Original Article

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

Bagheri-Josheghani S[1], Moniri R[2*], Firoozeh F[3], Sehhat M[4], Ghenaat Ghamsari E[1]

1- Student Research Committee, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.
2- Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.
3- Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.
4- Trauma Research Center, Shahid–Beheshti Hospital, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

Received April 12, 2014; Accepted November 11, 2015

Abstract:

Background: *Acinetobacter baumannii (A .baumannii*) is a nosocomial opportunistic pathogen especially in intensive care unit (ICU) patients with innate resistance to many antibiotics. The aims of this study were to determine the antibiotic resistance patterns, the frequency of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) and metallo-β-lactamase (MBL) enzymes among the *A. baumannii* isolated from tracheal tubes of hospitalized patients in ICU ward of Beheshti hospital (Kashan, Iran) during 2013-2014.

Materials and Methods: A descriptive cross-sectional study was performed on 40 isolates of *A .baumannii*. Antibiotic susceptibility test for seventeen antimicrobial agents was performed according to the CLSIs guidelines. ESBL and MBL producing isolates were confirmed by double-disk diffusion test. The presence of *bla*OXA51 gene was investigated using PCR.

Results: All of *A. baumannii* isolates were resistant to Piperacillin, Piperacillin-Tazobactam, Ceftazidime, Cefepime, Cefotaxime, Ceftriaxone, Meropenem, Imipenem, Ciprofloxacin, Levofloxacin, and Trimethoprim-Sulfamethoxazole; 100% of the isolates were multi-drug resistant (MDR). Two (5%) and 26 (65%) strains were ESBL– and MBL-positive, respectively. All isolates were positive for *bla*OXA.51 gene.

Conclusions: The study emphasizes the high frequency of MDR in Kashan Shahid Beheshti hospital. Since the resistance genes are located on mobile elements, to prevent further spread of the infection, rapid identification of the mentioned strains is essential.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Extended-spectrum beta-lactamase, Metallo-β-lactamase, Multidrug resistant

*** Corresponding Author.**
Email: moniri@kaums.ac.ir
Tel: 0098 913 361 2636
Fax: 0098 31 5554 1112

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2016; Vol. 20, No 1, Pages 49-56

Please cite this article as: 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.

ظهور *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو، مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و متالوبتالاکتاماز در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شهید بهشتی کاشان طی سال‌های ۹۳-۱۳۹۲

ساره باقری جوشقانی [۱]، رضوان منیری [۲*]، فرزانه فیروزه [۳]، مجتبی صحت [۴]، الهام قناعت قمصری [۵]

خلاصه:

سابقه و هدف: *اسینتوباکتر بومانی* یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماریزای ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی به‌خصوص در بخش مراقبت‌های ویژه است که دارای مقاومت ذاتی نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) و متالوبتالاکتاماز (MBL) در ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* جداشده از نمونه‌های لوله تراشه بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شهید بهشتی کاشان طی سال‌های ۹۳-۱۳۹۲ بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مقطعی توصیفی بر روی ۴۰ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* جداشده از بیمارستان شهید بهشتی انجام گرفت. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ۱۷ عامل ضد میکروبی، با روش دیسک دیفیوژن طبق معیار CLSI انجام پذیرفت. ایزوله‌های مولد (ESBLs) و (MBL) توسط تست Double Disk Diffusion تأیید گردیدند. تشخیص ژن *bla*OXA-51 برای تایید *اسینتوباکتر بومانی* با روش PCR انجام گرفت.

نتایج: از تعداد ۴۰ *ایزوله اسینتوباکتر بومانی* همه نمونه‌ها به پیپراسیلین، پیپراسیلین تازوباکتام، سفتازیدیم، سفپیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، مروپنم، ایمی‌پنم، سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، تری متوپریم سولفومتاکسازول مقاوم بودند. صد در صد ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو (MDR) بودند. ۲ ایزوله (۵ درصد) ESBL مثبت و ۲۶ ایزوله (۶۵ درصد)MBL مثبت بودند. تمامی ایزوله‌ها از نظر حضور ژن *bla*OXA-51 مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که فراوانی *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو در بیمارستان شهید بهشتی کاشان بالا است. از آنجایی‌که ژن‌های مقاومت بر روی عناصر متحرک قرار دارند، شناسایی سریع این سویه‌ها جهت جلوگیری از انتشار بعدی این میکروب، ضروری می‌باشد.

