



مقاومت آنتی‌بیوتیکی وابسته به پمپ افلاکس در جدایه های بالینی و محیطی *اسیتوباکتر بامانی*

مرجان شاه ایلی^۱، مجید باصری صالحی^{۲*}، نیما بهادر^۳

^۱ دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشگاه علوم و تحقیقات فارس، گروه میکروب شناسی و دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، گروه میکروب شناسی،
^۲ دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، گروه میکروب شناسی، ^۳ دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، گروه میکروب شناسی.

چکیده

سابقه و هدف: اعضای جنس *اسیتوباکتر فلور طبیعی* و عامل عفونت‌های فرصت طلب بیمارستانی هستند. هدف از این مطالعه بررسی کسب مقاومت دارویی از طریق پمپ افلاکس در سویه های *اسیتوباکتر بامانی* مقاوم به چند دارو و نقش فنیل آرزینین بتا نفتیل آمید (PAβN) به عنوان مهار کننده پمپ افلاکس بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی-توصیفی ۸۳ جدایه بالینی و ۶۲ جدایه محیطی جمع آوری گردید. شناسایی باکتری‌های جدا شده با آزمون های استاندارد بیوشیمیایی و پرایمر اختصاصی ژن های *16S rRNA* و *16S-23S rRNA* با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) انجام شد. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و سنجش MIC با توجه به استاندارد CLSI انجام گردید. ارزیابی فعالیت پمپ افلاکس با استفاده از مهار کننده PAβN و فراوانی ژن *adeABC* با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع نمونه های مورد بررسی، در ۵۶ (۶۷/۴۷٪) نمونه بالینی و ۳۴ (۵۴/۸۴٪) نمونه محیطی باکتری *اسیتوباکتر بامانی* تشخیص داده شد. بر اساس نتایج آنتی‌بیوگرام ۱۰۰٪ نمونه‌ها به سفوتاکسیم و سفتری‌آکسون مقاومت نشان دادند. تنها ۷/۱۳٪ از نمونه‌های بالینی و ۵/۸۹٪ از نمونه‌های محیطی مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی را نداشتند. شیوع *adeABC* در نمونه های بالینی به ترتیب ۶۹/۶۰٪، ۸۲/۱۴٪، ۷۶/۸۰٪ و در نمونه های محیطی به ترتیب ۵۰٪، ۸۵/۳۰٪ و ۷۳/۵۰٪ بوده است. همچنین حداقل غلظت بازدارندگی تراسیکلین در حضور PAβN در تمام جدایه‌های مقاوم با کاهش همراه بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که پمپ افلاکس می‌تواند در مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* نقش داشته باشد. همچنین به دلیل مقاومت جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* به سفالوسپورین‌ها، پیشنهاد می‌شود از تجویز آن‌ها خودداری گردد.

واژگان کلیدی: *اسیتوباکتر بامانی*، پمپ افلاکس، ژن *adeABC* PAβN.

پذیرش برای چاپ: شهریور ماه ۹۷

دریافت مقاله: مرداد ماه ۹۷

مقدمه

غیرمتحرک هستند. این جنس باکتریایی بخشی از فلور نرمال افراد سالم بوده و می‌تواند به عنوان یک ارگانیسم فرصت طلب، عفونت‌های متفاوت بیمارستانی ایجاد کنند (۱). این باکتری‌ها می‌توانند عامل باکتری می، عفونت دستگاه ادراری و مننژیت ثانویه باشند. در واقع نقش اصلی آن‌ها ایجاد پنومونی

گونه‌های *اسیتوباکتر بامانی* (*Acinetobacter baumannii*) کوکوباسیل‌های گرم منفی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و

* آدرس برای مکاتبه: کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروب شناسی.

پست الکترونیک: baserisalehi@hotmail.com

تلفن: ۰۹۱۷۱۱۵۷۸۶۲



می‌گردند (۳).

این باکتری‌ها با افزایش بیان این پمپ‌ها به واسطه جهش، باعث ایجاد مقاومت نسبت به گستره وسیعی از داروها می‌گردند (۴). همچنین اثر هم‌افزایی آن‌ها با سایر مکانیسم‌های مقاومت دارویی بسیار حائز اهمیت بوده و لازم است مانند سایر مکانیسم‌های مقاومت، راه‌کارهای مقابله با آن‌ها بررسی شود (۵).

هدف از این مطالعه بررسی فنوتیپی حضور پمپ افلاکس در جدایه‌های اسپیتوباکتر بامانی و مهار آن با استفاده از فنیل آرژنینین بتا نفتیل آمید (PAβN) به منظور ارائه به مراکز خدمات درمانی بود.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه‌گیری و شناسایی فنوتیپی اسپیتوباکتر بامانی: در این مطالعه مقطعی - توصیفی از اسفند ۱۳۹۴ تا خرداد ۱۳۹۵ تعداد ۸۳ جدایه بالینی از آزمایشگاه‌ها و بیمارستان سوانح و سوختگی قطب الدین شیراز و ۶۲ جدایه محیطی از خاک مزارع گندم و ذرت (عمق ۱۵-۰ سانتی‌متری) و سطح آب‌های راکد اطراف شهر شیراز جمع‌آوری گردید (۶ و ۷). شناسایی جنس باکتری با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، آزمون‌های بیوشیمیایی و افتراقی شامل اکسیداز، کاتالاز، TSI، سیترات، ایندول، اوره، تحرک، احیای نیترات، متیل رد، و گس پروسکاتر، لیزین دکربوکسیلاز و OF انجام شد (۸).

ب) استخراج DNA: از کشت ۲۴ ساعته باکتری به روش جوشاندن، DNA استخراج گردید. برای این منظور ابتدا یک تا سه کلنی از باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل قرار داده شد و پس از جوشاندن به مدت ۱۵ دقیقه و سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه، DNA استخراج گردید. سپس مقدار آن با استفاده از دستگاه نانودراپ و با طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر بررسی گردید (۹).

ج) تأیید شناسایی جدایه‌های اسپیتوباکتر با روش PCR: برای اطمینان از جداسازی جنس اسپیتوباکتر از پرایمر اختصاصی ژن *16S rRNA* موجود در جدول ۱ و روش PCR استفاده شد.

