مجله دنیای میکروب‌ها
سال دهم شماره چهارم (پیاپی ۳۳) زمستان ۱۳۹۶
صفحات ۳۰۹-۲۹۹

Original Article

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن های متالوبتالاکتاماز bla_{IMP} و bla_{VIM} در گونه های *اسینتوباکتر* جداسازی شده از نمونه های بالینی در بندرعباس

فهیمه گلستانی[۱]، صدیقه جواد پور*[۲]، فرشید کفیل زاده[۳]، زینب قلندرزاده دریایی[۱]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی، [۲] دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، پژوهشکده سلامت هرمزگان، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، [۳] استاد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی.

چکیده

سابقه و هدف: *اسینتوباکتر*ها باکتری های گرم منفی و غیر تخمیری هستند که با عفونت های بیمارستانی در ارتباط هستند. این باکتری‌ها پاتوژن‌های فرصت طلب مهمی هستند که در صورت داشتن ژن متالوبتالاکتاماز (MBL_s) به تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشند. این مطالعه با هدف تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن‌های متالوبتالاکتاماز سویه های *اسینتوباکتر* جدا شده از نمونه‌های بالینی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مقطعی-توصیفی بر روی ۸۱ سویه *اسینتوباکتر* جمع آوری شده از نمونه‌های مختلف بالینی در بیمارستان شهید محمدی بندرعباس انجام گرفت. برای تعیین هویت باکتری ها از کیت تشخیصی Microgen^{TM} GNA–ID System استفاده شد. به منظور ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها از روش کربی-بائر استفاده گردید. اندازه گیری MIC مروپنم با استفاده از نوار E-test و تولید MBL_s با روش دیسک ترکیبی ایمی‌پنم-EDTA (روش CDST) صورت گرفت. به منظور شناسایی و مشخص کردن ژن‌های MBLs نوع *IMP* و *VIM*، از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) استفاده شد.

یافته ها: از مجموع ۸۱ جدایه، تعداد ۷۹ سویه (۹۷/۵۴ درصد) به عنوان *اسینتوباکتر بامانی*، ۱ سویه *اسینتوباکتر لوفیی* (۱/۲۳ درصد) و ۱ سویه *اسینتوباکتر هممولا یتیکوس* (۱/۲۳ درصد) شناسایی شدند. گونه‌های *اسینتوباکتر* بیشترین مقاومت را نسبت به ایمی‌پنم و مروپنم (۸۱/۵۰ درصد) و بیشترین حساسیت را نسبت به پلی میکسین B (۹۶/۳۲ درصد) و کلیستین (۹۵/۱۳ درصد) نشان دادند. با تعیین MIC به روش E-test ۷۷/۸۲ درصد از سویه‌ها به مروپنم مقاوم بودند. از طریق تست CDST مشخص شد که ۷۶/۵۱ درصد از جدایه‌ها MBL مثبت هستند. تعداد ۱۳ جدایه (۱۶ درصد) حاوی ژن bla_{IMP} بودند. در حالی که هیچ جدایه‌ای ژن bla_{VIM} را نداشت.

نتیجه گیری: انتشار سویه‌های *اسینتوباکتر* تولید کننده متالوبتالاکتاماز نگران کننده است. به منظور کاهش و کنترل عفونت‌های *اسینتوباکتر* اجرای اقدامات نظارتی و تجویز مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری است.

واژگان کلیدی: *اسینتوباکتر بامانی*، متالوبتالاکتاماز، ایمی پنم، مروپنم، ژن bla_{IMP}، ژن bla_{VIM}.

دریافت مقاله: آذر ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: بهمن ماه ۹۵

مقدمه

اسینتوباکترها (*Acinetobacter*) کوکوباسیل‌های گرم منفی، هوازی، غیر متحرک و چندشکلی (pleomorphic) هستند که معمولاً در همه جا از جمله آب، خاک، فاضلاب ریشه گیاهان و مواد غذایی یافت می‌شوند (۱ و ۲). تاریخ جنس *اسینتوباکتر*

*) آدرس برای مکاتبه: بندرعباس، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۷۶۱۶۶۸۹۶۲ پست الکترونیک: sedigheh.javadpour@yahoo.com

به سال ۱۹۱۱، زمان توصیف ارگانیسمی با عنوان *میکروکوکوس کالکواستیکوس* (*Micrococcus calcoaceticus*) به وسیله یک میکروبیولوژیست هلندی به نام بایرینک برمی‌گردد (۳).

اسینتوباکتر بامانی (*Acinetobacter baumannii*)، رایج‌ترین و مهم‌ترین گونه *اسینتوباکتر* در جدایه های بالینی می باشد که شیوع آن در سرتاسر جهان گزارش شده است. سویه *اسینتوباکتر بامانی* یکی از پاتوژن‌های بیمارستانی بسیار مهم با مقاومت چند دارویی است که به دلیل مکانیسم های مقاومت ذاتی و اکتسابی و همچنین محدودیت گزینه‌های درمانی از نگرانی های عمده جامعه پزشکی محسوب می‌شود (٤).

اطلاعات متعددی نشان داده که برخی از گونه‌های *اسینتوباکتر* می‌توانند نسبت به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، مدت طولانی‌تری در شرایط خشک بر روی ذرات و گرد و غبار زنده بمانند و از منابع کربن و انرژی مختلفی استفاده کنند. سه عامل عمده شامل مقاومت به اکثر داروهای ضد میکروبی، مقاومت به خشکی و مقاومت به مواد ضد عفونی کننده به بقاء *اسینتوباکتر بومانی* در محیط بیمارستان کمک می‌کند (۳، ۵ و ٦). همچنین این باکتری‌ها به برخی فلزات همچون مس نیز مقاوم هستند (۷).