واژگان کلیدی: *اسینتوباکتر بومانی*، بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، متالوبتالاکتاماز، مقاوم به چند دارو

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۵، صفحات ۵۶-۴۹

مقدمه

پنومونی یکی از مهم‌ترین عفونت‌های بیمارستانی ایجاد شده ناشی از لوله تراشه و تهویه مکانیکی است. پنومونی بیمارستانی ناشی از عوامل عفونی حداقل ۴۸ ساعت بعد از بستری شدن در بیمارستان ایجاد می‌شود و از مشکلات جدی و پرهزینه در بیمارستان‌ها است. این پنومونی با عوارض جدی همراه است و به‌دنبال افزایش طول مدت بستری در ICU و استفاده مداوم از دستگاه تهویه مصنوعی ایجاد می‌شود [۱]. در این پنومونی عامل عفونی از لوله تراشه به داخل برونش‌ها آسپیره شده و به‌دنبال آن تکثیر و تهاجم باکتری‌ها در پارانشیم ریه ایجاد می گردد. در چند دهه اخیر *اسینتوباکتر بومانی*، از مهم‌ترین عوامل جدی عفونت‌های بیمارستانی از قبیل عفونت‌های ادراری، باکتریمی، عفونت پس از عمل جراحی، و پنومونی ایجاد شده به‌دنبال ونتیلاسیون Ventilator (VAP) Associated Pneumonia است [۲]. بیمارانی که از دستگاه تهویه مصنوعی، کاتتر وریدی و ادراری استفاده نموده و آنهایی‌که تحت عمل جراحی قرار گرفته‌اند، بیشتر در معرض عفونت با این باکتری قرار دارند [۳]. متاسفانه به‌دلیل مصرف بی‌رویه این آنتی‌بیوتیک‌ها شیوع سویه‌های مقاوم چند دارویی در سال‌های اخیر در حال افزایش است [۴]. تشخیص سریع این باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌منظور کنترل و جلوگیری از انتشار سویه‌های مقاوم به داروها در مراکز درمانی و هم‌چنین کمک به پزشکان جهت

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۲] استاد، مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۳] استادیار، گروه میکروب شناسی و ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۴] استادیار، مرکز تحقیقات تروما، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۵] دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

***نشانی نویسنده مسئول:**

کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی‌و ایمنولوژی

تلفن: ۰۹۱۲ ۳۶۱۲۶۳۶ **دورنویس:** ۰۳۱ ۵۵۵۴۱۱۱۲

پست الکترونیک: moniri@kaums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۲۳ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۴/۸/۲۰

انتخاب آنتی بیوتیک مناسب جهت درمان بیماران حائز اهمیت می‌باشد [۵]. در مطالعه‌ای که بین سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۴ در یک بیمارستان در ایتالیا صورت گرفت نشان داده شد که ۵۹ درصد ایزوله‌های *اسینتوباکتر* جدا شده، *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو (MDR) بوده‌اند، به‌طوری‌که به همه عوامل آمینوگلیکوزیدها و کاربا‌پنم‌ها مقاوم بوده‌اند [۶]. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ در فرانسه دریک اپیدمی ناشی از یک سویه *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو صورت گرفته، نشان داده شد که ۲۶ درصد مرگ‌ومیر ناشی از این سویه بوده است. در مقایسه‌ای که بین این سویه و یک سویه حساس به آنتی‌بیوتیک صورت گرفت، مشخص شد که سویه MDR در یک ناحیه ژنومی ۸۶kb چندین ژن مقاومت را هم‌زمان حمل می‌کند که همین امر باعث مقاومت این سویه نسبت به چندین خانواده آنتی‌بیوتیکی شده که سبب ایجاد مشکل درمانی و محدود شدن انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب در درمان بیماران در آن کشور شده است [۷]. ۱۰۰ درصد از ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* مورد بررسی در مطالعه‌ای که توسط بازرگانی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در شیراز انجام داده شد فنوتیپ مقاومت به چند دارو را دارا بودند [۸]. در مطالعه‌ای که فراهانی و همکاران او در سال ۱۳۸۶ روی نمونه‌های *اسینتوباکتر* انجام دادند میزان سویه‌های MDR ۱۵ درصد گزارش شده است [۹]. انتقال افقی اینتگرون‌ها موفق‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاومت و پیدایش گونه‌هایی با مقاومت چندگانه است. یکی از عوامل مهم ایجاد کننده مقاومت چند دارویی در جنس *اسینتوباکتر* در محیط بیمارستان در پاسخ به افزایش فشار آنتی بیوتیکی ایجاد شده است. بنابراین کنترل مصرف آنتی بیوتیک یک نقش مهم در جهت جلوگیری از ظهور عفونت اسینتوباکتر دارا می‌باشد. سویه‌های مقاوم *اسینتوباکتر بومانی* در بیمارستان‌ها باعث پیامدهای نامطلوب می‌شود؛ این سویه‌های مقاوم به چند دارو به‌سرعت در بین بیماران بستری در بیمارستان درحال گسترش می‌باشند [۱۰]. مکانیسم‌های مقاومت *اسینتوباکتر بومانی* شامل تولید بتالاکتامازها، پمپ‌های ترشحی و تغییرات غشای خارجی می‌باشد. مکانیسم مقاومت به بتالاکتام در *اسینتو-باکتر بومانی* تجزیه آنزیمی توسط بتالاکتامازها می‌باشد. آنزیم‌های بتالاکتاماز بر اساس ساختمان اولیه‌شان به چهار دسته (A تا D) تقسیم‌بندی می‌شوند که آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف جزء گروه A بوده و موجب هیدرولیز سفالوسپورین‌های نسل اول، دوم، سوم و مونوباکتام‌ها شده، اما توسط مهارکننده بتالاکتامازها از جمله کلاونیک اسید مهار می‌شوند [۱۱]. متالوبتالاکتامازها جزء گروه B بتالاکتامازها هستند. متالوبتالاکتامازها توانایی غیرفعال کردن تمامی آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام به‌جز مونوباکتام را دارند. متابتالاکتامازها برای فعالیت کاتالیتیکی خود نیاز به کوفاکتور فلزی روی دارند که توسط EDTA مهار می‌شوند. ژن‌های کلاس OXA از خانواده D–سرین بتالاکتاماز شامل *bla*OXA24، *bla*OXA58، *bla*OXA23 و *bla*OXA51 بوده که دارای فعالیت هیدرولیز کاربا‌پنم می‌باشند. در میان این چهار گروه اصلی ژن *bla*OXA-51 با توجه به مطالعات مختلف در سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* به‌طور ذاتی وجود دارد و می‌تواند روش سریع برای تشخیص *اسینتوباکتر بومانی* باشد [۱۲]. انتقال ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی *اسینتوباکتر بومانی* از طریق کروموزومی، پلاسمیدها و ترانسپوزن‌ها انجام می‌پذیرد. با افزایش و ظهور این سویه‌های مقاوم، درمان عفونت‌های ناشی از *اسینتوباکتر* به‌عنوان مشکل مهم بهداشتی در بسیاری از کشورها مورد توجه است [۱۳]. با توجه به عدم آگاهی نسبت به شیوع عفونت *اسینتوباکتر بومانی* در بخش مراقبت‌های ویژه در بیمارستان شهید بهشتی کاشان و به‌منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، تولید آنزیم بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) و متالوبتالاکتاماز (MBL) در ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از نمونه‌های لوله تراشه بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شهید بهشتی کاشان طی سال‌های ۹۳-۱۳۹۲ انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد بررسی و نمونه‌ها:

