CC BY

Original paper

Phenotypic and molecular detection of AmpC-beta-lactamase in *Acintobacter baumannii* strains isolated of clinical specimens

Ali Barari M, Noorbakhsh F*, Honarmand Jahromi S

Department of Microbiology, Biological Science College, Varamin-pishva branch, Islamic Azad University,Varamin-Pishva,Iran

***Corresponding author:** e-mail: niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

Received:11/10/2021 Accepted:12/29/2021

Abstract

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen that remains persistent in the environment for a long time. The eradication of the bacteria is difficult, since it has the ability to acquire antibiotic resistance. The aims of this study were to identify the ampC Betalactamas genes and antibiotic sensitivity of Acinetobacter baumannii strains. Sixty three strains of *Acinetobacter baumannii* isolates from wound, blood, and respiratory secretions were isolated and identified by biochemical tests. Antimicrobial susceptibility testing against five antibiotics was performed by disc diffusion method for all isolates. Phenotypic methods combined disk test (CDT), was performed for idenfication AmpC Betalactamase activity in bacteria. The presence of AmpC Betalactamase and ISAba-1 and ISAba-2 genes were evaluated by PCR. Disk difiusion result showed that all of samples were resistance to 5 antibiotics ceftriaxone, cefoxitin, ceftazidime, cefotaxime and cefepime. Combined Disk test result showed that (63%) of samples were strong (30%) weak and (6%) of negative. AmpC betalactamase gene in 90.5% was positive and in 9.5% was negative. All of sampls had ISAba-1 gene (69.2%) had ISAba-2. Current study showed a high percentage of AmpC Betalactamas genes and also high prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii.*

Keywords: *A. baumannii*, AmpC Betalactamase, Combined Disk test

مقاله تحقیقی

بررسی فنوتیپی و مولکولیAmpC بتالاکتامازی در ایزوله های اسینتو باکتربومانی جدا شده از نمونه های بالینی

معصومه علی براری، فاطمه نوربخش*، سحر هنرمند جهرمی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین- پیشوا، ایران

***مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

محل انجام تحقیق: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین- پیشوا، ایران

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۸/۱۹ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۱۰/۸

چکیده

آسینتوباکتر بومانی یک پاتوژن فرصت‌طلب بیمارستانی است. یکی از ویژگی های این ارگانیسم مقاومت ذاتی دارویی و یا تمایل بالای آن در کسب فاکتور های مختلف مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک های مصرفی در بیمارستان است. هدف از این مطالعه تعیین ژن‌های *AmpC* بتالاکتاماز و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه های اسینتوباکتر بومانی است. ۶۳ سویه *اسینتوباکتر بومانی* از زخم، خون و ترشحات تنفسی بیماران بستری در بیمارستان قلب تهران جدا شد و با استفاده از تست های بیوشیمیایی تشخیص داده شد. حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها با روش انتشار از دیسک تعیین شد. روش فنوتیپی دیسک ترکیبی جهت تعیین فعالیتAmpC بتالاکتامازی انجام شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تعیین وجود ژن‌های *ISAba-1*، *ISAba-2* و *Ampc* بتالاکتاماز انجام شد. در این مطالعه تمام سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* در برابر ۵ آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون، سفوکسیتین، سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفپیم مقاوم بودند. با روش دیسک ترکیبی نشان داده شد که فعالیت AmpC بتالاکتامازی ۶۳٪ نمونه‌ها قوی، ۳۰٪ ضعیف و ۶٪ منفی بودند. بررسی مولکولی نشان داد که ۹۰/۵٪ از ایزوله ها دارای ژن *AmpC* بتالاکتامازی و ۹/۵٪ فاقد این ژن بودند. همه نمونه‌ها دارای ژن *ISAba-1* و۶۹/۸٪ ژن دارای *ISAba-2* بودند. مطالعه حال حاضر درصد بالایی از ژن‌های*AmpC* بتالاکتاماز و همچنین شیوع بالایی از مقاومت به آنتی‌بیوتیک در اسینتوباکتر بومانی را نشان داد.

واژه های کلیدی: اسینتوباکتر بومانی، *AmpC* بتالاکتاماز، تست دیسک ترکیبی

مقدمه

اسینتوباکتر بومانی کوکوباسیل گرم منفی و اکسیداز منفی، هوازی اجباری، غیرتخمیری و غیرمتحرک می باشد که بطور وسیع در خاک و آب وجود دارد و از طرفی در محیط بیمارستان پراکنده بوده و مدت زیادی در محیط زنده می ماند و به راحتی به بیماران منتقل می شود (۲،۱). *اسینتوباکتربومانی* عامل عفونت‌های مختلف بیمارستانی نظیر باکتریمی-عفونت مجاری ادراری و مننژیت ثانویه می-باشد ولی نقش برجسته آن ایجاد پنومونی بیمارستانی به

ویژه پنومونی ایجاد شده در دستگاه تنفسی فوقانی بیماران بستری شده در بخش مراقبت‌های ویژه است (۳).

