مقاله تحقیقی

بررسی اثر ممانعت گر کربونیل سیانید۳- کلروفنیل هیدرازون بر حداقل غلظت مهار کننده آمینوگلیکوزید ها و تعیین فعالیت پمپ تراوشی در ایزوله های اسینتوباکتر بومانی مقاوم چند دارویی

جیران فتحی راد [۱]، سحر هنرمند جهرمی*[۲]، فاطمه نوربخش [۳]

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

* **مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: sahar_hj2@yahoo.com

محل انجام تحقیق: مجتمع آزمایشگاهی شهید بهشتی

تاریخ دریافت:۹۷/۵/۲۸ تاریخ پذیرش:۹۷/۶/۱۳

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۲- شماره ۴- زمستان ۱۳۹۶

چکیده

اسینتوباکتر بومانی مهمترین عامل عفونت های بیمارستانی است. این باکتری نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک های رایج مقاوم است و مقاومت چندگانه دارویی(MDR[۱]) علت نقص درمان آنتی بیوتیکی برای باکتری است. مکانیسم های مختلفی منجر به بروز MDR می شوند و پمپ های افلاکس فعال مهترین عامل هستند. آمینوگلیکوزیدها داروهای مهم در درمان عفونت های جدی *اسینتوباکتر بومانئی* می باشند. هدف از این تحقیق بررسی فعالیت پمپ افلاکس در مقاومت آمینوگلیکوزیدی بین ایزوله های MDR اسینتوباکتربومانئی است. ۵۵ سویه *اسینتوباکتر بومانئی* از نمونه های بالینی بیماران بستری در بیمارستان میلاد تهران جداسازی شده و با تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها با روش انتشار در دیسک مطابق با استاندارد CLSI تعیین شد و سویه های MDR مشخص شدند. حداقل غلظت ممانعت کننده مربوط به آمیکاسین و جنتامایسین قبل و پس از تیمار با ممانعت گر کربونیل سیانید۳- کلروفنیل هیدرازون تعیین گردید. بیشترین مقاومت مربوط به سفتازیدیم و سفوتاکسیم (۹۸/۲ درصد) و کمترین مقاومت برای جنتامایسین (۶۲ درصد) بود. مقاومت به آمیکاسین و جنتامیسین به ترتیب ۷۸ و۶۲ درصد گزارش شد. فراوانی سویه های MDR، ۹۸٪ بود. از بین سویه های مقاوم به آمیکاسین و جنتامایسین به ترتیب ۴ سویه و ۱۷سویه به عنوان سویه های فعال پمپ افلاکس گزارش شدند. یک سویه برای هر دو نوع آنتی بیوتیک فعال بود. بررسی فعالیت افلاکس از طریق ممانعت گر CCCP نشان داد که پمپ افلاکس برای مقاومت به آنتی بیوتیک جنتامیسین نسبت به آمیکاسین فعالیت بیشتری در بین ایزوله های اسنیتوباکتر بومانئی دارد.

واژه های کلیدی: اسینتوباکتر بومانئی، مقاومت چندگانه دارویی، ممانعت گر، پمپ تراوشی

مقدمه

تعدادی از گونه های *Acinetobacter* مستقیما در عفونت های انسانی دخیلند، که مهم ترین آن ها*اسینتوباکتر بومانی* می باشد. این باکتری عامل عفونت تنفسی، باکتریمی، مننژیت و عفونت دستگاه ادراری است (۱). درمان عفونت های ناشی از این پاتوژن به دلیل مقاومت قابل توجه آن به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها، بسیار دشوار است و این امر میزان مرگ و میر بیماران مبتلا به عفونت با این باکتری را به ۴۳ درصد و در برخی از کشورها به ۷۵ درصد می رساند (۲،۳). *Acinetobacter baumannii* بیشتر در محیط

[۱]Multiple drug resistance

توجه قرار گرفته است. رتبه ی اول این پاتوژن در ایجاد عفونتهای بیمارستانی اهمیت توجه و مطالعه ی *اسینتوباکتر بومانی* را گوشزد می کند (۴). این میکروارگانیسم را می توان از پوست، سیستم تنفسی، افراد بیمار و نیز تجهیزات بیمارستانی جداسازی کرد (۵). مطالعات نشان داده است که *اسینتوباکتر بومانی* مقاومت طبیعی نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها، کارباپنم ها و فلوروکینولون ها دارد (۶). این باکتری هم چنین به دلیل توانایی بالا در کسب ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی و ایجاد سویه های مقاوم به چند دارو (MDR) درمان این نوع عفونت ها را مشکل، پرهزینه و گاه غیر ممکن نموده است (۹-۷). مقاومت چند دارویی در *اسینتوباکتر بومانی*، علت اصلی شکست درمان عفونت های بیمارستانی ناشی از آن به شمار می آید. آمینوگلیکوزیدها از داروهای اصلی در درمان عفونت های اسینتوباکتر به شمار می آیند. اما در سال های اخیر مقاومت به این آنتی بیوتیک ها نیز در این باکتری افزایش یافته است (۱۰). امروزه پمپ های تراوشی فعال به عنوان یکی از مهم ترین مکانیسم های مقاومت ذاتی و اکتسابی آنتی بیوتیک ها در باکتری ها مطرح شده اند. سیستم های افلاکس در غشاء باکتری قرار دارند و نقش مهمی در هومئوستازی سلول و دفع ترکیبات سمی دارند (۱۱).

