مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۱ بهار ۱۳۸۸، صفحات ۹- ۱

تشخیص ملکولی ژن‌های بتالاکتاماز bla_{CTX} و bla_{TEM} در ایزوله‌های اسینتو باکتر، جدا شده از نمونه‌های بالینی در بیمارستان‌های منتخب تهران

فرشته شاهچراغی[1*]، نیکو اکبری شهمیرزادی[1]، مریم عباس علی پور بشاش[1]،
حسین جباری[2]، نور امیر مظفری [3]

۱) بخش میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران
۲) مراکز تحقیقاتی ایدز ایران، بیماری‌های گوارش و کبد و محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایران
نویسنده رابط: فرشته شاهچراغی، بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران
همراه : ۰۹۱۲۲۹۷۲۲۳۲ shahcheraghifereshteh@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۵/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۰/۲۸

چکیده:

زمینه و اهداف: شیوع باکتری‌های مولد بتالاکتامازهای طیف گسترده (ESBL) در عفونت‌های بیمارستانی، از اهمیت ویژه برخوردار است. این مطالعه با هدف تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های اسینتوباکتر نسبت به آنتی بیوتیک‌*های* بتالاکتام و تحقیق پیرامون وجود ژن‌های بتالاکتاماز bla_{CTX} و bla_{TEM} در ایزوله‌های جدا شده در بیمارستان‌های منتخب تهران صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی ۹۵ ایزوله اسینتوباکتر از نمونه بیماران بیمارستان‌های منتخب تهران در سال ۱۳۸۷ جمع آوری شد. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی با روش‌های انتشار از دیسک (disk diffusion) و حداقل غلظت بازدارنده سفتازیدیم به روش Microbroth Dilution بر اساس دستورالعمل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) تعیین شد. تولید ESBL با تست فنوتیپی تاییدی (Phenotypic Confirmatory Tests) تعیین گردید. ژن‌های bla_{CTX} و bla_{TEM} در ایزوله‌ها با روش Multiplex PCR شناسایی شدند.برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمونT-test استفاده شد.

یافته ها: بیشترین و کمترین مقاومت در بین ایزوله‌ها به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفکسیم (۹۵ ایزوله، ٪۱۰۰) و کلیستین ((۴ ایزوله، ٪۴/۲) مشاهده شد. حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفتازیدیم در ۷۹ (٪83/1)ایزوله $\geq 64\mu g/ml$ بود و ۱۸ (٪۱۸/۹) ایزوله مولد ESBL بودند. ژن‌های bla_{TEM} وbla_{CTX} به ترتیب در۱۱ (٪۱۲/۸) و ۱ (٪۱/۲) ایزوله یافت شد .

نتیجه گیری: حداقل غلظت بازدارنده ایزوله‌ها در مقابل سفتازیدیم بالا است و حضور ژن bla_{TEM} در آنها بسیار قابل توجه می‌باشد. با توجه به اینکه در مطالعه‌ی حاضر کمتر از یک پنجم ایزوله‌ها مولد ESBL هستند، لذا علاوه بر بتالاکتامازها، مکانیزم‌هایی از قبیل پمپ‌های تراوشی و پورین‌ها از علل دیگر مقاومت در این باکتری‌ها می‌باشد .از آنجاییکه عوامل مقاومت برروی عناصر ژنتیکی متحرک قرار دارند، شناسایی سریع و ردیابی این سویه‌ها می‌تواند نقش مهمی در جلوگیری از گسترش آنها داشته باشد.

کلید واژه ها: اسینتوباکتر ، مقاومت آنتی بیوتیکی، ESBL ، bla_{CTX} ,bla_{TEM}

مقدمه:

اسینتوباکتر،کوکوباسیل گرم منفی است که از بسیاری از منابع انسانی و محیطی جدا می‌شود (۱). این باکتری به پاتوژن مناطق گرمسیری و مرطوب معروف بوده است. شیوع عفونت‌های ناشی از آن در فصل تابستان بیشتر از فصول دیگر می‌باشد (۳,۲). طی دههٔ گذشته شیوع عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری در حال افزایش بوده است. این موضوع به‌ویژه در بیماران بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه، سوختگی و جراحی اهمیت بیشتری دارد.اولین بار در سال ۱۹۹۱، گزارش مقاومت آنتی بیوتیکی اسینتوباکتر به کرباپنم‌ها درایالات متحده، موجب نگرانی همگان شد(۴).