یکی از داروهایی که در سراسر دنیا برای درمان عفونت-های ناشی از این باکتری به کار می رود، داروهای خانواده بتالاکتام‌ها می باشد، اما باکتری با تولید آنزیم های بتالاکتاماز از طریق هیدرولیز هسته ی مرکزی در آنتی-بیوتیک‌های بتالاکتام باعث غیر فعال شدن انتی بیوتیک شده و مقاومت بروز می نماید (۵،۴).

آنزیم های بتالاکتاماز در باکتری ها بسیار متنوع بوده و در پاسخ به فشار انتخابی آنتی بیوتیک، دائما در حال موتاسیون و جایگزینی اسید های آمینه به ویژه در جایگاه فعال آنزیم هستند و باعث ظهور انواع جدیدی از بتالاکتامازهای وسیع الطیف می شوند. بتالاکتامازها بر اساس ساختار اولیه به چهار کلاس مولکولی A تا D تقسیم می‌شوند. بتالاکتامازهای نوعA ، C و D سرین بتالاکتاماز بوده و نوع B ، متالوبتالاکتاماز است. فراوانی انواع A و C بیشتر از دو نوع دیگر می‌باشد (۶). آنزیم های بتالاکتاماز در *اسینتوباکتر بومانی* مرتبط با پلاسمید و کروموزوم بوده و سویه های مقاوم قادر هستند مجموعه ای از ژن های کد کننده مقاومت نسبت به چند خانواده آنتی بیوتیک را همزمان حمل کنند و حتی این مقاومت را به یکدیگر انتقال دهند. امروزه گسترش این سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم، فقط محدود به بیمارستان های شهر نمی شود و انتشار در جامعه نیز مهم است (۷).شایع ترین مقاومت ها در سویه های اسینتوباکتر دارای مقاومت های چند گانه، عبارتند از سفالوسپورینز AmpC، کارباپنماز Oxa، متالوبتالاکتامازها، پمپ افلاکس و اینتگرون‌ها می باشد. امروزه به دلیل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین، کارباپنم، آمینوگلیکوزید و فلوروکینولون، متاسفانه مقاومت به آنها به فراوانی در سویه‌های بالینی و محیطی این باکتری گزارش شده است (۸).

ژن های *AmpC* وابسته به پلاسمید، اولین بار در سال ۱۹۸۹ شناسایی شدند. پس از آن جدایه های بیمارستانی و غیر بیمارستانی به خصوص در باکتری های روده ای که دارای ژن های متعددی شامل *MOX*، *FOX*، *DHA*، *ACC*، *MIR* و *CIT* می باشد و متعلق به کلاس C بتالاکتامازها (سرین بتالاکتاماز) می باشند، یافت شدند. آنزیم های تولید شده توسط این ژن ها نسبت به سایر ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام به میزان کمتری رایج بوده و مقاومت به طیف وسیعی از بتالاکتام ها شامل پنی سیلین‌ها، سفالوسپورین ها، سفامایسین ها و آزترئونام و تا حدودی مقاومت به کارباپنم را به عهده دارند (۹،۱۰). *اسینتوباکتربومانی* بطور ذاتی سفالوسپورینز AmpC را تولید می کند که معمولا" در سطح پایینی بیان می شود و اثر چندانی بر روی سفالوسپورین های وسیع الطیف و کارباپنم-ها ندارد. قرار گرفتن ISAba1 (متعلق به خانواده IS4) در بالادست ژن *blaAmpC* با فراهم نمودن یک پروموتور سبب افزایش بیان آن و در نتیجه مقاومت به سفالوسپورین های وسیع الطیف می شود (۱۱). *اسینتوباکتر بومانی* به عنوان عامل عفونت های بیمارستانی به دلیل قابلیت کسب مقاومت به آنتی بیوتیک ها به مدت طولانی در محیط پایدار مانده و ریشه کنی این باکتری را دشوار می سازد. این مطالعه با هدف تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی سویه های مولد بتالاکتامازهای AmpC به روش فنوتیپی و بررسی حضور ژن های AmpC بتالاکتاماز در سویه های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از نمونه های بالینی می باشد.

