فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف KPC و NDM در اسینتوباکتر بومانی ایزوله شده از بیماران شهر تهران به روش مولکولی PCR

الهام میرزائی[۱]، رضا حسینی دوست[۲]، رضا میرنژاد[۳]*، ستاره حقیقت[۴]، حسین رضا ربیعی[۵]

۱.کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی، واحد علوم داروئی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۲.استاد میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، واحد علوم داروئی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۳.استادیار باکتری شناسی پزشکی- مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران،ایران.
۴.استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی، واحد علوم داروئی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.
۵.کارشناس ارشد بیوتکنولوژی پزشکی- مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، تلفاکس : ۸۸۰۳۹۸۸۳-۰۲۱،rmirnejad@yahoo.com
دریافت مقاله: فروردین نود و سه پذیرش برای چاپ: خرداد نود و سه

چکیده

سابقه و هدف: *امروزه به علت خاصیت کلینیکی قابل توجه اسینتوباکتر بومانی به ویژه طی سال های اخیر و توانایی آن در کسب مقاومت دارویی، به علت تولید آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL)، آن را به عنوان یکی از میکروارگانیسم های تهدید کننده نسبت به درمان با داروهای ضد میکروبی در نظر می گیرند. لذا این مطالعه با هدف تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی سویه های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف KPC و NDM در سویه های اسینتوباکتربومانی جدا شده از نمونه های بالینی شهر تهران به روش مولکولی PCR انجام گردید.*

روش کار: *این مطالعه در ۳ بیمارستان شهر تهران بر روی ۵۰۰ نمونه ی کلینیکی طی مدت ۱ سال اجرا گردید. با استفاده از روش های کشت و بیوشیمیایی ایزوله های اسینتوباکتر بومانی تا حد گونه شناسایی شدند. سپس تست حساسیت آنتی بیوتیکی بر روی ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با روش انتشار دیسک (Disk diffusion) برای ۱۱ آنتی بیوتیک بر اساس دستورالعمل CLIS انجام گردید. سپس برای بررسی شیوع ژن های blaKPC و blaNDM با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PCR انجام شد.*

یافته ها: *با توجه به نتایج غربالگری اولیه، بیش از ۵۵٪ ایزوله های اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو بودند و بیش از ۹۰٪ سویه ها مقاوم به سفی پیم، سفتریاکسون و آمیکاسین بودند. هم چنین نتایج PCR نشان داد که به ترتیب ۱۳مورد(۱۳٪) و ۱۹ مورد(۱۹٪) سویه ها حامل ژن های blaKPC وblaNDM می باشند که اغلب این سویه ها از افراد بستری در بخش مراقبت های ویژه بود.*

نتیجه گیری: *اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو در ایران در حال گسترش می باشد و یک مشکل بزرگ برای بیماران می باشند. با توجه به نتایج این تحقیق می توان گفت که اسینتوباکتربومانی حامل ژن های مقاومت و با توجه به انتقال افقی این ژن ها بین میکروارگانیسم ها امکان انتشار مقاومت در بین آن ها وجود دارد. در نتیجه شناسایی سریع این سویه ها نقش مهمی در جلوگیری از گسترش آن ها دارد.*

واژگان کلیدی: اسینتوباکتر بومانی، مقاومت چند داروئی ، blaKPC blaNDM وPCR

مقدمه

گونه های اسینتوباکتر، باکتری های گرم منفی هستند که به طور وسیعی در خاک و آب و پوست انسان وجود دارند. این باکتری هم چنین از آلوده کننده های شایع محیط های آزمایشگاهی و بیمارستانی می باشد. این ارگانیسم به عنوان فلور نرمال در اوروفارنکس و پوست افراد سالم وجود داشته و در سال های اخیر به عنوان یک عامل مهم در عفونت های بیمارستانی گزارش شده است. اسینتوباکتر بومانی شایع ترین گونه ای است که از خون، خلط، پوست، مایع جنب و ادرار قابل جداسازی می باشد(۱). مشکلات درمانی ناشی از این باکتری و امکان انتقال بین موجودات زنده و غیر زنده و هم چنین ماندگاری طولانی مدت در محیط بیمارستان باعث افزایش ظهور این باکتری در محیط های بیمارستانی و عفونت روز افزون ناشی از آن شده است(۲). به طوری که مرگ و میر در بیمارانی که از عفونت های اسینتوباکتر بومانی رنج می برند حدود ۷۵٪

تخمین زده می شود. در طی دهه ی گذشته ایزوله های مقاوم به چند دارو اسینتوباکتر بومانی در حال افزایش بوده که احتمالا نتیجه استفاده گسترده از عوامل ضد میکروبی می باشد، مقاومت به چند دارو در اسینتوباکترها تنها در اسینتوباکتر بومانی گزارش شده است. اکثر سویه های اسینتوباکتر بومانی به آمپی سیلین، آموکسی سیلین، کلاولانیک اسید، پنی سیلین ضد استافیلوکوکی، سفالوسپورین ها با طیف وسیع، تتراسایکلین، ماکرولیدها، ریفامپین، کلرامفنیکل مقاوم هستند. مقاومت به عوامل ضد میکروبی در میان ایزوله های کلینیکی ممکن است درمان عفونت ها را بسیار مشکل کند و هم چنین اثر بدی بر روی نتایج کلینیکی و هزینه های درمانی بگذارد(۴،۳).