با وجود اینکه این باکتری معمولاً از ویرولانس پایینی برخوردار است، امّا از طریق تجهیزات مرتبط با دستگاه تنفسی و کاتترهای آلوده موجب طیف وسیعی از عفونت‌ها می‌گردد(۱). اسینتوباکتر تا مدتها می‌تواند در محیط بیمارستان باقی مانده و بین بیماران انتقال یابد(۵). مشکل عمده در عفونت‌های ناشی از آن مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است. همانطور که نتایج تحقیقات نشان می‌دهد مقاومت نسبت به کرباپنم‌ها که از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند روز به روز در حال افزایش است.به عنوان مثال، مرکزمدیریت بیماری‌های آمریکا (CDC) اعلام نموده میزان مقاومت ٪۹ در بین نمونه‌های جدا شده در سال ۱۹۹۵ افزایش چشمگیر به میزان ٪۳۱ پیدا کرده که در سال ۲۰۰۴ به ٪۴۰ رسیده است (۸-۶). مکانیسم‌های مقاومت در گونه‌های مختلف اسینتوباکتر به صور مختلفی بروز می‌کنند. این مکانیسم‌ها شامل کانال‌های دیوارهٔ سلولی (پورین‌ها)، سیستم‌های تراوشی (efflux pumps) و ترشح بتالاکتامازها می‌باشند(۹).یکی از این مکانیسم‌ها تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است. این آنزیم‌ها از طریق هیدرولیز هسته مرکزی در آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام باعث غیر فعال شدن آنها می‌شوند. بتالاکتامازها انواع مختلفی دارند که از آن جمله می‌توان به آنزیم‌های نوع SHV، PER ، CTX و TEM اشاره نمود. ژن‌های کد کنندهٔ این آنزیم‌ها معمولاً" جزو ژن‌هایی هستند که بر روی پلاسمید قرار گرفته‌اند. با مصرف گسترده و روز افزون آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سفالوسپورین‌ها، دسته دیگری از بتالاکتامازها بوجود آمدند که در مقایسه با بتالاکتامازهای اولیه طیف فعالیت گسترده‌تری داشتند(ESBLs). این آنزیم‌ها قادراند آنتی‌بیوتیک‌های گروه پنی‌سیلین، سفالوسپورین‌ها و نیز آزترئونام را هیدرولیز نمایند. ژن‌های bla_{CTX} و bla_{TEM} رمز کننده این دسته از آنزیم‌های وسیع الطیف هستند. البته bla_{TEM-1} و bla_{TEM-2} وbla_{TEM-13} به‌طور استثناء طیف محدود(Narrow spectrum)دارند (۱۱،۱۰). گونه‌های اسینتوباکتر رفتار مشابهی در رابطه با مقاومت آنتی‌بیوتیکی از خود نشان نمی‌دهند. کمپلکس *اسینتوباکتر بومانی* که از *A. baumannii* و *A. calcoaceticus* تشکیل شده است از لحاظ ژنتیکی به هم نزدیک می‌باشند. به‌طوریکه در جنس اسینتوباکتر، این کمپلکس بیشترین عامل ایجاد عفونت‌های ناشی از این جنس است. در ضمن این کمپلکس بیشترین مقاومت دارویی چند گانه (Multiple drug resistance = MDR) را دارد(۱۲).