مواد و روش ها

نمونه برداری و شناسایی

این مطالعه بر روی ۶۳ سویه *اسینتوباکتر بومانی* ایزوله شده از نمونه های بالینی بیماران بستری در بخش مراقبت ویژه بیمارستان قلب تهران انجام گرفت. نمونه های بالینی مورد مطالعه مربوط به نمونه های زخم و تراشه بیماران بود. هر نمونه روی محیط های بلاد آگار و مک کانکی آگار کشت داده شدند. کشت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس تست های افتراقی (TSI ,SIM ,MR-VP ,Simons Citrate Agar ,urease oxidas ,catalas)،جهت تشخیص باکتری ها انجام شد (۱۲).

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن

برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی از روش انتشار دیسک مطابق با دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (۲۰۱۷) CLSI استفاده شد. حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک های سفپیم (۳۰ میکروگرم، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، (شرکت پاتن طب ایران) انجام شد. ابتدا از باکتری های مورد مطالعه سوسپانسیونی با کدورتی برابر با کدورت نیم مک فارلند تهیه شد، سپس به کمک سوآپ از سوسپانسیون میکروبی برداشته و در تمام جهات روی محیط مولر هینتون آگار به صورت روش متراکم (چمنی) کشت داده شد، سپس به کمک پنس استریل، دیسک های آنتی-بیوتیکی در سطح پلیت قرار داده شده، به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در انکوباتور در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس با استفاده از یک خط کش، قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گرفته شد و طبق استاندارد CLSI (۲۰۱۷) به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش شدند (۱۳).

تعیین سویه های تولید کننده AmpC بتالاکتاماز به روش تست دیسک ترکیبی (Combined disk)

ابتدا باکتری *E.coli ATCC 25923* بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار بصورت متراکم (چمنی) کشت داده شد، سپس یک دیسک سفوکسیتین با غلظت ۳۰ میکروگرم در وسط پلیت قرار داده شد در مجاورت این دیسک، یک دیسک بلانک حاوی چند کلنی از باکتری *اسینتوباکتر بومانی* مورد مطالعه، قرار داده شد. بعد از یک شبانه روز انکوباسیون اطراف دیسک سفوکسیتین هاله ای ایجاد شده که در تماس با دیسک بلانک یک فرورفتگی یا هاله بازدارنده مشاهده می شود. نتایج بر اساس حساس، ضعیف و مقاوم بودن سویه ها در برابر آنتی بیوتیک سفوکسیتین ارزیابی می‌گردد (۱۴).

بررسی مولکولی سویه های تولید کننده *AmpC* بتالاکتاماز

استخراج ژنوم با روش فنل- کلروفرم انجام شد (۱۵). جهت بررسی ژن های اصلی مقاومت *AmpC* بتالاکتامازی از روش Multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) انجام شد.

جدول۱: توالی پرایمرها مورد مطالعه.

Gene	Sequence (5`>>>3`)	Amplifid Fragment(bp)	References
AmpC	FW: ACTTACTTCAACTCGCGACG RV: TAAACACCACATATGTTCCG	663	۱۶
MIR	FW: TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG RV: CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	302	۱۷
CIT	FW: TGGCCAGAACTGACAGGCAAA RV: TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462	۱۸
FOX	FW: AACATGGGGTATCAGGGAGATG RV: CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190	۱۷
MOX	FW: GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT RV: CACATTGACATAGGTGTGGTGC	520	۱۷
ACC	FW: AACAGCTCTAGCAGCCGGTTA RV: TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	346	۱۷

DHA	FW: AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT RV: CCGTACGCATACTGGCTTTGC	405	۱۷
ISAba-1	FW: GTGCTTTGCGCTCATGC RV: CATGTAAACCAATGCTCACC	435	۱۶
ISAba-2	FW: AATCCGAGATAGAGCGGTTC RV: TGACACATAACCTAGTGCAC	1100	۱۶

پرایمرها از شرکت سیناژن تهیه شده و مطابق دستورالعمل شرکت آماده گردید. واکنش PCR به کمک کیت سیناژن انجام گرفت مواد مورد استفاده شامل Master Mix به میزان ۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای رفت و برگشت هر کدام ۱۰ پیکومول، DNA به میزان ۲ نانوگرم و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. برنامه دستگاه ترموسایکلر در ۳۵ سیکل حرارتی شامل دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، دمای دناتوراسیون ۹۵ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال برای ۶ ژن Fox، Mox، Mir، DHA، ACC وCIT، ۶۴ درجه سانتیگراد که به روش مولتیپلکس انجام شد، و برای ژن های AmpC، ISAba-1 و ISAba-2، دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. از سویه *E. coli* CCUG 58543 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس محصول PCR در ژل آگارز ۲ درصد با 6x Loading رنگ آمیزی و تحت اشعه UV عکس برداری گردید. از مارکر ۵۰bp (شرکت کیاژن) برای شناسایی محصول PCR استفاده شد.