مکانیسم های مقاومت در گونه های مختلف اسینتوباکتر به صورت مختلفی بروز می کنند. این مکانیسم ها شامل تغییر در نفوذ پذیری پورین، سیستم های دفع آنتی بیوتیکی (Efflux Pump) و ترشح بتالاکتامازها به خصوص بتالاکتامازهای وسیع الطیف می باشند. بتالاکتامازهای وسیع الطیف بر اساس عملکرد و ویژگی های مولکولی به گروه های مختلف تقسیم شده اند که می توان به CMY، TEM، SHV، CTX، OXA ، KPC، IMP، VIM، NDM اشاره کرد(۸-۵). ، KPC، OXA، IMP، VIM، NDM اشاره کرد(۸-۵).

کارباپنماز کلبسیلا پنومونیه (KPC)، یک بتالاکتاماز کلاس A(زیر گروه 2f بوش) می باشد که مقاومت به تقریبا همه بتالاکتام ها شامل کارباپنم ها را دارا می باشند. این آنزیم نخستین بار در آمریکا در سال ۱۹۹۶ در یک ایزوله کلبسیلا پنومونیه گزارش شد. گسترش آنزیم های KPC در میان گونه های مختلف باکتریایی تقریبا ناشی از قرارگیری ژن های blaKPC روی پلاسمیدهای میزبانی انتقال پذیر و ارتباطشان با ترانس پوزون ها و عناصر IS می باشد. گسترش سریع این آنزیم ها زمانی است که درمان عفونت هایی که توسط تولید کنندگان KPC ایجاد می شود، دشوار بوده، که این مساله ناشی از گزینه های درمانی نادری است که در دسترس هستند و نیز سرعت بالای شیوع بیماری می باشد. باکتری های حاوی آنزیم های KPC توانایی غیر فعال کردن تمام پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها، آزترونام ها و از همه مهم تر کارباپنم ها را دارند(۶).

NDM(New Delhi Metalo betalactamase) یک متالوبتالاکتاماز کلاس B آمبلر و ۳ بوش می باشد، این آنزیم وابسته به روی است و به همین دلیل به عنوان متالوبتالاکتاماز نامیده می شود، که باعث هیدرولیز تمام آنتی بیوتیک های بتالاکتامی به جز آزترونام می شود. سویه واجد این بتالاکتاماز بطور گسترده ای به آنتی بیوتیک ها مقاوم می باشند و تنها به کلستین و به میزان کمتر به تایگلسین حساس هستند. NDM برای اولین بار در سال ۲۰۰۸ از بیمار سوئدی هندی تبار از کلبسیلا پنومونیه جداسازی شد. پخش و گسترش آنزیم های NDM در میان گونه های مختلف باکتریایی ناشی از قرار گیری ژن های blaNDM بر روی پلاسمید های میزبانی انتقال پذیر و ارتباطشان با ترانس پوزون ها و عناصر IS می باشد(۸،۷).

با توجه به ظهور سویه های مقاوم حاوی ژن های blaKPC و blaNDM در نمونه های بالینی در جهان، که به عنوان یک تهدید عمده برای بهداشت جهانی می باشد و با نظر به این که تاکنون مطالعه ای در ایران مبنی بر تایید حضور این ژن ها (bla KPC و blaNDM) در نمونه های بالینی اسینتوباکتر بومانی صورت نگرفته است. این مطالعه طراحی گردید تا با شناخت صحیح الگوی مقاومت ژنتیکی، جهت انتخاب نوع و مقدار مناسب دارو در مراحل خاص بیماری زایی در جهت کاهش ایجاد عفونت های ناشی از این باکتری گام برداشت.

