فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال سیزدهم، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۰ ص. ۴۶-۳۵

مقاله پژوهشی

بررسی فراوانی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی عفونت‌های *Acinetobacter spp.* در مراکز درمانی شهرکرد

توحید پیری قراقیه[۱]، عباس دوستی[۲،*]، سیدعباس میرزایی[۱،۳]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاداسلامي، شهرکرد، ایران.

[۲] دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

[۳] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، انستیتوی علوم پایه بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): biotechnology.97@yahoo.com

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۰

چکیده

گونه‌های *Acinetobacter* به طور فزاینده‌ای در حال تبدیل به جنس مقاوم به آنتی بیوتیک می‌باشند. دانش شیوع و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی *Acinetobacter spp.* مهم است. از این رو، مطالعه انجام شده به برآورد میزان شیوع و الگوی مقاومت ضد میکروبی ایزوله‌های *Acinetobacter spp.* از نمونه‌های مختلف بالینی پرداخته است. با نرم افزارهای بیوانفورماتیکی Primer Express و Gene Runner طراحی پرایمر برای جنس *Acinetobacter spp.* انجام شد. تایید صحت پرایمر توسط ابزار آنلاین BLASTn و برنامه Sequence Match انجام شد. ایزوله‌های *Acinetobacter* از نمونه‌های مختلف بالینی با روش‌های استاندارد بیوشیمیایی و تست PCR شناسایی شدند. آزمایشات حساسیت ضدمیکروبی و تشخیص بیوفیلم برای ایزوله‌های شناسایی شده به روش استاندارد دیسک‌دیفیوژن مطابق پروتکل CLSI و میکروتیترپلیت انجام شد. پرایمر طراحی شده *Acinetobacter spp* را با Query Cover و نمره Per. Ident برابر با ۱۰۰% شناسایی کرد. از ۶۰ نمونه بالینی، ۲۴۳ ایزوله باکتریایی به دست آمد. ۱۱۲ ایزوله (۴۶/۰۹ %) مربوط به باکتری‌های گرم منفی بود که ۴۳ ایزوله (۱۷/۶۹ %) به عنوان *Acinetobacter* ، شناسایی شد. مطابق آزمون PCR ۳۱ سویه (۷۷/۵ %) به عنوان *Acinetobacter baumannii*، ۷ سویه (۱۷/۵ %) به عنوان *Acinetobacter* **lwoffii** ، ۲ سویه (۵%) به عنوان *Acinetobacter* **junii** شناسایی شد. مطالعه حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که تمام سویه‌های جداشده MDR بوده و ۸۷/۵ % ایزوله‌ها XDR بودند. این در حالیست که تنها ۱۲/۵ % از ایزوله‌ها نسبت به کاربانپنم‌ها حساسیت نشان دادند که تماما مربوط به سویه هایی غیر از *Acinetobacter baumannii* بودند. تمام ایزوله‌های *Acinetobacter* بیوفیلم مثبت بوده و با میانگین کل ۰/۲۱۳ به عنوان بیوفیلم قوی شناخته شدند. با توجه به بررسی انجام شده مشخص می شود که آلودگی با باکتری *Acinetobacter* احتمالا در آینده می تواند منجر به چالش‌های مهم در سیستم درمانی کشور گردد. به این منظور یافتن راه حل هایی برای پیشگیری و جلوگیری از عفونت این جنس باکتریایی خصوصا *Acinetobacter baumannii* بسیار مهم و ضروری می باشد.

کلیدواژه‌ها: *Acinetobacter spp*، حساسیت آنتی بیوتیکی، طراحی پرایمر.

مقدمه

Acinetobacter یک باکتری گرم منفی در ارتباط با عفونت‌های کسب شده از بیمارستان می‌باشد، به خصوص عفونت‌هایی که در بخش مراقبت‌های ویژه یا ICU رخ می‌دهد؛ این عفونت‌ها شامل عفونت‌های باکتریائی از جمله باکتریمی، پنومونی، عفونت‌های مجاری ادراری، مننژیت و عفونت زخم می‌باشند [۱].

معمولا عفونت‌های جدی و شدید ناشی از *Acinetobacter spp.* با استفاده از ایمی پنم به عنوان داروی انتخابی مورد درمان قرار می‌گیرند [۲]. اهمیت بررسی شیوع و فراوانی این باکتری در مراکز درمانی و بیمارستانی به علت توانایی آن در ایجاد مقاومت چند دارویی (MDR)، عفونت‌های بیمارستانی، بقای طولانی مدت در انواع محیط‌های تر و خشک و همه گیری بالای آن است [۳]. یکی از بزرگترین چالش‌های قرن اخیر افزایش مداوم مقاومت چند دارویی اعضای این جنس می‌باشد، تا جایی که امروزه با پیدایش سویه‌های بسیار مقاوم Multidrug-Resistant (MDR) و Extensively-Drug Resistant (XDR) این باکتری، درمان عفونت‌های ناشی از آن با مشکل مواجه شده است [۴]. از طرفی *Acinetobacter spp.* ذاتا در برابر برخی از آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم است و توانایی به دست آوردن مقاومت در برابر همه عوامل ضد میکروبی موجود در بازار را دارد [۵]. در حال حاضر درمان‌های آنتی بیوتیکی علیه این باکتری پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و بتالاکتامازها می باشند. یکي از مشکلات موجود درمورد اسینتوباکترها ظهور سویه‌هایی با مقاومت چند دارویي است که به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکي مانند β-lactam، aminoglycoside وfluoroquinolone مقاومند [۶]. بتالاکتامازها آنزیم‌هایي هستند که حلقه بتالاکتام را باز کرده و آنتي‌بیوتیک را غیرفعال مي‌سازند [۷-۸]. طبق تقسیم‌بندی آمبلر، بتالاکتامازها براساس ساختار اولیه خود به ۴ دسته (A تا D) تقسیم می‌شوند. بتالاکتامازهای نوع A، C وD سرین بتالاکتاماز بوده و نوع B، متالوبتالاکتاماز است. فراواني انواع A و C بیشتر از دو نوع دیگر مي‌باشد. کلاس A باعث هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها مي‌شود. کلاس B متالوبتالاکتامازهای وابسته به روی (zn) مي باشد که قادر به هیدرولیز کارباپنم است. کلاس که از آنها مي‌توان به Ampc بتالاکتامازها اشاره نمود که توانايي هیدرولیز سفالوسپورین‌ها و سفومایسین‌ها را دارند. کلاس D بتالاکتامازهايي با قدرت هیدرولیز فراوان مثل OXA1 علیه کلوکسازین‌ها و اکساسیلین‌ها هستند [۹]. طی بررسی دوره ای که از سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۴ از منطقه Tshwane آفریقای جنوبی انجام شد، شیوع سویه‌های MDR این باکتری از میانگین ۵۵% در سال ۲۰۰۸ به ۸۵% در سال ۲۰۱۴ افزایش یافته بود [۱۰] . سویه‌های مقاوم به کارباپنم این باکتری تا سال ۲۰۱۴ تقریبا در تمام نقاط جهان با فراوانی ۳۰ تا ۵۰% گزارش شد [۱۱]. اخیرا در مطالعات متعدد افزایش شیوع انواع سویه‌های مقاوم و ژن‌های مقاومت این باکتری از شهرهای مختلف کشور ایران گزارش شده است [۱۲-۱۴].

