



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

فهیمة گلستانی^۱، صدیقه جواد پور^{۲*}، فرشید کفیل زاده^۳، زینب قلندرزاده دریایی^۱

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

چکیده

سابقه و هدف: *اسیتوباکترها* باکتری های گرم منفی و غیر تخمیری هستند که با عفونت های بیمارستانی در ارتباط هستند. این باکتری ها پاتوژن های فرصت طلب مهمی هستند که در صورت داشتن ژن متالوبتالاکتاماز (MBL_s) به تعداد زیادی از آنتی بیوتیک ها مقاوم می باشند. این مطالعه با هدف تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن های متالوبتالاکتاماز سویه های *اسیتوباکتر* جدا شده از نمونه های بالینی انجام شد.

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

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

نتیجه گیری: انتشار سویه های *اسیتوباکتر* تولید کننده متالوبتالاکتاماز نگران کننده است. به منظور کاهش و کنترل عفونت های *اسیتوباکتر* اجرای اقدامات نظارتی و تجویز مناسب آنتی بیوتیک ها ضروری است.

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

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

مقدمه

هوازی، غیر متحرک و چندشکلی (pleomorphic) هستند که معمولاً در همه جا از جمله آب، خاک، فاضلاب ریشه گیاهان و مواد غذایی یافت می شوند (۱ و ۲). تاریخ جنس *اسیتوباکتر*

اسیتوباکترها (*Acinetobacter*) کوکوباسیل های گرم منفی،

شناخته شده وجود دارد. در سال ۱۹۸۰ کارباپنم‌ها به عنوان گزینه درمانی جدید برای عفونت‌های باکتریایی از جمله اسیتوباکتر معرفی شدند. این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از درمان‌های انتخابی برای عفونت‌های ناشی از اسیتوباکتر بامانی می‌باشند و اغلب به عنوان آخرین راه حل در درمان عفونت‌های جدی مربوط به مقاومت چند دارویی باسیل‌های گرم منفی محسوب می‌شوند. با این وجود مقاومت باکتری‌ها نسبت به آن در حال گسترش می‌باشد (۱۴ و ۱۵).

کارباپنم‌ها توسط استرپتومایسس کاتیلیه (*Streptomyces cattleya*) تولید می‌شوند (۱۶). مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند کارباپنم در اسیتوباکتر به مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی نسبت داده شده است. از این میان می‌توان به تغییر پروتئین‌های غشای خارجی (OMPs)، پمپ‌های جریان چند دارویی و تغییرات در تمایل یا بیان پروتئین‌های متصل شونده به پنی سیلین (PBPs) و آنزیم‌ها اشاره نمود. تغییر پروتئین‌های متصل به پنی سیلین به عنوان یک منبع مهم مقاومت در اسیتوباکتر بامانی همراه با تولید کارباپنمازها منجر به ایجاد سطح بالای مقاومت به ایمی پنم می‌شوند (۱۷).

شایع‌ترین مکانیسم مقاومت آنزیمی در اسیتوباکتر بامانی تولید انواع بتالاکتامازها می‌باشد (۳). علاوه بر بتالاکتامازهای طبیعی، چندین بتالاکتاماز اکتسابی نیز به عنوان منبعی از مقاومت به کارباپنم (کارباپنمازها) در سویه اسیتوباکتر بامانی شناسایی شده که این آنزیم‌ها به عنوان متالوبتالاکتامازها شناخته می‌شوند (۱۴ و ۱۸). این آنزیم‌ها برای فعالیت نیازمند یون فلزی روی هستند (۱۹). متالوبتالاکتامازها اولین بار در سال ۱۹۶۰ در باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) شناخته شده‌اند (۲۰) و (۲۱). تاکنون ۵ نوع از MBLs: IMP، VIM، SIM-1، SPM و GIM-1 شناخته شده است. تاکنون فقط ۳ نوع اول در اسیتوباکتر بامانی شناسایی شده است. انواع مختلفی از bla_{VIM} و bla_{IMP} از ۳۷ کشور جهان گزارش شده است (۲۲).

