مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های بالینی Acinetobacter baumannii در حضور مهارکننده پمپ تراوشی

پریسا نیک‌آسا [۱]، احیا عبدی عالی [*۲]، محمدعلی بهار [۳]، وحید نیکنام [۴]

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی از دانشکده علوم‌پایه دانشگاه الزهرا (س)
۲. دکترای میکروب‌شناسی پزشکی، استادیار دانشکده علوم‌پایه دانشگاه الزهرا (س)
۳. دکترای ایمونولوژی پزشکی، دانشیار بیمارستان شهید مطهری تهران
۴. دکترای فیزیولوژی گیاهی، استادیار دانشکده علوم‌پایه دانشگاه تهران

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران، میدان ونک، ده ونک، گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم‌پایه دانشگاه الزهرا (س) تلفن ۸۸۰۵۸۹۱۲، abdialya@alzahra.ac.ir

دریافت مقاله: تیر هشتاد و هفت پذیرش برای چاپ: شهریور هشتاد و هفت

چکیده

سابقه و هدف: *گونه‌های Acinetobacter به‌ویژه A.baumannii ، پاتوژن‌های فرصت‌طلب مهمی هستند که عامل انواع عفونت-های بیمارستانی به‌شمار می‌روند. گونه مذکور با دارا بودن مقاومت ذاتی به آنتی‌بیوتیک‌ها و توانایی پذیرش ژنهای کدکننده مقاومت، به‌عنوان یکی از میکروارگانیزم‌های شاخص مطرح است. یکی از انواع مکانیسم‌های مقاومت در این باکتری بیان پمپ‌های تراوشی (Efflux) می‌باشد. هدف از انجام پروژه حاضر بررسی مقاومت A.baumannii نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی و نقش پمپ تراوشی در میزان مقاومت سویه‌های بالینی است.*

روش کار: *در مدت ۹ ماه ۶۵ سویه Acinetobacter از نمونه‌های بالینی مختلف زخم، ادرار، خلط، خون و مغزاستخوان از سه بیمارستان تهران جمع‌آوری گردید و توسط تست‌های بیوشیمیایی تعیین گونه شدند. ابتدا تست حساسیت آنتی‌بیوتیک به روش انتشار در آگار (Kirby-Bauer) نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک و سپس تست حساسیت ضد میکروبی به روش میکرودایلوشن به شش آنتی‌بیوتیک رایج درمانی بررسی شد و نتایج به صورت MIC بدست آمد. در مرحله آخر برای بررسی نقش افلاکس در میزان مقاومت باکتری، MIC در حضور CCCP به‌عنوان مهارکننده پمپ‌های تراوشی بر روی ۲۰ سویه مقاوم به بیش از ده آنتی‌بیوتیک، تعیین شد.*

یافته ها: *تنها گونه جدا شده A.baumannii بود. اکثر سویه‌های این گونه به‌عنوان سویه‌های دارای مقاومت چندگانه دارویی (MDR) شناخته شدند. میزان MIC (µg/ml) برای آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، جنتامیسین، آمیکاسین، سفپیم، سیپروفلوکساسین، و افلوکساسین به‌ترتیب بیشتر از ۲۵۶، ۶۴، ۶۴، ۳۲، ۱۶ و ۸ گزارش شد. CCCP میزان MIC را در سویه‌های مورد بررسی حداقل یک رقت کاهش داد.*

نتیجه‌گیری: *سویه‌های A.baumannii ، مقاومت بسیار بالایی به آنتی‌بیوتیک‌های درمانی دارند و با توجه به کاهش میزان MIC در حضور ماده مهارکننده پمپ‌های تراوشی در سویه‌های مورد بررسی، احتمال بیان سیستم‌های تراوشی فعال و نقش آنها در بالا بردن میزان مقاومت این باکتری‌ها وجود دارد.*