مشکلات درمانی ناشی از این باکتری و امکان انتقال بین موجودات زنده و غیر زنده و همچنین ماندگاری طولانی مدت در محیط بیمارستان باعث افزایش ظهور این باکتری در محیط‌های بیمارستانی و عفونت روزافزون ناشی آن شده‌است(۱۳). یکی از مواقعی که عفونت ناشی از اسینتوباکتر ایجاد مشکل می‌کند جنگ و وقوع بلایای طبیعی است. در جنگ آمریکا با عراق و افغانستان و همچنین جنگ ویتنام این عفونت‌ها سربازان را دچار مشکل کرد (۱۴).اولین سابقه حضور اسینتوباکتر در جنگ، به جنگ کره بر می‌گردد (در آن دوره Achromobacter نامیده می‌شد) که از کشت خون مجروحان جنگ جدا شد. در سال ۱۹۷۲ Tong بیشترین عفونت اسینتوباکتر در جنگ را گزارش کرد، که در آن ۳۰ نفر دریانورد جنگ ویتنام دارای ۶۳ زخم با عفونت شدید ناشی از اسینتو باکتر بودند(۱۵).ژن‌های مقاومت بتالاکتام‌ها در این باکتری معمولا بر روی عناصر ژنتیکی متحرک قرار دارند و در نتیجه به راحتی بین سویه‌ها انتقال می‌یابند. لذا، شناسایی سریع و ردیابی سویه‌های مولد این آنزیم‌ها می‌تواند گامی مهم در درمان عفونت‌های ناشی از آنها و جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم بشمار رود. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه تعیین مقاومت و حساسیت ایزوله‌های اسینتوباکتر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از جمله سفالوسپورین‌های نسل‌سوم ، تعیین MIC سفتازیدیم و تحقیق پیرامون وجود ژن‌های bla_{CTX} و bla_{TEM} بود.

مواد و روش ها:

در فاصله ماه‌های فروردین تا بهمن سال ۱۳۸۷ تعداد ۹۵ ایزوله مربوط به نمونه ترشحات تنفسی، ادرار، زخم و خون بیماران

بستری و سرپایی بیمارستان‌های شریعتی ، بقیه الله ، امام خمینی ، مصطفی خمینی تهران جمع آوری گردید. به منظور حصول اطمینان از صحت انتخاب کلونی‌ها، تست‌های بیوشیمیایی (اکسیداز، کاتالاز،OF هوازی ،OF بی هوازی، TSI ، اندول(SIM)، حرکت (SIM)، سیمون سیترات، VP، MR ، مک کانکی، لاکتوز)انجام شد. به این ترتیب، ۹۵ ایزوله اسینتو باکتر شناسائی و تائید شدند(۱۶). سپس ایزوله‌ها در محیط حاوی گلیسیرین ۱۸- ۱۵٪ در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تعیین حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی به وسیله روش دیسک دیفیوژن (Baur- Kirby) صورت گرفت (۱۷). دیسک‌هامحصول شرکت MAST (کشور انگلستان) و به شرح زیر بودند: سفوتاکسیم (۳۰ µg)، پیپراسیلین (۱۰۰µg)، پیپراسیلن/ تازوباکتام (۱۱۰ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، ایمی پنم (۱۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg) و سفتریاکسون (۳۰ µg) سفکسیم (۵ µg)، ازترونام (۳۰ µg)، سفپیم (۳۰ µg) و کلیستین (۱۰ µg) . تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) سفتازیدیم به روش Microbroth dilution و مطابق دستورالعمل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) انجام گردید (۱۸).

آزمایش تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده(**ESBLs**) :

برای این منظور از تست فنوتیپی تاییدی (Phenotypic Confirmatory Tests) استفاده شد. دیسک‌های مورد آزمایش شامل سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید ($\frac{CAZ:30\mu g}{CA:10\mu g}$)، سفوتاکسیم کلاولانیک اسید ($\frac{CAZ:30\mu g}{CA:10\mu g}$)، سفوتاکسیم و سفتازیدیم بود (محصول شرکت Mast). بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، تولید ESBLs از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی‌متر یا بیشتر در اطراف دیسک سفتازیدیم-کلاوونیک اسید و یا سفوتاکسیم-کلاوولانیک اسید مشخص گشت (۲۰،۱۹).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده آنتی بیوتیک(**Minimum Inhibitory Concentration**):

ایزوله‌هایی برای تعیین MIC سفتازیدیم انتخاب شدند که قطر ناحیه عدم رشد در آنها حداکثر تا اندازه ۲۰ میلی‌متر بود. برای تعیین MIC ایزوله‌ها از روش Micro-broth dilution استفاده شد. جهت کنترل روش‌های آنتی‌بیوگرام و MIC از سویه *P. aeruginosa* ATCC 27853استفاده شد.