پمپ های تراوشی آنتی بیوتیکی در باکتری ها از نظر فیلوژنی به پنج خانواده بزرگ تعلق دارند. از بین آنها پمپ های خانواده RND[۲] در اسینتوباکتر بومانی جزء پمپ های تراوشی چند دارویی (MDR)[۳] می باشند. پمپهای تراوشی نه تنها باعث افزایش حداقل غلظت مهار کننده رشد باکتری (MIC) آنتی بیوتیک ها می گردند، بلکه با کاهش غلظت دارو در داخل سلول منجر به ایجاد سویه هایی موتانت مقاوم به آنتی بیوتیک در باکتری ها می شود (۱۲). پمپ AdeABC یکی از مهم ترین سیستم افلاکس متعلق به خانواده RND در *آسینتوباکتر بومانی* می باشد (۱۳). مطالعات نشان داده که این پمپ های تراوشی منجر به افزایش MIC آنتی بیوتیک های آمیکاسین و جنتامایسین می شود (۱۴). برای مهار پمپ های تر شحی در آزمایشگاه از ترکیبات مهارکننده استفاده می شود که یکی از مهمترین این مهارکننده ها، کربو نیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون (CCCP)[۴] می باشد (۱۵). این مهار کننده از جمله مهارکننده ها ی پمپ پروتون[۵] (PMF) و مهارکننده ی پمپ های ترشحی خانواده ی RND می باشد. CCCP عملکرد پمپ ترشحی را مختل نموده و باعث تجمع آنتی بیوتیک درون سلول باکتریایی می شود و در نتیجه اثر بخشی آنتی بیوتیک ها افزایش می یابد (۱۶). هدف از انجام این تحقیق بررسی مقاومت آمینوگلیکوزیدی ایزوله های *اسینتوباکتر ,بومانئی* مقاوم چند دارویی و ارتباط این نوع مقاومت با پمپ افلاکس فعال این ایزوله ها است.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

این مطالعه بر روی ۵۵ سویه *اسینتوباکتر بومانی* ایزوله شده از نمونه های تراشه و زخم بیماران بستری در بخش های بیمارستان میلاد تهران در تاریخ آبان ماه تا فروردین ماه ۱۳۹۶-۱۳۹۵ انجام گرفت. پس از جداسازی و خالص سازی سویه ها بر روی محیط های کشت بلاد آگار و مک کانگی آگار، به منظور شناسایی سویه ها از رنگ آمیزی گرم و آزمون های بیوشیمیایی استاندارد مانند کاتالاز، اکسیداز، TSI (Triple Suger Iron)، MRVP(Methyle Red VogesProskauer Broth)، اوره آز، Oxidation OF(Fermentation Fluid Medium Base) ،لایزین، بایل اسکولین استفاده گردید و رشد در ۴۲درجه سلیسیوس انجام شد.

تست تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی و تعیین سویه های مقاوم چند گانه دارویی

حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های *آسینتوباکتر بومانی* به روش انتشار از دیسک و بر اساس استانداردهای 2016 CLSI نسبت به ۱۱ آنتی بیوتیک با استفاده ازکشت بر روی محیط مولر هینتون آگار تعیین شد. دیسک های آنتی بیوتیکی که از شرکت پادتن طب تهیه شد، شامل آمیکاسین ۳۰ میکروگرم, ایمی پنم ۱۰ میکروگرم, تتراسایکلین ۳۰ میکروگرم, کوتریموکسازول ۱/۲۵-۲۳/۷۵

[2] *Resistance-Nodulation-Division*
[3] *Multi drug Efflux pumps*
[۴] carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone[۴]
[5] Proton Motif Force

میکروگرم , پیپراسایکلین ۱۰۰ میکروگرم, جنتامایسین ۱۰ میکروگرم , سفتازیدیوم ۳۰ میکروگرم, سیپروفلوکسازین ۵ میکروگرم, سفوتاکسیم ۳۰ میکروگرم, پیپراسیلین تازوباکتام ۱۰۰ میکروگرم، مروپنم ۱۰ میکروگرم بود. از سویه های استاندارد *آسینتوباکتر بومانی* (ATCC19606) به عنوان سویه کنترل کیفی استفاده شد. سویه هایی که به بیش از دو کلاس مختلف آنتی بیوتیکی مقاوم بودند به عنوان سویه های MDR انتخاب شدند .