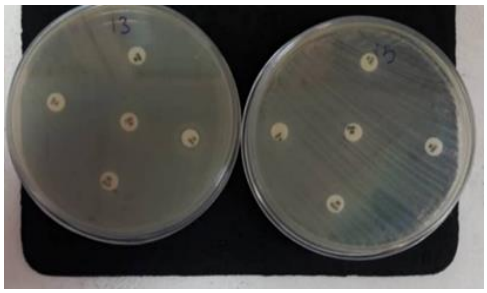
نتایج

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی در سویه های *اسینتوباکتر بومانی*

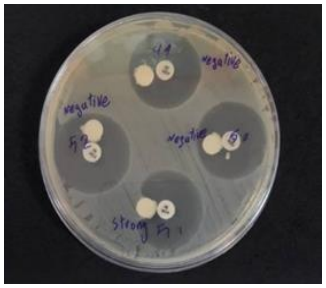
آنالیز تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن در این مطالعه نشان داد که *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بیماران دارای مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۰۰٪ نسبت به آنتی بیوتیک های سفیپیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفوکسیتین و سفتریاکسون بودند (شکل ۱).

نتایج حاصل از روش دیسک ترکیبی

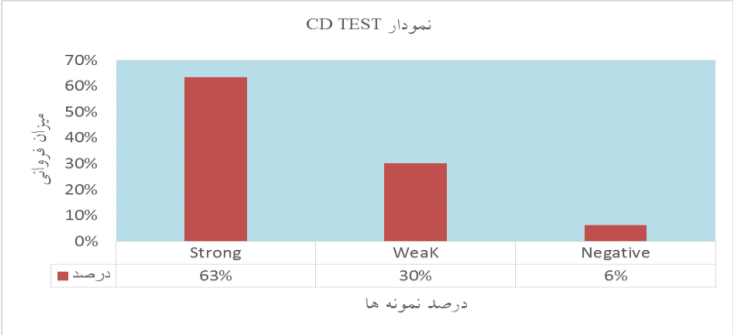
فعالیت AmpC بتالاکتامازی سویه های *اسینتوباکتر بومانی* با روش دیسک ترکیبی بررسی شد ونتایج زیر بر اساس حساس، ضعیف ومقاوم بودن سویه ها در برابر آنتی بیوتیک سفوکسیتین بدست آمده است (شکل ۲).



شکل ۱ - تعیین حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های اسینتوباکتر بومانی.



شکل ۲ - فعالیت AmpC بتالاکتامازی به روش دیسک ترکیبی در سویه های اسینتوباکتر بومانی.



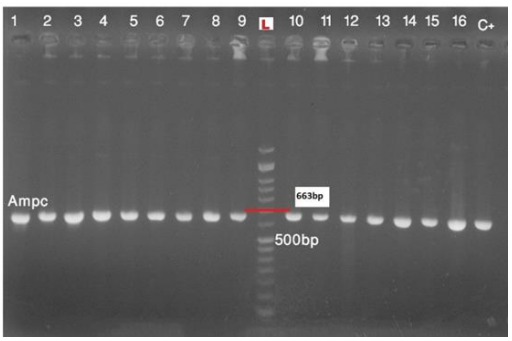
نمودار ۱ - فراوانی مقاومت AmpC بتالاکتاماز در سویه های اسینتوباکتر بومانی به روش CD تست.

نتایج بررسی وجود ژن AmpC

در این مطالعه با استفاده از تکنیک PCR، ۶۳ سویه برای وجود ژن AmpC مورد بررسی قرار گرفتند (۹۰/۵٪) ۵۷ سویه باندی به اندازه ۶۶۳bp بودند که نشان دهنده سویه های هستند که دارای ژن AmpC می باشند.

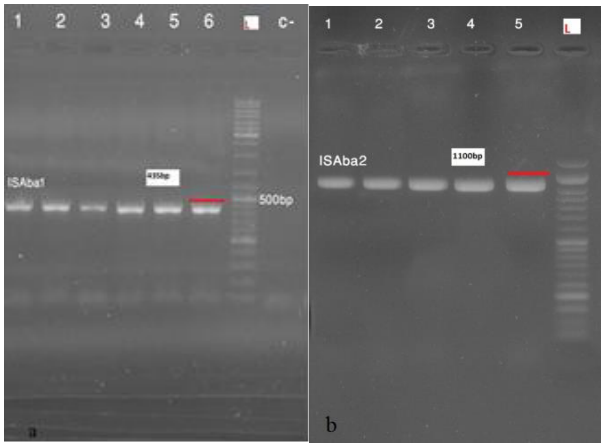
نتایج بررسی ژن ISAba-1 و ISAba-2

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR ژن ISAba-1 و ISAba-2 برای ۶۳ ایزوله سویه اسینتوباکتر بومانی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به باندهای ایجاد شده و باند راهنما، تمام سویه های مورد بررسی دارای ژن ISAba-1 با اندازه باند ۴۳۵ جفت باز و۴۳ سویه(۶۸/۲٪) دارای ژن ISAba-2 بودند.