ژن imipenemase (*imp*) مسئول تولید متالوبتالاکتاماز تایپ bla_{IMP} می‌باشد (۱). این نوع از متالوبتالاکتامازها می‌تواند ایمی پنم و همچنین برخی از سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف را

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

اسیتوباکتر بامانی (*Acinetobacter baumannii*)، رایج‌ترین و مهم‌ترین گونه اسیتوباکتر در جدایه‌های بالینی می‌باشد که شیوع آن در سرتاسر جهان گزارش شده است. سویه اسیتوباکتر بامانی یکی از پاتوژن‌های بیمارستانی بسیار مهم با مقاومت چند دارویی است که به دلیل مکانیسم‌های مقاومت ذاتی و اکتسابی و همچنین محدودیت گزینه‌های درمانی از نگرانی‌های عمده جامعه پزشکی محسوب می‌شود (۴).

اطلاعات متعددی نشان داده که برخی از گونه‌های اسیتوباکتر می‌توانند نسبت به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، مدت طولانی‌تری در شرایط خشک بر روی ذرات و گرد و غبار زنده بمانند و از منابع کربن و انرژی مختلفی استفاده کنند. سه عامل عمده شامل مقاومت به اکثر داروهای ضد میکروبی، مقاومت به خشکی و مقاومت به مواد ضد عفونی کننده به بقاء اسیتوباکتر بومانی در محیط بیمارستان کمک می‌کند (۳، ۵ و ۶). همچنین این باکتری‌ها به برخی فلزات همچون مس نیز مقاوم هستند (۷).

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

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک مشکل اساسی در درمان و کنترل عفونت‌ها محسوب می‌شود. گزارش‌هایی از سراسر دنیا در مورد مقاومت سویه‌های اسیتوباکتر به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های

تعیین هویت در سطح گونه از کیت تشخیصی GNA (Microgen™ GNA-ID System) استفاده شد. نتایج حاصل از کیت با استفاده از نرم افزار مربوطه تفسیر شدند. (ج) ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی: برای این منظور از دیسک های آنتی بیوتیکی تایگه سایکلین (۱۵ μg)، پلی میکسین B (۳۰۰ μg)، کلیستین (پلی میکسین E) (۴ μg)، ایمی پنم (۱۰ μg) و مروپنم (۱۰ μg) (پادتن طب، ایران) و روش انتشار دیسک مطابق با دستورالعمل (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute استفاده گردید (۲۶). کدورت ۰/۵ مک فارلند برای تلقیح به محیط مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) استفاده شد. برای بررسی فنوتیپ تولید متالوبتالاکتامازها، از ایمی پنم و دیسک ترکیبی ایمی پنم-EDTA یا روش سینرژیسم دیسک ترکیبی (Combined-Disc Synergy Test= CDST) استفاده گردید.

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

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

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه.

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

هیدرولیز نماید (۱۴). ژن Veronese imipenemas (*vim*) مسئول تولید متالوبتالاکتاماز نوع bla_{VIM} می باشد. آنزیم های VIM به تعدادی از بتالاکتامها مانند پی پراسیلین، سفتازیدیم، ایمی پنم و آزترونام مقاوم هستند. آنزیم های VIM اولین بار در سال ۱۹۹۷ در شهر ورونا، ایتالیا در یک جدایه سودوموناس آئروژینوسا (*Pseudomonas aeruginos*) توصیف شدند (۱۴، ۲۲ و ۲۳). مقاومت به عوامل ضد میکروبی در میان جدایه های بالینی ممکن است درمان عفونت ها را بسیار مشکل کند و همچنین اثر نامطلوبی بر روی نتایج بالینی و هزینه های درمانی بگذارد. سوخت و ساز باکتری ها باعث کموتاکسی نوتروفیل ها می شود و هدف قرار گرفتن این مراحل می تواند باعث کاهش بیماری و تقویت پاسخ ایمنی ذاتی شود (۲۴).