Acinetobacter baumannii با توانایی بقای طولانی مدت در محیط‌های مرطوب و حتی خشک علاوه بر این که احتمال بروز بیماری‌های مرتبط عفونی را در افراد افزایش می‌دهد، شانس دریافت مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی مختلف را نیز دارد [۱۵].

علاوه بر این توانایی ایجاد همه‌گیری و متعاقبا عفونت‌های بیمارستانی در این باکتری به علت توانایی‌های منحصر به فرد آن می‌باشد [۱۶]. سویه‌های *Acinetobacter baumannii* ظرفیت ویران‌کننده‌ای برای مقاومت و گردش و انتقال در فضای بیمارستان دارند. دلیل این امر توانایی زیاد آنها در تشکیل بیوفیلم روی سطوح زنده و غیر زنده می‌باشد [۱۶]. *Acinetobacter baumannii* توانایی تشکیل بیوفیلم روی سطوح مختلف از جمله تجهیزات پزشکی و انواع دستگاه‌های در ارتباط با پزشکی از جمله کتترهای وریدی و همچنین کتترهای ادراری و لوله تراشه‌های مورد استفاده در گلو را دارند [۱۷]. از طرفی محیط بیمارستان به عنوان منبعی حیاتی برای این باکتری

عمل نموده و در بسیاری از مطالعات مشاهده شده است که آلودگی محیط، منبع اپیدمی‌های ناگهانی حاصل از این باکتری بوده است [۱۸].

از این رو بررسی منابع احتمالی این باکتری، میزان شیوع در مراکز درمانی و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *Acinetobacter spp.* حایز اهمیت است. هدف از این مطالعه، بررسی میزان شیوع و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جدا شده *Acinetobacter spp.* از مراکز درمانی شهرکرد می باشد.

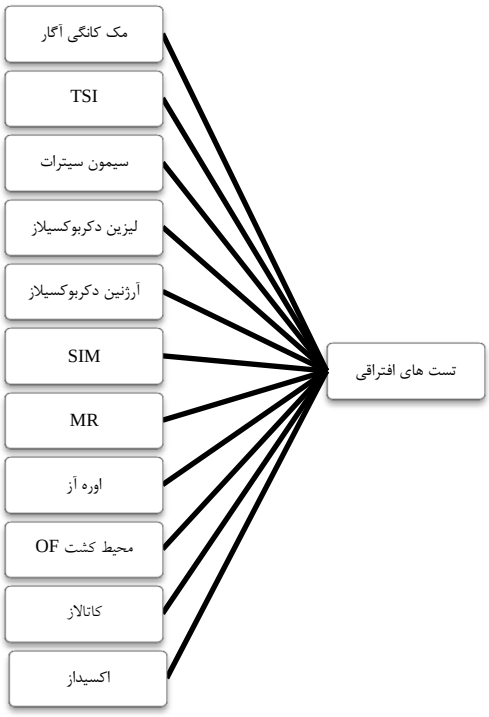
مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

در این مطالعه از تیر تا شهریور ماه ۱۳۹۹ به مدت ۳ ماه ۶۰ نمونه از بخش‌های مختلف بیمارستان‌های امام علی، آیت اله کاشانی و بیمارستان خصوصی پارسیان شهرکرد جمع آوری شد. تمامی نمونه‌ها پس از انتقال با زنجیره سرد به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد برای تعیین هویت باکتریایی مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های مورد بررسی شامل نمونه‌های جمع آوری شده از خون، ادرار، زخم، تراشه و نمونه‌های تنفسی از بیماران سپتی سمی، عفونت‌های زخم و پوست، مننژیت، پنومونی و باکتریمی بودند.

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی باکتری

کلیه نمونه‌ها روی محیط کشت نوترینت‌آگار در داخل پلیت کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گشت. به منظور تهیه کلونی منفرد کشت چهارمرحله ای انجام شد. سپس از لحاظ توانایی رشد روی محیط مک کانکی مورد بررسی قرارگرفتند. باکتری‌های گرم منفی و لاکتوز منفی رشد یافته روی محیط مک کانگی جهت بررسی بیشتر انتخاب گردیده و از لحاظ تولید پیگمان و ایجاد همولیز روی محیط بلاد آگار، مورد بررسی قرار گرفتند. از کلونی‌های منفرد جداسازی شده روی لام، گسترش تهیه شده و لام‌ها به روش گرم، رنگ آمیزی گردید. سپس جهت جداسازی *Acinetobacter spp.* تمام باکتری‌های جداسازی شده با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱). سویه *Pseudomonas aeroginosa ATCC 10145* به عنوان کنترل مثبت تست اکسیداز و حرکت در نظر گرفته شد.