بیمارستانی به ویژه پنومونی وابسته به دستگاه تنفسی در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) می‌باشد (۲). اغلب، درمان چنین عفونت‌هایی به دلیل مقاومت گسترده این باکتری‌ها به گروه‌های متعددی از آنتی‌بیوتیک‌ها، برای پزشکان بسیار مشکل است (۲). یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد این ارگانسیم‌ها مقاومت ذاتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز تمایل بالای آن در کسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی است. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها مشکلات فراوانی را در درمان عفونت به گونه‌های اسپیتوباکتر بامانی ایجاد کرده است (۱). مقاومت ذاتی این باکتری می‌تواند در نتیجه اثر متقابل کاهش نفوذپذیری غشای خارجی و بیان سیستم‌های تراوشی فعال صورت گیرد (۲).

پمپ‌های افلاکس آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها از نظر فیلوژنی به ۵ خانواده تعلق دارند. از بین آن‌ها پمپ‌های خانواده RND (Resistance Nodulation Division) متعلق به پمپ‌های افلاکس چند دارویی (Multidrug efflux pumps) هستند (۳). تاکنون سه نوع پمپ تراوشی سه جزئی از این دسته با نام‌های *adeABC*، *adeIJK* و *adeFGH* در اسپیتوباکترها شناسایی شده است (۴).

پمپ تراوشی *adeABC* یکی از مهم‌ترین سیستم‌های افلاکس می‌باشد که از سه پروتئین *adeA*، *adeB* و *adeC* تشکیل شده است. *adeA* یک پروتئین فیوژن غشایی، *adeB* یک پروتئین ترانسپورتر و *adeC* یک پروتئین غشای خارجی می‌باشد (۵).

داروها به عنوان سوبسترای پمپ *adeABC* می‌توانند بیان ژن‌های *adeABC* را افزایش دهند که به نوبه خود منجر به بروز مقاومت چند دارویی می‌شوند (۳).

adeABC در ایجاد مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها، کلرامفنیکل، اریترومايسين، تتراسیکلین، ماکرولیدها، فلورکینولون‌ها، تایگی سایکلین و تری‌متوپریم نقش ایفا می‌کند (۱). پمپ‌های افلاکس نه تنها باعث افزایش حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک‌ها (MIC) می‌شوند، بلکه با استفاده از نیروی محرکه پروتونی (PMF) و با کاهش غلظت دارو در داخل سلول باعث ایجاد سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک

موسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI) تعیین گردید. دیسک‌های مصرفی شامل سفنازیدیم (۳۰ µg)، سفوناکسیم (۳۰ µg)، سفتری‌آکسون (۳۰ µg)، توبرامایسین (۱۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg)، تتراسیکلین (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg)، پپراسیلین (۱۰۰ µg)، آمپی‌سیلین-سولباکتام (۱۰ µg)، مروپنم (۱۰ µg)، ایمپنم (۱۰ µg)، پلی‌میکسین B (۳۰۰ U) و کوتتری‌موکسازول (۲۵/۱ µg) (پادتن طب، ایران) بودند. پس از مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد و سویه‌ها بر اساس دستورالعمل CLSI در گروه‌های حساس، نیمه حساس و مقاوم تقسیم بندی شدند (۱۱).

ه) بررسی فراوانی ژن *adeABC* در جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی*: برای این منظور از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) برای شناسایی فراوانی ژن پمپ تراوشی (افلاکس) در جدایه‌های بالینی و محیطی استفاده شد (۱۴-۱۲).

برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر برای *adeA* در دمای ۵۶ °C و برای *adeB* در دمای ۵۷ °C به مدت ۱ دقیقه و برای *adeC* در دمای ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه بود. (۱۴-۱۲).

و) آزمون MIC و بررسی اثر مهار کننده پمپ افلاکس: برای جدایه‌های مقاوم به تتراسیکلین که واجد ژن *adeB* بودند، آزمون حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) در نظر گرفته شد. برای محاسبه کم‌ترین غلظت بازدارندگی رشد، مقدار ۰/۲۵۶ میلی‌گرم از پودر خالص آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و سپس به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد. تا نهایتاً غلظت ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. سپس از غلظت ذخیره همراه با محیط مولر هینتون براث، رقت تهیه گردید. به طوری که اولین لوله ۱۲۸ و آخرین لوله حاوی ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک بود. به هر لوله حاوی آنتی‌بیوتیک و محیط کشت (جمعاً ۱ میلی‌لیتر) به میزان

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس شرکت سیناژن، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، ۲/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها به غلظت ۱۰ پیکومول و ۲ میکرولیتر DNA الگو انجام شد. برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل واسرشت سازی در دمای ۹۵ °C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ °C به مدت ۳۵ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ °C به مدت ۵۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۷ دقیقه بود (۱۰).

همچنین برای جداسازی گونه *اسیتوباکتر بامانی* از پرایمر اختصاصی *16S-23S rRNA* (جدول ۱) استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (شرکت سیناژن)، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، ۲/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (غلظت ۱۰ پیکومول) و ۲ میکرولیتر DNA الگو انجام گرفت. چرخه دمایی PCR شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۷ دقیقه بود. محصول PCR، بروی ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید. از سویه استاندارد *اسیتوباکتر بامانی* PTCC1797 به عنوان کنترل مثبت در تشخیص جدایه‌ها استفاده شد (۱۰).

د) ارزیابی حساسیت *اسیتوباکتر بامانی* به آنتی‌بیوتیک‌ها: الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های به دست آمده با استفاده از روش انتشار دیسک (کربی-بائر) و مطابق با دستورالعمل

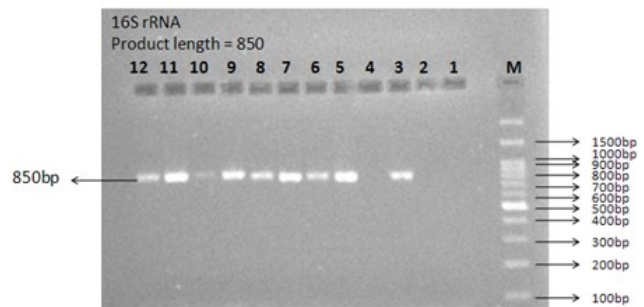
جدول ۱: پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در مطالعه