اسینتوباکترها می‌توانند بخشی از فلور باکتریایی پوست به ویژه کشاله ران، زیر بغل و بین انگشتان و همچنین غشای مخاطی باشند و در افراد سالم باعث عفونت‌های جدی شوند (۸ و ۹). عوامل متعدد بیماری‌زا در *اسینتوباکتر* مانند لیپاز، پروتئاز، OmpA، CpaB و پیلی وجود دارد که البته به خوبی شناخته نشده اند. بسیاری از این عوامل همانند سایر باکتری‌های گرم منفی به وسیله ی سیستم ترشحی نوع دو تولید می شوند (۱۰ و ۱۱). این ارگانیسم‌ها از طریق زخم‌های باز، کاتتر ادراری و مجاری تنفسی وارد بدن شده و عامل بیماری‌های مهمی مانند پنومونی، مننژیت، عفونت دستگاه ادراری، پریتونیت، اندوکاردیت و عفونت‌های سوختگی می‌باشند (۱۲ و ۱۳).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک مشکل اساسی در درمان و کنترل عفونت‌ها محسوب می‌شود. گزارش هایی از سراسر دنیا در مورد مقاومت سویه‌های *اسینتوباکتر* به تمامی آنتی بیوتیک‌های شناخته شده وجود دارد. در سال ۱۹۸۰ کاربابپنم‌ها به عنوان گزینه درمانی جدید برای عفونت‌های باکتریایی از جمله *اسینتوباکتر* معرفی شدند. این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از درمان های انتخابی برای عفونت‌های ناشی از *اسینتوباکتر بامانی* می‌باشند و اغلب به عنوان آخرین راه حل در درمان عفونت‌های جدی مربوط به مقاومت چند دارویی باسیل‌های گرم منفی محسوب می شوند. با این وجود مقاومت باکتری ها نسبت به آن در حال گسترش می باشد (١٤ و ١٥).

کاربابپنم‌ها توسط *استرپتومایسس کاتیلیه* (*Streptomyces cattylea*) تولید می‌شوند (١٦). مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند کاربابپنم در *اسینتوباکتر* به مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی نسبت داده شده است. از این میان می‌توان به تغییر پروتئین‌های غشای خارجی (OMPs)، پمپ‌های جریان چند دارویی و تغییرات در تمایل یا بیان پروتئین‌های متصل شونده به پنی سیلین (PBPs) و آنزیم‌ها اشاره نمود. تغییر پروتئین‌های متصل به پنی سیلین به عنوان یک منبع مهم مقاومت در *اسینتوباکتر بامانی* همراه با تولید کاربابپنمازها منجر به ایجاد سطح بالای مقاومت به ایمی پنم می‌شوند (۱۷).

شایع‌ترین مکانیسم مقاومت آنزیمی در *اسینتوباکتربامانی* تولید انواع بتالاکتامازها می باشد (۳). علاوه بر بتالاکتامازهای طبیعی، چندین بتالاکتاماز اکتسابی نیز به عنوان منبعی از مقاومت به کاربابپنم (کاربابپنمازها) در سویه *اسینتوباکتر بامانی* شناسایی شده که این آنزیم‌ها به عنوان متالوبتالاکتامازها شناخته می‌شوند (١٤ و ١٨). این آنزیم‌ها برای فعالیت نیازمند یون فلزی روی هستند (۱۹). متالوبتالاکتامازها اولین بار در سال ۱۹٦۰ در *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) شناخته شده اند (۲۰ و ۲۱). تاکنون ۵ نوع از MBLs: IMP، VIM، SIM-1، SPM و GIM-1 شناخته شده است. تاکنون فقط ۳ نوع اول در *اسینتوباکتربامانی* شناسایی شده است. انواع مختلفی از bla_{VIM} و bla_{IMP} از ۳۷ کشور جهان گزارش شده است (۲۲).

ژن imipenemase (*imp*) مسئول تولید متالوبتالاکتاماز تایپ bla_{IMP} می باشد (۱). این نوع از متالوبتالاکتامازها می‌توانند ایمی‌پنم و همچنین برخی از سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف را

هیدرولیز نماید (۱٤). ژن Veronese imipenemas (*vim*) مسئول تولید متالوبتالاکتاماز نوع bla_{VIM} می‌باشد. آنزیم‌های VIM به تعدادی از بتالاکتام‌ها مانند پی‌پراسیلین، سفتازیدیم، ایمی پنم و آزترونام مقاوم هستند. آنزیم‌های VIM اولین بار در سال ۱۹۹۷ درشهر ورونای ایتالیا در یک جدایه *سودوموناس آئروژینوسا* (*Pseudomonas aeruginos*) توصیف شدند (۱٤، ۲۲ و ۲۳). مقاومت به عوامل ضدمیکروبی در میان جدایه‌های بالینی ممکن است درمان عفونت ها را بسیار مشکل کند و همچنین اثر نامطلوبی بر روی نتایج بالینی و هزینه‌های درمانی بگذارد. سوخت و ساز باکتری‌ها باعث کموتاکسی نوتروفیل‌ها می‌شود و هدف قرار گرفتن این مراحل می‌تواند باعث کاهش بیماری و تقویت پاسخ ایمنی ذاتی شود (۲٤).