تعیین MIC آمیکاسین و جنتامیسین قبل و پس از تیمار با ممانعت گر کربو نیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون

حداقل غلظت مهار کننده آنتی بیوتیک های جنتامیسین و آمیکاسین با روش میکرودایلوشن براث براساس استاندارد CLSI ۲۰۱۶ و در پلیت های ۹۶ خانه تعیین شد. به منظور بررسی فعالیت پمپ افلاکس، ممانعت گر کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون (CCCP) با غلظت نهایی ۳۰ µg/ml به هر یک از پلیت های مولر هینتون آگار حاوی ۲ تا ۱۰۲۴ µg /ml آمیکاسین و جنتامایسین اضافه گردید. یکبار دیگر حداقل غلظت مهار کننده آنتی بیوتیک ها پس از تیمار با ممانعت گر تعیین شد. کاهش در MIC حداقل به میزان ۴برابر پس از استفاده از ممانعت گر CCCP به عنوان شاخص وجود فعالیت شدید پمپ تراوشی در نظر گرفته شد. تمامی آزمایش ها با ۳ بار تکرار انجام شد. یک پلیت حاوی ممانعت گر CCCP و فاقد آنتی بیوتیک به عنوان کنترل استفاده شد. از سویه استاندارد *آسینتوباکتر بومانی* (ATCC19606) به عنوان سویه کنترل کیفی استفاده شد .

آنالیز آماری

آنالیز آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. جهت بررسی ارتباط فعالیت پمپ تراوشی سویه های *اسینتوباکتر بومانی* با نوع آنتی بیوتیک های جنتامیسین و آمیکاسین از آزمون اماری مربع کای استفاده شد. سطح معنا داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

از ۵۵ سویه *اسینتوباکتر بومانی* شناسایی شده، ۵۳ نمونه از بخش مراقبت های ویژه و ۲ نمونه از سایر بخش ها جدا سازی شدند. ۴۹ (۸۹ درصد) سویه ها مربوط به نمونه تراشه بیمارن بودند و ۶ (۱۰/۹ درصد) سویه ها از نمونه زخم جدا سازی شدند. ۲۵ (۴۵/۴ درصد)سویه از نمونه بالینی مردان و ۳۰ (۵۴/۴ درصد) سویه ها از نمونه بالینی زنان جدا شدند.

نتایج تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های اسینتوباکتر بومانی

با توجه به نتایج به دست آمده از جدول ۱ درصد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم، سفوتاکسیم، مروپنم، سیپروفلوکساسین، ایمی پنم، پیپراسیلین، کورتیموکسازول، آمیکاسین، تتراسایکلین، پیپراسیلین تازوباکتام، جنتامایسین به ترتیب شامل ۹۸/۲ درصد، ۹۸/۲ درصد، ۹۶/۴ درصد، ۹۴/۵ درصد، ۹۴/۵ درصد، ۹۳ درصد، ۸۷ درصد، ۷۸ درصد، ۷۴/۵ درصد، ۷۱ درصد، ۶۲ درصد مقاومت به آنتی بیوتیک ها (به ترتیب از راست به چپ) گزارش شد. ۹۸ درصد سویه های اسینتوباکتر بومانئی به ۳ کلاس آنتی بیوتیکی مقاومت نشان دادند و به عنوان سویه های MDR انتخاب شدند.

نتایج MIC آنتی بیوتیک های جنتامایسین و آمیکاسین در سویه های آسینتوباکتر بومانی قبل و پس از تیمار با ممانعت گر

بر اساس استاندارد CLSI، مقایر MIC ≤ ۱۶µg/mL و MIC ≤ ۶۴µg/m به عنوان مقاومت به آنتی بیوتیک های جنتامیسین و آمیکاسین برای ایزوله های *اسینتوباکتر بومانی* در نظر گرفته شد. در مطالعه حاضر میزان MIC برای آنتی بیوتیک جنتامیسین بین ۴ و ۱۰۲۴µg/mL و برای آنتی بیوتیک آمیکاسین بین ۱۶ و ۱۰۲۴ µg/mLگزارش شد. اغلب سویه ها MIC بالای ۵۱۲ µg/mL برای هر دو آنتی بیوتیک داشتند که نشان از مقاومت بالای سویه های اسینتوباکتر نسبت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه بود.