شکل ۱. تست‌های افتراقی انجام شده جهت جداسازی *Acinetobacter spp.*

شناسایی مولکولی جنس *Acinetobacter spp.*

الف) طراحی پرایمر

به منظور تشخیص مولکولی و تایید باکتری‌های جداسازی شده، آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *16SrRNA* طراحی شده برای جنس *Acinetobacter spp.* انجام شد. برای این منظور با استفاده از پایگاه GenBank (مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی؛ http://www.ncbi.nlm.nih.gov)، توالی‌های تایید شده انواع گونه‌های شناخته شده و طبقه بندی شده *Acinetobacter spp.* جمع‌آوری شد. در این مطالعه از ژن RNA polymerase β-subunit استفاده شد که در اکثر باکتری‌ها ثابت می باشد و طبق مطالعات پیشین برای شناسایی انواع جنس‌های باکتریایی مثل *Streptococcus*، *Staphylococcus* و *Salmonella* بکار رفته است [۲۳و۲۴]. طراحی پرایمرهای این پژوهش با نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی Primer Express (www.fishersci.se) و Gene Runner انجام شد. تایید صحت پرایمرهای انتخاب شده با استفاده از ابزار آنلاین BLASTn (GenBank, NCBI, USA) و برنامه Sequence Match از پایگاه داده Ribosomal Database Project (RDP II, USA) (RDP; http://rdp.cme.msu.edu/) انجام شد. سپس پرایمر طراحی شده توسط شرکت سیناکلون (ایران) سنتز شد.

ب) استخراج DNA از نمونه‌ها

استخراج DNA از هر نمونه مطابق با پروتکل کیت استخراج DNA (سیناکلون، ایران) انجام شد. به این ترتیب که مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری را با ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط پروتئاز و پروتئاز بافر میکس کرده و به مدت ۲ ساعت در هیتربلاک در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول Lysis به آن اضافه کرده و پس از ۱۵ ثانیه ورتکس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رسوب گذاری اضافه شد. نمونه ها، ۱ ساعت در درمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. مقدار ۷۰۰ میکرولیتر محلول شستشو اضافه شده و بلافاصله در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت را دور ریخته و مقدار ۶۰ میکرولیتر آب تزریق به رسوب حاصل (پس از خشک شدن) اضافه شده و به مدت ۲ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به عنوان منبع DNA استفاده گردید. جذب نوری DNA استخراج شده جهت تعیین کیفیت، توسط دستگاه نانودراپ thermo مدل **NanoDrop One C (آمریکا)** خوانده شد.

ج) واکنش زنجیره‌ی پلیمراز (PCR)

به منظور بررسی جنس *Acinetobacter spp.* از تکثیر ژن *16SrRNA* به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم نهایی ۲۵μL استفاده شد. برنامه PCR به صورت دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه به شکل دناتوراسیون اولیه سیکل به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد، بسط و گسترش به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. از سویه *Acinetobacter ATCC19606* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

پس از تهیه کشت خالص از ایزوله‌های جنس *Acinetobacter spp.*، سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک فارلند، تهیه شده و روی دو محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. تست حساسیت آنتی بیوتیکی به روش استاندارد دیسک دیفیوژن مطابق پروتکل CLSI[1] و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی جنتامایسین (GM, 10 μg)، ایمی‌پنم (IMI, 10 μg)، مروپنم (MEN, 10μg)، اریترومایسین (E, 15 μg)، پیپراسیلین-تازوباکتام (PTZ, 100/10 μg)، آمیکاسین (AN, 30 μg)، تریمتوپریم- سولفامتوکسازول (SXT, 1.25/23.75 μg)، آمپی‌سیلین -سولباکتام (SAM, 10/10 μg)، کانامایسین (K, 30 μg)،

[1] Clinical and Laboratory Standard Institute

سفتازیدیم (CAZ, 30 µg) و کلیستین (CL, 10 µg) (MAST, England) انجام شد. نتایج تست آنتی‌بیوگرام برای هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌صورت حساس (Susceptible) و مقاوم(Resistant) گزارش شد.

بررسی سیستم مقاومت بیوفیلمی

توانایی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های مورد بررسی با روش میکروتیتر پلیت انجام شد. در این روش پس از کشت باکتری میزان ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک‌های پلی استایرن استریل۹۶ خانه اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس محتویات چاهک ها خالی شده و پس از شستشو با محلول بافر فسفات سالین (PBS)، رنگ آمیزی با استفاده از کریستال ویوله ۱% به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۳% به هر چاهک اضافه و جذب نوری آن توسط دستگاه الایزا ریدر Stat Fax2100 (Awareness Technology, Ukraine) در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شد. برای بررسی نتایج از روش Optical density cut-off (ODc) استفاده شد. به منظور بررسی ابتدا انحراف معیار و میانگین OD چاهک‌های کنترل منفی را محاسبه نموده و سپس طبق فرمول زیر محاسبه انجام شد.

ODc= میانگین OD چاهک‌های کنترل منفی + (3 × انحراف معیار چاهک‌های کنترل منفی)

نتایج تولید بیوفیلم به صورت قوی، متوسط، ضعیف و بیوفیلم منفی گزارش شد (جدول ۱).

جدول ۱. طبقه بندی باکتری‌ها بر اساس قدرت تشکیل بیوفیلم

Results	Biofilm Class
بیوفیلم قوی	$OD > 4\times ODc$
بیوفیلم متوسط	$2\times ODc < OD \leq 4\times ODc$
بیوفیلم ضعیف	$ODc < OD \leq 2\times ODc$
بیوفیلم منفی	$OD \leq ODc$