شکل ۳ - محصول PCR برای ژن AmpC در سویه های اسینتوباکتر بومانی.

* L: Ladder 50 bp plus ، ۱-۱۶ نمونه مورد بررسی، C^+:کنترل مثبت (*E. coli* CCUG 58543)



شکل ۴: محصول PCR a)ژن ISAba-1 b)ژن ISAba-2در سویه های اسینتوباکتر بومانی
* L:Ladder 50 bp plus، C⁻: کنترل منفی(*E.coli ATCC 25923*)

نتایج بررسی ژن های MOX، FOX، DHA، ACC، CIT

در این مطالعه ژن های تولید کننده فعالیت AmpC بتالاکتامازی با روش Multiplex-PCR مورد بررسی قرار گرفت، تمامی ۶۳ سویه فاقد ژن های MOX، FOX، DHA، ACC، MIR وCIT بودند.

بحث

کنترل عفونت های کسب شده از بیمارستان که به وسیله باسیل های گرم منفی مقاوم به چند دارو ایجاد می‌شود به عنوان یک مشکل اساسی در کشور های توسعه یافته طی دو دهه گذشته شناخته شده است (۱۹). امروزه استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها باعث افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی شده است. انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری های بیماری زا به عنوان یک چالش مهم در عفونت‌های بیمارستانی مطرح شده است. مطالعات فراوانی در زمینه تشخیص مقاومت باکتریایی در عفونت بیمارستانی تمرکز دارد (۲۰). از موارد بسیار مهم ایجاد کننده عفونت بیمارستانی، باسیل های گرم منفی غیر تخمیری شامل *سودوموناس آئروژینوزا*، *اسینتوباکتر بومانی* و *استنوترفوموناس مالتوفیلیا* می باشند (۲۱).

در مطالعه حاضر حساسیت آنتی بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن برای ۶۳ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* طبق معیار CLSI(2017) جهت تعیین فنوتیپ مقاومت دارویی در برابر پنج دیسک آنتی بیوتیکی مختلف (سفپیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفوکسیتین و سفتریاکسون) انجام گرفت و مقاومت ۱۰۰٪ نسبت به آنتی بیوتیک ها در سویه های اسینتوباکتر مشاهده شد. Singh در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۳ بر روی سویه های *اسینتوباکتر بومانی* با مقاومت چندگانه انجام داد، مشاهده کرد که ایزوله های کلینیکی *اسینتوباکتر بومانی* جمع آوری شده از بخش های ICU به میزان چشمگیری نسبت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم (۹۸٪)، سفپیم (۹۶٪)، سفتازیدیم (۸۶٪) و سیپروفلوکسازین (۹۴٪) مقاومت دارند (۲۲). Hasan و همکاران در سال ۲۰۱۴، نشان دادند که سویه های مختلف *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به اکثر انتی بیتیک های مصرفی مقاوم شده اند (۲۳). مطالعه در مورد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی در زمان ها ومکان های مختلف در دو بیمارستان شهر تهران در سال ۱۳۹۲ نشان داد که فراوانی مقاومت به سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفپیم از گروه سفالوسپورین ها در ایزوله های مورد مطالعه ۹۸/۱٪ بود، در این پژوهش نیز سویه های *اسینتوباکتر بومانی* مورد مطالعه

نسبت به آنتی بیوتیک های مذکور مقاومت ۱۰۰٪ نشان دادند، که با نتایج سایر مطالعات صورت گرفته در ایران که بین ۸۴/۱٪ تا ۱۰۰٪ بوده همخوانی داشته است (۲۵-۲۴).