DNA: و انجام استخراج **PCR**:

برای انجام PCR و شناسائی ژن‌های bla_{TEM} و bla_{CTX} ایزوله‌هایی با MIC≥ 16 µ g/ml ،انتخاب شدند. به منظور استخراج DNAی ایزوله‌ها، سوسپانسیون غلیظی از آنها در آب مقطر حاوی RNase (20 µg/ml) تهیه شد. سپس DNAی هر یک از ایزوله‌ها به روش جوشانیدن(boiling) استخراج گردید(۲۱).

تست PCR برای شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز bla_{CTX} (550bp) و bla_{TEM} (800bp) تحت شرایط مندرج در جدول ۱ انجام شد(۲۲).

مشخصات پرایمرهای مورد استفاده ، به شرح جدول ۲ می‌باشد. لازم به ذکر است که کلبسیلا پنومونیه ۷۸۸۱ حاوی ژن‌هایCTX و TEM (اهدائی پروفوسور Patrice Nordmann از کشور فرانسه) به عنوان سویه استاندارد استفاده شد. همچنین ژل آگاروز ۱٪ برای الکتروفورز محصولات PCR و نیز مارکر 100bp Ladder Fermentase (محصول لیتوانی)، مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز آماری به کمک نرم افزار spss و رابطه‌ی بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های bla_{CTX} و bla_{TEM} باآزمون آماریT-test بررسی گردید.

جدول ۱ : شرایط انجام PCR

No.	Factor / Gene / Step	Temp. (°C)	Time
		CTX/ TEM	CTX/ TEM
1	Initial denaturation	94/ 94	3/ 3 min
2	Denaturation	94/ 94	30/ 30 s
3	Annealing	63/ 45	1/ 1 min
4	Extension	72/ 72	1/ 1 min
5	Final extension	72/ 72	10/ 10 min
6	Cycle number	35	

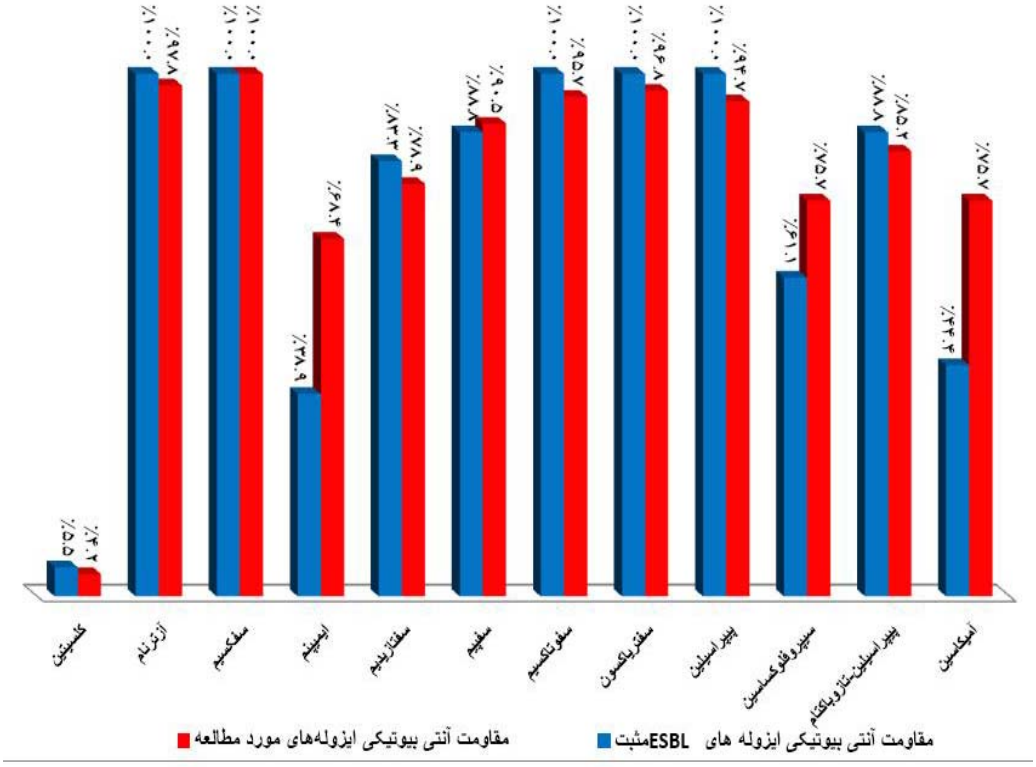
جدول ۲: مشخصات پرایمرهاي مورد استفاده در PCR