به نظر می‌رسد عوامل ضد میکروبی جدیدی که بتوانند در مقابل این باکتری فعالیت مؤثر داشته باشند در آینده نزدیک قابل دسترس نباشد (۲۵). این موضوع اهمیت استفاده صحیح از عوامل ضد میکروبی رایج را بیشتر می‌کند. به همین دلیل، داشتن اطلاعات کافی از اپیدمیولوژی ارگانیسم‌ها و الگوی مقاومت آن‌ها به منظورانتخاب نوع و مقدار مناسب داروها در مراحل خاص ضروری است.

هدف از این مطالعه، شناسایی سویه‌های *اسینتوباکتر*، به دست آوردن الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و MIC مروپنم و هم چنین تعیین فراوانی ژن‌های MBL سویه‌های *اسینتوباکتر* جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف بیمارستان شهید محمدی بندرعباس بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه‌گیری: این مطالعه مقطعی-توصیفی بر روی ۸۱ سویه *اسینتوباکتر* جمع آوری شده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان شهید محمدی بندرعباس در سال ۱۳۹۲ انجام پذیرفت.

ب) غربال‌گری سویه‌های باکتری: به منظور شناسایی اولیه سویه‌های جمع‌آوری شده از رنگ آمیزی گرم و آزمون های حرکت، اکسیداز و کاتالاز استفاده شد. برای تعیین هویت در سطح گونه از کیت تشخیصی GNA (Microgen^{TM} GNA–ID System) استفاده شد. نتایج حاصل از کیت با استفاده از نرم افزار مربوطه تفسیر شدند.

ج) ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی: برای این منظور از دیسک های آنتی بیوتیکی تایگه سایکلین (۱۵ µg)، پلی میکسین B (۳۰۰ µg)، کلیستین (پلی میکسین E) (٤ µg)، ایمی پنم (۱۰ µg) و مروپنم (۱۰ µg) (پادتن طب، ایران) و روش انتشار دیسک مطابق با دستوالعمل (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute استفاده گردید (۲٦). کدورت ۰/۵ مک فارلند برای تلقیح به محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) استفاده شد. برای بررسی فنوتیپ تولید متالوبتالاکتامازها، از ایمی‌پنم و دیسک ترکیبی ایمی‌پنم–EDTA یا روش سینرژیسم دیسک ترکیبی (Combined-Disc Synergy Test= CDST) استفاده گردید.

برای این منظور از محلول EDTA ۰/۵ مولار دارای pH ۸ استفاده شد. میزان ۷۵۰ میکرولیتر از این محلول به دیسک‌های ایمی‌پنم اضافه و دیسک‌ها کاملا به EDTA آغشته شدند. پس از کشت چمنی دیسک ایمی‌پنم به تنهایی و دیسک ایمی پنم آغشته به EDTA با فاصله مناسب از یکدیگر قرار داده شدند. اگر اندازه هاله عدم رشد دیسک ترکیبی ایمی پنم–EDTA، نسبت به دیسک ایمی‌پنم، بزرگتر یا مساوی ۷ میلی متر بود، نتیجه مثبت در نظر گرفته شد (۲۷). برای تعیین MIC مروپنم، از نوار E-Test (Liofilchem، ایتالیا) استفاده شد. با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، اگر بر روی نوار µg/ml ۲ ≥MIC باشد به عنوان حساس و µg/ml ۸ ≤MIC به عنوان مقاوم در نظر گرفته شد.

د) استخراج DNA: در این مطالعه به منظور استخراج DNA ژنومی از روش جوشاندن استفاده شد.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه.

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی ('3---- '5)	اندازه محصول (جفت باز)
bla_{IMP}	F: CAT GGT TTG GTG GTT CTT GT R: GTA AGT TTC AAG AGT GAT GC	۵۲۷
bla_{VIM}	F: ATT GGT CTA TTT GAC CGC GTC R: AAT GCG CAG CAC CAG GAT AG	۵۱۴

ه) انجام PCR: به منظور تکثیر ژن‌های bla_{VIM} و bla_{IMP} از پرایمرهای موجود در جدول ۱ استفاده شد (ژن فناوران، ایران) (۲۸). مخلوط واکنش بعد از بهینه سازی شامل ۱۷/۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۱/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلی مراز، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر و ۰/۵ میکرولیتر از dNTPs بود. در این مطالعه از باکتری *سودوموناس* واجد ژن های bla_{VIM} و bla_{IMP} به عنوان کنترل مثبت و از *سودوموناس آئروژینوسا* سویه ATCC27853 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر SensQuest (آلمان) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، اتصال در دمای ٥٦ درجه برای ژن IMP و ۵۵ درجه سلیسیوس برای ژن VIM به مدت ٦۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید.

و) آنالیز آماری: به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نسخه هیجدهم نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای استفاده شد. همچنین مرز معنی داری بر روی P< ۰/۰۵ قرار داده شد.

یافته‌ها

در مجموع تعداد ۸۱ سویه *اسینتوباکتر* به مدت ۱ سال از بیمارستان شهید محمدی بندرعباس جمع آوری گردید. بررسی پرونده بیماران نشان داد که ٦٦ نفر (۸۱/٤۸٪) بیمار مرد و ۱۵ نفر (۱۸/۷۲٪) از بیماران زن بودند. فراوانی بیماران با سن کمتر از ٤۰ سال، بین ٤۰ تا ۷۵ سال و بالاتر از ۷۵ سال به ترتیب، ۵۵/۵۵٪ (٤۵ بیمار)، ۳۸/۲۷٪ (۳۱ بیمار) و ٦/۷۳٪ (۵ بیمار) بود.