منبع	اندازه	پرایمر	ژن
۱۰	۸۰۰ bp	F: 5'GTCGTAACAAGGTAGCCGTA3' R: 5'GGGTTCCCCATTACAGACAT3'	<i>16S rRNA</i>
۱۰	۲۰۸ bp	F: 5'-CATTATCACGGTAATTAAGTG-3' R: 5'-AGAGCACTGTGCACCTAAG-3'	<i>16S-23S rRNA</i>
۱۳	۵۱۳ bp	F: 5'-ATCTTCCTGCACGGTGTACAT-3' R: 5'-GGCGTTCATACTCACTAACCC-3'	<i>adeA</i>
۱۲	۵۴۱ bp	F: 5'TTAACGATAGCGTTGTAACCC3' R: 5'TGAGCAGACAATGGAATAGT3'	<i>adeB</i>
۱۴	۲۲۲ bp	5'-ATGCATCATCTGAACTGAAAG-3' 5'-GTGCATGTGTAGCAAGTGCA-3'	<i>adeC</i>

بازدارنده ۱۰۰ میلی‌گرم/۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بوده است. سپس همانند مرحله قبل به این محلول، آنتی‌بیوتیک اضافه گردید و رقت‌های ۱۲۸ تا ۲ میکروگرم ساخته شد (۱۲ و ۱۵).
 (ز) *آنالیز آماری*: داده‌های به دست آمده با استفاده از نسخه هجدهم نرم افزار *SPSS* و آزمون های مربع کای و *One sample T test* در سطح معنی دار $p \leq 0.05$ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها

(الف) *آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی*: در مطالعه حاضر پس از انجام آزمون های بیوشیمیایی از مجموع ۸۳ نمونه بالینی، ۶۱ (۷۳/۴۹٪) و از ۶۲ نمونه محیطی ۳۶ (۵۸/۰۶٪) جدایه به عنوان *اسیتوباکتر* تشخیص داده شدند. پس از استفاده از پرایمرهای اختصاصی *16S rRNA* و *16S-23S rRNA* از مجموع ۶۱ نمونه بالینی ۵۶ (۶۷/۴۷٪) و از ۳۶ نمونه محیطی ۳۴ (۵۴/۸۴٪) جدایه به عنوان *اسیتوباکتر بامانی* معرفی گردید (شکل ۱ و ۲). لازم به ذکر است که تشکیل دو باند ۸۵۰ و ۲۰۸ جفت بازی



شکل ۱: الکتروفورز محصول ژن *16S rRNA* بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد. (M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱) کنترل منفی، ۲ و ۴) نمونه‌های منفی، ۳، ۵ تا ۱۱) نمونه‌های مثبت، ۱۲: کنترل مثبت.

۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی که ابتدا برابر ۰/۵ مک فارلند تهیه و سپس به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شده بود (1×10^6 CFU/ml) اضافه گردید. در حالت مشابه پس از ساخت محیط مایع مولر هیتون براث (مرک، آلمان) و سرد شدن، مقدار ۱۰۰ mg/l محلول PAβN (ماده بازدارنده فنیل آرژینین بتا نفتیل آمید) اضافه گردید. شایان یادآوری است که غلظت ماده

جدول ۲: آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی و قطر هاله‌های عدم رشد براساس جدول CLSI.

گروه	آنتی‌بیوتیک	قطر هاله عدم رشد		
		S	I	R
A	سفتازیدیم	≥۱۸	۱۷-۱۵	≤۱۴
A	جتنامایسین	≥۱۵	۱۴-۱۳	≤۱۲
A	سیپروفلوکساسین	≥۲۱	۲۰-۱۶	≤۱۵
A	ایمی پنم	≥۱۶	۱۵-۱۴	≤۱۳
A	توبرامایسین	≥۱۵	۱۴-۱۳	≤۱۲
A	مروپنم	≥۱۶	۱۵-۱۴	≤۱۳
A	آمی سیلین-سورباکتام	≥۱۵	۱۴-۱۲	≤۱۱
B	سفتوآکسیم	≥۲۳	۲۲-۱۵	≤۱۴
B	سفتری آکسون	≥۲۱	۲۰-۱۴	≤۱۳
B	آمیکاسین	≥۱۷	۱۶-۱۵	≤۱۴
B	کوتری موکسازول	≥۱۶	۱۵-۱۱	≤۱۰
O	پلی میکسین B	≥۱۲	-	≤۱۱
O	پپراسیلین	≥۲۱	۲۰-۱۸	≤۱۷
U	تتراسایکلین	≥۱۵	۱۴-۱۲	≤۱۱

A: به صورت متداول از این قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود.
 B: در صورت مقاوم بودن به گروه A از این دسته استفاده می‌شود.
 O: این گروه به عنوان آخرین انتخاب در نظر گرفته می‌شود.
 U: از این گروه برای عفونت های ادراری استفاده می‌شود.

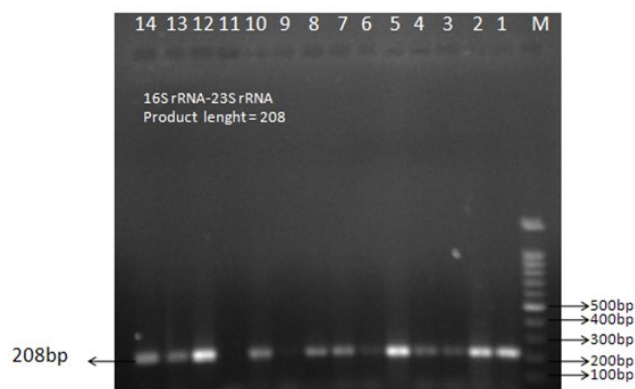
جدول ۳: درصد فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های جدا شده.

کلاس آنتی‌بیوتیکی	آنتی‌بیوتیک	درصد سویه‌های مقاوم	
		محیطی	بالینی
سفالوسپورین ها	سفتازیدیم	٪۹۱/۲	٪۹۶/۵
	سفتوآکسیم	٪۱۰۰	٪۱۰۰
	سفتری آکسون	٪۱۰۰	٪۱۰۰
	توبرامایسین	٪۸۵/۳	٪۹۱/۱
آمینوگلیکوزیدها	جتنامایسین	٪۸۸/۳	٪۸۹/۳
	آمیکاسین	٪۸۵/۳	٪۹۱/۱
تتراسایکلین ها	تتراسایکلین	٪۵۰	٪۴۴/۷
	سیپروفلوکساسین	٪۸۸/۳	٪۹۱/۱
پنسیلین	پپراسیلین	٪۸۸/۳	٪۹۱/۱
	آمی سیلین-سولباکتام	٪۷۰/۶	٪۷۱/۵
کریپتام ها	مروپنم	٪۸۵/۳	٪۸۹/۳
	ایمی پنم	٪۸۵/۳	٪۸۹/۳
لیپوپتیدها	پلی میکسین B	٪۴۴/۸	٪۲۸/۶
	کوتری موکسازول	٪۸۸/۳	٪۹۱/۱
مهارکننده مسیر فولات			