نام ژن شناسایی شده	توالی نوکلئوتیدی	مشخصات / نام پرایمر
CTX-A	5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3'	bla_{CTX}
CTX-B	5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3'	bla_{CTX}
TEM-A	5´- GAGTATTCAACATTTCCGTGTC -3´	bla_{TEM}
TEM-B	5´- TAATCAGTGAGGCACCTATCTC -3´	bla_{TEM}

یافته ها:

از ۹۵ ایزوله اسینتوباکتر جمع آوری و تایید شده به روش‌های بیوشیمیایی ،۴۳(۴۵/۳٪) ایزوله مربوط به نمونه‌های تنفس (خلط و تراشه)، ۴(۴/۲٪)ایزوله مربوط به زخم،۱۱(۱۱/۶٪) ایزوله مربوط به ادرار، ۳۷(۳۸/۹٪) ایزوله مربوط به خون بود. بررسی میزان مقاومت ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه نشان داد که کمترین و بیشترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به کلیستین(۴ ایزوله ۴/۲٪) و سفکسیم (۹۵ ایزوله ۱۰۰٪) بود. مقاومت به سفتازیدیم نیز در۷۵(۷۸/۹٪) ایزوله مشاهده شد.

میزان مقاومت به سایر آنتی بیوتیک‌ها به شرح ذیل بود: آمیکاسین در ۷۲ ایزوله (۷۵/۷٪)، پیپراسیلین- تازوباکتام در۸۱ ایزوله (۸۵/۲٪)،سیپروفلوکساسین در ۷۲ ایزوله (۷۵/۷٪)، پیپراسیلین در ۹۰ ایزوله (۹۴/۷٪)،سفتریاکسون در ۹۲ ایزوله (۹۶/۸٪)، سفوتاکسیم در ۹۱ ایزوله (۹۵/۷٪)، سفپیم در ۸۶ ایزوله (۹۰/۵٪)، ایمیپنم در ۶۵ ایزوله (۶۸/۴٪)، و آزترنام در ۹۲ ایزوله (۹۶/۸٪). (نمودار ۱)



نمودار ۱: درصد مقاومت آنتی بیوتیکی کلیه ایزوله‌ها و ایزوله‌های ESBL مثبت

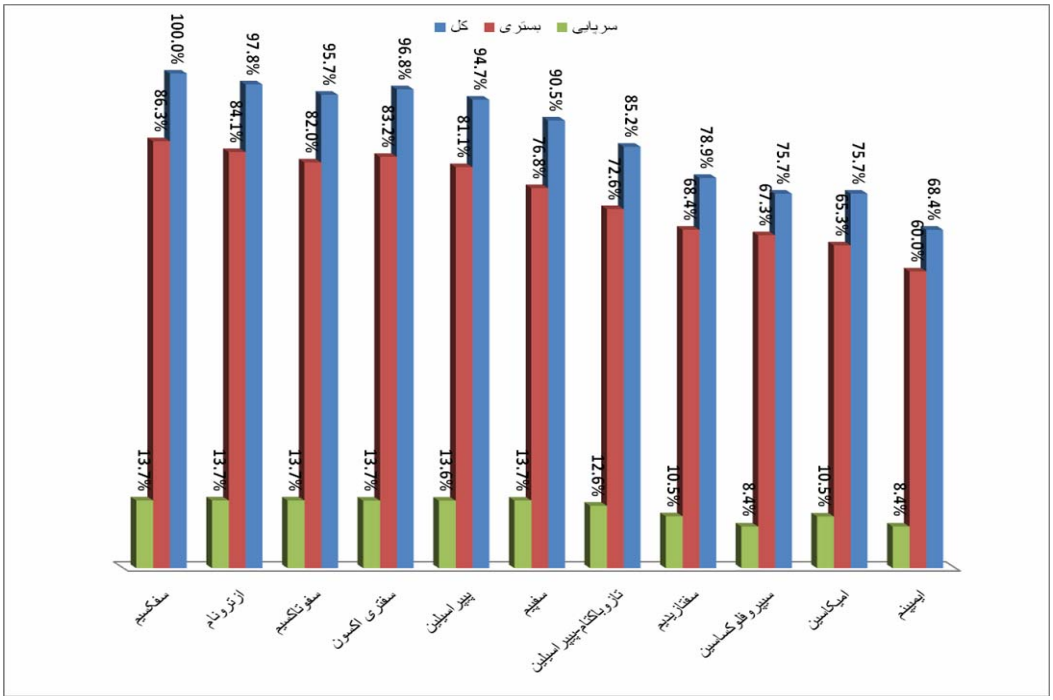
از مجموع ایزوله‌های مورد مطالعه ۸۴ ایزوله(۸۸/۴٪) با روش انتشار در آگار نسبت‌به سفتازیدیم غیرحساس(مقاوم وحد واسط) بودند. از این میان ۷۹ ایزوله(۸۳/۲٪) MIC≥ 64 µg/ml به این آنتی‌بیوتیک نشان دادند. از این تعداد ۵ (۵/۱٪) ایزوله تنفسی و ۳ (۳/۸٪) ایزوله از عفونت‌های زخم، ۱۱(۱۳/۹٪) ایزوله از ادرار و۶۰ (۷۵/۹٪) ایزوله از خون جدا شده بود.