این مطالعه مقطعی توصیفی طی یک دوره شش ماهه از آبان ۱۳۹۲ تا فروردین ۱۳۹۳ انجام گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده بعد از کشت در محیط Trypticase soy broth (TSB) به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی کاشان منتقل شده و ایزوله‌ها با تست‌های بیوشیمیایی استاندارد مورد تأیید قرار گرفت. تعداد ۴۰ سویه *اسینتوباکتر بومانی* از ترشحات لوله تراشه بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان آموزشی شهید بهشتی کاشان جدا گردید.

کشت و جدا سازی:

نمونه‌ها در محیط مک‌کانکی و بلاد آگار کشت داده شده، سپس پلیت‌ها به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در صورت مشاهده رشد، پس از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده کوکسی و کوکوباسیل گرم منفی با تست اکسیداز تایید شدند. در مرحله بعد نمونه‌های اکسیداز منفی با استفاده از API تهیه شده از (Microgen Bioproducts Co.UK) تعیین هویت شدند.

بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها:

بر روی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده تست حساسیت آنتی بیوتیکی با ۱۷ دیسک آنتی بیوتیک پیپراسیلین (۱۰۰µg)، آمپی‌سیلین/سولباکتام (۱۰/۱۰µg)، پیپراسیلین-/تازوباکتام (۱۰۰/۱۰µg)، سفتازیدیم (۳۰µg)، سفپیم (۳۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفتریاکسون (۳۰µg)، مروپنم (۱۰µg)، ایمی‌پنم (۱۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، لووفلوکساسین (۵µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg)، تتراسیکلین (۱۰µg)، تری متوپریم سولفومتاکسازول (۱/۲۵/۲۳/۷۵ µg)، کلیستین (۱۰ µg)، پلی میکسین (۳۰۰ Unit) از شرکت Mast انگلیس به‌روش دیسک دیفیوژن طبق معیار CLSI (موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی) انجام پذیرفت. *اشرشیا کلی* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل کیفی مورد استفاده قرار گرفت. سویه‌های مقاوم به حداقل سه کلاس آنتی بیوتیک (کاربا‌پنم‌ها، فلوروکوئینولون‌ها، پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، مونوباکتام‌ها و آمینوگلیکوزیدها به‌عنوان سویه‌های مقاوم به چند دارو در نظر گرفته شدند [۱۴].

تعیین ESBL با روش Double-disk-diffusion Test:

جهت انجام این تست، باکتری‌ها بر روی محیط مولر هینتون کشت داده شده و دیسک سفوتاکسیم (۳۰µg) در مقابل دیسک ترکیبی سفوتاکسیم – کلاونیک اسید (۳۰µg+۱۰ µg) آن قرار داده شد. افزایش قطر هاله مهاری بیش از ۵ میلی‌متر در اطراف دیسک حاوی اسید کلاولانیک به‌عنوان سویه مولد ESBL تعیین شد [۱۵].

تعیین MBL با روش Double-disk-diffusion Test:

جهت انجام این تست، باکتری‌ها بر روی محیط مولر هینتون کشت داده شده و دیسک ایمی‌پنم (۳۰µg) در مقابل دیسک ترکیبی ایمی‌پنم- EDTA (750µg/disk) (ROSCO، دانمارک) قرار داده شد. افزایش قطر هاله مهاری ≤ ۷ میلی‌متر در مقابل دیسک ایمی‌پنم-EDTA نسبت به دیسک ایمی‌پنم به‌تنهایی به‌عنوان سویه MBL در نظر گرفته شد [۱۵].