جدول ۴: وجود رابطه معنی‌دار بین آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی و حضور ژن *adeB*

آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده	<i>adeB</i> ($p \leq 0/05$)	
	بالینی	محیطی
سفتازیدیم	۱/۰۰۰	۰/۱۴۷
سفتوتاکسیم	۰۰۰	۰۰۰
سفتری آکسون	۰۰۰	۰۰۰
توبرامایسین	۰/۲۱۴	۰/۰۱۵
جتتامایسین	۰/۵۹۶	۰/۰۰۲
آمیکاسین	۰/۵۷۸	۰/۰۰۶
تتراسایکلین	۰/۷۳۵	۰/۰۰۳
سیپروفلوکساسین	۰/۵۷۸	۰/۰۰۲
پیپراسیلین	۰/۲۱۴	۰/۰۰۶
آمی‌سیلین-سولباکتام	۰/۴۶۸	۰/۲۰۵
مروینم	۰/۵۷۸	۰/۰۱۵
ایمی پنم	۰/۵۷۸	۰/۰۱۵
پلی میکسین B	۱/۰۰۰	۰/۲۹۱
کوئتریموکسازول	۰/۵۸۷	۰/۰۱۵

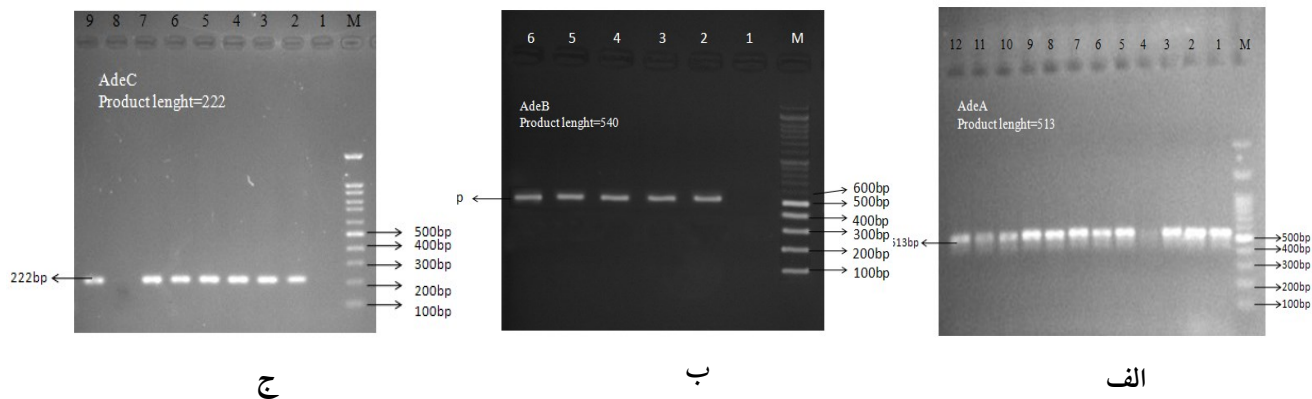
بر اساس آزمون One sample T test در سطح معنی‌دار $p \leq 0/05$ رابطه معنی‌داری از خود نشان داد. مطالعه MDR نشان داد که ۷/۱۳ درصد نمونه‌های بالینی و ۵/۸۹ درصد از نمونه‌های محیطی مقاومت چندگانه نداشته‌اند و جالب این‌که نمونه‌های محیطی ۱/۰۱۳ بار بیشتر از نمونه‌های بالینی مقاومت چندگانه داشته‌اند. (ج) آزمون PCR: نتایج به‌دست آمده نشان داد که فراوانی



شکل ۲: الکتروفورز محصول ژن *16S-23SrRNA* بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد. (M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، (۱) کنترل مثبت، ۸-۲، ۱۰، ۱۴-۱۲) نمونه‌های مثبت، ۹، ۱۱) نمونه‌های منفی.

نشان دهنده حضور *اسیتوباکتر بامانی* و تشکیل فقط یک باند ۸۵۰ جفت بازی حاکی از وجود سایر گونه‌ها بود.

(ب) حساسیت آنتی‌بیوتیکی: بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی با توجه به جدول ۲ در هر دو گروه مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های سفتوتاکسیم، سفتری آکسون و سفتازیدیم به ترتیب با درصد‌های ۱۰۰٪، ۱۰۰٪ و ۹۶/۵٪ برای نمونه‌های بالینی و ۱۰۰٪، ۱۰۰٪ و ۹۱/۲٪ برای نمونه‌های محیطی بود (جدول ۳). همچنین بیشترین حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پلی میکسین B، تتراسایکلین و آمی‌سیلین/سولباکتام بود. به طوری که میزان حساسیت برای جدایه‌های بالینی به ترتیب ۷۱/۴۳٪، ۵۵/۴٪ و ۲۸/۶٪ و برای جدایه‌های محیطی ۵۵/۹٪، ۵۰٪ و ۲۹/۴۱٪ بود. بیشترین مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی



شکل ۳: (الف) الکتروفورز ژن *adeA* (M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون‌های ۱ تا ۱۲) نمونه مثبت. (ب) الکتروفورز ژن *adeB* (M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، (۱) کنترل منفی، (۲) کنترل مثبت، ۶-۳) نمونه مثبت. (ج) الکتروفورز ژن *adeC* (M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، (۱ و ۸) نمونه‌های منفی، ۷-۲ و ۹)

جدول ۵: فراوانی مقاومت و حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین و وجود (+) یا عدم وجود (-) ژن *adeB*

محیطی			بالینی		
<i>adeB</i>	تتراسیکلین	تعداد	<i>adeB</i>	تتراسیکلین	تعداد
+	R	۱۴	+	R	۲۰
-	R	۳	-	R	۵
+	S	۱۵	+	S	۲۶
-	S	۲	-	S	۵

ژن های *adeA*، *adeB* و *adeC* در نمونه های بالینی به ترتیب ۶۰/۶۹، ۲۰/۸۲ و ۸/۷۶ درصد و در نمونه های محیطی برابر با ۵۰، ۳/۸۵ و ۵/۷۳ درصد بوده است (شکل ۳). با استفاده از آزمون مربع کای مشخص گردید که مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی اغلب برای نمونه‌های محیطی رابطه‌ای معنی‌دار با حضور ژن *adeB* دارند. اما همان طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود این وضعیت در جدایه‌های بالینی وجود نداشت. جدول ۵ وضعیت جدایه های بالینی و محیطی را نسبت به وجود یا عدم وجود ژن *adeB* و مقاومت یا حساسیت نسبت به تتراسیکلین نشان می‌دهد.