بیشترین نمونه جمع آوری شده مربوط به تراشه و پس از آن مربوط به زخم، ادرار، خون، بزاق، لوله قفسه سینه (chest tube) و خلط بود (جدول ۲). جدول شماره ۳ فراوانی *اسینتوباکتر* را در بخش‌های مختلف بیمارستانی نشان می‌دهد. در مرحله بعد با استفاده از کیت تشخیصی GNA گونه‌ها تعیین هویت گردیدند. از ۸۱ سویه تائید شده، ۷۹ سویه (۹۷/٥٤ درصد) *اسینتوباکتربامانی*، یک سویه (۱/۲۳ درصد) *اسینتوباکترهمولا یتیکوس* و یک سویه (۱/۲۳ درصد) *اسینتوباکترلوفیی* گزارش شد (جدول ٤).

اسینتوباکتر لوفیی از بخش سوختگی و نمونه زخم و *اسینتوباکتر همولا یتیکوس* از بخش مراقبت‌های ویژه و از نمونه

جدول ۲: توزیع فراوانی نمونه ها برحسب نمونه بالینی.

منبع	فراوانی	درصد
تراشه	۳۲	۳۹/۵۰
زخم	۱۲	۱٤/۸۱
بزاق	۹	۱۱/۱۱
ادرار	۸	۹/۸۸
خون	٦	۷/٤۱
لوله قفسه سینه	٤	٤/۹٤
خلط	٤	٤/۹٤
سایر نمونه ها	٦	۷/٤۱
جمع	۸۱	۱۰۰

جدول ۳: توزیع فراوانی نمونه ها بر اساس بخش های بیمارستانی.

بخش بیمارستانی	فراوانی	درصد
مراقبت های ویژه	٤۷	۵۸/۰۲
داخلی	۲۱	۲۵/۹۲
ارتوپدی	۳	۳/۷۰
اورژانس	۳	۳/۷۰
سایر بخش ها	۷	۸/٦٤
جمع	۸۱	۱۰۰

جدول ٤: نتایج مربوط به آزمون های بیوشیمیایی کیت تشخیصی GNA.

آزمون ها	*اسینتوباکتر همولا یتیکوس*	*اسینتوباکتر لوفیی*	*اسینتوباکتر بامانی*
لیزین	-	+	-
اورنیتین	-	-	-
H_2S	-	-	-
گلوکز	+	-	+
مانیتول	-	-	-
زایلوز	+	-	+
ONPG	+	-	-
ایندول	-	-	-
اوره آز	-	-	±
V.P	-	-	-
سیترات	+	-	+
TDA	-	-	-

جدول ۵: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در *اسینتوباکتربومانی* با استفـاده از روش انتشار دیسک.

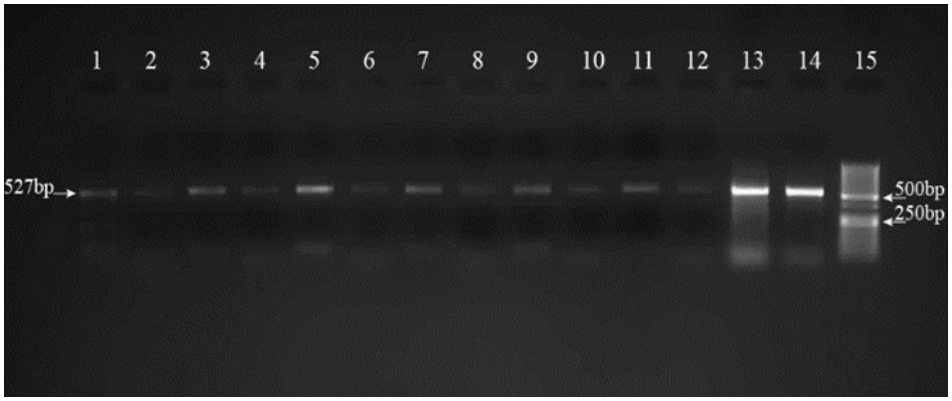
آنتی بیوتیک	مقاوم (٪)	نیمه حساس(٪)	حساس (٪)
پلی میکسین B	۳/٦۸	۰	۹٦/۳۲
کلیستین (پلی میکسین E)	٤/۸۷	۰	۹۵/۱۳
تایگه سایکلین	٦/۲٤	۱۱/۱۰	۸۲/٦٦
ایمی پنم	۸۱/۵۰	۰	۱۸/۵۰
مروپنم	۸۱/۵۰	۰	۱۸/۵۰

لوله قفسه سینه به دست آمد. ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های به دست آمده نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های ایمی پنم و مروپنم با ۵۰/۸۱ درصد و کمترین مقاومت مربوط به پلی میکسین B (۳/٦۸ درصد) و کلیستین (۸۷/٤ درصد) بوده است (جدول ۵). با استفاده از روش CDST مشخص شد ٦۲ سویه (۷٦/۵٤٪) متالوبتالاکتاماز مثبت و ۱۹ سویه (۲۳/٤۵٪) متالوبتالاکتاماز منفی بودند. تعیین حداقل غلظت مهاری نشان داد که ٦۳ سویه (۷۷/۷۷٪) به مروپنم مقاوم و ۱۸ سویه (۲۲/۲۳٪) حساس بودند.