تکثیر ژن *bla*OXA-51 به‌روش PCR:

در این مطالعه پس از تشخیص *اسینتوباکتر بومانی* با روش بیوشیمیایی برای تائید از ژن *bla*OXA-51 که اختصاص به گونه *اسینتوباکتر بومانی* دارد به‌روش PCR تعیین و استخراج ژن با روش boiling انجام پذیرفت. پرایمر مورد استفاده (353 bp)
5’-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3’
5’- TGGATTGCACTTCATCTTGG-3’
از شرکت بایونیر کشور کره تهیه شد [۱۶]. آزمون در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از Taq PCR Master Mix (از شرکت بایونیر کره)، ۱۰پیکومول از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر از DNA الگو تحت شرایط زیر با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر (اپندورف آلمان) انجام شد: دناتوراسیون اولیه (۹۴ درجه به‌مدت ۵ دقیقه)، ۳۰ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون (۹۴ درجه به‌مدت ۲۵ ثانیه)، اتصال پرایمر (۴۰ درجه به‌مدت ۵۳ ثانیه) و تکثیر(۷۲ درجه به‌مدت ۵۰ ثانیه) و در نهایت تکثیر نهایی (۷۲ درجه به‌مدت ۶ دقیقه) [۱۶]. پس از انجام آزمون، محصول PCR در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تحت اشعه UV عکس برداری گردید. در این آزمون از سویه استاندارد *اسینتوباکتر بومانی* ATCC 19606 به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد [۱۴]. محصول PCR جهت تایید از نظر حضور ژن برای ترادف‌یابی (Sequencing) به شرکت بایونیرکره ارسال شد. از مارکر ۱۰۰bp تولید شرکت سیناژن برای شناسایی محصول PCR استفاده شد.

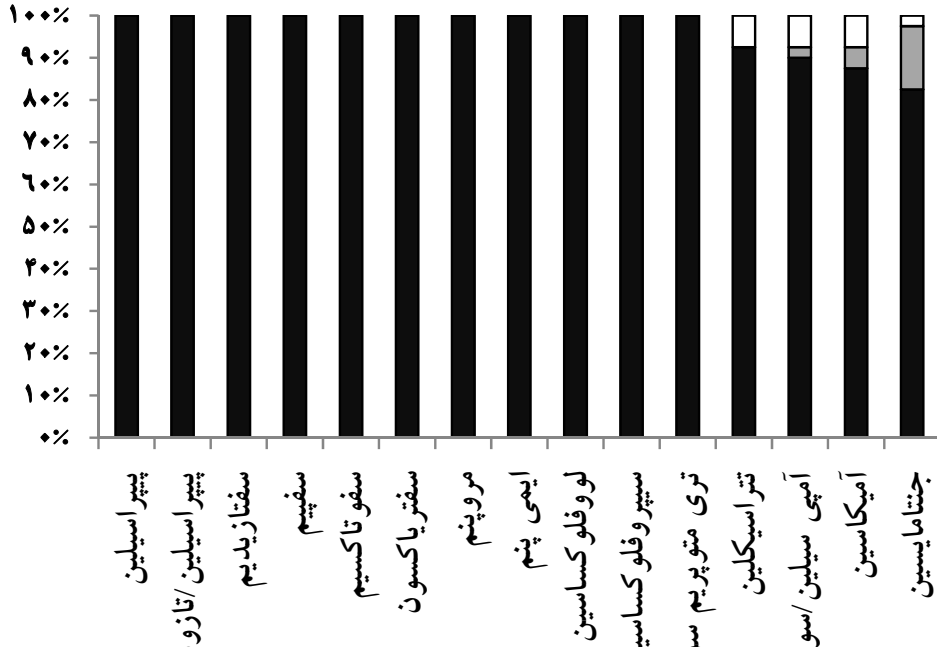
تعیین توالی و ترادف DNA و آنالیز داده‌ها:

محصول PCR به‌دست آمده برای ژن به شرکت تکاپو-زیست برای تعیین توالی فرستاده شد و توالی‌ها با استفاده از نرم-افزار Chromas ویرایش ۱/۷/۵ بررسی شدند.