نتایج

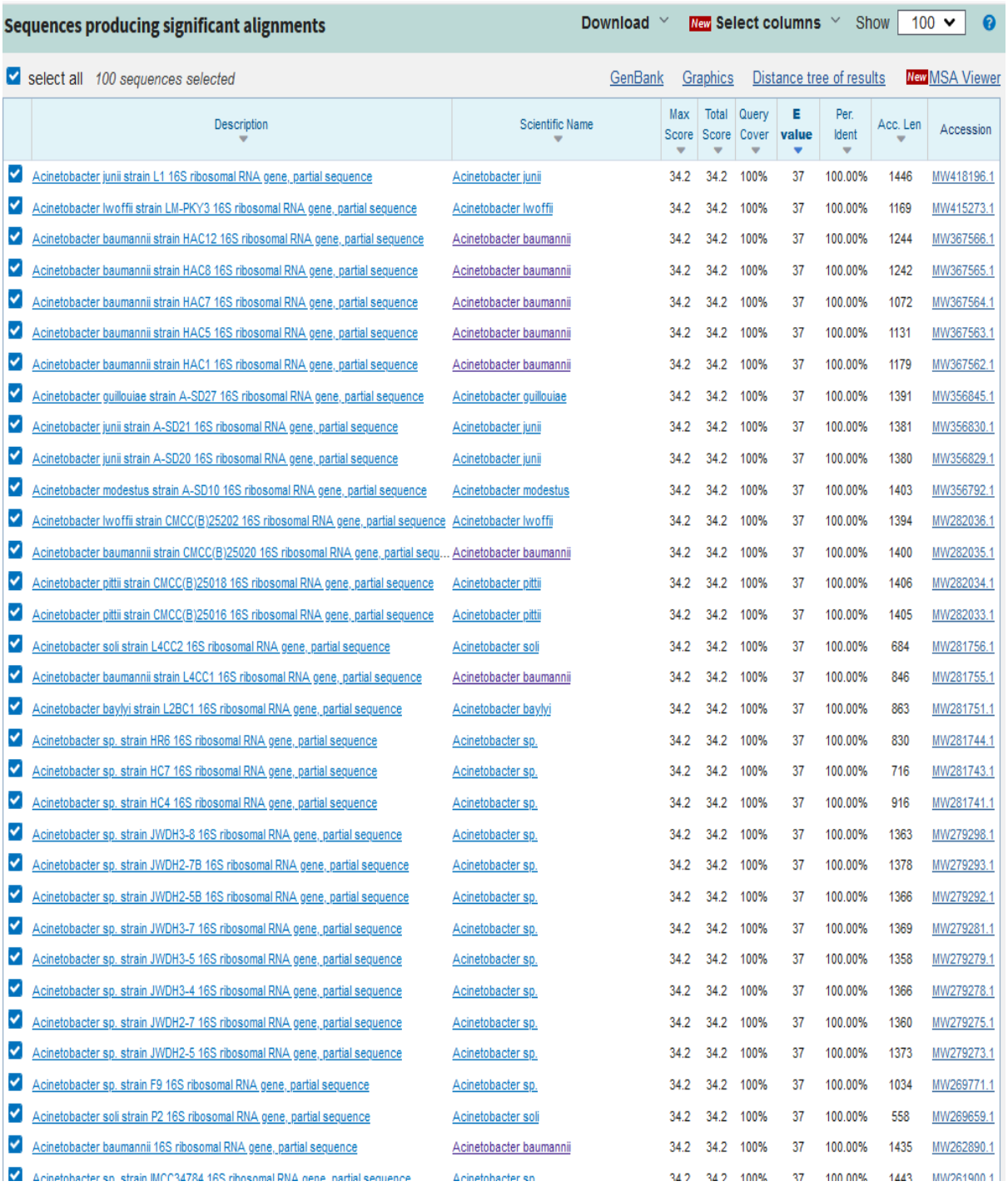
بعد از جمع‌آوری نمونه‌ها (۶۰ نمونه بالینی)، ۲۴۳ ایزوله باکتریایی از تمام بخش‌های بیمارستان به دست آمد. ۱۳۱ ایزوله (۵۳/۹ %) مربوط به باکتری‌های گرم مثبت بودند که با توجه به هدف پژوهش از ادامه بررسی کنار گذاشته شدند. ۱۱۲ ایزوله جداسازی شده (۴۶/۰۹ %) مربوط به باکتری‌های گرم منفی بود. سپس جهت جداسازی *Acinetobacter spp.*، نمونه‌های گرم منفی روی محیط مک‌کانکی آگار کشت داده شدند. *Acinetobacter* باکتری‌های گرم منفی هستند که قادر به تخمیر نمی باشند؛ در نتیجه کلنی‌های بی‌رنگی روی محیط کشت ایجاد می‌کنند؛ بطوریکه تقریبا کلنی‌ها هم‌رنگ محیط می‌باشند. بعد از کشت کلونی خالص بر روی محیط کشت مک‌کانکی آگار و انکوباسیون ۲۴ ساعته، کلونی‌های بیرنگ روی محیط کشت مشاهده شد. مطابق جدول ۲ غربالگری سویه‌های گرم منفی انجام شد که در نهایت ۴۳ ایزوله (۱۷/۶۹ %) *Acinetobacter spp.* که باسیل گرم منفی غیر تخمیرکننده بود، شناسایی شد.

همانطور که قبلا اشاره شد، با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی Primer Express (www.fishersci.se) و Gene Runner، طراحی پرایمر برای این پژوهش انجام شد. مطابق با نتایج پرایمرهای جلوبر Ac260f (5’ TTT AAG CGA GGA GGA GG 3’) و پرایمر برگشتی Ac540r (5’ ATT CTA CCA TCC TCT CCC 3’) به عنوان پرایمر اختصاصی جنس *Acinetobacter spp.* شناسایی شد. پرایمرهای طراحی شده ابتدا توسط ابزار BLASTn بررسی شد و مطابق با نتایج شکل ۲ تعداد ۱۰۰ ایزوله مختلف *Acinetobacter* با Query Cover برابر با ۱۰۰% و نمره Per. Ident برابر با ۱۰۰% شناسایی شدند که نشان دهنده اختصاصیت بالای توالی‌های پرایمر طراحی شده برای جنس *Acinetobacter spp.* می باشد.

همچنین مطابق با شکل ۳، نتایج برنامه Sequence Match از پایگاه داده Ribosomal Database Project نشان دهنده اختصاصیت ۱۰۰ درصدی پرایمر جلوبر و برگشتی طراحی شده برای جنس *Acinetobacter spp.* می‌باشد. در این بررسی انواعی از گونه‌های مختلف جنس *Acinetobacter spp.* توسط پرایمرهای طراحی شده شناسایی شد.

جدول ۲: نتایج تست‌های بیوشیمیایی تشخیصی *Acinetobacter spp.*

محیط‌ها / نمونه	مک کانکی	TSI	SIM (INDOL)	سیمون سیترات	اوره	لیزین دکربوکسیلاز	آرژنین دکربوکسیلاز	اکسیداز	کاتالاز	MR	OF
ATCC19606	+	K/K	-	+	-	+	+	-	+	-	+
A1-A43	+	K/K	-	+	-	+	+	-	+	-	+



شکل ۲. نتایج BLASTn پرایمرهای طراحی شده برای جنس *Acinetobacter spp.*

در بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها مشخص شد که تمام ایزوله‌های مورد نظر *Acinetobacter spp.* حداقل به سه کلاس آنتی بیوتیکی مقاوم بوده و MDR در نظر گرفته شدند. علاوه بر آن از مجموع ۴۰ ایزوله تنها ۵ ایزوله نسبت به کاربانپم‌ها (ایمی پنم و مروپنم) دارای حساسیت بودند. بنابراین ۳۵ ایزوله باقی مانده (۸۷/۵%) به عنوان سویه های XDR در نظر گرفته شدند (جدول ۳). جهت بررسی توانایی تشکیل و قدرت بیوفیلم در سویه‌های جدا شده، تست میکروتیتر پلیت انجام شد. میانگین OD چاهک های کنترل (ODC) برابر با 0.036 محاسبه شد. سپس برای محاسبه قدرت بیوفیلم داده ها در فرمول جدول ۱ جاگذاری شد.