از ۴۷ ایزوله مقاوم به جنتامیسین ، ۱۹ ایزوله با MIC ۱۰۲۴ µg/mL پس از تیمار با ممانعت گر کاهشی در

میزان MIC آنتی بیوتیک جنتامیسین نداشتند. ۸ ایزوله کاهش ۲برابری MIC نشان دادند. ۱۷ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* کاهش بیشتر از ۴ برابری MIC داشتند (جدول ۲). از بین آنها ۱ سویه کاهش ۲۵۶ برابری داشت و MIC پس از ممانعت گر از ۱۰۲۴ µg/mL به حد حساسیت (۴ µg/mL) رسیده بود. از بین ایزوله های مقاوم به جنتامیسین ۱۷(۳۶/۱درصد) از نظر فنوتیپی دارای فعالیت شدید پمپ تراوشی بودند.

از ۵۰ ایزوله مقاوم به آمیکاسین، ۲۶ ایزوله با MIC ۱۰۲۴ µg/mL پس از تیمار با ممانعت گر کاهشی در میزان MIC آنتی بیوتیک آمیکاسین نداشتند. یک سویه با MIC۵۱۲ µg/mL ، کاهش ۴ برابری MIC داشت. ۴ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* کاهش بیشتر از ۴ برابری MIC داشتند (جدول ۲). از بین آنها ۲ سویه کاهش ۶۴ و ۱۲۸ برابری داشته و MIC آمیکاسین پس از ممانعت گر از ۱۰۲۴ µg/mL به حد حساسیت (µg/mL≤۱۶) رسیده بود. از بین ایزوله های مقاوم به آمیکاسین ۴(۸ درصد) از نظر فنوتیپی دارای فعالیت شدید پمپ تراوشی بودند. آنالیز آماری اختلاف معنا داری را بین میزان کاهش MIC آنتی بیوتیک جنتامیسین و آنتی بیوتیک آمیکاسین پس از تیمار با ممانعت گر CCCP نشان داد (P<0.001). تنها یک سویه برای هر دو نوع آنتی بیوتیک جنتامیسین و آمیکاسین پس از ممانعت گر کاهشMIC ۴ برابر و بیشتر داشته و به عنوان سویه فعال پمپ تراوشی برای هر دو نوع آنتی بیوتیک آمینوگلیکوزیدی گزارش شد.

جدول ۱ - الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های اسینتوباکتر بومانئی جدا شده از نمونه های بالینی.

نام آنتی بیوتیک	مقاوم تعداد (٪)	نیمه حساس تعداد (٪)	حساس تعداد (٪)
سفتازیدیم	۵۴(۹۸/۲)	۰	۱ (۱/۸)
سفوتاکسیم	۵۴(۹۸/۲)	۱(۱/۸)	۰
مروپنم	۵۳(۹۶/۴)	۰	۲ (۳/۶)
سیپروفلوکساسین	۵۲(۹۴/۵)	۰	۳(۵/۵)
ایمی پنم	۵۲(۹۴/۵)	۰	۳(۵/۵)
پیپراسیلین	۵۱(۹۳)	۲ (۳/۵)	۲ (۳/۵)
کوتریموکسازول	۴۸(۸۷)	۲ (۴)	۵ (۹)
آمیکاسین	۴۳(۷۸)	۶ (۱۱)	۶ (۱۱)
تتراسایکلین	۴۱(۷۴/۵)	۳ (۵/۵)	۱۱ (۲۰)
پیپراسیلین تازوباکتام	۳۹(۷۱)	۱۰(۱۸)	۶(۱۱)
جنتامایسین	۶۲(۳۴)	۲(۳/۶)	۱۹ (۳۴/۴)

بحث

مقاومت چند دارویی (MDR) یک فرم شایع از مقاومت کلینیکی می باشد و به عنوان توانایی زنده ماندن یک ارگانیسم ایجاد کننده بیماری در دزهای کشنده از داروهای مختلف یا مواد شیمیایی متنوع تعریف می شود که قادر هستند سلول های غیر مقاوم را نابود کنند (۹). *آسینتوباکتر بومانی* به دلیل توانایی بالا در کسب ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی و ایجاد سویه های مقاوم به چند دارو از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۱۱, ۱۲). مقاومت چند دارویی در *اسینتوباکتربومانی* علت اصلی شکست درمان عفونتهای بیمارستانی ناشی از آن به شمار می آید. نقشی که سیستم های افلاکس در مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های MDR ایفا میکنند موضوع مهمی است که در سالهای اخیر بطور وسیعی مورد بحث قرار گرفته است (۱۷). در این تحقیق از ۵۵ سویه ی *آسینتوباکتر بومانی* جداشده از نمونه های بالینی بیماران بستری در بخش های بیمارستان میلاد ۵۳، سویهMDR (۹۸) درصد گزارش شد. مقاومت آنتی بیوتیکی در نمونه های مورد مطالعه به ترتیب نسبت به