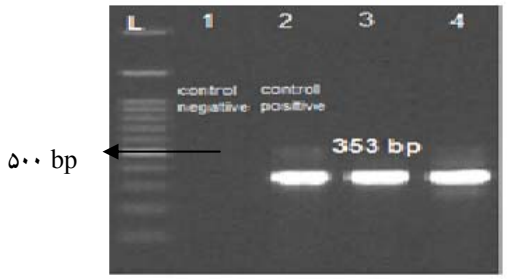
نتایج

تعداد ۴۰ سویه *اسینتوباکتر بومانی* از نمونه‌های لوله تراشه جدا گردید. متوسط سن افراد مورد مطالعه ۲۲/۶۲± ۵۳/۸۸ سال بود. از ۴۰ بیمار مورد مطالعه ۲۱ نفر (۵۲/۵ درصد) مرد بودند. صد درصد سویه‌ها به کلاس سفالوسپورین‌ها، کینولون‌ها و کاربا‌پنم‌ها مقاوم بودند و به تتراسیکلین ۹۲/۵ درصد، آمپی-سیلین/سولباکتام ۹۰ درصد، آمیکاسین و جنتامایسین ۸۷/۵ و۸۲/۵ درصد مقاومت نشان دادند و تمامی سویه‌ها به کلیستین و پلی-میکسین حساس بودند (نمودار شماره ۱). صد درصد سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو (MDR) بودند. سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* از نظر مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها تفکیک شدند؛ به‌طوری‌که ۲۸ سویه (۷۰ درصد) به ۱۵ آنتی بیوتیک و ۱۲ سویه (۳۰ درصد) به ۱۳ و ۱۴ آنتی بیوتیک مورد آزمایش مقاوم بودند. دو سویه (۵ درصد) و ۲۶ سویه (۶۵ درصد) به‌ترتیب تولید آنزیم بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) و متالوبتالاکتاماز(MBL) مثبت بودند. تمامی ایزوله‌ها از نظر حضور ژن *bla*OXA-51 مثبت بودند.

مثبت بودند که نشان از تایید حضور *اسینتوباکتر بومانی* است (شکل شماره ۱). نتایج ترادف‌یابی نیز حضور ژن مورد نظر را تایید کردند.



نمودار شماره ۱- توزیع درصد فراوانی الگوی مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی در ۴۰ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از نمونه لوله تراشه بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شهید بهشتی کاشان



شکل شماره ۱- نتایج PCR ژن *bla*OXA51 سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از نمونه لوله تراشه بیماران بستری در بیمارستان بهشتی کاشان

ستون‌های شماره ۳ و ۴ محصولات PCR مثبت ژن با اندازه ۳۵۳ bp هستند. باندهای شماره ۲ کنترل مثبت و باند شماره ۱ کنترل منفی است. چاهک L مارکر (ladder) ۱۰۰bp است.

بحث

اسینتوباکتر بومانی MDR از مهم‌ترین عوامل خطر عفونت بیمارستانی به‌شمار می‌آید [۱۲]. در این مطالعه شیوع *اسینتوباکتر بومانی* MDR ۱۰۰ درصد بود؛ به‌این‌صورت که به بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف، فلورکینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها هم‌زمان مقاوم بودند. در مطالعه میرنژاد و همکاران در سال ۱۳۹۰ فنوتیپ مقاومت به چند دارو در ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* ۸۲ درصد گزارش گردیده است [۱۷]. در مطالعه منیری و همکاران در سال ۱۳۸۶ روی نمونه‌های *اسینتوباکتر* جداشده از بیماران بستری در بیمارستان شهید بهشتی کاشان ایزوله‌های MDR ۱۵ درصد گزارش گردید [۱۸] که با نتایج این تحقیق مطابقت نداشت. این افزایش قابل توجه ممکن است ناشی از تفاوت در نمونه‌های بالینی مورد بررسی، زمان انجام مطالعه، تنوع در الگوی مصرف آنتی بیوتیک‌های مصرفی و عدم به‌کارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت بیمارستان در سال‌های اخیر بوده که منجر به ظهور و انتشار باکتری‌های MDR در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شده است. در این مطالعه بیشترین مقاومت به سفالوسپورین‌ها، کینولون‌ها و کارباپنم‌ها مشاهده شد. باتوجه به اینکه کاربا‌پنم‌ها داروهای انتخابی جهت درمان بیماران آلوده به ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* با مقاومت دارویی چندگانه هستند، لذا آمار بالای مقاومت نسبت به این داروها نگران کننده بوده و نشان از محدود شدن گزینه‌های درمانی است [۱۶]. در مطالعه کاشان در سال ۸۶، مقاومت به ایمی‌پنم ۲۵ درصد گزارش شده [۱۸] و در مطالعه حاضر مقاومت به ایمی‌پنم ۱۰۰ درصد بود. از آن‌جایی‌که تمامی بیماران مورد مطالعه سابقه تجویز مصرف داروهای کاربا‌پنم را داشتند، یکی از دلایل افزایش مقاومت می‌تواند مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک بدون توجه به نتایج آنتی بیوگرام در بیماران آلوده به *اسینتوباکتر* باشد. سایر محققین در ایران مقاومت کاربا‌پنم را از