همچنین ۱۸ (۱۸/۹٪) ایزوله به روش PCT مولد ESBL بودند. میزان مقاومت این ایزوله‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به قرار ذیل بود: آمیکاسین: ۸ (۴۴/۴٪)، پیپراسیلین-تازوباکتام : ۱۶(۸۸/۸٪)، سیپروفلوکساسین: ۱۱(۶۱/۱٪)، پیپراسیلین: ۱۸(۱۰۰٪) ، سفتریاکسون: ۱۸(۱۰۰٪) ، سفوتاکسیم: ۱۸(۱۰۰٪) ، سفپیم: ۱۶ (۸۸/۸٪)، سفتازیدیم: ۱۵(۸۳/۳٪)، ایمیپنم: ۷ (۳۸/۹٪) ، سفکسیم: ۱۸(۱۰۰٪)، کلیستین: ۱(۵/۵٪) و آزترنام: ۱۸ (۱۰۰٪).

از کل ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم (n=۶۵)، بیشترین ایزوله (n =۳۷ یا ۵۶/۹٪) از خون جدا شده بود. بیشترین تعداد ایزوله مورد مطالعه در این گزارش از بیمارستان شریعتی جدا شده بود و بیشترین و کمترین میزان مقاومت در ایزوله‌های این بیمارستان نیز همانند کل ایزوله‌های مورد بررسی به ترتیب متعلق به سفکسیم ۹۵(۱۰۰٪) و کلیستین۴ (۴/۲٪) بود.

همانطور که در نمودار ۲ مشخص است، میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های بیماران بستری بیشتر از بیماران سرپایی است.

جهت انجام PCR ژن‌های bla_{TEM} و bla_{CTX} از ۸۶ ایزوله‌ای استفاده شد که MICcaz ≥ ۱۶ µg/ml داشتند. از بین تعداد ۱۲/۸٪ (۱۱ ایزوله) دارای ژن bla_{TEM} ، ۱/۲٪ (۱ ایزوله) دارای ژن bla_{CTX} بودند. بین مقاومت به سفوتاکسیم و فراوانی ژن bla_{TEM} رابطه‌معنی دار (P= 0.042) وجود داشت.



نمودار ۲: درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های مربوط به بیماران بستری و سرپائی

بحث:

اسینتوباکتر از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌رود. نتایج نشان داد سویه‌های اسینتوباکتر دارای مقاومت بسیار بالایی نسبت به اکثر آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه و همچنین MIC بسیار بالایی نسبت به سفتازیدیم دارند. نتیجه حاصل از مقایسه حساسیت آنتی بیوتیکی پیپرا سیلین به تنهایی و همراه با تازوباکتام تفاوت چندانی نشان نداد (مقاومت از ۹٤/۷ درصد به ۸۵/۲ درصد رسید). این تفاوت جزئی نشان می‌دهد که آنتی بیوتیک پیپرا سیلین- تازوباکتام هم داروی مناسبی برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری نمی‌باشد.