روش کار

در طی سال های ۹۲-۱۳۹۱ ، ۵۰۰ نمونه از بیمارستان های مختلف شهر تهران (امام خمینی، بقیه ا...(عج)، میلاد و ...) جمع آوری شد و سپس در محیط انتقال دهنده ی BHI براث به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نمونه های مورد بررسی شامل نمونه های جمع آوری شده از خون، ادرار، زخم و تراشه و... بودند. این نمونه ها از بیمارانی که حداقل به مدت سه روز در این بیمارستان ها بستری شده بودند و عفونت را در محیط بیمارستان کسب کرده بودند جمع آوری شد. هر نمونه روی محیط های بلادآگار و مک کانکی آگار کشت داده شدند. سپس کشت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس نگه داری شدند. پس از ۲۴ ساعت، تمام کشت ها با استفاده از محیط های کشت اختصاصی و تست های بیوشیمیائی مانند اوره آز، OF، SIM، MRVP، TSI و هم چنین تست های کاتالاز، اکسیداز ، سیمون سیترات و رشد در ۳۷ و ۴۲ درجه سلسیوس جهت تشخیص گونه های مختلف اسینتوباکتر انجام گردید. جهت تعیین فنوتیپ مقاومت دارویی از روش دیسک دیفیوژن طبق دستورالعمل CLSI 2012 استفاده گردید(۹). بطور کلی ابتدا باکتری را در محیط مولرهینتون براث کشت داده و پس از یک ساعت انکوبه در ۳۷ درجه سلسیوس، با استفاده از سوآپ استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار پخش گردید. سپس دیسک های آنتی بیوتیک به فاصله استاندارد از یکدیگر قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله عدم رشد برای هر آنتی‌بیوتیک اندازه گیری گردید و نتایج برای هر آنتی بیوتیک مطابق با دستورالعمل مربوطه به عنوان حساس، حد واسط و مقاوم ثبت شد. در این مطالعه ۱۱ دیسک آنتی بیوتیکی مختلف از شرکت MAST (Mast Diagnostics, Mast group Ltd., Merseyside, UK) مورد استفاده قرار گرفت که شامل: سفی پیم(μg ۳۰)، سفتریاکسون(μg ۳۰)، آمیکاسین(μg ۳۰)، ، ایمی پنم(μg ۱۰)، پیپراسیلین-تازوباکتام (μg ۱۱۰)، مروپنم(μg ۱۰)، جنتامایسین (μg ۱۲)، توبرامایسین(μg ۱۰)، تتراسایکلین(μg ۳۰)، آمپی سیلین-سولباکتام(μg ۲۰)و پلی میکسین B(۳۰۰μg)بود. جهت کنترل کیفی آزمایشات بالا از سویه استاندارد اشریشیا کلی ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و سویه استاندارد اسینتوباکتر بومانی ATCC 19606 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد(۹).

مطابق با دستورالعمل CLSI 2012 به منظور تعیین حداقل غلظت آنتی بیوتیکی که مانع رشد باکتری می شود، آزمون MIC(Minimum Inhibitory Concentration Test) برای آنتی بیوتیک های سفی پیم و سفتازیدیم به روش رقت سازی متوالی انجام شد(۹).

با توجه به دستورالعمل CLSI 2012 جهت تعیین تولید آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف از روش غربالگری دیسک ترکیبی استفاده گردید. بدین صورت که بعد از کشت باکتری روی محیط مولر هینتون آگار، چهار دیسک سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم-کلاولانیک اسید و سفوتاکسیم- کلاولانیک اسید دیسک با فاصله ۱۵ میلی متر از یکدیگر روی آن ها قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، مشاهده افزایش بیش از ۵ میلی متر در قطر هاله هر کدام از آنتی بیوتیک های فوق در ترکیب با کلاولانیک اسید نسبت به آنتی بیوتیک تنها ارگانیسم تولید کننده ESBL و در غیر این صورت ارگانیسم ESBL منفی گزارش می شدند(۹) .

ژنوم تمام ایزوله های اسینتوباکتر بومانی به روش Boiling استخراج شدند. برای این منظور یک لوپ از کشت خالص باکتری در ۱۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی حل کرده سپس آن را به مدت ۲۰ دقیقه در آب جوش با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده و به سرعت میکروتیوپ در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاوی DNA باکتری می باشد. واکنش PCR در حجم نهائی ۲۵µL در نظر گرفته شد. هر نمونه شامل: ۹ µL 2X Master mix (ساخته کمپانی Ampliqon III کشور دانمارک و حاوی mM ۲۰dNTP، 1.5mM MgCl2) ۲ µL از DNA الگو، ۱ µL پرایمر شامل ۱۰pmol از هر پرایمر R و F (جدول ۱) و آب مقطر دوبار تقطیر استریل تا حجم۲۵ µL بود. با هر سری آزمایش PCR، یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی در نظر گرفته شد.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه (۱۰)

پرایمر	سکانس	اندازه محصول (برحسبbp)
KPC–F KPC–R	5'- CGTCTAGTTCTGCTGTCTTGC-3' 5'- CTTGTCATCCTTGTTAGGCG -3'	۷۸۹
NDM – F NDM - R	5'- GGTTTGGCGATCTGGTTTTCG-3' 5'- CGGAATGGCTCATCACGATCG-3'	۸۰۰

فرایند PCR برای تکثیر blaKPC در دستگاه ترموسایکلر GenAmp (دستگاه Eppendorf , Harburg ی آلمان) شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۰ سیکل (شامل مراحل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه) و در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. هم چنین این فرآیند برای تکثیر blaNDM شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۶ سیکل (شامل مراحل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه) و در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی DNA با رنگ سایبرگرین انجام شد. ژل ها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت محصولات PCR تعیین توالی شدند. .