به نظر می رسد عوامل ضد میکروبی جدیدی که بتوانند در مقابل این باکتری فعالیت مؤثر داشته باشند در آینده نزدیک قابل دسترس نباشد (۲۵). این موضوع اهمیت استفاده صحیح از عوامل ضد میکروبی رایج را بیشتر می کند. به همین دلیل، داشتن اطلاعات کافی از اپیدمیولوژی ارگانیسیم ها و الگوی مقاومت آن ها به منظور انتخاب نوع و مقدار مناسب داروها در مراحل خاص ضروری است.

هدف از این مطالعه، شناسایی سویه های اسیتوباکتر، به دست آوردن الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و MIC مروپنم و هم چنین تعیین فراوانی ژن های MBL سویه های اسیتوباکتر جدا شده از نمونه های بالینی مختلف بیمارستان شهید محمدی بندرعباس بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه گیری: این مطالعه مقطعی-توصیفی بر روی ۸۱ سویه اسیتوباکتر جمع آوری شده از نمونه های بالینی بیماران بستری در بیمارستان شهید محمدی بندرعباس در سال ۱۳۹۲ انجام پذیرفت.

ب) غربالگری سویه های باکتری: به منظور شناسایی اولیه سویه های جمع آوری شده از رنگ آمیزی گرم و آزمون های حرکت، اکسیداز و کاتالاز استفاده شد. برای

و) آنالیز آماری: به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نسخه هیجدهم نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای استفاده شد. همچنین مرز معنی داری بر روی $P < 0/05$ قرار داده شد.

یافته‌ها

در مجموع تعداد ۸۱ سویه اسیتوباکتر به مدت ۱ سال از بیمارستان شهید محمدی بندرعباس جمع آوری گردید. بررسی پرونده بیماران نشان داد که ۶۶ نفر (۸۱/۴۸٪) بیمار مرد و ۱۵ نفر (۱۸/۷۲٪) از بیماران زن بودند. فراوانی بیماران با سن کمتر از ۴۰ سال، بین ۴۰ تا ۷۵ سال و بالاتر از ۷۵ سال به ترتیب، ۵۵/۵۵٪ (۴۵ بیمار)، ۳۸/۲۷٪ (۳۱ بیمار) و ۶/۷۳٪ (۵ بیمار) بود.

بیشترین نمونه جمع آوری شده مربوط به تراشه و پس از آن مربوط به زخم، ادرار، خون، بزاق، لوله قفسه سینه (chest tube) و خلط بود (جدول ۲). جدول شماره ۳ فراوانی اسیتوباکتر را در بخش‌های مختلف بیمارستانی نشان می‌دهد. در مرحله بعد با استفاده از کیت تشخیصی GNA گونه‌ها تعیین هویت گردیدند. از ۸۱ سویه تأیید شده، ۷۹ سویه (۹۷/۵۴ درصد) اسیتوباکتر بامانی، یک سویه (۱/۲۳ درصد) اسیتوباکتر همولایتیکوس و یک سویه (۱/۲۳ درصد) اسیتوباکتر لوفیی گزارش شد (جدول ۴).

اسیتوباکتر لوفیی از بخش سوختگی و نمونه زخم و اسیتوباکتر همولایتیکوس از بخش مراقبت‌های ویژه و از نمونه

جدول ۴: نتایج مربوط به آزمون های بیوشیمیایی کیت تشخیصی GNA.