واژگان کلیدی: ***Acinetobacter baumannii، MIC، پمپ‌های تراوشی***

مقدمه

گونه‌های Acinetobacter به‌ویژه A.baumannii ، پاتوژن‌های فرصت‌طلب مهمی هستند. گونه ژنومی ۲ این جنس (A.baumannii) مقام دوم را پس از P.aeruginosa در بین پاتوژن‌های غیرتخمیری MDR (Multi-drug resistant) در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی دارد. این باکتری‌ها می‌توانندعامل باکتریمی، عفونت دستگاه ادراری و مننژیت ثانویه باشند و در واقع نقش اصلی آنها ایجاد پنومونی بیمارستانی به‌ویژه پنومونی وابسته به دستگاه تنفسی در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) می‌باشد. اغلب درمان چنین عفونت‌هایی به علت مقاومت گسترده این باکتری‌ها به گروه‌های زیادی از آنتی‌بیوتیک‌های درمانی، برای پزشکان بسیار مشکل است (۱و۲). سویه‌های A.baumannii به لحاظ مقاومت ذاتی به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین توانایی بالای پذیرش عوامل ژنتیکی مقاومت بسیار شناخته شده‌اند (۳). مقاومت ذاتی این باکتری‌ها می‌تواند در نتیجه اثر متقابل کاهش نفوذپذیری غشای خارجی و بیان سیستم‌های تراوشی فعال صورت گیرد (۴).

مهمترین مکانیسم‌های مقاومت در این باکتری‌ها تولید آنزیم‌های β-لاکتاماز و آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها می‌باشند. به‌علاوه بیان کاهش یافته پروتئین‌های غشای خارجی، موتاسیون در توپوایزومرازها و افزایش بیان پمپ‌های تراوشی نقش مهمی در مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایفا می‌کنند (۳). دو سیستم تراوشی فعال نوع RND -(resistance nodulation-cell division) به‌نام‌های AdeABC و AdeDE در گونه‌های Acinetobacter شناسایی شده‌اند (۵). افلاکس فعال باعث افزایش میزان MIC عوامل ضدمیکروبی می‌شود. بنابراین میزان MIC سوبستراهای آنتی‌بیوتیکی این پمپ‌ها در حضور مواد تخریب کننده گرادیان الکتروشیمیایی یون‌های پروتون در غشا و در نتیجه مهار پمپ‌های تراوشی استفاده کننده از نیروی محرکه پروتونی، کاهش می‌یابد (۶). در این پروژه مقاومت A.baumannii نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک رایج بررسی شد و نقش پمپ تراوشی در میزان مقاومت سویه‌های بالینی مورد مطالعه قرار گرفت.

روش کار

۶۵ سویه کلینیکی Acinetobacter از نمونه‌های بالینی مختلف زخم، ادرار، خون، خلط و مغز استخوان در طی ۹ ماه از سه بیمارستان در تهران جمع‌آوری و پس از تایید توسط تست‌های بیوشیمیایی که در جدول ۱ آمده است، تعیین گونه شد. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار در آگار Kirby-bauer برای ۱۲ آنتی‌بیوتیک بر روی تمامی سویه‌ها انجام شد (۷) . در مرحله بعد حساسیت سویه‌های کلینیکی A.baumannii به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، آمیکاسین، جنتامیسین، سفتازیدیم و سفپیم با روش تهیه رقت‌های متوالی استاندارد (Broth serial dilution) در محیط MHB (Merck) با تعداد 10^6 Cfu/ml × ۱ باکتری اندازه‌گیری شد (۸و۹) . سپس روش میکرودایلوشن در حضور ماده مهارکننده سیستم‌های تراوشی کربونیل سیانید m-کلروفنیل هیدرازون (CCCP) با غلظت نهایی ۳۰ µM بر روی سویه‌های مقاوم به بیش از ده آنتی‌بیوتیک انجام شد (۱۰). نتایج به‌عنوان MIC بدست آمد که نشان‌دهنده غلظتی از آنتی-بیوتیک است که در حضور و غیاب CCCP رشد قابل مشاهده با چشم غیرمسلح را پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در C ۳۷ درجه مهار می‌کند.

جدول ۱. تست‌های بیوشیمیایی لازم برای شناسایی A.baumannii

تست بیوشیمیایی	*A.baumannii*
اکسیداز	-
کاتالاز	+
Mac	+
همولیز	-
TSI	Alk/NC
Oxidative-Fermentation (O-F)	Oxi
بایل‌اسکولین	-
مالونات	+
آرژنین‌دهیدرولاز	+
اورنیتین‌دکربوکسیلاز	+ (-)
فنیل‌آلانین دآمیناز	-
رشد در ۴۲ درجه	+
SIM	-
سیترات	+