AmpC بتالاکتاماز، سفالوسپورینازی هستند که به طور ضعیف توسط اسید کلاوولانیک مهار می شوند. این آنزیم ها قادر به هیدرولیز سفامایسین ها (سفوکسیتین،سفوتتان) و سایر سفالوسپورین های وسیع الطیف هستند و از این نظر از ESBL متمایز می گردند. اگر چه در دستور العمل های فعلی CLSI هیچ روشی برای تشخیص سویه های تولید کننده AmpC بتالاکتاماز توصیف نشده، اما برای تشخیص AmpC بتالاکتامازها از روش مختلفی می توان استفاده کرد. در این مطالعه مقاومت AmpC بتالاکتامازی در سویه های *اسینتوباکتر بومانی* به روش دیسک ترکیبی انجام شد که ۶۳/۴۹٪ از سویه ها مثبت قوی، ۳۰/۱٪ از سویه ها ضعیف و ۶/۳۴٪ از سویه ها منفی بودند. Philip و همکاران (۲۰۰۵) برای تایید تولید کننده های AmpC از دیسک های سفوکسین و مهار کننده اسید بوریک بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده کردند و هاله های اطراف این دیسک ها با هم مقایسه شد. از بین ۱۳۶ ایزوله جدا شده ۸۲ (۶۰/۲۹٪) در تولید AmpC بتالاکتاماز با روش دیسک مثبت بودند.(۶۱/۷۶٪) مثبت قوی و (۱۱/۷۶٪) تولید کننده متوسط AmpC بودند و (۲۶/۴۷٪) AmpC منفی بودند (۲۶). Lee و همکاران برای بررسی فعالیت بتالاکتامازی از ۱۸۰ سویه اسینتوباکتر مقاوم به چند دارو از روش دیسک آنتی بیوتیک استفاده کردند. ۱۴۷ سویه ایزوله بتالاکتاماز مثبت بودند. ۸۴ سویه (۵۷/۱۴٪) ESBL بودند و ۱۰۵ سویه (۷۱/۴۲٪) AmpC بتالاکتاماز و ۴۳ سویه (۲۹/۲۵٪) MBL بودند که با روش های فنوتیپی تایید شد (۲۷). Jacoby در یک مطالعه نشان داد ۱۷ ایزوله از ۳۹ ایزوله جدا شده (۴۳/۵۹٪) از سویه های اسینتوباکتر بومانی و ۴ سویه از *سودوموناس آئروژینوزا* آنزیم AmpC بتالاکتاماز دارند (۲۸).

در این مطالعه بررسی ژن AmpC بتالاکتامازی در ۶۳ سویه *اسینتوباکتر بومانی* انجام شد، ۹۰/۵ ٪ از سویه ها دارای ژن AmpC بودند و ۹/۵ ٪ از سویه ها فاقد این ژن بودند، همچنین تمام سویه های مورد بررسی دارای ژن ISAba-1 و۴۳ سویه (۶۹/۲ ٪) دارای ژن ISAba-2 بودند. Hamidian و همکارانش (۲۰۱۳) با مطالعه روی سویه های *اسینتوباکتر بومانی* نشان دادند که توالی الحاقی ISAba-1 در بالادست AmpC بتالاکتاماز می تواند باعث مقاومت ذاتی به سفالوسپورین های نسل سوم از جمله سفتازیدیم و سفوتاکسیم شود (۲۹). Lopes و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که در باکتری های گرم منفی بیان ژن القایی است، اما، در اسینتوباکتر بومانی، AmpC در یک سطح پایه بیان می شود. بیان این ژن وقتی است که یک توالی الحاقی بنام ISAba-1یا ISAba-125 در بالادست ژن قرار می گیرد و یک پروموتر بهتری برای بیان ژن AmpC فراهم می کند و گسترش طبیعی ژن blaADC دلیل اصلی مقاومت زیاد به پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها در *اسینتوباکتر بومانی* است (۳۰). اسدالهی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در یک تجزیه و تحلیل به روش PCR نشان دادند که ISAba-1 در تمام ایزوله های *اسینتوباکتر بومانی* وجود دارد. در حالیکه ۹۲/۳۶٪ از ایزوله ها برای ISAba-2 مثبت بودند (۳۱).

Owrang و همکاران در سال ۲۰۱۷، بعد از بررسی مقاومت‌های بدست آمده در *اسینتوباکتر بومانی* بواسطه عناصر الحاقی مثل ISAba-2 به این نتیجه رسیدند که وجود عناصر اضافی به عنوان فاکتورهای موثر، می تواند بیان ژن های مقاوم را افزایش داده و بنابراین به آنها کمک می کند تا بتوانند از طریق حرکت و انتقال بین باکتری ها منتقل شوند. بنابراین تعیین این عناصر برای کنترل عفونت ها ضروری است (۳۲). Post و همکاران توالی ISAba-2 را در ۹۲/۳۸٪ از ایزوله های *اسینتوباکتر بومانی* جدا کردند و ISAba-1 در همه سویه ها وجود داشت (۳۳).