آزمون ها	اسیتوباکتر همولایتیکوس	اسیتوباکتر لوفی	اسیتوباکتر بامانی
لیزین	-	+	-
اورنیتین	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
گلوکز	+	-	+
مانیتول	-	-	-
زایلوز	+	-	+
ONPG	+	-	-
ايندول	-	-	-
اوره آز	-	-	±
V.P	-	-	-
سیرات	+	-	+
TDA	-	-	-

ه) انجام PCR: به منظور تکثیر ژن های bla_{VIM} و bla_{IMP} از پرایمرهای موجود در جدول ۱ استفاده شد (ژن فناوران، ایران) (۲۸). مخلوط واکنش بعد از بهینه سازی شامل ۱۷/۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۱/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلی مراز، ۱/۵ میکرولیتر MgCl₂، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر و ۰/۵ میکرولیتر از dNTPs بود. در این مطالعه از باکتری سودوموناس واجد ژن های bla_{VIM} و bla_{IMP} به عنوان کنترل مثبت و از سودوموناس آئروژینوسا سویه ATCC27853 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر SensQuest (آلمان) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶ درجه برای ژن IMP و ۵۵ درجه سلیسیوس برای ژن VIM به مدت ۶۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید.

جدول ۲: توزیع فراوانی نمونه ها برحسب نمونه بالینی.

منبع	فراوانی	درصد
تراشه	۳۲	۳۹/۵۰
زخم	۱۲	۱۴/۸۱
بزاق	۹	۱۱/۱۱
ادرار	۸	۹/۸۸
خون	۶	۷/۴۱
لوله قفسه سینه	۴	۴/۹۴
خلط	۴	۴/۹۴
سایر نمونه ها	۶	۷/۴۱
جمع	۸۱	۱۰۰

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

بخش بیمارستانی	فراوانی	درصد
مراقبت های ویژه	۴۷	۵۸/۰۲
داخلی	۲۱	۲۵/۹۲
ارتوپدی	۳	۳/۷۰
اورژانس	۳	۳/۷۰
سایر بخش ها	۷	۸/۶۴
جمع	۸۱	۱۰۰

سویه که فاقد ژن *bla_{IMP}* بودند، ۵۱ سویه در محدوده مقاوم به مروپنم و ۱۷ سویه در محدوده حساس به مروپنم قرار داشتند. با استفاده از آزمون آماری مربع کای مشخص گردید که رابطه معناداری بین ژن مقاومت *bla_{IMP}* و MIC مروپنم وجود ندارد. از ۱۳ سویه حاوی ژن مقاومت متالوبتالاکتاماز *bla_{IMP}*، ۵۳/۸۲ درصد مربوط به نمونه تراشه و بقیه (۴۶/۱۸ درصد) مربوط به سایر نمونه ها بودند. از میان بخش‌های بیمارستانی، بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) با ۵۳/۸۱ درصد بیشتر از سایر بخش‌ها سویه حاوی ژن *bla_{IMP}* را به خود اختصاص داده بود. از بین بیمارانی که به سویه حامل ژن مقاومت متالوبتالاکتامازی *bla_{IMP}* آلوده بودند، ۱۰ نفر (۷۶/۹۰٪) مرد و ۳ نفر (۲۳/۱۰٪) زن بودند.