د) کمترین غلظت بازدارندگی: نتایج حاصل از MIC برای آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین در نمونه‌های *اسیتوباکتر بامانی* مقاوم بالینی (۲۰ مورد) و محیطی (۱۴ مورد) واجد ژن کد کننده پمپ تراوشی *adeB* $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ بود. بر اساس دستورالعمل CLSI مقادیر $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ نشانه مقاومت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین است. همچنین مقدار MIC برای تتراسیکلین به همراه PA β N در نمونه‌های *اسیتوباکتر بامانی* مقاوم بالینی و محیطی واجد ژن کد کننده پمپ تراوشی *adeB* به $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ تقلیل پیدا نمود. همچنین بر اساس آزمون مربع کای ارتباط معنی‌داری در سطح $p \leq 0.05$ بین حضور ژن *adeB* و مقاومت به تتراسیکلین در نمونه‌های بالینی و محیطی مشاهده نشد.

بحث

جدایه های *اسیتوباکتر بامانی*، پاتوژن‌های فرصت طلب و مسئول عفونت‌های بیمارستانی متعددی می‌باشند که مشکلات

درمانی بسیاری را در دنیا ایجاد نموده‌اند. این باکتری‌ها خطر مهمی برای بیماران بستری محسوب می‌شوند. درمان عفونت‌های *اسیتوباکتر بامانی* اغلب در مواردی که فنوتیپ‌های مقاومت، چند دارویی است مشکل می‌باشد. در حال حاضر کارباینها به عنوان داروی انتخابی در درمان عفونت‌های *اسیتوباکتر* مقاوم به چند دارو، استفاده می‌گردند. درمان عفونت‌های ناشی از *اسیتوباکتر بامانی*، به عنوان مشکلی مهم در بسیاری از کشورها مورد توجه قرار گرفته است (۱۶). در این تحقیق، ۹۰ جدایه *اسیتوباکتر* (۵۶ نمونه بالینی و ۳۴ نمونه محیطی) مورد ارزیابی قرار گرفت. در هر دو گروه به طور ۱۰۰٪ مقاومت آنتی‌بیوتیکی به سفوتاکسیم و سفتری‌آکسون و نیز بالاترین نرخ حساسیت نسبت به پلی‌میکسین B، تتراسیکلین و آمپی‌سیلین/سولباتام مشاهده گردید.

نتایج به دست آمده نشان دهنده این مطلب است که *اسیتوباکتر بامانی* های جدا شده نسبت به سفالوسپورین‌ها، به ویژه نسل سوم، که PBPs باکتری‌های گرم منفی را هدف قرار می‌دهند بیش از حد مقاوم شده‌اند. همچنین درصد قابل توجهی از جمعیت میکروبی مورد مطالعه به کارباینها (ایمی‌پنم و مروپنم) که داروی انتخابی در درمان *اسیتوباکتر بامانی* هستند نیز مقاوم شده‌اند. این مساله موجب دشواری درمان عفونت های ناشی از *اسیتوباکتر بامانی* می‌گردد. از طرفی باوجود حساسیت به داروهایی مانند تتراسیکلین و پلی‌میکسین باید خاطر نشان کرد که داروهای یاد شده عوارضی همچون تاثیر بر دستگاه گوارش، کلیه و سیستم شنوایی دارند. بنابراین مصرف آن‌ها در گروه‌های سنی مختلف می‌تواند پیامدهای متفاوتی داشته باشد. مقایسه درصد فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی دو جمعیت میکروبی بالینی و محیطی بیان‌گر این مطلب است که سرعت شکل‌گیری سویه‌های مقاوم در نمونه‌های بالینی بیشتر بوده است.

جعفری (Jafari) و همکاران با بررسی ۶۳ نمونه *اسیتوباکتر بامانی*، مقاومت به ایمی‌پنم، مروپنم و سیپروفلوکساسین را به ترتیب ۹/۴۰٪، ۶۰٪ و ۷۷٪ گزارش نمودند (۱۷).

وفایی (Vafaei) و همکاران با بررسی ۱۰۰ نمونه *اسیتوباکتر*

گزارش کردند (۱۸). میرنژاد (Mirnejad) و همکاران با بررسی ۵۰ گونه *اسیتوباکتر بامانی*، ۸۲٪ آن‌ها را دارای مقاومت چند دارویی گزارش نمودند (۲۱). سوی ینگ (Su-ying) و همکاران با تحقیق بر روی ۱۲۰ گونه *اسیتوباکتر بامانی* ۶۴٪ آن‌ها را دارای مقاومت چنددارویی گزارش نمودند (۲۲).

طاهری کلانی (Taherikalani) و همکاران با بررسی ۱۰۰ گونه *اسیتوباکتر بامانی*، ۵۰٪ آن‌ها را دارای مقاومت چند دارویی گزارش نمودند (۲۳). قجاوند (Ghajavand) و همکاران با مطالعه ۴۳ گونه *اسیتوباکتر بامانی*، نشان دادند که تمامی جدایه‌های *اسیتوباکتر مقاومت چند دارویی* دارند (۲۴).

اپرون *adeABC* در ۵۳ تا ۹۷ درصد سویه‌های *اسیتوباکتر بامانی* وجود دارد. بیان بالای این پمپ باعث ایجاد مقاومت چند دارویی در این قبیل سویه‌ها می‌گردد. همچنین حضور این پمپ باعث ایجاد مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها، تتراسیکلین، فلوروکینولون‌ها، تاییدی سایکلین، ماکرولیدها، کلرامفنیکل و تری‌متوپریم می‌شود (۱۲).

نتایج این پژوهش نشان داد که به ترتیب ۶۹/۶۰٪، ۸۲/۱۴٪، ۷۶/۸٪ از نمونه‌های بالینی و ۵۰٪، ۸۵/۳٪ و ۷۳/۵۰٪ از نمونه‌های محیطی واجد ژن‌های *adeABC* بوده‌اند. لازم به ذکر است که ارتباط معنی داری بین حضور ژن *adeB* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های بالینی مشاهده نگردید. این موضوع می‌تواند به عدم بیان ژن و یا تاثیرات شرایط محیط کشت بر بیان ژن در جدایه‌های مختلف و یا سایر راه‌های مقاومتی نسبت داده شود.