$$ODC = 0.006 + (3 \times 2) = 0.036$$

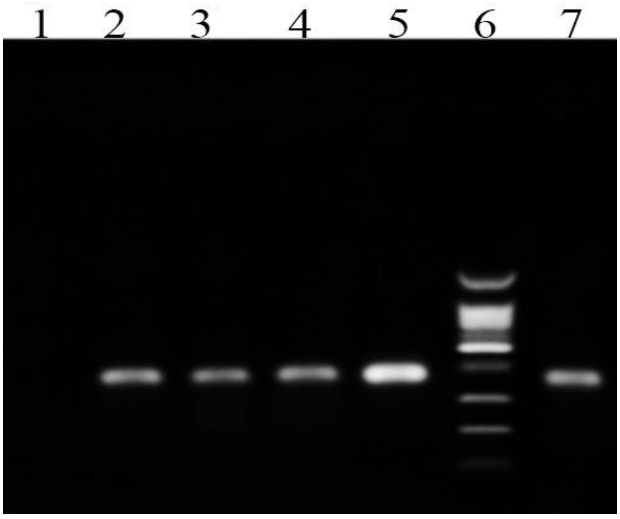
$$OD > 4 \times ODc \rightarrow \quad OD > 0.144$$

با توجه به نتایج تمام سویه‌های جداسازی شده با جذب نوری بالاتر از ۰/۱۴۴ به عنوان بیوفیلم قوی شناسایی شدند.

rootrank Root (0/20/1558788) (selected/match/total RDP sequences)
domain Bacteria (0/20/1502570)
phylum Proteobacteria (0/20/429685)
class Gammaproteobacteria (0/20/209322)
order Pseudomonadales (0/20/59843)
family Moraxellaceae (0/20/26555)
genus Acinetobacter (0/20/13583)

S000000351	not_calculated	1.000	1384	Acinetobacter calcoaceticus; DSM 1139; X81657
S000001137	not_calculated	1.000	1357	Acinetobacter johnsonii; DSM 6963; X81663
S000001872	not_calculated	1.000	1374	Acinetobacter baumannii; DSM 30008; X81667
S000002617	not_calculated	1.000	1294	Acinetobacter sp.; LY1; AJ007008
S000002678	not_calculated	1.000	1361	Acinetobacter radioresistens (T); DSM 6976; X81666
S000003452	not_calculated	1.000	1366	Acinetobacter lwoffii (T); DSM 2403; X81665
S000005818	not_calculated	1.000	1336	Acinetobacter sp.; AC-40; X86572
S000008403	not_calculated	1.000	1357	Acinetobacter calcoaceticus; X80285
S000008827	not_calculated	1.000	1364	Acinetobacter haemolyticus (T); DSM 6962; X81662
S000010335	not_calculated	1.000	1306	Acinetobacter johnsonii; Ben 56; X95303
S000010336	not_calculated	1.000	1371	Acinetobacter junii (T); DSM 6964; X81664
S000010762	not_calculated	1.000	1374	Acinetobacter guillouiae (T); DSM 590; X81659
S000011143	not_calculated	1.000	1275	uncultured eubacterium; 5-20; AJ222834
S000011544	not_calculated	1.000	1342	Acinetobacter sp.; Ben 59; X95305
S000012980	not_calculated	1.000	1374	Acinetobacter baumannii (T); DSM 30007; X81660
S000013021	not_calculated	1.000	1410	Acinetobacter calcoaceticus; A2; AF159045
S000014585	not_calculated	1.000	1371	Acinetobacter junii; DSM 1532; X81658
S000014698	not_calculated	1.000	1438	unidentified bacterium; T17; Z93992
S000014926	not_calculated	1.000	1349	Acinetobacter johnsonii; X89775
S000015221	not_calculated	1.000	1387	Acinetobacter calcoaceticus; DSM 30006; X81661

شکل ۳. نتایج بررسی اختصاصیت پرایمر طراحی شده برای جنس *Acinetobacter spp.* توسط برنامه Sequence Match



شکل ۴. نتایج آزمون PCR برای شناسایی جنس *Acinetobacter spp.*

۱: نمونه کنترل منفی ۲: کنترل مثبت (*Acinetobacter ATCC19606*) ۳، ۴، ۵ و ۷: نمونه‌های *Acinetobacter* ۶: DNA Ladder 100bp

جدول ۳. غربالگری و تعیین الگوی حساسیت جنس .*Acinetobacter spp* به آنتی بیوتیک ها

باکتری (تعداد ایزوله کلی شناسایی شده)	منبع جداسازی	فراوانی	تونایی تشکیل بیوفیلم		آنتی بیوگرام		
			بیوفیلم	قدرت بیوفیلم (میانگین OD)	حساس	مقاوم	فنوتیپ
Acinetobacter baumannii (۳۱) % ۷۷/۵	سپتی سمی	۱۸ (۵۸/۰۶ %)	+	قوی (۰/۳۲۸)	CL, SAM, SXT	GM, IMI, MEN, E, PTZ, AN, K, CAZ	MDR, XDR
	عفونت زخم و پوست	۷ (۲۲/۵۸ %)	+	قوی (۰/۲۴۷)	CL, PTZ, CAZ, AN, SXT	GM, IMI, MEN, E, SAM, K	MDR, XDR
	ادرار	۴ (۱۲/۹ %)	+	قوی (۰/۱۷۳)	CL, PTZ	GM, IMI, MEN, E, AN, SXT, SAM, K, CAZ	MDR, XDR
	دهان و دماغ	۲ (۶/۴۵ %)	+	قوی (۰/۲۳۴)	CL, PTZ CAZ, K, SXT, SAM	GM, IMI, MEN, E, PTZ, AN	MDR, XDR
Acinetobacter **lwoffii** (۷) % ۱۷/۵	ادرار	۳ (۴۲/۸ %)	+	قوی (۰/۲۱۵)	IMI, MEN, CL, SXT, CAZ	AN, E, PTZ, GM, SAM, K	MDR
	دهان و دماغ	۲ (۲۸/۵۷ %)	+	قوی (۰/۱۸۳)	CL, SXT, AN, K, CAZ	MI, MEN, E, PTZ, SAM	MDR, XDR
	سپتی سمی	۱ (۱۴/۲ %)	+	قوی (۰/۱۲۳)	CL, GM, SXT, CAZ	IMI, MEN, E, PTZ, AN, SAM, K	MDR, XDR
	عفونت زخم و پوست	۱ (۱۴/۲ %)	+	قوی (۰/۲۰۴)	CL, IMI, MEN, K, CAZ, AN, E	GM, PTZ, SXT, SAM	MDR
Acinetobacter **junii** (۲) %۵	عفونت زخم و پوست	۱ (۵۰ %)	+	قوی (۰/۱۸۳)	CL, SXT, AN, K, CAZ	MI, MEN, E, PTZ, SAM	MDR, XDR
	ادرار	۱ (۵۰ %)	+	قوی (۰/۱۲۳)	CL, CAZ	GM, PTZ, SXT, SAM	MDR
	دهان و دماغ	۰ (۰)	---	---	---	---	---