سفتازیدیم ۹۸/۲ درصد، سفوتاکسیم ۹۸/۲ درصد، مروپنم ۹۶/۴ درصد، سیپروفلوکساسین ۹۴/۵ درصد، ایمی پنم ۹۴/۵ درصد، پیپراسیلین ۹۳ درصد، کوتریموکسازول ۸۷ درصد، آمیکاسین ۹۰/۹ درصد، تتراسایکلین ۸/ ۷۵ درصد، پیپراسیلین تازوباکتام ۷۱ درصد، جنتامایسین ۸۴/۴ درصد گزارش شد. کای و همکاران در سال ۲۰۱۲ از مجموع ۱۷۶ ایزوله آسینتوباکتر ،۱۲۸ایزوله راMDR گزارش داده بودند که۹۰ درصد به ایمی پنم و ۹۵درصد به مروپنم مقاوم بوده اما تنها ۱۵ درصد نسبت به سیپروفلوکساسین مقاومت داشتند (۱۸). Karbasi و همکاران در سال ۲۰۱۲ در بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۵۰ایزوله آسینتوباکتر بومانی جدا شده از بخش های مراقبت های ویژه در شهر اصفهان نشان دادند که ۸۵٪ایزوله ها دارای مقاومت آنتی بیوتیکی چند گانه هستند (۱۹). Bayugo و همکارانش در سال ۲۰۰۲(۲۰) ، Joshi و همکارانش در سال ۲۰۰۳ (۲۱) نشان دادند مقاومت چندگانه ی آنتی بیوتیکی ایزوله های *آسینتوباکتر بومانی* در حال افزایش می باشد و میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها را ۴۵ درصد تا ۷۵ درصد گزارش نمودند و گزارش دادند ۷۰ درصد از ایزوله های *آسینتوباکتر بومانی* فنوتیپ MDR را نشان می دهند. مطالعه ای که توسط Bhatt و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی ایزوله های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بیماران سوختگی در هند انجام گرفت مقاومت به جنتاما یسین را ۸۴درصد، سفتازیدیم ۷۹ درصد ، توبراما یسین ۷۵ درصد، آمیکاسین ۷۳/۲ درصد، سیپروفلوکساسین ۷۱/۴ درصد، ایمی پنم ۶۱ درصد نشان داد (۲۲). Vahdani و همکاران در سال ۲۰۱۲ مقاومت ایزوله های *اسینتوباکتربومانی* نسبت به آنتی بیوتیک های مروپنم ۹۹ درصد، سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین، ۹۸ درصد گزارش دادند (۲۳). یکی از مکانیسم های مقاومت در باکتری ها حضور پمپ های تراوشی است. این گونه پمپ ها باعث دفع و تراوش طیف گسترده ای از مواد شامل آنتی بیوتیک ها، ترکیبات آنتی سپتیک، رنگ ها و دترژنت ها می گردند؛ بنابراین در ایجاد مقاومت چند دارویی نقش به سزایی دارند (۲۴). مطالعات نشان داده که پمپ های تراوشی منجر به افزایش MIC آنتی بیوتیک های افلوکساسین، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین در *اسینتوباکتر بومانی* می شود (۲۵). مطالعات زیادی بر روی افزایش در میزان MIC آنتی بیوتیک ها پس از وقوع بیان ژن ها ی پمپ های تراوشی برای کلاس های مختلف آنتی بیوتیک صورت گرفته است و بروز مقاومت چندگانه دارویی توسط این پمپ ها را در سویه های *اسینتوباکتر بومانی* به اثبات رسانده است (۲۶). در این تحقیق ممانعت گر CCCP جهت بررسی فعالیت فنوتیپی پمپ های تراوشی *آسینتوباکتر بومانی* مورد استفاده قرار گرفت. به طوریکه MIC آنتی بیوتیک های آمیکاسین و جنتامایسین در سویه های MDR مورد مطالعه یکبار قبل و یکبار پس از تاثیر ممانعت گر مورد مقایسه قرار گرفت. سویه هایی که پس از تاثیر ممانعت گر تا ۴ برابر کاهش داشتند دارای فعالیت قوی پمپ تراوشی برای خارج راندن آنتی بیوتیک مورد نظر بودند. در این مطالعه، مقدار MIC آنتی بیوتیک های انتخابی که بعنوان سوبستراهای پمپ تراوشی شناخته می شوند یعنی آمیکاسین و جنتامایسین بسیار بالا بود که ممکن است این امر بخاطر فعالیت پمپ تراوشی فعال در بین انها باشد. در سال ۲۰۱۰ Hornsey و همکاران نشان دادند افزایش MIC تایگی سایکلین، با افزایش بیان پمپ تراوشی *adeABC* مرتبط است (۲۷). طی مطالعه ای که توسط Nikasak درسال 2013 انجام شد، فعالیت پمپ تراوشی سویه های باکتری *A.baumannii* , MDR (AB07, AB62 AB10 و, AB2) و AB50 (سویه حساس) را با استفاده از ممانعت گر CCCPبا غلظت 30 µM و تعیین MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بررسی کردند و مشاهده کردند که در بین سویه های مقاوم کاهش MIC تا 16 برابر ولی در سویه حساس کاهشی مشاهده نشد (۲۸). Adabi و همکاران در تهران در سال ۲۰۱۵ دریافتند که، ۸ درصد ایزوله های *اسینتوباکتر بومانی* در حضور CCCP کاهش ۴ برابری MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین را نشان می دهند (۲۹). Ardebili و همکاران دریافتند که تمام سویه های آسینتوباکتر به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و MIC سیپروفلوکساسین سویه ها ۴ تا ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر یا بیشتر بود. علاوه بر این، آنها نشان دادند حساسیت سویه ها به سیپروفلوکساسین در حضور مهار کننده CCCP پمپ تراوشی افزایش یافته؛ به طوری که برای۸۶/۱٪ از سویه ها کاهش ۲ تا ۶۴ برابری MIC را نشان می دهد (۳۰). در مطالعه ای که توسط *Abdi* و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد، یک کاهش قابل ملاحظه در MIC سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک با استفاده از EPI(CCCP) نشان دادند. مشاهدات این مطالعه نیز حاکی از آن بود که