بحث

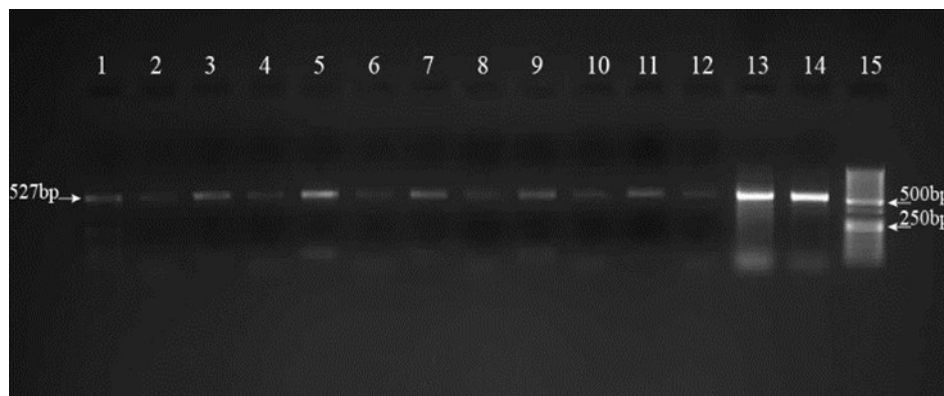
از اوایل سال ۱۹۸۰ تا به امروز عفونت‌های اسیتوباکتر *بامانی* یک مسئله قابل توجه در بسیاری از مناطق اروپا به ویژه انگلیس، فرانسه، آلمان، ایتالیا و اسپانیا به شمار می‌رود. انتقال سویه‌ها بین بیمارستان‌ها احتمالاً از طریق استقرار در بیماران انجام شده است. همچنین دلیل گسترش بین قاره‌ای سویه‌ها به ویژه اسیتوباکتر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

جدول ۵: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در اسیتوباکتر *بامانی* با استفاده از روش انتشار دیسک.

آنتی بیوتیک	مقاوم (%)	نیمه حساس (%)	حساس (%)
پلی میکسین B	۳/۶۸	۰	۹۶/۳۲
کلیستین (پلی میکسین E)	۴/۸۷	۰	۹۵/۱۳
تایگه سایکلین	۶/۲۴	۱۱/۱۰	۸۲/۶۶
ایمی پنم	۸۱/۵۰	۰	۱۸/۵۰
مروپنم	۸۱/۵۰	۰	۱۸/۵۰

لوله قفسه سینه به دست آمد. ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های به دست آمده نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های ایمی پنم و مروپنم با ۵۰/۸۱ درصد و کمترین مقاومت مربوط به پلی میکسین B (۳/۶۸ درصد) و کلیستین (۴/۸۷ درصد) بوده است (جدول ۵). با استفاده از روش CDST مشخص شد ۶۲ سویه (۷۶/۵۴٪) متالوبتالاکتاماز مثبت و ۱۹ سویه (۲۳/۴۵٪) متالوبتالاکتاماز منفی بودند. تعیین حداقل غلظت مهاري نشان داد که ۶۳ سویه (۷۷/۷۷٪) به مروپنم مقاوم و ۱۸ سویه (۲۲/۲۳٪) حساس بودند.

نتایج PCR حاکی از آن بود که تنها ۱۳ سویه (۱۶/۰۵٪) حاوی ژن *bla_{IMP}* بودند (شکل ۱). هیچ کدام از سویه ها دارای ژن *bla_{VIM}* نبودند (شکل ۲). در این مطالعه تمامی سویه‌های حاوی ژن *bla_{IMP}*، اسیتوباکتر *بامانی* بودند. اما اسیتوباکتر همولایتیکوس و اسیتوباکتر لوفیسی فاقد ژن‌های مقاومت بودند. از ۱۳ سویه حاوی ژن *bla_{IMP}*، ۱۲ سویه (۹۲/۳۱٪) دارای MIC $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ و یک سویه (۷/۶۹٪) دارای MIC $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ بودند. از ۶۸



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR در سویه های حامل ژن *imp*. ستون های ۱ تا ۱۲) نمونه های مثبت حاوی ژن *imp* (۵۲۷ جفت باز)، ستون های ۱۳ و ۱۴) کنترل مثبت، ستون ۱۵) مارکر ۵۰ جفت بازی.