نتایج PCR حاکی از آن بود که تنها ۱۳ سویه (۱٦/۰۵٪) حاوی ژن bla_{IMP} بودند (شکل ۱). هیچ کدام از سویه ها دارای ژن bla_{VIM} نبودند (شکل ۲). در این مطالعه تمامی سویه‌های حاوی ژن bla_{IMP}، *اسینتوباکتربامانی* بودند. اما *اسینتوباکترهمولا یتیکوس* و *اسینتوباکترلوفیی* فاقد ژن‌های مقاومت بودند. از ۱۳ سویه حاوی ژن bla_{IMP} ، ۱۲ سویه (۹۲/۳۱٪) دارای MIC ≥۸ µg/ml و یک سویه (۷/٦۹٪) دارای MIC ≥۲ µg/ml بودند. از ٦۸ سویه که فاقد ژن bla_{IMP} بودند، ۵۱ سویه در محدوده مقاوم به مروپنم و ۱۷ سویه در محدوده حساس به مروپنم قرار داشتند. با استفاده از آزمون آماری مربع کای مشخص گردید که رابطه معناداری بین ژن مقاومت bla_{IMP} و MIC مروپنم وجود ندارد. از ۱۳ سویه حاوی ژن مقاومت متالوبتالاکتاماز bla_{IMP}، ۵۳/۸۲ درصد مربوط به نمونه تراشه و بقیه (٤٦/۱۸ درصد) مربوط به سایر نمونه ها بودند. از میان بخش‌های بیمارستانی، بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) با ۵۳/۸۱ درصد بیشتر از سایر بخش‌ها سویه حاوی ژن bla_{IMP} را به خود اختصاص داده بود. از بین بیمارانی که به سویه حامل ژن مقاومت متالوبتالاکتامازی bla_{IMP} آلـوده بودنـد، ۱۰ نفر (۷٦/۹۰٪) مرد و ۳ نفر (۲۳/۱۰٪) زن بـودنـد.

بحث

از اوایل سال ۱۹۸۰ تا به امروز عفونت‌های *اسینتوباکتر بامانی* یک مسئله قابل توجه در بسیاری از مناطق اروپا به ویژه انگلیس، فرانسه، آلمان، ایتالیا و اسپانیا به شمار می‌رود. انتقال سویه‌ها بین بیمارستان‌ها احتمالاً از طریق استقرار در بیماران انجام شده است. همچنین دلیل گسترش بین قاره‌ای سویه‌ها به ویژه *اسینتوباکتر بامانی* می تواند مسافرت های هوایی باشد. *اسینتوباکتر بامانی* می‌تواند عامل بیماری خفیف تا شدید و حتی کشنده باشد. شدت عفونت‌های ایجاد شده به محل عفونت و حساسیت بیماران به ویژه وجود بیماری های زمینه ای بستگی



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR در سویه های حامل ژن *imp*. ستون های ۱ تا ۱۲) نمونه های مثبت حاوی ژن *imp* (۵۲۷ جفت باز)، ستون های ۱۳ و ۱٤) کنترل مثبت، ستون ۱۵) مارکر ۵۰ جفت بازی.

دارد (۲۹). در مطالعه حاضر از ۸۱ سویه بالینی *اسینتوباکتر*، ۷۹ سویه (۹۷/۵٤٪) *اسینتوباکتر* بامانی، یک سویه (۱/۲۳٪) *اسینتوباکتر لوفی* و یک سویه (۱/۲۳٪) *اسینتوباکتر هموللایتیکوس* بودند.

در مطالعه هاشمی‌زاده (Hashemizadeh) و همکاران در شیراز، از بین ۲۹۷ نمونه *اسینتوباکتر* جمع آوری شده از بخش مراقبت‌های ویژه، تعداد ۱٤۷ سویه *اسینتوباکتر بامانی* جدا شد (۲۹). خلت آبادی (Kheltabadi) و همکاران از ٦۰ سویه *اسینتوباکتر*، تعداد ٤۸ سویه *اسینتوباکتر بامانی*، ٦ سویه *اسینتوباکتر لوفیی* و ٦ سویه سایر گونه‌های *اسینتوباکتر* را گزارش نمودند (۳۰). حضور گسترده سویه های *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به آنتی بیوتیک ها در سراسر جهان، نشان دهنده پتانسیل این باکتری در پاسخ سریع به تغییرات در فشار انتخابی زیست محیطی است (٦).

الگوی مقاومت آنتی‌بیونیکی در بین باکتری‌های پاتوژن بیمارستانی ممکن است به طور واضحی از یک کشور به کشور دیگر و یا در مناطق مختلف یک کشور متفاوت باشد (۳۱). در مطالعه حاضر ۹٦/۳۲ درصد از سویه‌ها به پلی‌میکسین B و ۹۵/۱۳ درصد به کلیستین حساس بودند. همچنین ۱۸/۵۰ درصد از سویه‌ها به ایمی‌پنم و مروپنم مقاوم بودند. در مطالعه باقری جوشقانی (Bagheri Josheghani) و همکاران در کاشان تمامی سویه‌های مورد مطالعه، نسبت به پلی‌میکسین B و کلیستین حساس و به ایمی‌پنم و مروپنم مقاوم بودند (۳۲). در مطالعه افشاریاوری (Afshar Yavari) و همکاران در آنکارا ۸۲ درصد و ۹٤ درصد از سویه‌ها به ترتیب نسبت به ایمی‌پنم به مروپنم مقاومت کامل داشتند. همچنین ۹۲ درصد از سویه‌ها نیز به تایگه سایکلین حساس بودند (۳۳).