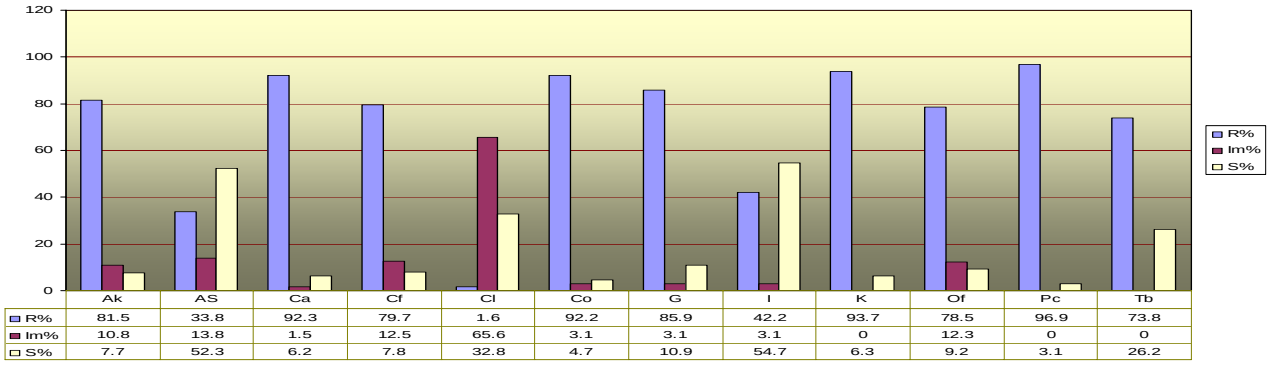
یافته ها

با توجه به نتایج حاصل از انجام تست‌های بیوشیمیایی بر روی ۶۵ سویه بالینی Acinetobacter و تشخیص تمامی آنها به عنوان A.baumannii (جدول ۱)، این گونه شایعترین گونه جنس Acinetobacter شناخته شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی حاصل از آنتی-بیوگرام سویه‌های کلینیکی A.baumannii بدین شرح می‌باشد: آمیکاسین (۸۱/۵ درصد)، آمپی‌سیلین-سولباکتام (۳۳/۸ درصد)، سفتازیدیم (۹۲/۳ درصد)، سیپروفلوکساسین (۷۹/۷ درصد)، کلیستین (۱/۶ درصد) کوتریموکسازول (۹۲/۲ درصد)، جنتامیسین (۸۵/۹ درصد)، ایمی‌پنم (۴۲/۲ درصد)، کانامایسین (۹۳/۷ درصد)، افلوکساسین (۷۸/۵ درصد)، پیپراسیلین (۹۶/۹ درصد) و توبرامایسین (۷۳/۸ درصد) (نمودار ۱). همانطورکه مشاهده می‌شود سویه‌های ایرانی A.baumannii به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های درمانی مقاومت نشان می‌دهند. ۲۲ آنتی‌بیوتیپ مختلف به‌دست آمده از نتایج آنتی‌بیوگرام سویه‌های A.baumannii در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از MIC بر حسب (µg/ml) برای آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، جنتامیسین، آمیکاسین، سفپیم، سیپروفلوکساسین و افلوکساسین به‌ترتیب بیشتر از ۲۵۶، ۶۴، ۶۴، ۳۲، ، ۱۶ و ۸ گزارش شد. همانطورکه در نمودار ۲ مشاهده می‌شود میزان MIC در حضور CCCP در سویه‌های MDR بررسی شده حداقل یک مرتبه کاهش نشان می‌دهد.

جدول ۲. فراوانی آنتی‌بیوتیپ‌های بدست‌آمده از نتایج آنتی‌بیوگرام در بین سویه‌های A.baumannii

تعداد سویه	آنتی‌بیوتیک	پروفیل مقاومت (آنتی‌بیوتیپ)
۲	-	۱
۱	Pc	۲
۱	Ca, G, Pc	۳
۱	Co, G, K, Pc, Tb	۴
۴	Ak, As, Cl, Cf, Of, I	۵
۲	Ca, Cf, Of, K, Pc, Co	۶
۱	Ak, Co, G, I, K, Pc, Tb	۷
۴	Ak, Ca, Cf, Of, Co, K, Pc	۸
۱	Ak, Ca, Co, G, K, Pc, Tb	۹
۱	Ak, Ca, Co, G, K, Pc, Tb, Cf	۱۰
۱	Ak, Ca, Co, G, I, K, Pc, Tb	۱۱
۱	Ak, Ca, Co, G, K, Pc, Cf, Of	۱۲
۱	Ca, G, K, Pc, Co, Cf, Of, As	۱۳
۱	Ak, Ca, Cf, G, K, Of, Pc, As, I	۱۴
۱۹	Ak, Ca, Cf, G, K, Of, Pc, Tb, Co	۱۵
۲	Ak, Ca, Cf, G, K, Of, Pc, As, Co	۱۶
۱	Ak, Ca, Cf, G, K, Of, Pc, Co, I	۱۷
۱	Ak, Ca, G, K, Pc, As, I, Co, Tb	۱۸
۱	Ak, Ca, G, K, Pc, As, I, Co, Cf, Of	۱۹
۱	Ak, Ca, G, K, Pc, As, Co, Cf, Of, Tb	۲۰
۷	Ak, Ca, G, K, Pc, I, Co, Cf, Of, Tb	۲۱
۱۱	Ak, Ca, G, K, Pc, I, Co, Cf, Of, Tb, As	۲۲