دارد (۲۹). در مطالعه حاضر از ۸۱ سویه بالینی اسیتوباکتر، ۷۹ سویه (۹۷/۵۴٪) اسیتوباکتر بامانی، یک سویه (۱/۲۳٪) اسیتوباکتر لوفی و یک سویه (۱/۲۳٪) اسیتوباکتر همولاپتیکوس بودند. در مطالعه هاشمی‌زاده (Hashemizadeh) و همکاران در شیراز، از بین ۲۹۷ نمونه اسیتوباکتر جمع آوری شده از بخش مراقبت‌های ویژه، تعداد ۱۴۷ سویه اسیتوباکتر بامانی جدا شد (۲۹). خلت آبادی (Kheltabadi) و همکاران از ۶۰ سویه اسیتوباکتر، تعداد ۴۸ سویه اسیتوباکتر بامانی، ۶ سویه اسیتوباکتر لوفی و ۶ سویه سایر گونه‌های اسیتوباکتر را گزارش نمودند (۳۰). حضور گسترده سویه های اسیتوباکتر بامانی مقاوم به آنتی بیوتیک ها در سراسر جهان، نشان دهنده پتانسیل این باکتری در پاسخ سریع به تغییرات در فشار انتخابی زیست محیطی است (۶).

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های پاتوژن بیمارستانی ممکن است به طور واضحی از یک کشور به کشور دیگر و یا در مناطق مختلف یک کشور متفاوت باشد (۳۱). در مطالعه حاضر ۹۶/۳۲ درصد از سویه‌ها به پلی‌میکسین B و ۹۵/۱۳ درصد به کلیستین حساس بودند. همچنین ۱۸/۵۰ درصد از سویه‌ها به ایمپنم و مروپنم مقاوم بودند. در مطالعه باقری جوشقانی (Bagheri Josheghani) و همکاران در کاشان تمامی سویه‌های مورد مطالعه، نسبت به پلی‌میکسین B و کلیستین حساس و به ایمپنم و مروپنم مقاوم بودند (۳۲). در مطالعه افشاری‌اوری (Afshar Yavari) و همکاران در آنکارا ۸۲ درصد و ۹۴ درصد از سویه‌ها به ترتیب نسبت به ایمپنم به مروپنم مقاوم کامل داشتند. همچنین ۹۲ درصد از سویه‌ها نیز به تایگه سایکلین حساس بودند (۳۳).

در مطالعه حاضر با استفاده از روش E-test، حداقل غلظت مهار آنتی‌بیوتیک مروپنم برای سویه‌ها، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمامی سویه‌های مقاوم دارای $MIC \geq 32 \mu g/ml$ بودند. در مطالعه‌ای که توسط سیگال (Sigal) و الیشا (Elisha) اسیتوباکتر بامانی انجام شد، با انجام PCR ژن های *vim* و *imp* در هیچ سویه‌ای تکثیر نگردید (۳۴). در مطالعه حاضر نیز هیچ سویه‌ای دارای ژن *vim* نبود. در مطالعه

غلظت مهارکنندگی مروپنم، $MIC > 32 \mu g/ml$ به دست آمده که مشابه نتایج مطالعه حاضر می باشد (۳۴). در مطالعه لیم (Lim) و همکاران نیز $MIC \geq 16 \mu g/ml$ تعیین گردید (۳۵). در مطالعه حاضر از روش دیسک ترکیبی ایمپنم-EDTA یا (CDST-IPM) به منظور شناسایی MBLs استفاده شد. از ۸۱ نمونه مورد بررسی، ۶۲ سویه (۷۶/۵۴٪) MBL مثبت و ۱۹ سویه (۲۳/۴۵٪) MBL منفی بودند. در مطالعه‌ای که توسط پانديا (Pandya) و همکاران در سال ۲۰۱۱ برای شناسایی MBL در باسیل‌های گرم منفی انجام شد، از ۲۷ سویه مقاوم به کارباپنم، ۲۶ مورد (۹۶/۳٪) با روش دیسک ترکیبی MBL، CDST-IPM مثبت گزارش شدند. این روش نسبت به روش های دیگر (دیسک ترکیبی با سفنازیدیم) بیشترین حساسیت (۹۶/۳۰ درصد) را نشان داد (۲۱). در مطالعه پراکاش (Prakash) و همکاران در سال ۲۰۱۲، از میان ۲۰۰ نمونه بالینی، ۷۶ سویه (۳۸٪) به عنوان اسیتوباکتر شناسایی شدند که با استفاده از روش دیسک ترکیبی، ۹ سویه (۳۲٪) MBL مثبت بودند (۲۰).