در مطالعه حاضر با استفاده از روش E-test، حداقل غلظت مهاری آنتی‌بیوتیک مروپنم برای سویه‌ها، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمامی سویه‌های مقاوم دارای MIC ≥ ۳۲µg/ml بودند. در مطالعه‌ای که توسط سیگال (Sigal) و الیشا (Elisha) برای شناسایی کاربانپنمازها در *اسینتوباکتر بامانی* انجام شد، با استفاده از نوار E-test، حداقل غلظت مهارکنندگی مروپنم، MIC > ۳۲ µg/ml به دست آمده که مشابه نتایج مطالعه حاضر می باشد (۳٤). در مطالعه لیم (Lim) و همکاران نیز MIC ≥ ۱٦ µg/ml تعیین گردید (۳۵).

در مطالعه حاضر از روش دیسک ترکیبی ایمی پنم–EDTA یا (CDST-IPM) به منظور شناسایی MBLs استفاده شد. از ۸۱ نمونه مورد بررسی، ٦۲ سویه (۷٦/۵٤٪) MBL مثبت و ۱۹ سویه (۲۳/٤۵٪) MBL منفی بودند. در مطالعه‌ای که توسط پاندیا (Pandya) و همکاران در سال ۲۰۱۱ برای شناسایی MBL در باسیل‌های گرم منفی انجام شد، از ۲۷ سویه مقاوم به کاربانپنم، ۲٦ مورد (۹٦/۳٪) با روش دیسک ترکیبی CDST-IPM، MBL مثبت گزارش شدند. این روش نسبت به روش های دیگر (دیسک ترکیبی با سفتازیدیم) بیشترین حساسیت (۹٦/۳۰ درصد) را نشان داد (۲۱). در مطالعه پراکاش (Prakash) و همکاران در سال ۲۰۱۲، از میان ۲۰۰ نمونه بالینی، ۷٦ سویه (۳۸٪) به عنوان *اسینتوباکتر* شناسایی شدند که با استفاده از روش دیسک ترکیبی، ۹ سویه (۳۲٪) MBL مثبت بودند (۲۰).

تاکنون ۵ تیپ MBLs شناخته شده است که شامل تیپ‌های IMP، VIM، SIM-1، GIM-1 و SPM می باشد. این تایپ ها می توانند واریانت‌های مختلفی داشته باشند. در مطالعه حاضر، با استفاده از روش PCR از ۸۱ جدایه *اسینتوباکتر*، ۱۳ مورد (۱٦٪) دارای ژن bla_{IMP} بودند و ژن bla_{VIM} در هیچ یک از سویه ها مشاهده نشد. علت مقاومت سایر سویه‌ها ممکن است به دلیل وجود سایر ژن‌های مقاومت آنزیمی و یا مکانیسم‌های مقاومت غیر آنزیمی باشد (۱۷ و ۲۲).

در بررسی ریو (Ryoo) و همکاران از ۹۳ سویه *اسینتوباکتر بامانی* به دست آمده از نمونه های بالینی، تنها ۳ مورد (۳/۲٪) تولیدکننده آنزیم MBL بودند. یک جدایه حامل ژن bla_{IMP-1} و ۲ جدایه حامل ژن *vim-2* بودند (۳٦). در مطالعه‌ای که توسط سیگال (Sigal) و الیشا (Elisha) برای شناسایی کاربانپنمازها در *اسینتوباکتربامانی* انجام شد، با انجام PCR ژن های *imp* و *vim* در هیچ سویه‌ای تکثیر نگردید (۳٤). در مطالعه حاضر نیز هیچ سویه‌ای دارای ژن *vim* نبود. در مطالعه

پیمانی (Peymani) و همکاران در سال ۲۰۱۱ در ایران بر روی فراوانی *اسینتوباکتربامانی* مولد متالوبتالاکتاماز، از میان ۱۰۰ جدایه بالینی، ۶۳ سویه مقاوم به کاربا‌پنم شناسایی شد که ۲۸ مورد (۹۰٪) آنها حامل ژن های MBL بودند. همچنین ۱۹ سویه (۶۱٪) حامل ژن bla_{IMP} و ۹ سویه (۲۹٪) حامل ژن bla_{VIM} بودند (۲۸). در مطالعه کارتیکا (Karthika) و همکاران با استفاده از روش PCR بر روی ۵۵ سویه *اسینتوباکتر*، تعداد ۲۳ سویه (۴۲٪) واجد ژن bla_{IMP-1} بودند. در مطالعه آنها هیچ سویه ای ژن bla_{VIM-2} را تکثیر نکرد که از این نظر با مطالعه حاضر هم خوانی دارد (۴).

نتیجه گیری

در این مطالعه *اسینتوباکتر بامانی* شایع ترین گونه جدا شده از بیماران به ویژه در بخش ICU بود و مقاومت آنتی بیوتیکی بالایی نسبت به ایمی پنم و مروپنم (۸۱/۵ درصد) داشت. با توجه به اینکه بیشترین حساسیت آنتی بیوتیکی مربوط به پلی میکسین B (۹۶/۳۲ درصد) و کلیستین (۹۵/۱۳ درصد) بود، پیشنهاد می شود از این دو آنتی بیوتیک در امر درمان استفاده شود. هر چند تغییرات در مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها پدیده رایجی است و انجام آزمون آنتی بیوگرام برای هر جدایه بالینی الزامی است. همچنین ضرورت دارد به منظور کنترل و کاهش گسترش *اسینتوباکتر بامانی* در بیمارستان، دستورات کمیته کنترل عفونت بیمارستان با جدیت تمام اجرا شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشکده علوم پزشکی بندرعباس به ویژه معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری جهت پشتیبانی مالی و تامین منابع کمال امتنان را دارند.

