالعه Lin و همکاران در تایوان ۷۲ درصد از ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* واجد ژن اینتگرول I بودند، اما اینتگرول کلاس II در آنها یافت نشد [۳۲]. در بررسی Koczura و همکاران (در سال ۲۰۱۴) در لهستان از سه کلاس اینتگرول تنها اینتگرول کلاس I در ۶۳/۵ درصد از ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* وجود داشت [۳۳]. به‌همین شکل در مطالعه‌ای که توسط Mengelöglu در کشور ترکیه (در سال ۲۰۱۴) انجام شد، تنها ۳۳ درصد از ایزوله‌های این باکتری

- in Karachi, Pakistan. *J Hosp Infect* 2011; 78(2): 143-8.
- [7] Rowe-Magnus DA, Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol* 2002; 292(2): 115-25.
  - [8] Chiang MC, Kuo SC, Chen YC, Lee YT, Chen TL, Fung CP. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Acinetobacter baumannii* in endotracheal aspirates from patients in the intensive care unit. *J Microbiol Immunol Infect* 2011; 44(2): 106-10.
  - [9] 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(12): 4114-23.
  - [10] Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJ, Woodward MJ. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53(2): 208-16.
  - [11] Van TT, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic

- resistance and virulence genes. *Int J Food Microbiol* 2008; 124(3): 217-23.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; 20<sup>th</sup> informational supplement. CLSI/NCCLS M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, 2010.
- [13] Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* 2007; 45(2): 544-7.
- [14] Toro CS, Farfán M, Contreras I, Flores O, Navarro N, Mora GC, et al. Genetic analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant *Shigella* strains isolated from Chilean children. *Epidemiol Infect* 2005; 133(1): 81-6.
- [15] Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(1): 71-6.
- [16] Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27(4): 351-3.
- [17] Koeleman JGM, Stoof J, Van Der Bijl MW, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Identification of Epidemic Strains of *Acinetobacter baumannii* by Integrase Gene PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(1): 8-13.
- [18] Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* Infections. *Clin Infect Dis* 2010; 51(1): 79-84.
- [19] Kheltabadi Farahani R, Moniri R, Shajari GhR, Nazem Shirazi MH, Musavi GhA, Ghasemi A, et al. Antimicrobial Susceptibility patterns and the distribution of resistance genes among *Acinetobacter* species isolated from patients in Shahid Beheshti hospital, Kashan. *Feyz* 2009; 12(4): 61-7. [in Persian]
- [20] D'Arezzo S, Principe L, Capone A, Petrosillo N, Petrucca A, Visca P. Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(1): 54-61.
- [21] Azhari F, Farajnia S, Rahnema M. Investigation of prevalence of ESBL types VEB-1 and PER-2 genes and INT-1 in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients of Imam Reza hospital in Tabriz. *Quarterly J Biological Sci* 2010; 4(4(11)): 1-10.
- [22] Huang L, Sun L, Xu G, Xia T. Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62(3): 326-32.
- [23] Momtaz H, Khamesipour F, Tavakol M, Awosile B. Determination of antimicrobial resistance and resistant genes in *Acinetobacter baumannii* from human clinical samples. *West Indian Med J* 2015.
- [24] Shakibaie MR, Adeli S, Salehi MH. Antibiotic resistance patterns and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production among *Acinetobacter* spp. isolated from an intensive care Unit of a hospital in Kerman, Iran. *Antimicrob Resist Infect Control* 2012; 1(1): 1-8.
- [25] Aliakbarzade K, Farajnia S, Karimi Nik A, Zarei F, Tanomand A. Prevalence of Aminoglycoside Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii* Isolates. *Jundishapur J Microbiol* 2014; 7(10): e11924.
- [26] Mirnejad R, Mostofi S, Masjedian F. Role of class 2 integron in antibiotic susceptibility pattern of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospitals in tehran. *Sci J Hamdan Univ Med Sci* 2012; 18(4): 22-8.
- [27] Moammadi F, Arabestani M, Safari M, Roshanaii G, Alikhani M. Prevalence of class 1, 2 and 3 integrons among extensive drug resistance *Acinetobacter baumannii* strains isolated from intensive care units in Hamadan, west province, Iran. *Iran J Med Microbiol* 2014; 8(3): 8-14.
- [28] Peymani A, Farajnia S, Nahaei MR, Sohrabi N, Abbasi L, Ansarin K, et al. Prevalence of class 1 integron among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, northwest of Iran. *Pol J Microbiol* 2012; 61(1): 57-60.
- [29] Japoni S, Japoni A, Farshad S, Ali AA, Jamalidoust M. Association between existence of integrons and multidrug resistance in *Acinetobacter* isolated from patients in southern Iran. *Pol J Microbiol* 2011; 60(2): 163-8.
- [30] Mirnejad R, Mostofi S, Masjedian F. Antibiotic resistance and carriage class 1 and 2 integrons in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Tehran, Iran. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; 3(2): 140-5.
- [31] Lin MF, Liou ML, Tu CC, Yeh HW, Lan CY. Molecular epidemiology of integron-associated antimicrobial gene cassettes in the clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from northern Taiwan. *Ann Lab Med* 2013; 33(4): 242-7.
- [32] Koczura M, Przyszlakowska B, Mokracka J, Kaznowski A. Class 1 Integrons and Antibiotic Resistance of Clinical *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* Complex in Poznan, Poland. *Curr Microbiol* 2014; 69(3): 105-14.
- [33] Mengeloğlu FZ, Copur Çiçek A, Koçoğlu E, Sandallı C, Budak EE, Özgümüş OB. Carriage of class 1 and 2 integrons in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens and a novel gene cassette array: blaOXA-11-cmlA7. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(1): 48-58.