مقاومت دارویی در جدایه های بالینی MDR بواسطه پمپ افلاکس فعال انجام میشود که داروی تجمع یافته را به بیرون منتقل می نمایند (۳۱). طی مطالعه *MARTINS* سال ۲۰۱۱ که بر روی سویه های استاندارد باکتری های *Escherichia coli*، *Enterobacter aerogenes* و *Salmonella* صورت گرفت فعالیت پمپ افلاکس با استفاده از ممانعت گر های مختلفی مانند *thioridazine (TZ)* ، *chlorpromazine (CPZ)* و-*β phenylarginine (PAN)* *naphthylamid* همراه با بررسی تغییرات MIC آنتی بیوتیک های تتراساسیکلین و سیپروفلوکساسین تعیین شد و نتایج نشان داد که برای برخی سویه ها با استفاده از ممانعت گر، کاهش آنتی بیوتیک های مورد نظر تا 4 برابر وبیشتر مشاهده می شود که نشانه فعالیت پمپ افلاکس در این سویه ها است (۳۲).

جدول ۲ - اثر ممانعت گر CCCP بر آنتی بیوتیک های جنتامیسین و آمیکاسین در سویه های اسینتوباکتر بومانی.

میزان کاهش MIC	MIC جنتامیسین پس از تیمار با CCCP	MIC جنتامیسین قبل از تیمار با CCCP	تعداد ایزوله ها
-	۱۶	۱۶	۱
۴تا ۸برابر	۴-۸	۳۲	۴
-	۲۵۶	۲۵۶	۱
۲برابر	۲۵۶	۵۱۲	۱
۲-۲۵۶ برابر	۸-۱۰۲۴	۱۰۲۴	۴۰
میزان کاهش MIC	MIC آمیکاسین پس از تیمار با CCCP	MIC آمیکاسین قبل از تیمار با CCCP	تعداد ایزوله ها
-	۶۴	۶۴	۱
۲برابر	۶۴-۱۲۸	۱۲۸	۳
-	۲۵۶	۲۵۶	۵
۲تا ۴برابر	۱۲۸-۵۱۲	۵۱۲	۹
۲-۱۲۸برابر	۸-۱۰۲۴	۱۰۲۴	۳۲