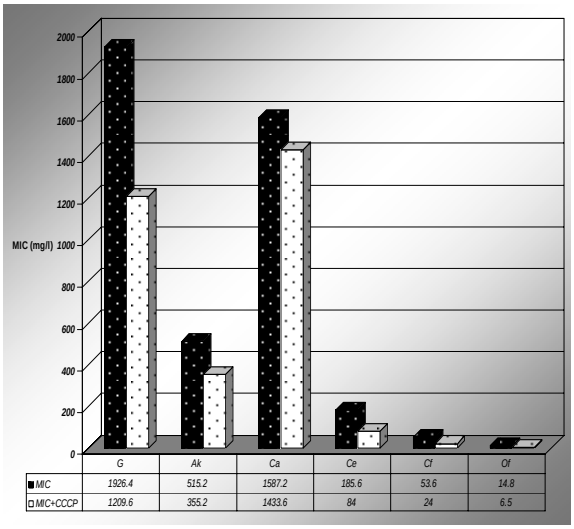
Ak: آمیکاسین، AS : آمپی‌سیلین-سولباکتام، Ca: سفتازیدیم، Cf : سیپروفلوکساسین، Cl : کلیستین، CO: کوتریموکسازول، G : جنتامیسین، I: ایمی‌پنم، K: کانامایسین، Of : افلوکساسین، Pc: پیپراسیلین Tb: توبرامایسین.



	Ak	AS	Ca	Cf	Cl	Co	G	I	K	Of	Pc	Tb
R%	81.5	33.8	92.3	79.7	1.6	92.2	85.9	42.2	93.7	78.5	96.9	73.8
Im%	10.8	13.8	1.5	12.5	65.6	3.1	3.1	3.1	0	12.3	0	0
S%	7.7	52.3	6.2	7.8	32.8	4.7	10.9	54.7	6.3	9.2	3.1	26.2

نمودار ۱. نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام ۱۲ آنتی‌بیوتیک رایج درمانی بر روی سویه‌های A.baumannii

Ak: آمیکاسین، AS : آمپی‌سیلین-سولباکتام، Ca: سفتازیدیم، Cf : سیپروفلوکساسین، Cl : کلیستین، CO :کوتریموکسازول، G : جنتامیسین، I: ایمی‌پنم، K: کانامایسین، Of : افلوکساسین، Pc: پیپراسیلین Tb: توبرامایسین. S: حساس؛ Im :حساس نسبی؛ R : مقاوم.



نمودار ۲. میزان MIC در حضور و غیاب ماده مهارکننده پمپ تراوشی (CCCP با غلظت ۳۰ µM).

Ak: آمیکاسین، AS : آمپی‌سیلین-سولباکتام، Ca: سفتازیدیم، Cf : سیپروفلوکساسین، Cl : کلیستین، CO : کوتریموکسازول، G : جنتامیسین، I: ایمی‌پنم، K: کانامایسین، Of : افلوکساسین، Pc: پیپراسیلین Tb: توبرامایسین.

بحث

گونه‌های Acinetobacter به خصوص A.baumannii نقش بسیار مهمی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی ایفا می‌کنند. این باکتری به علت داشتن توانایی بالا در کسب ژن‌های مقاومت تقریبا به تمامی آنتی‌بیوتیک-های رایج مقاومت نشان می‌دهد به‌طوریکه تا چندی پیش داروهای پیشنهادی برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها، پنی‌سیلین‌های وسیع الطیف و کرباپنم‌ها بودند که امروزه نتایج حاصل از تحقیقات در کشورهای مختلف افزایش مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد.

مطالعات نشان داده‌اند که سویه‌های کلینیکی Acinetobacter هنوز تا حد زیادی به آمپی‌سیلین-سولباکتام حساس باقی مانده‌اند با این حال متاسفانه ظهور مقاومت به سولباکتام در سویه‌های A,baumannii دیده می‌شود. به‌این‌ترتیب کلیستین (از انواع پلی‌میکسین‌ها) به عنوان تنها جایگزین درمان باقی مانده است ولی به علت عوارض جانبی ناشی از این آنتی‌بیوتیک استفاده از آن محدود می‌باشد (۱۳-۱۱).