در حال حاضر از ایمی‌پنم برای سویه‌هایی که به اکثر آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام، از جمله سفالوسپورین‌های نسل سوم، مقاوم بودند،استفاده می شود. اما، نتایج مطالعات دیگر (۲۳)و نیز نتایج حاصل از مطالعه حاضر بیانگر مقاومت ۶۸/۴ درصد نسبت به ایمی‌پنم است. در این مطالعه بیشترین تعداد (۵۵/۳ درصد) ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم از خون جدا شده بود.

به علت افراط در مصرف سفالوسپورین‌های نسل سوم و عدم رعایت اصول بهداشتی در سطح جامعه، همانطور که در نتایج این مطالعه مشخص است، مقاومت قابل ملاحظه‌ای در این نسل از سفالسپورین‌ها به‌وجود آمده‌است. مقاومت ۹۶/۸ درصد در سفتریاکسون، ۹۵/۷ درصد در سفوتاکسیم، ۷۸/۹ درصد در سفتازیدیم و در نهایت مقاومت ۱۰۰ درصد در سفکسیم نشان می‌دهد که سفالوسپورین‌های نسل سوم داروی مناسبی برای درمان این نوع عفونت‌ها نمی‌باشند. یکی از راهکارهای مبارزه با گسترش مقاومت در این نوع عفونت‌ها، در صورت مشاهده مقاومت در سویه عامل عفونت به یکی از آنتی بیوتیک‌های این گروه از سفالوسپورین‌ها ، می‌تواند عدم تجویز مجدد سفالوسپورین‌های نسل سوم باشد. مقایسه نشان داد میزان مقاومت به طور چشمگیری در کلیستین پایین تر از دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها است. بدین ترتیب، کلیستین برای درمان عفونت‌های ناشی از اسینتوباکتر بسیار مناسب به نظر می‌رسد . دلیل احتمالی پایین بودن مقاومت به این آنتی بیوتیک، تجویز کم آن در دوره اخیر بوده است.

نظر به اینکه در این مطالعه بیشترین تعداد نمونه از خلط و تراشه جدا شده است، لذا به‌نظر می‌رسد بیشترین قسمت درگیر در عفونت‌های ناشی از اسینتوباکتر ، دستگاه تنفسی باشد. بنا براین، گند زدایی و سترون‌سازی تجهیزات و دستگاه‌های تنفسی مثل کاتترهای تنفسی یکی از راه‌های جلو گیری از انتشار این عفونت می‌باشد. گزارشات متعددی از سراسر دنیا بروز عفونت‌های حاد و یا کلونیزاسیون افراد به وسیله اسینتوباکترهای مولد ESBL را

تایید می‌کنند (۲۴و ۲۵). طی پژوهشی که در سال ۲۰۰۷ در هندوستان انجام شده است ۲۸ درصد از نمونه های مورد مطالعه ESBL مثبت بوده است در حالی که این میزان در مطالعه حاضر ۱۸/۹ درصد است که به این ترتیب نسبت به هندوستان ۹/۱ درصد کمتر است(۵). با توجه به اینکه ایزوله‌های تولید کننده بتالاکتاماز درصد پایین تری را در مقایسه با ایزوله‌های مقاوم نسبت به بتا لاکتام‌ها دارند، بنا براین، به نظر می‌رسد که علاوه بر تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وجود Efflux pump و کانال‌های دیواره سلولی (پورین‌ها) نیز در ایجاد مقاومت دخیل باشند. همچنین انجام تست‌های فنوتیپی به تنهایی قادر به تعیین سویه‌های مولد انواع آنزیم‌های ESBL نمی‌باشد. لذا، بایستی آزمایشات مولکولی نیز بر روی این سویه‌ها، جهت بررسی وجود آنزیم‌های ESBL ،انجام شود.