References

1. Shakibaie MR, Adeli S, Salehi MH. Antibiotic resistance patterns and extended-spectrum β-lactamase production among *Acinetobacter* spp. isolated from an intensive care unit of a hospital in kerman, Iran. Antimicrob Resist Infect Control. 2012; 1(1): 8-11.
2. Al Atrouni A, LaureJoly-Guillou M, Hamze M, Kempf M. Reservoirs of non-*baumannii* *Acinetobacter* species. Front Microbiol. 2016; 7:49.
3. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008; 21(3): 538-582.
4. Karthika RU, Rao RS, Sahoo S, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, Prashanth K. Phenotypic and genotypic assays for detecting the prevalence of metallo-β-lactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a South Indian tertiary care hospital. J Med Microbiol. 2009; 58(4): 430-435.
5. Rosenbaum P, Aureden K, Cloughessy M, Goss L, Kassai M, Streed S. Guide to the elimination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* transmission in healthcare settings. Available at: http://apic.org/EliminationGuides (2010).
6. Shafiqul Islam AHM. 2009. Demonstration of antigenic and specific outer membrane protein(s) of *Acinetobacter baumannii*. Masters thesis. University Sains Malaysia.
7. Williams CL, Neu HM, Gilbreath JJ, Michel SL, Zurawski OV, Merrell DS. Copper resistance of the emerging pathogen *Acinetobacter baumannii*. Appl Environ Microbiol. 2016; 82(20): 6174-88.

8. Neetu G, Negeswari G, Sauita J, Ravindro NM. Isolation and identification of *Acinetobacter* species with special reference to antibiotic resistance. J Nat Sci Bio Med. 2016; 6(1): 158-162.

9. Cosseau C, Romano-Bertrand S, Duplan H, Lucas O, Ingrassia I, Pigasse C, Roques C, Jumas-Bilak E. Proteobacteria from the human skin microbiota: Species-level diversity & hypotheses. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771416000045 (December 2016).

10. Christian MH, Rachel LK, Lauren DP, Eric PS, Mario FF. Medically relevant *Acinetobacter* species *requive* a type ii section system and specific membrane-associated chaperones for the export of multiple subtracts and full virulence. PLOS Pathogen. 2016; 12(1): 1-19.

11. Kim SW, Oh MH, Jun SH, Jeon H, Kim SI, Kim K, Lee YC, Lee JC. Outer membrane protein A plays a role in pathogenesis *of Acinetobacter nosocomialis*. Virulence. 2016; 7(4): 413-426.

12. Szabo D, Szentandrassy J, Juhasz Z, Katona K, Nagy K, Rokusz L. Importand PER-1 producing *Psedomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacter baumannii* and VIM-2 producing *Psedomonas aeruginosa* strains in Hungary. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2008; 7 (12): 1-5.

13. Salzer JFH, Rolling T, Schmiedel S, Klupp EM, Lange C, Seifert H. Severe community-acquired bloodstream infection with *acinetobacter ursingii* in person who injects drugs. Emerg Infect Dis. 2016: 22(1): 134-137.

14. Dugal S, Fernandes A. Carbapenem hydrolysing metallo-β-lactamases. Int J Curr Pharm Res. 2011; 3(3): 9-16.

15. Shobha KL, Lenka PR, Sharma MK, Ramachandra L, Bairy I. Metallo-β-lactamase production among *Pseudomonas* species and *Acinetobacter* species in Costal Karnataka. J Clin Diagnos Res. 2009; 3(5): 1747-1753.

16. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β-lactamases accelerated by generations of β-lactam antibiotics. Clin Infect Dis. 1997; 24 (Suppl 1): 19-45.

17. Almasaudi SB. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi J Biol Sci. 2018; 25(3): 586-596.

18. Zarrilli R, casillo R, Dipopolo A, Tripodi MF, Bagattini M, Cuccurullo S, Crivaro V, Raqone E, Mattei A, Galdieri N, Triassi M, Utili R. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug–resistant *Acinetobacter baumannii* in university hospital in Italy. Clin Microbial Infect. 2007; 13(5): 481-489.

19. Jorge Da Silva G, Domingues S. Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. Microorganism. 2016; 4 (29): 1-23.

20. Prakash MR, Veena M, Sharma A, Basavaraj KN, Viswanath G. The prospective evaluation of four convenient methods for detecting mbls in the clinical isolates. J Clin Diagnos Res. 2012; 6(7): 1196-1199.

21. Pandya NP, Prajapati SB, Mehta SJ, Kikani KM, Joshi PJ. Evaluation of various methods for

detection of metallo-β-lactamase (MBL) production in gram negative bacilli. Int J Biol Med Res. 2011; 2(3): 775-777.

22. Helen CM. Metallo-β-lactamase in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance?. Int J Antimicrob Agents. 2009; 33(5): 405.e1-7.

23. Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. Expert Opin Investig.Drugs. 2008; 17(2): 131-143.

24. Bhuiyan MS, Ellett F, Murray GL, Kostoulias X, Cerqueira GM, Schulze KE, Mahamad Maifiah MH, Li J, Creek DJ, Lieschke GJ, Peleg AY. *Acinetobacter baumannii* phenylacetic acid metabolism influences infection outcome through a direct effect on neutrophil chemotaxis. Proc Natl Acad Sci USA. 2016; 113(34): 9599-9604.