در این مطالعه ژن های *MOX، FOX، DHA، ACC*، *MIR* و*CIT* برای ۶۳ سویه *اسینتوباکتر بومانی* مورد بررسی قرار گرفت، تمام ۶۳ سویه فاقد ژن های فوق بودند. در مطالعات که توسط جعفری و همکاران در سال ۱۳۹۶ انجام شد از ۶۰ نمونه مورد بررسی ۳۹ نمونه (۶۵٪) دارای ژن *CIT*، ۳۶نمونه (۶۰٪) دارای ژن *DHA*، ۱۲ نمونه (۲۰٪) دارای ژن *MOX* و ۸ نمونه(۱۳/۳٪) واجد ژن های *ACC* و *FOX* بودند (۳۴). در مطالعه Shanthi و همکاران در سال

۲۰۱۴، ۶۰ سویه اسینتوباکتر و *کلبسیلا پنومونیه* از نظر حضور ژن های پلاسمیدی *AmpC* بررسی شد که ۲ سویه *کلبسیلا پنومونیه* دارای ژن های *MOX* و *FOX* و دو سویه *اسینتوباکتر بومانی* دارای ژن *DHA* بودند(۳۵). در مطالعه Nia-jian فقط دو سویه *اسینتوباکتر بومانی* و *اشریشیاکلی* دارای ژن *ACT* بودند، اما ژن های *MOX*، *FOX*، *DHA* و *CIT* در هیچ کدام از سویه ها شناسایی نشد (۳۶). در مطالعه KUO هیچ ژن *AmpC* بتالاکتامازی در سویه های اسینتوباکتر بومانی دارای مقاومت چندگانه شناسایی نشد (۳۷).

نتیجه گیری

با مقایسه ی نتایج حاصل از این تحقیق و مطالعات مشابه می توان به شیوع فزون یافته ی عفونت های بیمارستانی ناشی از اسینتوباکتر بومانی با مقاومت آنتی-بیوتیکی چند گانه به دلیل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها پی برد. در بین کشور های مختلف، تفاوت های زیادی در میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف مشاهده می شود که از فاکتورهای محیطی و الگوهای مختلف استفاده از عوامل ضد میکروبی ناشی می گردد. در بررسی CD تست مشخص شد که ۶۳ درصد سویه ها مقاومت قوی و ۳۰ درصد مقاومت ضعیف را نشان دادند که باتوجه به وجود ۹۰/۵ درصد ژن های *AmpC* می توان گفت این روش برای تعیین مقاومت AmpC بتالاکتامازی مناسب می باشد و همچنین شیوع ۱۰۰ درصدی *ISAba* نشان دهنده این است که این ژن در بالادست ژن AmpC نقش مهی در بیان این ژن دارد. در سویه های مورد مطالعه هیچ یک از ژن های *MOX*، *FOX*، *DHA*، *ACC*، *MIR* و *CIT* وجود نداشتند که با توجه به اینکه این ژن ها اغلب از انتروباکتریاسه انتقال پیدا می کند در این سویه ها مقاومت سفالوسپورینی از انتروباکتریاسه انتقال نیافته بلکه مقاومت ذاتی به این آنتی بیوتیک ها می باشد.

تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی واحد ورامین – پیشوا قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

1. Peleg AP, Seifert H, Paterson DL. 2008. Acinetobacter baumannii: Emergence of a Successful Pathogen. Clin Microbiol Rev. 21(3):538-582.
2. Gaynes R, Edwards JR. 2005. Overview of nosocomial infections caused by gram negative bacilli, Clin Infect Dis. 41:848–854.
3. Bassetti M, Righi E, Esposito S, Petrosillo N, Nicolini L. 2008. Drug treatment for multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections. Future Microbiol. 3(6):649-60.
4. Michalopoulos A, Falagas ME. 2010. Treatment of Acinetobacter infections. Expert Opin Pharmacother. 11(5):779-88.
5. El Salabi, A., Walsh, T. R., & Chouchani, C. 2013. Extended spectrum β-lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. Critical reviews in microbiology, 39(2), 113-122
6. Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 54(3):969-976
7. Livermore DM, Woodford N. 2006. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. Trends Microbiol. 14(9):413-420.
8. Poirel L, Nordmann P. 2006. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 12: 826–836.
9. Jacoby GA. 2009. AmpC β-Lactamases. Clin Microbiol Rev. 22(1): 161-182.
10. Livermore DM and Woodford N. 2006. The β-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends Microbiol . 14(9): 412-419.
11. Poirel, L., Bonnin, R. A., & Nordmann, P. 2011. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. IUBMB life, 63(12), 1061-1067..
12. Sandle, T. 2016. Microbial identification. Pharmaceutical Microbiology; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands. 103-113