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

تشکر و قدردانی

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

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

نتیجه گیری

در این مطالعه اسیتوباکتر بامانی شایع ترین گونه جدا شده از بیماران به ویژه در بخش ICU بود و مقاومت آنتی بیوتیکی

References

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

8. Neetu G, Negeswari G, Sauita J, Ravindro NM. Isolation and identification of *Acinetobacter* species with special reference to antibiotic resistance. *J Nat Sci Bio Med*. 2016; 6(1): 158-162.
9. Cosseau C, Romano-Bertrand S, Duplan H, Lucas O, Ingrassia I, Pigasse C, Roques C, Jumas-Bilak E. Proteobacteria from the human skin microbiota: Species-level diversity & hypotheses. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771416000045> (December 2016).
10. Christian MH, Rachel LK, Lauren DP, Eric PS, Mario FF. Medically relevant *Acinetobacter* species *require* a type ii secretion system and specific membrane-associated chaperones for the export of multiple substrates and full virulence. *PLOS Pathogen*. 2016; 12(1): 1-19.
11. Kim SW, Oh MH, Jun SH, Jeon H, Kim SI, Kim K, Lee YC, Lee JC. Outer membrane protein A plays a role in pathogenesis of *Acinetobacter nosocomialis*. *Virulence*. 2016; 7(4): 413-426.
12. Szabo D, Szentandrassy J, Juhasz Z, Katona K, Nagy K, Rokusz L. Important PER-1 producing *Pseudomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacter baumannii* and VIM-2 producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hungary. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2008; 7 (12): 1-5.
13. Salzer JFH, Rolling T, Schmiedel S, Klupp EM, Lange C, Seifert H. Severe community-acquired bloodstream infection with *Acinetobacter ursingii* in person who injects drugs. *Emerg Infect Dis*. 2016; 22(1): 134-137.
14. Dugal S, Fernandes A. Carbapenem hydrolysing metallo-β-lactamases. *Int J Curr Pharm Res*. 2011; 3(3): 9-16.
15. Shobha KL, Lenka PR, Sharma MK, Ramachandra L, Bairy I. Metallo-β-lactamase production among *Pseudomonas* species and *Acinetobacter* species in Coastal Karnataka. *J Clin Diagn Res*. 2009; 3(5): 1747-1753.
16. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β-lactamases accelerated by generations of β-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis*. 1997; 24 (Suppl 1): 19-45.
17. Almasaudi SB. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi J Biol Sci*. 2018; 25(3): 586-596.
18. Zarrilli R, Casillo R, Dipopolo A, Tripodi MF, Bagattini M, Cuccurullo S, Crivaro V, Raqone E, Mattei A, Galdieri N, Triassi M, Utili R. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in university hospital in Italy. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13(5): 481-489.
19. Jorge Da Silva G, Domingues S. Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganism*. 2016; 4 (29): 1-23.
20. Prakash MR, Veena M, Sharma A, Basavaraj KN, Viswanath G. The prospective evaluation of four convenient methods for detecting mbls in the clinical isolates. *J Clin Diagn Res*. 2012; 6(7): 1196-1199.
21. Pandya NP, Prajapati SB, Mehta SJ, Kikani KM, Joshi PJ. Evaluation of various methods for