ژاپونی‌نژاد (JaponiNejad) و همکاران با بررسی ۵۶ گونه *اسیتوباکتر بامانی*، نشان دادند که ژن *adeABC* به ترتیب در ۱۰۰٪، ۱۰۰٪ و ۹۶/۵٪ جدایه‌ها یافت شد (۱۲). غلامی (Gholami) و همکاران با بررسی ۶۰ گونه *اسیتوباکتر بامانی*، نشان دادند که ژن *adeABC* به ترتیب در ۱۰۰٪، ۱۰٪ و ۸۵٪ جدایه‌ها یافت شد (۲۵).

جسیم (Jassim) و همکاران با مطالعه بر روی ۹۷ گونه *اسیتوباکتر بامانی* مشخص نمودند که ژن‌های *adeABC* به ترتیب در ۷۷/۴٪، ۱۰۰٪ و ۸۳/۳٪ گونه‌هایی که مقاومت

بامانی بیشترین مقاومت را به سفتری‌آکسون، آمیکاسین، ایمپنم، پپراسیلین-تازوباکتام، مروپنم، جنتامیسین، تویرامایسین و تتراسیکلین و کم‌ترین مقاومت را به آمپی‌سیلین-سولباکتام و پلی‌میکسین B گزارش نمودند (۱۸).

میرنژاد (Mirnejad) و همکاران با بررسی ۷۰ گونه *اسیتوباکتر* بیشترین مقاومت را نسبت به سفپیم، سفنازیدیم، آزترونام، نورفلوکساسین، اوفلوکساسین و آمیکاسین و کم‌ترین مقاومت را به ایمپنم، جنتامایسین، آمپی‌سیلین-سولباکتام، پپراسیلین-تازوباکتام گزارش نمودند (۱۹). گلستانی (Golestani) و همکاران با بررسی ۸۱ گونه *اسیتوباکتر* بیشترین مقاومت را به ایمپنم و مروپنم و کم‌ترین مقاومت را به پلی‌میکسین B و کلیستین گزارش نمودند (۲۰). بررسی نتایج پیشین و مقایسه آنها با مطالعه حاضر حاکی از افزایش مقاومت نسبت به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی است.

افزایش شیوع مقاومت چند دارویی در سویه‌های *اسیتوباکتر بامانی* در مراکز درمانی رو به افزایش است و به عنوان یکی از پاتوزن‌های مهم بیمارستانی پس از سودوموناس *آئروجینوسا* قرار گرفته است. درمان عفونت‌های *اسیتوباکتر* اغلب در مواردی که فنوتیپ‌های مقاومت MDR است، مشکل می‌باشد (۱۸). نتایج این پژوهش نشان داد که تنها ۷/۱۳ درصد نمونه‌های بالینی و ۵/۸۹ درصد از نمونه‌های محیطی مقاومت چندگانه نداشته‌اند و جالب این‌که نمونه‌های محیطی ۱/۰۱۳ بار بیشتر از نمونه‌های بالینی مقاومت چندگانه داشته‌اند. نکته شایان توجه این پژوهش، مقاومت ۳ سویه از ۵۶ جدایه بالینی و ۸ سویه از ۳۴ جدایه محیطی به هر ۹ کلاس آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی بود. در صورتی که این سویه‌ها فرصت پیدا کنند، در آینده جایگزین سویه‌های حساس خواهند شد و یا در اثر نقل و انتقال‌های ژنی (عمودی و افقی)، ژن‌های مقاومت را به سویه‌های حساس انتقال خواهند داد.

جعفری (Jafari) و همکاران با بررسی ۶۳ سویه *اسیتوباکتر بامانی* اعلام داشتند که ۹۷٪ نمونه‌ها مقاومت چنددارویی داشته‌اند (۱۷). وفایی (Vafaei) و همکاران با مطالعه بر روی ۱۰۰ گونه *اسیتوباکتر بامانی* مقاومت چند دارویی را ۷۰٪

کینجیا (Qingya) و همکاران بیان داشتند که حداقل غلظت بازدارنده مروپنم در حضور مهارکننده پمپ تراوشی در جدایه‌ها کاهش نشان داده است (۳۱). جسیم (Jassim) و همکاران با مطالعه ۹۷ گونه *اسیتوباکتر بامانی* مشخص نمودند که حساسیت تتراسیکلین در حضور مهارکننده پمپ افلاکس افزایش پیدا نمود و مقدار MIC ۴ تا ۳۲ بار کاهش نشان داد (۱۳). خیاط (Khayat) و همکاران با مطالعه ۱۰۳ گونه *اسیتوباکتر بامانی* مشخص نمودند که کاهش مقدار MIC در حضور مهار کننده پمپ افلاکس، در ۴۰٪ جدایه‌ها مشاهده گردید (۲۶). پلگ (Peleg) و همکاران با مطالعه ۲ جدایه غیرحساس به تایگی سایکلین و تماس آن‌ها به مهار کننده پمپ افلاکس PAβN مشاهده نمودند که ۴ بار کاهش در مقدار MIC به وجود آمد. این در حالی بود که هر دو گونه‌های حساس و مقاوم حاوی ژن *adeB* بودند (۳۲). پانک (Pannek) و همکاران گزارش نمودند که در غلظت بالای مهارکننده پمپ افلاکس PAβN (۱۰۰ mg/l) ۴ بار کاهش در مقدار MIC در برابر ریفامپسین و کلاریترومایسین به وجود می‌آید. این اثر مهار کنندگی محدود به سویه‌های واجد ژن *adeB* نبوده است (۳۰). مقایسه نتایج تحقیق حاضر با سایر تحقیقات، نشان می‌دهد که پمپ افلاکس در بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی تاثیرگذار بوده است. همچنین با توجه به افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی (به روش‌های مختلف) در بین جدایه‌های *اسیتوباکتر* لازم است که با استفاده از آزمون MIC قبل از تجویز دارو از تاثیر آن مطمئن گردید.

نتیجه گیری

در مطالعه انجام شده مشخص گردید که مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های محیطی *اسیتوباکتر بامانی* نه تنها از نمونه‌های بالینی کم‌تر نیست بلکه در زمینه مقاومت چنددارویی از نمونه‌های بالینی پیشی گرفته‌اند. این نگرانی وجود دارد که سویه‌های محیطی نقش مخزن ژن‌های مقاومتی را در آینده بازی کنند. با توجه به مقاومت ۱۰۰٪ به دو آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و سفتری‌آکسون و نیز مقاومت‌های بالای ۸۰٪ به مروپنم و

چند دارویی دارند وجود داشته است. برعکس این ژن در گونه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک دیده نشد (۱۳).