۲۵ تا ۹۷/۷ درصد گزارش کرده‌اند [۲۵-۱۸]. در سایر نقاط جهان نیز میزان مقاومت به کاربـاپنم گـزارش شـده اسـت. در مطالعـه Hujer و همکاران بر روی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از نمونه‌های کلینیکی بیماران در سال ۲۰۰۵، ۲۰ درصد سـویه‌هـا مقاوم بوده‌اند [۲۶]، درحالی‌که در مطالعـه حاضـر ۱۰۰ درصـد از *اسینتوباکتر*های ایزوله شده نسبت به ایمی‌پنم مقاومت نشان دادنـد. اختلاف مشاهده شده در نتایج می‌تواند به‌دلیل تفاوت در پروتکـل درمانی استفاده شده در دو کشور باشد. مقاومت به کارباپنم‌هـا در مصر ۷۰ درصد [۲۷]، در عربستان سعودی ۳۲/۶ درصد [۲۸]، و در نیجریه ۶۴/۳ درصد گزارش شده است [۲۹]. به‌طور کلی بر اساس نتایج به‌دست آمده از این تحقیق و سایر مطالعات، به‌دلیل تفـاوت در سطح کیفی برنامه‌های حساسیت ضد میکروبی، الگوی مصرفی آنتی بیوتیکی، موقعیت جغرافیایی و عوامل محیطی، مقاومت ضـد میکروبی متفاوت در بین سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* در هر کشور و یا مناطق جغرافیایی مختلف و حتی بیمارستان‌های مختلف یـک کشور وجود دارد و از طرف دیگر این الگوهای مقاومتی بـه‌طـور دائم در حال تغییر می‌باشد که باید مورد توجه قرار گیرد [۲۶]. در این مطالعه تمامی سویه‌های *اسینتوباکتر* بومانی به پلـی‌میکسـین و کلیستین حساسیت داشتند که این یافته‌ها با مطالعات قبلی مطابقت دارد. در مطالعات سایر کشورها میـزان حسـایت بـه کلیسـتین در الجزایـر ۱۰۰ درصـد، در عربسـتان سـعودی ۷۰/۹ درصـد، و در کویت ۹۲/۵ درصد گزارش شده است [۳۰]. در یـک مطالعـه کـه توسط مهاجرانی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در غرب ایـران انجـام شد میزان حساسیت به کلیستین و پلی‌میکسین ۸۹/۴ و ۸۶/۵ درصد گزارش شـده اسـت [۲۰]. هـم‌چنـین، در بررسـی شـاهچراغی و همکارانش ۹۵/۸ درصد سویه‌های *اسینتوباکتر* به کلیستین حسـاس بودند [۳۱]. دلیل احتمالی حساس بودن نسبت به این آنتی بیوتیک-ها، تجویز کم این دو آنتی بیوتیک در دوره اخیر بوده اسـت. لـذا، به‌نظر می‌رسد کلیستین و پلی‌میکسین تنها انتخاب آنتی بیوتیکی در درمان این عفونت‌ها بوده، می‌تواند به‌صورت ترکیبی با سـایرآنتی بیوتیک‌ها استفاده گـردد [۲۶]. بنـابراین، بررسـی میـزان مقاومـت ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* در این تحقیق، اطلاعات کافی بـرای پزشکان در زمینه دست‌یابی بـه‌روش‌هـای مناسـب بـرای درمـان عفونت‌های ناشی از ایزوله‌های *اسـینتوباکتر بومـانی* را بـه‌همـراه خواهد داشت. مقاومت به کارباپنم‌ها به‌دلیل تولیـد دو بتالاکتامـاز (متالوبتالاکتاماز و بتالاکتاماز هیدرولیز کننده کارباپنم کـلاس(D) مـی‌باشـد [۱۲]. در مطالعـه حاضـر ۶۵ درصـد از ایزولـه‌هـای *اسینتوباکتر بومانی* مورد بررسی دارای آنزیم‌هـای متالوبتالاکتامـاز بودند که حاکی از گسترش شیوع این نوع مقاومت در ایـن منطقـه است. در سال ۱۹۹۸ Pino و همکارانش در فرانسه گزارش کردند که ۱۰ درصد ایزوله‌های *اسینتو باکتر بومانی* جدا شده از نمونه‌های بیماران بستری در چندین بیمارستان، متالوبتالاکتاماز مثبـت بودنـد [۱۵]. در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۹ توسط پیمانی و همکـاران در تبریز انجام شد، ۴۹ درصد از *اسینتوباکتر بومانی*‌های جدا شـده از نمونه‌های کلینیکی متالوبتالاکتاماز تولید می‌کردنـد [۳۲]. در سـال ۲۰۱۰ انور و همکاران گزارش نمودند که ۴۴/۸ درصد ایزوله‌هـای *اسینتوباکتر بومانی* جدا شـده از نمونـه‌هـای بیمـاران بسـتری در بیمارستان بنگلادش، متالوبتالاکتاماز مثبت بودند [۳۳]. به‌نظر مـی-رسد افزایش این نوع مقاومت به‌دلیل تجویز بیش از اندازه ایمـی-پنم برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری باشد. در مطالعـه ما ۵ در صد سویه‌هـا ESBL مثبـت بودنـد. در مطالعـه اولیـا و همکاران در سال ۲۰۱۱ در تهران میزان ESBL را در ایزوله‌هـای *اسینتوباکتر بومانی* جـدا شـده از بیمـاران سـوختگی ۲۱ درصـد گزارش کرده‌اند [۱۵]. این تفاوت‌ها ممکن است بـه‌دلیـل الگـوی مصرفی آنتی بیوتیک، روش مورد استفاده و نمونه‌هـای مختلـف و تغییراتی که در سویه‌های باکتری ممکن است ایجـاد شـود، باشـد [۱۸]. ژن‌های OXA تایپ از خانواده D-سرین بتالاکتامـاز دارای فعالیت هیدرولیز کارباپنم بوده و مقاومت به کارباپنم‌هـا از طریـق ایـن ژن‌هـا صـورت مـی‌گیـرد [۱۳]. در ایـن مطالعـه میـزان ژن *bla*OXA51 در بین تمامی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مشاهده شد. بروز این ژن از ایران و سایر نقاط جهان با شیوع بالا گـزارش گردیده است. Turton و همکاران در سال ۲۰۰۶ [۱۳]، Walsh و همکـاران در سـال ۲۰۱۰ [۳۴]، Zavascki و همکـاران در سـال ۲۰۱۰ [۳۵]، مروت و همکـاران در تهـران در سـال ۲۰۰۹ [۳۶]، و سهرابی و همکاران در بررسی‌ای که در سال ۲۰۱۲ در شمال ایران انجام دادند، این ژن را گزارش کرده‌اند [۳۷]. این مطالعـه هماننـد سایر مطالعات تائید کرد که شناسایی ژن *bla*OXA51 می‌توانـد راه ساده‌ای برای تشخیص *اسینتوباکتر بومانی* باشد. ژن مذکور بـر روی ترانسپوزون، پلاسمید و یا اینتگرون واقع شده است و چـون این ساختارها به‌راحتی می‌توانند جابه‌جا شوند سبب انتشار جهانی آن گردیده است [۱۳].