میانگین کل قدرت بیوفیلم ایزوله ها= ۰/۲۱۳ (قوی) MDR = مقاوم به حداقل ۳ آنتی بیوتیک XDR= مقاوم به کاربا‌پنم ها

بحث و نتیجه گیری

عفونت‌های ناشی از اعضای جنس *Acinetobacter spp.* به یکی از مشکلات عمده مراکز درمانی تبدیل شده است [۱۹]. سالانه شیوع‌های ناگهانی متعددی ناشی از این باکتری، از بیمارستان‌های سراسر جهان گزارش می گردد که نشان دهنده اهمیت این باکتری و نیاز به یک برنامه ریزی مناسب جهت جلوگیری از ایجاد عفونت به ویژه توسط سویه‌های مقاوم می‌باشد [۲۰]. امروزه مقاومت چند دارویی به علت استفاده بی‌رویه از داروهای ضد میکروبی گسترش فراوانی یافته است. در حال حاضر انتشار پاتوژن‌های مقاوم به چند دارو در محیط‌های بیمارستانی بسیار گسترده و میزان آن در بسیاری از کشورها در حال افزایش می باشد که این مساله یک تهدید جهانی جدی به شمار می رود. در میان این پاتوژن‌ها، *Acinetobacter baumannii* باکتری است که تقریبا در همه جا می‌تواند حضور داشته باشد. این کوکوباسیل غیر تخمیرکننده بعنوان یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی بخصوص در بخش مراقبت ویژه (ICU) مشاهده می شود [۲۱].

بیماران بستری به مدت طولانی در بخش‌های ICU دارای میزان بالایی از عفونت بخصوص عفونت‌های استافیلوکوکی، *Acinetobacter*، سودوموناسی و کاندیدایی می باشند. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۲۱، میزان ۶۳% از بیمارانی که در بیمارستان بستری بودند دچار عفونت بیمارستانی شدند. میزان ۶۴% این عفونت‌ها مربوط به ناحیه تنفسی بود که پس از ایزولاسیون باکتری‌ها مشخص گردید ۳۴/۷% باکتری *Escherichia spp* و ۱۰/۵% آنها *Acinetobacter spp.* بودند [۲۲].

در مطالعه ای دیگری که در اسپانیا انجام شد [۲۳]، مشخص گردید که ۳۵ مورد (۱۹/۴ درصد) از بیماران بستری در بیمارستان دچار عفونت ناشی از *Acinetobacter* شده‌اند که ۱۴/۱۴ % مرد و ۲۲/۸۶% زن بودند. از این بین، ۱۵/۳۵ (۴۲/۸۶٪) مورد از ترشحات

نای، ۵/۵ مورد (۱۴/۲۹٪) از زخم و ۲/۳۵ مورد (۵/۷۱٪) دارای عفونت مجاری ادراری بودند [۲۳].

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۱ روی فراوانی عفونت ناشی از *Acinetobacter* انجام گرفت [۲۴]، گزارش گردید که این عفونت اغلب در بیمارانی که بوسیله دستگاه تنفسی لوله گذاری شدند، شایع می‌باشد و شیوع پنومونی ناشی از *Acinetobacter* در این بیماران، ۱۴۲ نفر (۴۴٪) در دستگاه تنفسی و ۱۰۵ نفر (۳۳٪) بافت نرم گزارش گردید [۲۴].

آلودگی بالای محیط بیمارستان نقش بسیار مهمی را در ایجاد اپیدمی های بیمارستانی ایفا می نماید چرا که در بررسی هایی که بر روی ایزوله های کلینیکی انجام شده است، همگی آنها توانایی زیادی در بقای طولانی مدت داشته اند (۱۲). در مطالعات متنوعی که در این زمینه صورت گرفته است، *Acinetobacter* توانسته است به مدت ۱۶ هفته در سطوح خشک محیطی زنده باقی بماند و ۹ روز بعد از ترخیص یک بیمار مبتلا به عفونت با این باکتری، از تخت آن جداسازی گردد که عامل شیوع ناگهانی در آن بیمارستان نیز بوده است. تمامی سطوح مانند سرامیک، استیل،لاستیک، چرخ و کناره‌های تخت، ونتیلاتور، سینک، دسته در و... همگی به عنوان مکان های کلونیزاسیون باکتری مطرح می‌باشند [۱۷،۱۸،۲۵]. در مطالعه حاضر، از بین ۲۴۳ ایزوله باکتریایی، ۴۰ ایزوله *Acinetobacter* جداسازی گردید. میزان فراوانی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی بیشتر بوده به طوری که ۵۳/۹ % ایزوله‌ها را به خود اختصاص دادند. از میان ۱۱۲ ایزوله گرم منفی ۳۵/۷۱% ایزوله‌ها متعلق به جنس *Acinetobacter spp.* و مابقی مربوط به سایر باکتری های انتروباکتریاسه بود.