خیاط (Khayat) و همکاران با مطالعه بر روی ۱۰۳ گونه *اسیتوباکتر بامانی* مشخص نمودند که ۱۰۰٪ جدایه‌ها واجد ژن *adeB* بودند (۲۶). لین (Lin) و همکاران با مطالعه ۲۱ گونه *اسیتوباکتر بامانی* که واجد مقاومت چندگانه بودند متوجه شدند که به استثنای یک مورد، همگی دارای ژن‌های پمپ افلاکس می‌باشند (۲۷).

ریزو (Rizzo) و همکاران با مطالعه بر روی ۸۳ گونه *اسیتوباکتر بامانی* مشخص نمودند که ۸۳٪ جدایه‌ها MDR و تمام اعضای MDR دارای ژن *adeB* بوده‌اند (۲۸). آنگوتی (Angoti) و همکاران در گزارشی میزان بروز این سه ژن را در ۶۱ جدایه به ترتیب ۸۸/۵۰٪، ۱۰۰٪ و ۹۳/۹۰٪ اعلام نمودند (۱۴). سرحدی (Sarhaddi) و همکاران با مطالعه ۵۴ گونه *اسیتوباکتر بامانی*، مشاهده کردند که ۷۲/۲٪ از نمونه‌ها واجد ژن *adeB* می‌باشند (۲۹).

مهار فارماکولوژیک پمپ‌های مقاومت چنددارویی MDR ممکن است هدف جذابی برای معکوس کردن مقاومت دارویی در گونه‌های *اسیتوباکتر* و بهبود گزینه‌های درمانی باشد. تا کنون چند مورد از مهارکننده‌های پمپ افلاکس شناسایی شده است. یک مثال از آن‌ها فنیل آرژینین-بتا-نفتیل آمید (PAβN) است (۳۰). در مطالعه حاضر مقدار MIC برای تتراسیکلین به همراه PAβN در نمونه‌های *اسیتوباکتر* مقاوم بالینی و محیطی واجد ژن کدکننده‌ی پمپ تراوشی *adeB*، از $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ به $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ تقلیل پیدا نمود.

ژاپونی‌نژاد (Japoni-Nejad) و همکاران با بررسی ۵۶ گونه *اسیتوباکتر بامانی*، نشان دادند که حداقل غلظت بازدارنده ایمی‌پنم در حضور مهارکننده پمپ تراوشی در جدایه‌ها کاهش نداشت (۱۲). غلامی (Gholami) و همکاران با بررسی ۶۰ گونه *اسیتوباکتر بامانی*، نشان دادند که حساسیت به ایمی‌پنم در حضور مهارکننده پمپ افلاکس افزایش پیدا نمود. به طوری که برای ۹۶/۶٪ جدایه‌ها حداقل غلظت بازدارندگی ۴ تا ۶۴ بار کاهش پیدا نمود (۲۵).

ایمی‌پنم، می‌بایست در تجویز کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی به ویژه سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها دقت بیشتری شود. با توجه به گستردگی مکانیسم‌های مقاومتی، به نظر می‌رسد مطالعات دوره‌ای بر روی این باکتری، نیز انجام آزمون MIC و آنتی‌بیوگرام امری ضروری است.

تشکر و قدردانی نویسندگان این مقاله از بیمارستان سوانح و سوختگی قطب الدین شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی علوم و تحقیقات فارس و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Dostvandi S, Abiri R, Mohajeri P, Alvandi A. Genotypic and phenotypic characteristics of efflux pumps in *Acinetobacter* spp. isolated from inpatients. J Mazandaran Univ Med Sci. 2015; 25(126): 1-10. [In Persian]
2. Nikasa P, Abdiaali E, Bahar MA, Niknam V. Antibiotic resistance of clinical *Acinetobacter baumannii* species in the presence of efflux pump inhibitor. J Infec Dise Trop Med. 2008; 13(42): 19-23. [In Persian]
3. Valadkhani F, Zeighami H. Efflux pump systems in bacteria. Lab Diagn. 2016; 8(33): 35-43. [In Persian]
4. Godarzi H, Doraghi M, Dabiri H, Ghaladvand Z. Examination of expression and function of efflux pumps gene of non-clonal multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. J Res Med Sc. 2013; 37(2): 107-112. [In Persian]
5. AfsharYavari S, Rota S, Caglar K, Fidan I. Efflux pump inhibitors effect on the minimum inhibitory concentration of Benzalkonium Chloride and Chlorhexidine in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospitalized inpatients in Gazi hospital, Ankara. J Urmia Univ Med. 2016; 27(5): 393-401. [In Persian]
6. Akpangodwin U, Illyasu M. Effect of length of soil sample storage on soil microbiological and biochemical properties in Uyo, Nigeria. J Global Agric Rec. 2015; 3(3): 25-37.
7. Xin F, Cai D, Sun Y, Guo D, Wu Z, Jiang D. Exploring the diversity of *Acinetobacter* populations in river water with genus-specific primers and probes. J Gen Appl Microbiol. 2014; 60(2): 51-58.
8. Mahon CR, Lehman OC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology fifth edition. Saunders. 2015; 494-512.
9. Krsek M, Wellington EMH. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. J Microbiol Methods. 1999; 39(1): 1-16.
10. Chen TL, Siu LK, Wu RCC, Shaio MF, Huang LY, Fung CP, Lee CM, Cho WL. Comparison of one-tube multiplex PCR, automated ribotyping and intergenic spacer (ITS) sequencing for rapid identification of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 2007; 13(8): 801-806.
11. Patel JB, Patel R, Weinstein MP. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S23. 2017; p: 66-67.
12. Japoni-Nejad AR, Sofian M, Ghaznavi-Rad E. Molecular detection of AdeABC efflux pump genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and their contribution in imipenem resistance. Iran South Med J. 2014; 17(5): 815-823.