- detection of metallo- β -lactamase (MBL) production in gram negative bacilli. *Int J Biol Med Res.* 2011; 2(3): 775-777.
22. Helen CM. Metallo- β -lactamase in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance?. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33(5): 405.e1-7.
 23. Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig. Drugs.* 2008; 17(2): 131-143.
 24. Bhuiyan MS, Ellett F, Murray GL, Kostoulis X, Cerqueira GM, Schulze KE, Mahamad Maifiah MH, Li J, Creek DJ, Lieschke GJ, Peleg AY. *Acinetobacter baumannii* phenylacetic acid metabolism influences infection outcome through a direct effect on neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016; 113(34): 9599-9604.
 25. Landman D, Quale JM, Mayorga D, Adedeji A, vangala K, Ravishankar J, Flores C, Brooks S. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY. *Arch Intern Med.* 2002; 162(13): 1515-1520.
 26. Hashemizadeh Z, Bazargani A, Emami A, Rahimi. *Acinetobacter* antibiotic resistance and frequency of ESBL-producing strains in ICU patients of Namazi Hospital (2008-2009). *J Qazvin Uni Med Sci.* 2010; 14(2): 47-53. [In Persian]
 27. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(10): 3798-3801.
 28. Peymani A, Nahaei MR., Farajnia S, Hasani A, Mirsalehian A, Sohrabi N, Abbasi L. High prevalence of metallo- β -lactamases-producing *Acinetobacter baumannii* in a teaching hospital in Tabriz, Iran. *Jpn J Infect Dis.* 2011; 64(1): 69-71.
 29. Braun G, Vidotto MC. Evaluation of adherence, hemagglutination, and presence of genes codifying for virulence factors of *Acinetobacter baumannii* causing urinary tract infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99(8): 839-844.
 30. Kheltabadi Farahani R, Moniri R, Shajari Gh, Nazem Shirazi MH, Musavi GH, Ghasemi A, Haj Aghazadeh S. Antimicrobial susceptibility patterns and the distribution of resistance genes among *Acinetobacter* species isolated from patients in Shahid Beheshti hospital, Kashan. *J Kashan Uni Med Sci.* 2008; 12(4): 61-67. [In Persian]
 31. Jafari S, Najafipour S, Kargar M, Abdollahy A, Mardaneh J, Fasihy Ramandy M, Abdollahi, Kheirabadi S, Moraveje A. Phenotypical evaluation of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Fasa Uni Med Sci.* 2012; 2(4): 254-258.
 32. Bagheri-Josheghani S, Moniri R, Firoozeh F, Sehhat M, Ghenaat Ghamsari E. Emergence of multidrug resistant, extended-spectrum β -lactamase and metallo- β -lactamase strain of *Acinetobacter baumannii* in ICU ward of Kashan Beheshti Hospital during 2013-14. *Feyz.* 2016; 20(1): 49-56.
 33. Afshar Yavari SH, Rota S, Caglar K, Fidan I. Determination of resistance pattern of isolated *Acinetobacter baumannii* from intensive care unite (ICUS) in Gazi hospital, Ankara. *J Urmia Nursing Midwifery.* 2016; 13(10): 912-918.

34. Segal H, Elisha G. Use of E-test MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2005; 56(3): 598-598.
35. Lim YM, Shin KS, Kim J. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates. J Clin Microbiol. 2007; 45(3): 902-905.
36. Ryoo NH, Ha JS, Jeon DS, Kim JR. Prevalence of metallo- β -lactamases in imipenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Korean J Clin Microbiol. 2010; 13(4): 169-172.



Determination of antibiotic resistance pattern and frequency of bla_{VIM} & bla_{IMP} genes in clinical isolates of *Acinetobacter* species in Bandar Abbas

Fahime Golestani¹, Sedigheh Javadpour², Farshid Kafilzadeh³, Zeinab Ghalandarzadeh Daryaei¹

¹M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

²Associate Professor, Molecular Medicine Research Center, Hormozgan Health Institute, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.

³Professor, Department of Microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

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

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

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

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

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Metallo-betalactamase, Imipenem, Meropenem, bla_{IMP} gene, bla_{VIM} gene.

Correspondence to: Sedigheh Javadpour

Tel: +98 7616689624

E-mail: sedigheh.javadpour@yahoo.com

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