نتیجه گیری کلی

به طور کلی در این تحقیق مقایسه MIC آنتی بیوتیک های آمیکاسین وجنتامایسین بین سویه های *آسینتوباکتر بومانی* دارای فعالیت قوی پمپ تراوشی قبل و بعد از استفاده از ممانعت گر CCCP نشان داد که این باکتری توانایی استفاده از پمپ های تراوشی برای خارج راندن آنتی بیوتیک های مذکور را دارد و در نتیجه کاهش قابل ملاحظه ای در برخی موارد در میزان MIC آنتی بیوتیک ها برای برخی سویه ها رخ داده تا حدی که در مواری منجر به حساس شدن سویه مقاوم به آن آنتی بیوتیک خاص شده است . به علاوه MIC سویه های *آسینتوباکتر بومانی* میزان مقاومت بالایی را به آنتی بیوتیک جنتامایسین نسبت به آمیکاسین نشان می دهد. در آمیکاسین تنها ۴ سویه کاهش ۴ برابری و بیشتر داشتند اما در جنتامایسین ۱۷ سویه کاهش ۴ برابری و بیشتر داشته است برای هر ۲ آنتی بیوتیک آمیکاسین و جنتامایسین در یک سویه پس از ممانعت گر کاهشMIC ۴ برابر و بیشتر داشته است و به عنوان سویه فعال پمپ افلاکس برای هر دو نوع آنتی بیوتیک آمینوگلیکوزیدی معرفی شد. مکانیسم های تراوشی که در میان باکتری ها به میزان بسیاری وجود دارند، نقش اساسی در تعیین مقادیر حساسیت و مقاومت به ترکیبات آنتی بیوتیکی مختلف دارند. بنابراین شناخت نحوه بیان و عملکرد پمپ های تراوشی چند دارویی در باکتری ها به ویژه *اسینتوباکتر بومانی* که امروزه مشکلات درمانی زیادی را به همراه دارد، به منظور طراحی راهکارهای نوین درمانی و درک نقش پمپ ها در تداوم و بقاء باکتری از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. از طرفی تعیین فعالیت ژنوتیپی پمپ های تراوشی از طریق تعیین میزان بیان ژنهای کد کننده پمپ های تراوشی در باکتری ها نیز باید مورد توجه قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

از همکاری جناب آقای امید حسینی کارشناس مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه شهید بهشتی که در انجام این تحقیق که پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین پیشوا است، تشکر و قدردانی می شود.

منابع مورد استفاده

1. Shields, R .K., Clancy, C. J., Gillis, L. M., Kwak, E. J., Silveira, F. P., Massih, R. C., et al, 2012. Epidemiology, clinical characteristics and outcomes of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections among solid organ transplant recipients. PLoS One 7(12): e52349.
2. Tan, S. Y., Chua, S. L., Liu, Y., Hoiby, N., Andersen, L. P., Givskov, M., et al. 2013. Comparative genomic analysis of rapid evolution of an extreme-drug-resistant Acinetobacter baumannii clone. Genome Biol *Evol.* 5(5): 807–18.
3. Opazo, A. C., Mella, S. M., Dominguez, M. Y., Bello, H. T., Gonzalez, G. R., 2009. Multi-drug efflux pumps and antibiotic resistance in Acinetobacter baumannii. Rev Chilena Infectol 26(6): 499–503.
4. Shahcheraghi, F., Abbasalipour, M., Feizabadi, M., Ebrahimipour, G., Akbari, N., 2011. Isolation and genetic characterization of metallo-beta-lactamase and carbapenamase producing strains of Acinetobacter baumannii from patients at Tehran hospitals. Iran J Microbiol 3(2):68–74.
5. Vahdani, P., Yaghoubi, T., Aminzadeh, Z., 2011. Hospital acquired antibiotic-resistant Acinetobacter baumannii infections in a 400-bed hospital in Tehran, Iran. Int J Prev Med 2(3):127–30.
6. Poirel, L., Menuteau, O., Agoli, N., Cattoen, C., Nordmann, P., 2003. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. J Clin Microbiol 41: 3542–7.
7. Huang, L. Y ., Chen, T. L., Lu, P. L., Tsai, C. A., Cho, W. L., Chang, F. Y., Fung, C. P., Siu, L. K ., 2008. Dissemination of multidrug-resistant class 1 integron-carrying *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. Clin Microbiol Infect 4:1010-1019
8. Song, W., Lee, K. M., Kang, H. J., Shin, D. H., Kim, D. K., 2001. Microbiological aspects of predominant bacteria isolated from the burn patients in Corea. Burns 27: 136-139.
9. Wang, C. H., Fang, C. C., Chen, N. C., Liu, S. S., Yu, P. H., Wu, T. Y., Chen, W.T., Lee, C. C., Chen, S. C., 2012. Cranberry-containing products for prevention of urinary tract infections in susceptible populations: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Arch Intern Med 172(13):988-996.
10. Akers, K., Chaney, C., Arsoumian, A., Eckius, M., Era, U., Uymon, C., Een, E. F., Robinson, M., Murray, C., 2010. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticu* Comple. Clin Microbioly 48(4): 1132-1138.
11. Bardwaj, A. K., Moanty, P., 2012. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: Rejuvinating the antimicrobial chemotherapy. Recent Patents on Anti- Infective Drug Discovery 7: 73-89.
12. Jessica, M. A. B., Laura, J. V. P., 2009. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram negative bacteria: an update. Current Opinion in Microbiology 12: 512-519.
13. Smith, C. W., Kaushansky, K., lichtman, M. A., Wiliams, S., 2016. Production, distribution and fate of neutrophils. Hematology. 9th ed. New York.
14. Vila, J., Martínez, J. L., 2008. Clinical impacts of the over-expression of efflux pump in nonfermentative Gram-negative bacilli, development of efflux pump inhibitors. Curr Drug Targets 9: 797-807.
15. Ni, W., Li, Y., Guan, J., Zhao, J., Cui, J., Wang, R., Liu, Y., 2016. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug-resistant gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 60: 3215-3218.
16. Yoon, E. J., Courvalin, P., Grillot-Courvalin, C., 2013. RND-type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of *Acineto-bacter baumannii*: Major role for AdeABC overexpression and AdeRS mutations. Antimicrob Agents Chemother 57: 2989-2995.
17. Bayug, S., Zeana, C., Sahni, J., Della-Latta, P., El-Sadr, W., Larson, E., 2002. Prevalence and antimicrobial patterns of Acinetobacter baumanii on hands and nares of hospital personnel and patients:the iceberg phenomena again. Heart Lung 31(5): 382-90.
18. Cai, Y., Chai, D., Wang, R., Liang, B., Bai, N., 2012. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 67 (7):1607- 15