داده های آماری با استفاده از نرم افزارSPSS13 و با کمک آزمون های آمار توصیفی تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها

در این تحقیق از ۱۳۰ نمونه اسینتوباکتر ایزوله شده از ۵۰۰ نمونه بیماران بستری،۱۰۰ نمونه (۷۶/۹٪) به عنوان اسینتوباکتر بومانی تعیین هویت شدند و۲۲ نمونه (۱۶/۹٪) اسینتوباکتر لوفی و ۸ نمونه (۶/۲٪) سایر گونه های اسینتوباکتر بود. از ۱۰۰ سویه ایزوله شده، ۴۰ نمونه از بخش مراقبت های ویژه، ۳۰ نمونه از بخش عفونی، ۲۰ نمونه از اورژانس و ۱۰ نمونه از سایر بخش ها ایزوله شد. ۴۰ نمونه خون (۴۰٪) ، ۲۷ نمونه تراشه (۲۷٪)، ۱۲ نمونه زخم (۱۲٪) ، ۸ نمونه ادرار (۸٪)، و ۱۳ نمونه (۱۳٪) مجهول ایزوله گردید .

بیش ترین مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های اسینتوباکتر بومانی به ترتیب مربوط به
آنتی بیوتیک های سفی پیم، سفتریاکسون و آمیکاسین و کم ترین مقاومت مربوط به پلی میکسین B به دست آمد

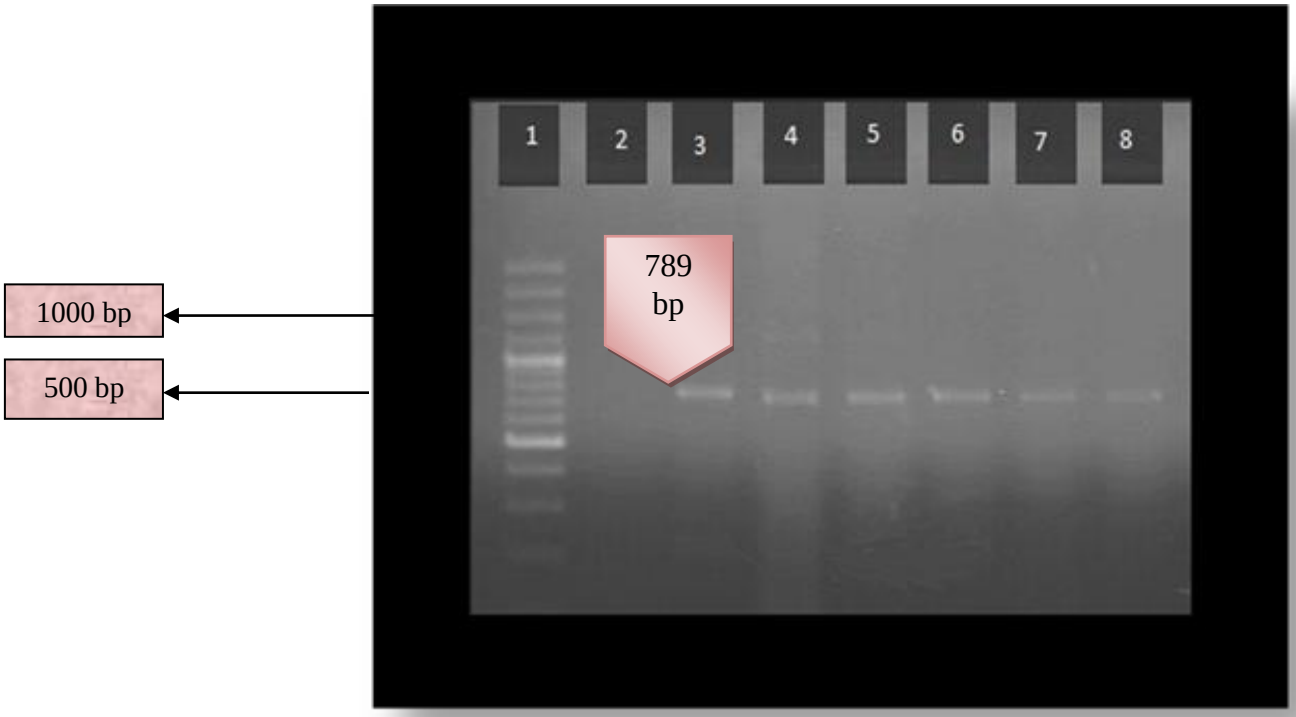
جدول ۲ . درصد مقاومت مشاهده شده در بین سویه های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران

نام آنتی بیوتیک	تعداد ایزوله های مقاوم اسینتوباکتر بومانی	مقاومت
سفی پیم	۹۷	٪۹۷
سفتریاکسون	۹۵	٪۹۵
آمیکاسین	۹۵	٪۹۵
ایمی پنم	۷۶	٪۷۶
پیپراسیلین-تازوباکتام	۷۰	٪۷۰
مروپنم	۶۹	٪۶۹
جنتامیسین	۶۳	٪۶۳
توبرامایسین	۵۶	٪۵۶
تتراسایکلین	۵۱	٪۵۱
آمپی سیلین-سولباکتام	۴۹	٪۴۹
پلی میکسین B	۳	٪۳