نتایج مطالعه حاضر در این پروژه نیز مقاومت بالای سویه‌های A.baumannii را به آنتی‌بیوتیک‌های درمانی نشان می‌دهد و همانند سایر کشورها در ایران نیز شاهد افزایش مقاومت این باکتری به ایمی‌پنم (۴۲/۲ درصد سویه‌ها)و آمپی‌سیلین-سولباکتام (۳۳/۸ درصد سویه‌ها) می‌باشیم. بنابراین طبق نتایج بدست آمده بهترین آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های ناشی از A.baumannii در ایران آمپی‌سیلین-سولباکتام و ایمی‌پنم می‌باشد و همچنین تجویز کلیستین می‌تواند برای بیماران به‌خصوص برای بیماران دارای نقص کلیوی با احتیاط کامل صورت گیرد. نتایج MIC گزارش شده از سایر کشورها مانند ایتالیا و امریکا در مقایسه با نتایج ما نشان می‌دهد که متاسفانه میزان مقاومت سویه‌های A.baumannii در ایران نسبت به کشورهای مذکور بالاتر می-باشد.مکانیسم افلاکس در این باکتری تا کنون بسیار کم مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است و شناخته شده‌ترین نوع افلاکس در این نوع باکتری (A.baumannii) پمپ AdeABC نوع RND می‌باشد (۱) . این پمپ توسط نیروی محرکه پروتونی غشا، توانایی تراوش سوبسترا به خارج از غشای سیتوپلاسمی را دارد، در نتیجه توسط مواد مهارکننده پمپ‌هایی که از نیروی محرکه پروتونی برای تراوش مواد ضدمیکروبی استفاده می‌کنند می‌توان این پمپ تراوشی را غیرفعال نمود. در پژوهش حاضر برای این کار از CCCP که تخریب‌کننده گرادیان الکتروشیمیایی یون‌های پروتون در غشای باکتری است استفاده شد و همانطور که انتظار می‌رفت MIC در سویه‌های MDR مورد بررسی در حضور CCCP کاهش نشان داد که می‌تواند نشان‌دهنده حضور پمپ‌های تراوشی در این باکتری باشد.

REFERENCES

1. Magnet,S., Courvalin,P ,and T,Lambert. Resistance-Nudulation-Cell Division-Type Efflux Pump Involved in Aminoglycoside Resistance in Acinetobacter baumannii strain BM4454. Antimicrob.Agents. chemother. 2001. 12: 3375-3380.

2. Bergogne, B.E, and K.J, Towner. Acinetobacter spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological,Clinical, and Epidemiological Features. Clin. Microbiol. Rev. 1996. p.148-165.

3. Bonomo, A.R, and Szabo, D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa. Clin. Infect. Dis. 2006. 43: 49-56

4. Vila, J., Marti, S, and S.C, Javier. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in Acinetobacter baumannii. J. Antimicrob. Chemother. 2007. P: 1-6.

5. Chu, Y.W., Chau, S.L, and E.T, Houang. Presence of active efflux systems AdeABC, AdeDE and Ade XYZ in different Acinetobacter genomic DNA groups. J.M.M. 2006.477-8.

6. Piddock, J.V, and M.M, Johnson. Accumulation of 10 Fluoroquinolones by wild-type of efflux mutant Streptococcus pneumonia. Antimicrobial. Agents. Chemother. 2002. 46: 813-820.

7. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test; Approved Standard–Ninth Edition, CLSI / NCCLS M2-A9.26-1.

8.CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard–Seventh Edition, CLSI / NCCLS M7-A7.26-2.

9. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, CLSI / NCCLS M100-S16. 26-3.
10. Paulsen, I.T., Brown, M.H, and R.A, Skuray. Proton-depended multidrug efflux system. Microbiolo. Rew. 1996. 575-608.

11. Higgins, G.p., Wisplinghoff, H., Stefanik, D, and H, Seifert. 2004. In vitro activity of the B-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with B-lactamase against epidemiologically characterized multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strains. Antimicrob. Agents. Chemother. 5:1586-92.

12. Mubareka, S, and E, Rubinstein. 2005. Aerosolized colistin for the treatment of nosocomial pneumonia due to multidrug-resistant gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. Bio. Med. Central. 9: 29-30.

13. Katragkou, A, and E, Roilides. 2005. Successful treatment of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii central nervous system infections with colistin. J. Clin. Microbiol. 9: 4916-17.