19. Karbasizade, V., Heidari, L., 2012. Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter Baumannii* Isolated from Intensive Care Units of Isfahan Hospitals, Iran. Journal of Isfahan Medical School 30 (191): 759- 63.
20. Bayug, S., Zeana C, Sahni J, Della-Latta P, El-Sadr W, Larson, E., 2002. Prevalence and antimicrobial patterns of Acinetobacter baumanii on hands and nares of hospital personnel and patients:the iceberg phenomena again. Heart Lung 31(5): 382-90.
21. Joshi, S. G., Litake, G. M., Niphadkar, K. B., Ghole, V. S., 2003. Multidrug resistant Acinetobacter baumannii isolates from a teaching hospital. J Infect Chemother 9(2): 187-90.
22. Bhatt, P., Rathi, K. R., Hazra, S., Sharma, A., Shete, V., 2015 .Prevalence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in burn patients at a tertiary care centre. Indian J burns 23(1):56-59.
23. Vahdani, M., Azimi, L., Asghari, B., Bazmi, F., Rastegarlari, A., 2012. Phenotypic screening of extended spectrum ß-lactamase and metallo-ß-lactamase in multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa from infected burns. Ann Burns Fire Disasters 25: 78- 81.
24. Braun, G., Vidotto, M. C., 2004. Evaluation of adherence, hem-agglutination, and presence of genes codifying for virulence factors of Acinetobacter baumannii causing urinary tract infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 99(8): 839-44.
25. Nikasa, P., 2014. Antibiotic resistance of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in the presence of efflux pump inhibitor. Infect Dis Trop Med 42: 19-23.
26. Wang, H., Dzink-Fox, J. L., Chen, M. J., Levy, S. B., 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical Escherichia coli strains from China: role of acrR mutations. Antimicrob Agents Chemother 45(5): 1515–1521.
27. Horney, C. E., Cushing, L. A., Frempong-Manso, E., Seo, S. M., Jaravaza, T. A. A., Patel, D., Kosmidis, C. H., Susan, M. S., Glenn, W. K., 2010. Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 54(12): 5070-5073.
28. Nikasa, P., Abdi-Ali, A., Rahmani-Badi, A., Al-Hamad, A., 2013. In vitro evaluation of proton motive force-dependent efflux pumps among multidrug resistant Acinetobacter baumannii isolated from patients at Tehran hospitals. Jundishapur Journal of Microbiology 6(7): e6792.
29. Adabi, M., Talebi-Taher, M., Arbabi, L., A. F., 2015. Fathizadeh, S., Minaeian, S., et al., Overexpressing-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in Pseudomonas aeruginosa by using an efflux pump inhibitor. J Infect Chemother 47(2): 98-104.
30. Ardebili, A. M., Chevalier, J., Alibert-Franco, S., Ker, S., Jean-Marie, P., 2007. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. J Antimicrob Chemother 59: 1223 –1229.
31. Abdi-Ali, A., Mohammadi-Mehr, M., Agha Alaei, Y., 2006. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm producing Pseudomonas aeruginosa. Int J Antimicrob Agents 27: 196–200.
32. Martines, M., Matthew, P., McCuskera M., Viveiros, M., Coutoc, I., Fanning, F., Pagès, J. M., Amaralb, L., 2013. A simple method for assessment of MDR bacteria for over-expressed efflux pumps. The Open Microbiol J 7 (Suppl 1-M6): 72-82.