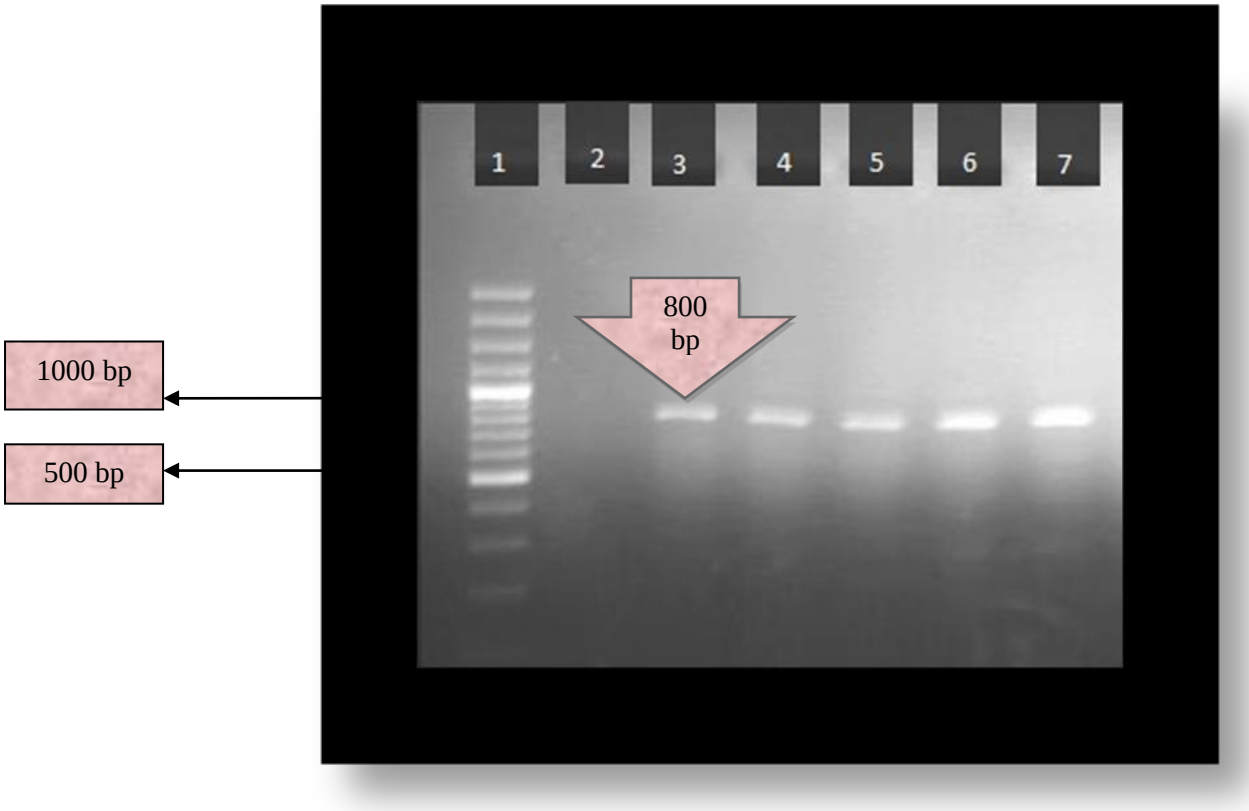
ایزوله های اسینتوباکتر بومانی در۲۰، ۱۰ و ۷۰ درصد موارد به ترتیب به یک، دو و سه یا بیش از سه آنتی بیوتیک مقاوم بودند.

از مجموع ایزوله های مورد مطالعه حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفتازیدیم در ۸۴٪ از نمونه ها برابر یا بیش از ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر و نسبت به سفی پیم در ۹۱٪ از نمونه ها برابر یا بیش از ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر بود. بر طبق نتایج آزمون غربالگری دیسک ترکیبی ۲۰٪ سویه ها مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف(ESBL) بودند.

نتایج PCR جهت شناسایی سویه های حاوی ژن blaKPC نشان داد که ۱۳ مورد (۱۳٪) از ایزوله ها دارای ژن blaKPC بودند(شکل ۱)، که بر اساس آنتی بیوگرام انجام شده بر روی این ۱۳ نمونه،۱۰۰٪ مقاوم به سفی پیم و سفتریاکسون، ۹۲٪ مقاوم به پیپراسیلین – تازوباکتام و ۷۶٪ مقاوم به ایمی پنم و مروپنم و آمیکاسین می باشند و هم چنین کم ترین میزان مقاومت نسبت به آمپی سیلین و سولباکتام ۳۸٪ و به پلی میکسین B حساس می باشد. هم چنین نتایج PCR جهت شناسایی سویه های حاوی ژن blaNDM نشان داد که ۱۹ مورد (۱۹٪) از ایزوله ها دارای ژن blaNDM بودند(شکل ۲)، که بر اساس آنتی بیوگرام انجام شده بر روی این ۱۹ نمونه،۹۴٪ مقاوم به سفتریاکسون، ۸۹٪مقاوم به آمیکاسین و ۸۴٪ مقاوم به ایمی پنم، مروپنم و سفی پیم می باشند و هم چنین کمترین میزان مقاومت نسبت به تتراسایکلین ۴۲٪ و به پلی میکسین B حساس می باشد.