25. Landman D, Quale JM, Mayorga D, Adedeji A, vangala K, Ravishankar J, Flores C, Brooks S. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY. Arch Intern Med. 2002; 162(13): 1515-1520.

26. Hashemizadeh Z, Bazargani A, Emami A, Rahimi. *Acinetobacter* antibiotic resistance and frequency of ESBL-producing strains in ICU patients of Namazi Hospital (2008-2009). J Qazvin Uni Med Sci. 2010; 14(2): 47-53. [In Persian]

27. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-β-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2002; 40(10): 3798-3801.

28. Peymani A, Nahaei MR., Farajnia S, Hasani A, Mirsalehian A, Sohrabi N, Abbasi L. High prevalence of metallo-β-lactamases-producing *Acinetobacter baumannii* in a teaching hospital in Tabriz, Iran. Jpn J Infect Dis. 2011; 64(1): 69-71.

29. Braun G, Vidotto MC. Evaluation of adherence, hemagglutination, and presence of genes codifying for virulence factors of *Acinetobacter baumannii* causing urinary tract infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99(8): 839-844.

30. Kheltabadi Farahani R, Moniri R, Shajari Gh, Nazem Shirazi MH, Musavi GH, Ghasemi A, Haj Aghazadeh S. Antimicrobial susceptibility patterns and the distribution of resistance genes among *Acinetobacter* species isolated from patients in Shahid Beheshti hospital, Kashan. J Kashan Uni Med Sci. 2008; 12(4): 61-67. [In Persian]

31. Jafari S, Najafipour S, Kargar M, Abdollahy A, Mardaneh J, Fasihy Ramandy M, Abdollahi, Kheirabadi S, Moraveje A. Phenotypical evaluation of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. J Fasa Uni Med Sci. 2012; 2(4): 254-258.

32. Bagheri-Josheghani S, Moniri R, Firoozeh F, Sehhat M, Ghenaat Ghamsari E. Emergence of multidrug resistant, extended-spectrum β-lactamase and metallo-β-lactamase strain of *Acinetobacter baumannii* in ICU ward of Kashan Beheshti Hospital during 2013-14. Feyz. 2016; 20(1): 49-56.

33. Afshar Yavari SH, Rota S, Caglar K, Fidan I. Determination of resistance pattern of isolated *Acinetobacter baumannii* from intensive care unite (ICUS) in Gazi hospital, Ankara. J Urmia Nursing Midwifery. 2016; 13(10): 912-918.

34. Segal H, Elisha G. Use of E-test MBL strips for the detection of carbapenmases in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2005; 56(3): 598-598.

35. Lim YM, Shin KS, Kim J. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates. J Clin Microbiol. 2007; 45(3): 902-905.

36. Ryoo NH, Ha JS, Jeon DS, Kim JR. Prevalence of metallo-β-lactamases in imipenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Korean J Clin Microbiol. 2010; 13(4): 169-172.

Journal of Microbial World
Volume 10, No. 4, January 2018

Original Article

Determination of antibiotic resistance pattern and frequency of bla$_{VIM}$ & bla$_{IMP}$ genes in clinical isolates of *Acinetobacter* species in Bandar Abbass

Fahime Golestani[1], Sedigheh Javadpour[2], Farshid Kafilzadeh[3], Zeinab Ghalandarzadeh Daryaei[1]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2]Associate Professor, Molecular Medicine Research Center, Hormozgan Health Institute, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.
[3]Professor, Department of Microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Acinetobacter* spp. are non-fermenting Gram-negative bacteria that are associated with nosocomial infections. They are serious opportunistic pathogens with resistance to many antibiotics due to the presence of Metallo-beta-lactamase (MBL) genes. The aims of this study were to determine antimicrobial susceptibility and frequency of MBLs genes in clinical isolates of *Acinetobacter* species in Shahid Mohammadi hospital, Bandar Abbas, Iran.

Material & Methods: This descriptive- cross-sectional study was carried out on 81 *Acinetobacter* isolates collected from different clinical samples from Shahid Mohammadi hospital, Bandar Abbas, Iran. The bacteria were identified to the species level by Microgen GNA-ID System kit. The Kirby-Bauer disk diffusion test was used to determine antibiotic resistance pattern. MIC of meropenem was determined by E-test, and MBLs production was detected by imipenem-EDTA synergy test (CDST method). The isolates were then subjected to polymerase chain reaction (PCR) for detection of bla$_{IMP}$ and bla$_{VIM}$ genes.

Results: Out of 81 isolates, 79(97.54%) were identified as *A. baumanni*, 1 (1.23%) as *A. lwoffii* and 1(1.23%) as *A. haemolyticus*. *Acinetobacter* spp. showed the highest resistance to imipenem and meropenem (81.5%) and the highest susceptibility to polymyxin B (96.3%) and colistin (95.1%), respectively. MIC determination by E-test revealed 77.8% of isolates as meropenem-resistant.76.5% of isolates were identified as MBL- positive by CDST method. Also, 13 (16%) isolates carried bla$_{IMP}$ gene, but none of them had the bla$_{VIM}$ gene.

Conclusion: Dissemination of MBL- producing *A. baumannii* is worrisome. In order to reduce and control *Acinetobacter* infections, implementation of strict surveillance, and judicious prescribing of antibiotics is necessary.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Metalo-betalactamase, Imipenem, Meropenem, bla$_{IMP}$ gene, bla$_{VIM}$ gene.

Correspondence to: Sedigheh Javadpour

Tel: +98 7616689624

E-mail: sedigheh.javadpour@yahoo.com

Journal of Microbial World 2018, 10(4): 299-309.