در این مطالعه مشاهده شد که در میان بخش‌های مختلف بیمارستان ها، عفونت مربوط به آلودگی با باکتری *Acinetobacter* با فراوانی ۱۷/۶۹ % بود. از طرفی، در میان عفونت های مربوط به *Acinetobacter spp.*، جنس *Acinetobacter baumannii* با فراوانی ۷۷/۵% بیشترین درصد پراکندگی در محیط بیمارستان را به خود اختصاص داد و پس از آن *Acinetobacter* lwoffii و junii *Acinetobacter* به ترتیب ۱۷/۵% و ۵% از آلودگی های محیط بیمارستان را به خود اختصاص دادند. این نتایج نشان می‌دهد که *Acinetobacter baumannii* به عنوان پاتوژن اصلی و خطرناک بیمارستانی در اکثر عفونت‌های بیمارستانی دخیل می‌باشد. همچنین در این مطالعه، پراکندگی جنس *Acinetobacter spp.* در عفونت‌های مختلف شامل سپتی‌سمی، عفونت‌های زخم، پوست و عفونت‌های ادراری متغیر بود؛ که این امر مرتبط با قدرت سازگاری بالای این باکتری با شرایط محیطی مختلف می‌باشد. از این رو، بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در این ایزوله‌ها نشان داد که تمام ایزوله‌های *Acinetobacter spp.* بیوفیلم مثبت بوده و با میانگین کل ۰/۲۱۳ به عنوان بیوفیلم قوی شناخته شدند؛ که تاثیر مستقیمی در افزایش مدت ماندگاری ایزوله های باکتریایی دارد. البته مدت بقای باکتری بستگی به منبع سویه نیز دارد.

مطابق با نتایج حاصل از این مطالعه ۱۰۰% از سویه‌های *Acinetobacter* lwoffii بیوفیلم مثبت بودند که ۸۵/۸ % (۶سویه) از آنها سویه های MDR و XDR بودند؛ این در حالیست ۵۰% سویه‌های junii *Acinetobacter* مربوط به MDR و XDR بودند. این مقدار برای سویه های *Acinetobacter baumannii* برابر با ۱۰۰% بیوفیلم مثبت بود که از این بین ۱۰۰% سویه ها مربوط به واریانت‌های با فنوتیپ MDR و XDR بودند. این نتایج حاکی از شیوع گسترده فنوتیپ های MDR و XDR در جنس *Acinetobacter spp.* می باشد. نتایج ما با نتایج مطالعه‌ای که توسط Velma Rebic و همکاران (۲۰۱۸) روی عفونت بیمارستانی انجام شد، مشابهت داشت [۲۵]. در مطالعه Rebic نیز بیشترین فراوانی مربوطه به ایزوله باکتریایی *Acinetobacter* با فراوانی (۸۴/۸ %) بود. از طرفی نتایج مطالعه ما همسو با گروه Rebic نشان داد که *Acinetobacter baumannii* به عنوان مهمترین عامل بیماری‌زای این جنس در محیط بیمارستان می باشد [۲۵].

مطالعه خالدی و همکاران [۲۶] نشان داد که الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی *Acinetobacter baumannii* دارای فنوتیپ MDR و XDR است. براساس آنتی بیوگرام صورت گرفته از بین ۵۰ ایزوله اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بستری در ICU، ۶۴%، ۲۴% و ۱۲% ایزوله ها به ترتیب دارای مقاومت به چند دارو(MDR) ، غیر مقاوم به چند دارو و مقاومت بسیار گسترده به چند دارو (XDR) بودند و بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به سفتریاکسون، تیکارسیلین، اریترومایسین و همچنین کمترین میزان مقاومت نسبت به مینوسایکلین بود [۲۶].

همچنین در مطالعه احمدی و همکاران [۲۷] ، سویه‌هاي اسینتوباکتر از ۲۴ نمونه ي بیوپسی، ۳۱ نمونه زخم و ۶ نمونه خون ایزوله شدند. نتایج تست حساسیت آنتي بیوتیکي نمونه‌ها نشان داد که بیشترین حساسیت نسبت به آنتي بیوتیک کلیستین بوده (۶۰/۵ %) و ۳۳ مورد (۷۶/۸ %) از سویه هاي ایزوله شده، به آنتي بیوتیک ایمي پنم مقاوم بودند[۲۷].

مطالعه حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *Acinetobacter spp.* نشان دهنده وجود مقاومت بالا در این باکتری نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد [۲۸-۳۰] ؛ به گونه ای که تمام سویه‌های جداشده MDR بوده و ۸۷/۵ % ایزوله‌ها XDR بودند و نسبت به آخرین سد دفاعی آنتی‌بیوتیکی یعنی کاربا‌پنم‌ها مقام بودند. این در حالیست که تنها ۱۲/۵ % از ایزوله‌ها نسبت به کاربا‌پنم‌ها حساسیت نشان دادند که تماما مربوط به سویه‌هایی غیر از *Acinetobacter baumannii* بودند. این نتایج نشان دهنده ظهور باکتری مقاومی به نام *Acinetobacter baumannii* می‌باشد. با این حال، تمامی سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک کلیستین حساسیت نشان دادند که به نوعی به عنوان آخرین و تنها راهکار فعلی مبارزه با عفونت‌های شدید این جنس باکتریایی می‌باشد.

با توجه به مطالعات و بررسی انجام شده در این زمینه مشخص می‌شود که آلودگی با باکتری *Acinetobacter spp.* یکی از موارد مهم در آلودگی بیمارستان‌ها به شمار می‌رود. احتمالا در آینده می‌تواند منجر به چالش‌های مهم در سیستم درمانی کشور گردد. به این منظور یافتن راه‌حل‌هایی برای پیشگیری و جلوگیری از عفونت این جنس باکتریایی خصوصا *Acinetobacter baumannii* بسیار مهم و ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری‌های پرسنل مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به خصوص خانم فرانک عالی، در حمایت‌های لازم از این تحقیق قدردانی می گردد.

References

[1] Almasaudi SB. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi journal of biological sciences. 2018; 25(3): 586-96.

[2] Viehman JA, Nguyen MH, Doi Y. Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii infections. Drugs. 2014; 74(12):1315-33.

[3] Piri Gharaghie T, Sadat Shandiz SA, Beiranvand S. Evaluation of silver nanoparticles effects on bla-per1 gene expression for biofilm formation in isolates of antibiotic-resistant Acientobacter Bumanni by real time PCR method. Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology). 2020 Dec 16.

[4] Gashaw M, Berhane M, Bekele S, Kibru G, Teshager L, Yilma Y, Ahmed Y, Fentahun N, Assefa H, Wieser A, Gudina EK. Emergence of high drug resistant bacterial isolates from patients with health care associated infections at Jimma University medical center: a cross sectional study. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2018;7(1):1-8.