شکل ۱. الکتروفورز ژل آگارز محصول آمپلی فای شده ی ژن blaKPC در سویه های *Acinetobacte baumanni* با PCR. ردیف ۱ مارکر (100bp DNA ladder, SM#333). ردیف ۳: محصولات آمپلی فای شده ژن blaKPC (۷۸۹bp) در سویه استاندارد.ردیف ۸-۴: محصولات آمپلی فای شده از نمونه های بالینی موردبررسی. ردیف ۲: محصول آمپلی فای شده ایزوله شده فاقد ژن blaKPC از نمونه های بالینی .



شکل ۲. الکتروفورز ژل آگارز محصول آمپلی فای شده ی ژن bla_{NDM} در سویه های *Acinetobacte baumannii* با PCR . ردیف ۱ مارکر (100bp DNA ladder, SM#333). ردیف ۳: محصول آمپلی فای شده ژن bla_{NDM} (۸۰۰bp) در سویه استاندارد. ردیف ۷-۴: محصولات آمپلی فای شده از نمونه های بالینی مورد بررسی. ردیف ۲ : محصول آمپلی فای شده ایزوله شده فاقد ژن blaNDM از نمونه های بالینی.

بحث

مطالعات مختلف در سراسر جهان نشان می دهد که سویه های اسینتوباکتر بومانی نسبت به تمام آنتی بیوتیک هایی که تاکنون گزارش شده است مقاومت نشان داده است. عملی که باعث تقویت این سیستم مقاومتی می شود، توانایی غیر عادی اسینتوباکتر بومانی در بقای طولانی مدت در محیط بیمارستان می باشد که همین امر عامل گسترش بیمارستانی این باکتری می باشد. این ارگانیسم به طور معمول بیماران بستری شده در بیمارستان که بسیار آسیب پذیر هستند و یا اختلال تنفسی دارند را مورد هدف قرار می دهد. امروزه مکانیسم های مختلفی برای مقاومت به چشم می خوردکه یکی از آن ها تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف است که توسط ژن های مختلفی از جمله blaKPC و blaNDM کد می شوند. با توجه به ظهور سویه های مقاوم حاوی ژن های blaKPC و blaNDM در نمونه های بالینی در جهان، که به عنوان یک تهدید عمده برای بهداشت جهانی می باشد و با نظر به این که تاکنون مطالعه ای در ایران مبنی بر تایید حضور این ژن ها (bla KPC و blaNDM) در نمونه های بالینی اسینتوباکتر بومانی صورت نگرفته است. این مطالعه با هدف تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی سویه های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف KPC و NDM در سویه های اسینتوباکتر بومانی جداشده از نمونه های بالینی به روش فنوتیپی و ژنوتیپی تعیین گردید.

در این تحقیق از ۱۳۰ نمونه اسینتوباکتر ایزوله شده از ۵۰۰ نمونه بیماران بستری، ۱۰۰ نمونه (۷۶/۹٪) به عنوان اسینتوباکتر بومانی تعیین هویت شدند و ۲۲ نمونه (۱۶/۹٪) اسینتوباکتر لوفی و ۸ نمونه (۶/۲٪) سایر گونه های اسینتوباکتر بودند که تقریبا مشابه مطالعه Constantiniu و همکارانش در طی سالهای ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۴ بود که گزارش نمودند از ۲۴ ایزوله های کلینیکی جدا شده، ۷۱٪ اسینتوباکتر بومانی و ۲۹٪ اسینتوباکتر لوفی می باشد(۱۱).

نتایج این مطالعه نیز همانند مطالعات Bassetti و Michalopoulosنشان داد که سویه های مختلف اسینتوباکتر بومانی نسبت به اکثر آنتی بیوتیک های مصرفی، مقاوم شده اند و ۷۰٪ ایزوله های اسینتوباکتر بومانی نسبت به ۳ یا بیش از ۳ آنتی بیوتیک مقاوم هستند. هم چنین در این مطالعه مشخص گردید که هیچ سویه ای از اسینتوباکتر بومانی مقاوم به همه آنتی بیوتیک ها ایزوله نشده و آنتی بیوتیکی وجود دارد که بر روی آن موثر باشد(۱۳،۱۲).

نتایج آنتی بیوگرام این تحقیق تا حدودی با نتایج Ayan در تناقض می باشد، اما با نتایج Karthika و Rahbar هم خوانی دارد که این می تواند ناشی از نحوه مطالعه و زمان اجرای تحقیق می باشد. همانند Mak و بر خلاف Tognim ، نتایج این مطالعه نشان داد که موثرترین دارو جهت درمان عفونت های ناشی از اسینتوباکتر پلی میکسین B می باشد (۱۶،۱۵،۱۴،۱۷).

در مطالعه حاضر همانند مطالعه Hujer و همکارانش (۱۸) و برخلاف بررسی های Feizabadi و همکارانش (۱۹)، نشان داده شد که حساسیت به مروپنم و ایمی پنم در ایزوله های اسینتوباکتر بومانی پائین می باشد و سویه های اسینتوباکتر بومانی به این آنتی بیوتیک ها تا حدودی مقاوم شده اند..