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که صـد درصـد ایزولـه‌هـای *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از لوله تراشه بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان مقاوم به چند دارو و مقاوم به کابـاپنم بودند که این مسئله زنگ خطری جدی در بیمارستان می‌باشد. لذا، لزوم توجه به معیارهای کنترل عفونت‌های بیمارستانی موثری نظیـر

شناسایی بیماران آلوده، یافتن منبع کولونیزاسیون باکتری و کنتـرل مصرف آنتی بیوتیک در بیمارستان را باید به‌کار برد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامـه مقطـع کارشناسـی ارشد میکروب شناسی و طرح تحقیقاتی شـماره ۹۲۱۴۹، مصـوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان می‌باشد. پژوهشگران از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشـگاه علـوم پزشکی کاشان، گروه محترم میکروب شناسی و پرسنل بیمارسـتان شهید بهشتی کاشان به‌ویژه آقای حسن کوشا که در پیش‌بـرد ایـن تحقیق یاری ارزنده و سودمند داشته‌اند، قدردانی به‌عمل می‌آورند.

References:

[1] Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. ***Lancet*** 2003; 361(9374): 2068-77.

[2] Aybar Türkoğlu M, Topeli Iskit A. Ventilator-associated pneumonia caused by high risk microorganisms: a matched case-control study. ***Tuberk Toraks*** 2008; 56(2): 139-49.

[3] Lambiase A, Rossano F, Piazza O, Del Pezzo M, Catania MR, Tufano R. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with VAP in an intensive care unit. ***New Microbiol*** 2009; 32(3): 277-83.

[4] Kluytmans-Vandenbergh MF, Kluytmans JA, Voss A. Dutch guideline for preventing nosocomial transmission of highly resistant microorganisms (HRMO). ***Infection*** 2005; 33(5-6): 309-13.

[5] Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2007; 51(10): 3471-84.

[6] Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A, Tripodi MF, Bagattini M, Cuccurullo S, et al. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multi drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. ***Clin Microbiol Infect*** 2007; 13(5): 481-9.

[7] Roberts MC. Multidrug-resistant genes are associated with an 86-kb island in *Acinetobacter baumannii*. ***Trends Microbiol*** 2006; 14(9): 375-8.

[8] BazarganiA, Hashemizadeh Z. Bacteremia due to multidrug-resistant (MDR) and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Acinetobacter baumannii*. ***Afr J Microbiol Res*** 2011; 5(21): 3483-6.

[9] Farahani RK, Moniri R, Dastehgoli K. Multi-Drug Resistant *Acinetobacter*-Derived Cephalos porinase and OXAs-etC Genes in Clinical Specimens of *Acinetobacter* spp. Isolated From Teach-ing Hospital. ***Jundishapur J Microbiol*** 2013; 6(2): 181-5.

[10] Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. ***Int J Antimicrob Agents*** 2013; 41(1): 11-9.

[11] Bradford PA. Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. ***Clin Microbiol Rev*** 2001; 14(4): 933-51.

[12] Evans BA, Hamouda A, Towner KJ, Amyes SG. OXA-51-like β-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. ***Clin Microbiol Infect*** 2008; 14(3): 268-75.

[13] Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acineto bacter baumannii* by detection of the *bla*OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species***.*** ***J Clin Microbiol*** 2006; 44(8): 2974-6.

[14] Jorgensen JH, Hindler JF. New consensus guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. ***Clin Infect Dis*** 2007; 44(2): 280-6.

[15] Owlia P, Azimi L, Gholami A, Asghari B, Lari AR. ESBL-and MBL-mediated resistance in *Acinetobacter baumannii*: a global threat to burn patients***.*** ***Infez Med*** 2012; 20(3): 182-7.

[16] Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, Rasoolinejad M, Sadeghifard N, Aligholi M, et al. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of *bla*OXA genes among *Acinetobacter spp*. isolated from patientsat Tehran hospitals. ***Jpn J Infect Dis*** 2008; 61(4): 274-8.