[5] Shields RK, Clancy CJ, Gillis LM, Kwak EJ, Silveira FP, Massih RC, Eschenauer GA, Potoski BA, Nguyen MH. Epidemiology, clinical characteristics and outcomes of extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii infections among solid organ transplant recipients. PloS one. 2012; 7(12): e52349.

[6] Lye DC, Kwa AL, Chlebicki P. World health day 2011: Antimicrobial resistance and practical solutions. Annals of the Academy of Medicine-Singapore. 2011;40(4):156.

[7] Pandey N, Cascella M. Beta lactam antibiotics. StatPearls [Internet]. 2020 Sep 9.

[8] Verdino A, Zollo F, De Rosa M, Soriente A, Hernández-Martínez MÁ, Marabotti A. Computational analysis of the interactions of a novel cephalosporin derivative with β-lactamases. BMC structural biology. 2018;18(1):1-2.

[9] Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of β-lactamases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005;55(6):1050-1.

[10] Lowe M, Ehlers MM, Ismail F, Peirano G, Becker PJ, Pitout JD, Kock MM. Acinetobacter baumannii: epidemiological and beta-lactamase data from two tertiary academic hospitals in Tshwane, South Africa. Frontiers in microbiology. 2018; 9:1280.

[11] Kim UJ, Kim HK, An JH, Cho SK, Park KH, Jang HC. Update on the epidemiology, treatment, and outcomes of carbapenem-resistant Acinetobacter infections. Chonnam medical journal. 2014;50(2):37-44.

[12] Ardeshiri Najmeh, et al. Evaluation of the frequency of class 1, 2 and 3 integrons in Acinetobacter baumannii strains isolated from patients admitted to teaching and medical hospitals in Sari. 2017: 217-225.

[13] Mostafavizadeh Kamyar, Mesgari Aylar, and Pourahmad Morteza. Prevalence and pattern of antibiotic resistance of Acinetobacter strains isolated from patients admitted to Alzahra Hospital in Isfahan in. 2015: 2374-2380.

[14] Jafari, et al. Phenotypic study of drug resistance of Acinetobacter baumannii with multiple drug resistance. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2015: 254-258.

[15] Vázquez-López R, Solano-Gálvez SG, Juárez Vignon-Whaley JJ, Abello Vaamonde JA, Padró Alonzo LA, Rivera Reséndiz A, Muleiro Álvarez M, Vega López EN, Franyuti-Kelly G, Álvarez-Hernández DA, Moncaleano Guzmán V. Acinetobacter baumannii resistance: a real challenge for clinicians. Antibiotics. 2020;9(4):205.

[16] Sikora A, Zahra F. Nosocomial infections. StatPearls [Internet]. 2021 Feb 10.

[17] Nocera FP, Attili AR, De Martino L. Acinetobacter baumannii: Its clinical significance in Human and Veterinary Medicine. Pathogens. 2021;10(2):127.

[18] Shamsizadeh Z, Nikaeen M, Esfahani BN, Mirhoseini SH, Hatamzadeh M, Hassanzadeh A. Detection of antibiotic resistant Acinetobacter baumannii in various hospital environments: potential sources for transmission of Acinetobacter infections. Environmental health and preventive medicine. 2017;22(1):1-7.

[19] Kurihara MN, Sales RO, Silva KE, Maciel WG, Simionatto S. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii

outbreaks: A global problem in healthcare settings. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2020;53.

[20] Khoshnood S, Eslami G, Hashemi A, Bahramian A, Heidary M, Yousefi N, Mohammdi F, Gholami M. Distribution of aminoglycoside resistance genes among Acinetobacter baumannii strains isolated from burn patients in Tehran, Iran. Archives of Pediatric Infectious Diseases. 2017;5(3).

[21] Maraki S, Mantadakis E, Mavromanolaki VE, Kofteridis DP, Samonis G. A 5-year surveillance study on antimicrobial resistance of Acinetobacter baumannii clinical isolates from a tertiary Greek hospital. Infection & chemotherapy. 2016;48(3):190-8.

[22] Jain N, Jansone I, Obidenova T, Simanis R, Meisters J, Straupmane D, Reinis A. Antimicrobial Resistance in Nosocomial Isolates of Gram-Negative Bacteria: Public Health Implications in the Latvian Context. Antibiotics. 2021;10(7):791.

[23] Alrahmany D, Omar AF, Harb G, El Nekidy WS, Ghazi IM. Acinetobacter baumannii Infections in Hospitalized Patients, Treatment Outcomes. Antibiotics. 2021;10(6):630.

[24] Montefour K, Frieden J, Hurst S, Helmich C, Headley D, Martin M, Boyle DA. Acinetobacter baumannii: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. Critical care nurse. 2008;28(1):15-25.

[25] Rebic V, Masic N, Teskeredzic S, Aljicevic M, Abduzaimovic A, Rebic D. The importance of Acinetobacter species in the hospital environment. medical archives. 2018;72(5):325.

[26] Khaledi A, Azad, Bahador, Abbas, Mansouri, Noor Mohammad, Ghazali Bina, Mehran, Qazvini, Kiarash (2015). Determination of antibiotic resistance pattern of clinical isolates of Acinetobacter baumannii isolated from patients admitted to the intensive care unit (ICU). Journal of Mashhad University of Medical Sciences. 2018; 58(7): 376-80.

[27] Ahmadi Khadijeh, Mardaneh Jalal, and Saadat Sara. Study of antibiotic resistance pattern of Acinetobacter strains isolated from patients admitted to different wards of Taleghani Hospital in Ahvaz. 2016: 620-628.

[28] La Scola B, Zeaiter Z, Khamis A, Raoult D. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the Bartonella paradigm. Trends in microbiology. 2003;11(7):318-21.

[29] Nemec A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, De Baere T, Janssens D, van der Reijden TJ, Ježek P, Vaneechoutte M. Acinetobacter parvus sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2003;53(5):1563-7.

[30] Bokaian M, Shahraki S, Raeisi J, Mohammadzadeh Rostami F. Prevalence of OXA-2 and OXA-10 Type ESBL among Acinetobacter Strains Isolated from Patients of Zahedan (South Eastern Iran). medical journal of mashhad university of medical sciences. 2016;59(1):26-34.