13. Jassim KA, Ghaima KK, Saadedin SMK. AdeABC efflux pump genes in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Avicenna J Clin Microb Infec. 2016; 3(4):1-6.
14. Angoti G, Bandehpour M, Goudarzi H, Zarringhalammoghaddam M, Kouchaki A. Detection of efflux pump genes (*adeA*, *adeB*, *adeC* and *adeM*) in *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalize patients, North-west of Iran. Infect Epidemiol Med. 2016; 2(4): 8-11.
15. AfsharYavari S, 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. [In Persian]
16. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol. 2007; 5(12): 939-951.
17. 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; 21(4): 254-258.
18. Vafaei S, Mirnejad R, Amirmozaffari N, Imanifoladi AA, Masjedian F. Antibiotic resistance pattern and extended β lactamase frequency in *Acinetobacter baumannii* strains isolates from clinical samples by phenotypic method. J Infec Dise Trop Med. 2013; 18(61): 39-44. [In Persian]
19. Mirnejad R, Mostofi S, Masjedian F. Evaluation of role of class 2 integron in the antibiotic susceptibility pattern of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from Tehran hospital. Sci J Hamdan Univ Med Sci. 2011; 18(4): 22-28. [In Persian]
20. Golestani F, javadpour S, Kafilzadeh F, Ghalandarzadeh Daryaei Z. Determination of antibiotic resistance pattern and frequency of *bla_{VIM}* & *bla_{IMP}* genes in clinical isolates of *Acinetobacter* species in Bandar Abbass. J Microb World. 2018; 10(4): 229-309. [In Persian]
21. Mirnejad R, Mostofi S, Masjedian F. Antibiotic resistance and carriage class 1 and 2 integrons in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Tehran, Iran. Asian Pac J Trop Biomed. 2013; 3(2): 140-145.
22. Su-ying Z, Dong-yang J, Peng-cheng X, Yi-kai Z, Heng-fang S, Hui-ling C, Qian W. An investigation of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a comprehensive hospital of East China. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2015; 14: 7.
23. Taherikalani M, Maleki A, Sadeghifard N, Mohammadzadeh D, Soroush S, Asadollahi P, Asadollahi K, Emaneini M. Dissemination of class 1, 2 and 3 integrons among different multidrug resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran hospitals, Iran. Pol J Microbiol. 2011; 60(2): 169-174.
24. Ghajavand H, Havaei A, Nasr Esfahani B, Fazeli H, Moghim S. Frequency of MDR *Acinetobacter baumannii* isolates in Intensive Care Units (ICU) of Isfahan hospitals by molecular method and their antimicrobial resistance pattern. J Isfahan Med Sch. 2014; 32(295): 1-11. [In Persian]
25. Gholami M, Hashemi A, Hakemi-Vala M, Goudarzi H, Hallajzadeh M. Efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine B-Naphthylamide effect on the minimum inhibitory concentration of imipenemin *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospitalized patients in Shahid Motahari Burn Hospital, Tehran, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(10): 1-7.
26. Khayat H, Sadeghifard N, Pakzad I, Azimi L, Delfani S, Sayehmiri K, Soroush S, Bogdanovic L,

- Taherikalani M. Determination of different fluoroquinolone mechanisms among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran, Iran . Iran Red Crescent Med J. 2017; 19(9): 1-8.
27. Lin MF, Lin YY, Tu CC, Lan CY. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. J Microbiol Immunol Infect. 2017; 50(2): 224-231.
28. Rizzo C, Marascio N, Zicca E, Pavia G, Quirino A, Lamberti AG, Liberto MC, Focà A. Efflux pump AdeABC assessment in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in a teaching hospital. J Med Microb Diag. 2016; 5(3): 1-3.
29. Sarhaddi N, Soleimanpour S, Farsiani H, Mosavatd A, Dolatabadi S, Salimizand H, Amel Jamehdar S. Elevated prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with extensive genetic diversity in the largest burn center of northeast Iran. J Glob Anti Microb Re. 2017; 8: 60-66.
30. Pannek S, Higgins PG, Steinke P, Jonas D, Akova M, Bohnert JA, Seifert H, Kern WV. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-b-naphthylamide. J Antimicrob Chemother. 2006; 57(5): 970-974.
31. Qingya D, Mingxiang Z, Jun L, Haichen W, Yongmei H, Wen'en L. AdeABC efflux pump and resistance of *Acinetobacter baumannii* against carbapenem. J Cent South Univ. 2017; 42(4): 426-433.
32. Peleg AY, Adams J, Paterson DL. Tigecycline efflux as a mechanism for non-susceptibility in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(6): 2065-2069.



Antibiotic resistance dependent on efflux pump in the isolates of clinical and environmental *Acinetobacter baumannii*

Marjan Shaheli¹, Majid BaseriSalehi², Nima Bahador³

¹Ph.D. student, Department of Microbiology, College of Science, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran & Department of Microbiology, College of Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

²Associate Professor, Department of Microbiology, College of Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

³Associate Professor, Department of Microbiology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Members of *Acinetobacter* genus are normal flora and the causal agent of the opportunistic nosocomial infections. The aim of this study was to investigate the ability to acquire drug resistance through efflux pump mechanism in multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. and the role of PA β N (Phenyl Arginin β naphthamid) as an efflux pump inhibitor.

Materials & Methods: In the cross-sectional descriptive study 83 clinical isolates and 62 environmental isolates were collected. Identification of the isolated bacteria was carried out by standard biochemical experiments and polymerase chain reaction (PCR) using specific primers of *16S rRNA* and *16S-23S rRNA*. Antibiotic susceptibility tests were conducted through disc diffusion and MIC test based on CLSI guidelines. The activity of the efflux pump was evaluated using the Pa β N, and the *adeABC* gene frequency was assessed by PCR.

Results: Of the total of the samples evaluated, 56 (67.47%) clinical isolates and 34 (54.84%) environmental isolates were identified as *Acinetobacter* spp. In accordance with the results of the antibiogram test, 100% of the isolates were resistant to cefotaxime and ceftriaxone. Only 7.13% of the clinical isolates and 5.89% of the environmental isolates were not multidrug-resistant (MDR). Prevalence of the *adeB* was 69.60%, 82.14%, and 76.80% in the clinical isolates and 50%, 85.30%, and 73.50% in the environmental isolates, respectively. Furthermore, tetracycline MIC was decreased in all resistant isolates in the presence of PA β N.

Conclusion: The results showed that the efflux pump could play a role in antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolates. Owing to the resistance of *Acinetobacter* isolates against cephalosporine, it is suggested to avoid prescribing.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Efflux pump, *adeABC* gene, PA β N.

Correspondence to: Majid Baseri-Salehi

Tel: +98 9171157862

E-mail: baserisalehi@hotmail.com

Journal of Microbial World 2019, 12(1): 15-26.



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.