[17] 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): 140-5.

[18] Moniri R, Farahani RK, Shajari G, Shirazi MN, Ghasemi A. Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance in *acinetobacter spp*. With emergence of multidrug-resistant strains. ***Iran J Public Health*** 2010; 39(2): 63-8.

[19] Khosrishahi N, Sharifi M. Isolation of carbapenem resistant *acinetobacter baumannii* (crab) strains from patients and equipments of intensive care units (icus) at qazvin between 2005-2006. ***Iran J Med Microbiol*** 2007; 1(3): 33-8. [in Persian]

[20] Mohajeri P, Farahani A, Feizabadi MM, Ketabi H, Abiri R, Najafi F. Antimicrobial Susceptibility Profiling and Genomic Diversity of *Acinetobacter*

baumannii isolates: A study in western Iran. ***Iran J Microbiol*** 2013; 5(3): 195-202.
[21] Safari M, Saidijam M, Bahador A, Jafari R, Alikhani MY. High Prevalence of Multidrug Resistance and Metallo-beta-lactamase (MβL) producing *Acinetobacter Baumannii* Isolated from Patients in ICU Wards, Hamadan, Iran. ***J Res Health Sci*** 2013; 13(2): 162-7.
[22] Jafari R, Karbasizade V. Frequency and Antimicrobial Susceptibility of *Acinetobacter baumannii* in Burn infections in Isfahan, Iran. ***Adv Biores*** 2014; 5(2): 148-52.
[23] Amini M, Davati A, Golestanifard M. Frequency of Nosocomial Infections with Antibiotic Resistant Strains of *Acinetobacter spp*. in ICU Patients. ***Iran J Pathol*** 2012; 7(4): 241-5.
[24] Japoni S, Japoni A, Farshad S, Ali AA, Jamalidoust M. Association between existence of integrons and multi-drug resistance in *Acinetobacter* isolated from patients in southern Iran. ***Pol J Microbiol*** 2011; 60(2): 163-8.
[25] Talebi-Taher M, Latifnia M, Javad-Moosavai SA, Adabi M, Rastgar Lari A, Fatahi Abdizadeh M, et al. Risk factors and antimicrobial susceptibility in ventilator associated pneumonia: a brief report. ***Tehran Univ Med J*** 2012; 70(9): 577-82.
[26] Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter sp*. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2006; 50(12): 4114-23.
[27] Al-Agamy MH, Khalaf NG, Tawfick MM, Shibl AM, Kholy AE. Molecular characterization of carbapenem-insensitive *Acinetobacter baumannii* in Egypt. ***Int J Infect Dis*** 2014; 22: 49-54.
[28] Al Johani SM, Akhter J, Balkhy H, El-Saed A, Younan M, Memish Z. Prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolates in an adult intensive care unit at a tertiary care center in Saudi Arabia. ***Ann Saudi Med*** 2010; 30(5): 364-9.
[29] Mordi RM, Erah PO. Susceptibility of common urinary isolates to the commonly usedantibiotics in a tertiary hospital in southern Nigeria. ***Afr J Biotechnol*** 2006; 5(11): 1067-71.
[30] Al-Agamy MH, Khalaf NG, Tawfick MM, Shibl AM, El KholyA. Molecular characterization of carbapenem-insensitive *Acinetobacte rbaumannii* in Egypt. ***Int J Infect Dis*** 2014; 22: 49-54.
[31] Shahcheraghi F, Akbari Shahmirzadi N, Abbas Alipour Bashash M, Jabbari H, Amir Mozafari N. Detection of *bla*CTX, *bla*TEM beta-lactamase genes in clinical isolates of *acinetobacter spp*. from selected Tehran hospitals. ***Iran J Med Microbiol*** 2009; 3(1): 1-9. [in Persian]
[32] Peymani A, Farajnia S, Mohammad R, Nasrollah sohrabi L, Abbasi KA, Azhari F. Prevalence of class 1 integron among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, Northwest of Iran. ***Pol J Microbiol*** 2012; 61(1): 57-60.
[33] Anwar S, Amin R. Phenotype detection of metallo – beta – lactamase among the imipenem resistant *psudomonas* and *asintobacter* in the tertiary care hospitals of Dhaka city. ***BMC proc*** 2011; 5 Suppl 1: 92
[34] Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. ***Int J Antimicrob Agents*** 2010; 36 Suppl 3: S8-14.
[35] Zavacski AP, Carvalhaes CG, Picao RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. ***Expert Rev Anti Infect Ther*** 2010; 8(1): 71-93.
[36] Taherikalani M, Fatolahzadeh B, Emaneini M, Soroush S, Feizabadi MM. Distribution of different carbapenem resistant clones of *Acinetobacter baumannii* in Tehran hospitals. ***New Microbiol*** 2009; 32(3): 265.
[37] Sohrabi N, Farajnia S, Akhi MT, Nahaei MR, Naghili B, Peymani A, et al. Prevalence of OXA-Type β-Lactamases Among *Acinetobacter baumannii* Isolates from Northwest of Iran. ***Microb Drug Resist*** 2012; 18(4): 385-9