این مطالعه همانند مطالعات Wang و همکارانش (۲۰) و Smolyakov و همکارانش (۲۱) مشخص گردید که اغلب سویه ها به آمیکاسین، آمپی‌سیلین- سولباکتام، سفتازیدیم، سفی پیم، جنتامایسین، ایمی پنم، مروپنم، پیپراسیلین- تازوباکتام مقاوم و به پلی میکسین B حساس بودند.

برخلاف مطالعه ای که توسط Shahcheraghi و همکارانش (۲۳) صورت گرفت که حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفتازیدیم در ۸۳/۱٪ از نمونه ها MIC ≥64 µg/ml بود، در این مطالعه حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفتازیدیم در ۸۴٪ از نمونه ها MIC≥ 128 µg/ml بود که می توان به علت افزایش سویه های مقاوم یا تفاوت در نمونه های مورد بررسی باشد. لازم به ذکر است که در مطالعه Shahcheraghi و همکارانش حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفی پیم برعکس مطالعه ی حاضر بررسی نشده بود. نتایج بررسی میزان حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفتازیدیم در سویه های اسینتوباکتر بومانی در این مطالعه با نتایج مطالعات انجام گرفته در کشور کره و در کشور تایوان تقریبا هم خوانی داشت.

درصد فراوانی مولدین ESBL در این مطالعه با مطالعه ی Shahcheraghi و همکارانش(۲۳) در تهران (۱۸،۹٪) و مطالعه ای که در سال ۲۰۰۷ توسط Sinha و همکارانش(۲۴)در هند انجام شد (۲۸٪) و گزارشاتی که از بلغارستان(۲۸٪) ، قبرس(۱۶٪)، رومانی (۱۶٪) و پرتقال(۱۲٪) که بر روی مولدین ESBL انجام گرفت، با مطالعه ی حاضر تا حدی هم خوانی دارد، در حالی که با مطالعه Bahador و همکارانش(۲۵) که میزان فراوانی ESBL را ۴۴٪ اعلام کردند متفاوت می باشد.

درصد فراوانی ژن blaKPC در این تحقیق (۱۳٪) ، نسبتا همانند مطالعه هایی است که توسط Campus در مکزیک(۲۰٪) ، Chen در اروپا (۱۵/۲٪) و بر خلاف مطالعه ی Chen در یونان (۹۳٪)، Robeledo(۳/۸٪) در پورتوریکو گزارش گردید (۲۷،۲۶،۲۸).

درصد فراوانی شیوع متالوبتالاکتاماز NDM در این مطالعه که ۱۹٪ گزارش شد، برخلاف مطالعاتی که توسط Tognim و همکارانش در سال ۲۰۰۶ (۵۵٪) ، lee و همکارنش در سال ۲۰۰۳ (۹۶٪) گزارش گردید می باشد
(۲۸،۷).

میزان مقاومت نمونه های حامل ژن blaKPC در این مطالعه نسبت به سفتریاکسون ۱۰۰٪ و ایمی پنم و مروپنم ۷۶٪ می باشد که تا حدودی با مطالعه Chen و همکارانش که میزان مقاومت به سفتریاکسون ۸۰٪ و مقاومت به مروپنم ۵۰٪ گزارش کرده اند، مشابهت دارد و هم چنین در هر دو مطالعه کمترین میزان مقاومت مربوط به پلی میکسین B می باشد، ولی با میزان مقاومت به پیپراسیلین-تازوباکتام که در مطالعه ی ما ۹۲٪ اعلام شده است و در این مطالعه ۲۰٪ گزارش شده است، در تناقض می باشد(۲۷).

میزان مقاومت نمونه های حامل ژن blaNDM در این مطالعه نسبت به سفی پیم، ایمی پنم و مروپنم ۸۴٪ و آمپی سیلین-سولباکتام ۴۷٪ می باشد که تا حدودی با مطالعه Lee و همکارانش که بیش ترین مقاومت را مربوط به سفی پیم ۹۰٪، ایمی پنم و مروپنم ۶۳٪ و آمپی سیلین-سولباکتام ۵۵٪ گزارش کرده اند، مشابهت دارد و در هر دو مطالعه کمترین میزان مقاومت مربوط به پلی میکسین B می باشد(۲۰،۲۹).

نتیجه گیری

بطورکلی این مطالعه نشان داد، مقاومت به داروهای کارباپنم و مقاومت های چند دارویی در سویه های اسینتوباکتربومانی جدا شده از بخش های مختلف بیمارستان های شهر تهران، به دلیل شیوع و گسترش آنزیم های بتالاکتامازی از جمله KPC و NDM می باشد. با توجه به نتایج حاضر به کارگیری رژیم درمانی مناسب و استراتژی دقیق جهت مدیریت پیش گیری از عفونت های بیمارستانی ناشی از این باکتری بیش از پیش ضروری می نماید.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از پرسنل محترم آزمایشگاه مرکز تحقیقاتی بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، گروه میکروب شناسی دانشکده ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم داروئی تشکر و قدردانی می گردد.