13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing .2017.
14. EUCAST subcommittee for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1, December 2013.
15. Vingataramin L., and Frost E.H. 2015. A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast. BioTechniques. 58:120-125
16. Merkier A.K., Catalano M. 2008. Soledad Ramírez M., Quiroga C., et al. Polyclonal spread of *bla*OXA-23 and *bla*OXA-58 in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. *J Infect Developing Countries* . 2(3):235-240.
17. Abd El-Aziz N.K., and Gharib A.A. 2016. Coexistence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and AmpC-Beta-Lactamases in *Escherichia coli* strains in Egypt. Cell. Mol. Biol. 61 (5): 29-35.
18. Fam N., Gamal D., El Said M., El Defrawy I., et al. 2013. Prevalence of Plasmid-Mediated *amp*C Genes in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae from Cairo, Egypt. British Microbiology Research Journal. 3(4): 525-537.
19. Bergogne-Berezin, E., & Towner, K. J. 1996. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clinical microbiology reviews, *9*(2), 148-165.
20. BÜYÜKTUNA, S. A., TURHAN, Ö., CENGİZ, M., RAMAZANOĞLU, A., & YALÇIN, A. N. 2010. Yoğun Bakım Ünitesinde Konsültasyonlarla Belirlenen Hastane İnfeksiyonları ve Etkenleri. Balkan Medical Journal, *2010*(3), 150-155.
21. Munoz-Price LS, Weinstein RA. 2008. Acinetobacter infection. New Engl J Med. 358(12):1271-1281.
22. Prashanth K, Badrinath S. 2004. In vitro susceptibility pattern of Acinetobacter species to commonly used cephalosporins, quinolones, and aminoglycosides. Indian J Med Microbiol. 22: 97-103
23. Hasan B, Perveen K, Olsen B, Zahra R. 2014. Emergence of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in hospitals in Pakistan .J Med Microbiol. 63(Pt 1):50- 5.
24. Safari M, Saidijam M, Bahadour A, Jafari R, Alikhani MY. 2013. High prevalence of multidrug resistance and metallo-beta-lactamase (MβL) producing Acinetobacter isolated from patients in ICU wards, Hamadan, Iran. Journal of Research in Health Sciences. 13(2): 162-7.
25. Peymani A, Farajnia S, Nahaei MR, Sohrabi N, Abbasi L, Ansarin K, et al. 2012. Prevalence of class 1 integron among multidrug-resistant Acinetobacter in Tabriz, northwest of Iran. Polish Journal of Microbiology . 61(1): 57-60.
26. Philip E. 2005.Coudron. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamases in Klebsiella spp., Escherichia coli and Proteus mirabilis. J Clin Microbiol. 43 : 4163-7.
27. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. 2007. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo β- lactamase producing strains of Pseudomonas and Acinetobacter species. Clin Microbiol Infect 7 (2): 88-91.
28. Jacoby, G. A. (2009). AmpC β-lactamases. Clinical microbiology reviews. 22(1), 161-182.
29. Hamidian, M., & Hall, R. M. 2013. ISAba1 targets a specific position upstream of the intrinsic ampC gene of Acinetobacter baumannii leading to cephalosporin resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 68(11), 2682-2683.
30. Lopes, B., A. Hamouda, S. Amyes. 2011. The role of IS30 in the expression of the blaADC gene in Acinetobacter baumannii. 21st ECCMID / 27th ICC, 7th-10th May 2011. Milano: Italy.
31. Asadollahi P, Akbari M, Soroush S, Taherikalani M, Asadollahi K, Sayehmiri K, et al. 2012. Antimicrobial resistance patterns and their encoding genes among Acinetobacter baumannii strains isolated from burned patients. Burns. 38(8):1198-203.
32. Owrang, M., Eslami, G., Fallah, F., Irani, S., & Rahbar, M. 2017. Molecular Detection of ISAba2 among Carbapenem Hydrolyzing Class D β-Lactamasese Acinetobacter baumannii Strains Isolated from Patients in Tehran Hospitals. Iranian Journal of Medical Microbiology, 11(3), 19-26.
33. Post V, Hall RM. 2009. AbaR5, a large multipleantibiotic resistance region found in Acinetobacter baumannii. Antimicrobial agents and chemotherapy. 53(6):2667-71.
34. Jafari S, Najafipour S, Kargar M, Abdollahy A, Mardaneh J, FasihyRamandy M, et al. 2012. Phenotypical evaluation of multi-drug resistant Acinetobacter baumannii. J Fasa Uni of Med Sci 2(4): 254-258.
35. Shanthi J, Balagurunathan R. 2014. Characterisation of heteroresistant subcolonies for MBL, AmpC genes in Klebsiella pneumoniae

and Acinetobacter baumannii. Indian J Med Microbiol. 32(2): 210-211.
36. Li, N., Xu, Y., Sun, H., Liao, W., & Li, Y. 2010. Study on the antibiotic resistance and AmpC gene of multi-drug resistant Acinetobater baumannii. Journal of Tropical Medicine (Guangzhou), 10(6), 669-729.
37. Kuo S, Fung C, Lee Y, Chen C, Chen T. 2010. Bacteremia due to Acinetobacter genomic species 10. J Clin Microbiol. 48(2): 586-590.