REFERENCES

1. Hanlon GW. The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species**:** a major concern in the hospital setting. Lett Appl Microbiol. 2005; 41(5): 375-8.
2. Fagon JY, Chastere J, Domart Y, et al. Mortality due to ventilatore-associated pnomonia or colonization with *pseudomonoas* or *Acinetobacter* spiecies: assssment by quantitative culture of sample obtained by a protected specimen brush. Clin Infact Dis. 1996; 23: 538-542.
3. Landman D, Quale JM, Mayoragea D, et al. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumanni* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn. Arch Intern Med. 2002; 162:1515-1520.
4. Mostofi S, Mirnejad R, Masjedian F. Multi-drug resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical specimens from three hospitals in Tehran-Iran. African Journal of Microbiology Research. 2011; 5(7): 3579-583.
5. Van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Front Microbiol. 2011 ; 28;2:203.
6. Bradford P, Bratu S, Urban C, et al.Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella species* possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 blactamases in New York City. Clin Infect Dis 2004;39(1):55-60.

7. Mirnejad R**,** Masjedian F, Mostofi S. 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): 140-145

8. Rahimzadeh A, Farajnia S, Pourbabaee AA , Ansarin Kh, Zolfaghari MR, Masoudi N. 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(5): 56-63.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M100-S222012. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

10. Nordmann P1, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2011 Oct;17(10):1791-8.

11. Constantiniu S, Romaniuc A, Iancu, SL, et al. Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter spp*. Strains isolated from hospital units. The Journal of preventive medicine. 2004;12:35-42.

12. Bassetti M, Righi E, Esposito S, Petrosillo N, Nicolini L. Drug treatment for multidrug-resistan *Acinetobacter baumannii* infections. Future Microbiol. 2008; 3(6):649-60.

13. Michalopoulos A, Falagas ME. Treatment of *Acinetobacter* infections. Expert Opin Pharmacother. 2010; 11(5):779-88.

14. Ayan M, Durmaz R, Aktas E, et al. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. J Hosp Infect. 2003 ;54(1):39-45.

15. Karthika RU, Singh SP, Shashikala P, et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Indian Jornal Med Microbiol. 2008;26(4):333-7.

16. Mak K, Kim J, Mi-Jurng, Ph, Tapsall J.Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2009; 63(1): 47–54.

17. Tognim MC, Gales AC, Penteado AP, Silbert S, Sader HS. Dissemination of IMP-1 metallo- beta -lactamase-producing Acinetobacter species in a Brazilian teaching hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 2006;27(7):742-7.

18. Hujer K,Hulten E, Bajaksouzian S,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.
19. Feizabadi M, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, et al. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of bla OXA genes among *Acinetobacter spp.* Isolated from patients at Tehran hospitals. Jpn J Infect Dis. 2008; 61(4):274-8.
20. Wang X, Xu X, Li Z, et al. An Outbreak of a Nosocomial NDM-1-Producing Klebsiella pneumoniae ST147 at a Teaching Hospital in Mainland China. Microb Drug Resist. 2013. [Epub ahead of print].
21. Song J, Kee S, wang H, et al. In vitro activities of carbapenem/sulbactam combination, colistin, colistin/rifampicin combination and tigecycline against carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2007; 60(2):317–22.
22. Smolyakov R, Borer A, Riesenberg K, et al. Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. J Hosp Infect. 2003 54(1):32-8.
23. Shahcheraghi F, Abbasalipour M, Feizabadi M, Ebrahimipour G, Akbari N. Isolation and genetic characterization of metallo-β-lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. Iran Journal of Microbiology. 2011;3(2):68-74.
24. Sinha M, Srinivasa H, Macaden R. Antibiotic resistance profile and Extended spectrum beta-lactamase production in *Acinetobacter species.* Indian J Med Res. 2007;126(1):63-67.
25. Bahador A, Taheri M, Pourakbari B, et al. Emergence of rifampicin, tigecycline, and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* in Iran; spreading of MDR strains of novel International Clone variants. Microb Drug Resist. 2013 ;19(5):397-406.
26. Campos SI. Emerging in Mexico of carbapenem resistance KPC carrying *Acintobacter baumanni*. Antimicrob Agents Chemother. 2011;20:20-23.
27. Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPC) resistance. Infect Drug Resist.2012; 5:133-41.
28. Robledo IE, Arroyo A, Nadal E,et al.A comparison of the antimicrobial resistance patterns of gram-negative bacilli isolated from community-private and university-affiliated hospitals from Puerto Rico. P R Health Sci J. 2003;22(3):265-71.
29. Lee W, Chung HS, Lee Y, Yong D, Jeong SH, Lee K, Chong Y. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry assay with conventional methods for detection of IMP-6, VIM-2, NDM-1, SIM-1, KPC-1, OXA-23, and OXA-51 carbapenemase-producing Acinetobacter spp., Pseudomonas aeruginosa, and Klebsiella pneumoniae. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013 Nov;77(3):227-30.