مقاومت آنتی بیوتیکی در بیماران بستری و سرپایی هم مقایسه شد. میزان مقاومت در بیماران بستری بیشتر بوده است. مقاومت بالا در بیماران بستری به دلیل احتمال انتقال ژن‌های مقاومت از طریق عناصر ژنتیکی متحرک در بین ایزوله‌ها و همچنین احتمال انتشار کلونال ایزوله‌های مقاوم در بین بیماران بستری است. همچنین مقایسه در بیماران سرپایی و بستری نشان داد بیشترین و کمترین مقاومت به ترتیت مربوط به سفپیم و سیپروفلوکساسین است. این موضوع بیانگر احتمال مصرف بیشتر آنتی بیوتیک سفپیم در بیماران سرپایی است.

ایزوله‌های مولد ESBL معمولا نسبت به آزترونام حساس می‌باشند. با این وجود همانطور که از نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی بر می آید میزان مقاومت به آزترونام در نمونه‌های مولد ESBL، ۱۰۰ درصد گزارش شد. میزان مقاومت بالا نسبت به این آنتی‌بیوتیک، همانطور که قبلا هم اشاره شد، بیانگر دو موضوع است:اول اینکه روش PCT روش مناسبی برای شناسایی تمامی ایزوله‌های مولد ESBL در این باکتری نمی‌باشد، دوم اینکه مکانیسم‌های دیگری از جمله Efflux pumpو پورین ها(منافذ غشا) در ایجاد این مقاومت دخیل می‌باشند. یکی از راه‌های اصلاح روش PCT،استفاده همزمان از سه دیسک است و دیگری استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی ژن‌های ESBL می‌باشد.

در مطالعه دیگری (۲۰۰۴-۲۰۰۲) مقاومت اسینتوباکتر جداشده از سربازان جنگ عراق و افغانستان بررسی گردید(۱۴). ۶۵ درصد از نمونه‌ها نسبت به ایمی‌پنم مقاوم بودند که در مقایسه با ۶۸/۴ درصد مقاومت در مطالعه ما ، اختلاف قابل ملاحظه ای وجود ندارد. طی تحقیقی که در سال ۱۳۸۳ در دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان انجام شد، مقاومت نسبت به آمیکاسین ۹۵/۵ درصد تعیین شد(۲۶). درحالیکه در مطالعه حاضر آمیکاسین با ۷۵/۷ درصد مقاومت بعد ازکلیستین و ایمی‌پنم کمترین مقاومت را نسبت به اسینتوباکتر دارد. به نظر می‌رسد که این کاهش مقاومت به دلیل مصرف محدودتر این آنتی بیوتیک در بیمارستان‌ها باشد.

در مطالعه حاضر، مقاومت در سویه‌های مولد ESBL نیز به صورت جداگانه بررسی گردید. میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در نمونه های ESBL مثبت بیشتر شده است، البته به استثناء سه آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم،آمیکاسین و سیپرو فلوکساسین. این سه آنتی‌بیوتیک به ترتیب متعلق به گروه‌های کربا‌پنم‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوئوروکینولون‌ها می‌باشند که مکانیسم های دیگری در ایجاد مقاومت به آنها دخیل هستند. این افزایش مقاومت در ایزوله‌های مولد ESBL می‌تواند بیانگر دخیل بودن آنزیم‌های ESBL در ایجاد مقاومت باشد.

در مطالعه Hujer و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی نمونه‌هایی که از بیمارستانی در آمریکا بر روی سربازان عراقی و افقانستانی انجام شده بود ۴۰ درصد از نمونه‌ها حاوی ژنbla_{TEM} بودند. میزان ایزوله‌های TEM مثبت در این مطالعه پایین‌تر(۱۲/۸ درصد) بود(۲۷).

در مطالعه‌ی دیگری که در سال ۲۰۰۹ توسط JIN Hui و همکاران در چین انجام شد ، میزان نمونه‌های TEM مثبت در بین ایزوله‌های مقاوم ۸۱/۵ درصد گزارش شد که در مقایسه با مطالعه ما بسیار بالاتر است(۲۸).

بررسی Giuseppe Celenza و همکارانش در آمریکای جنوبی در سال ۲۰۰۶ نشان داد ، میزانTEMمثبت و CTXمثبت به ترتیب ۲۶/۱و ۳۰/۴ درصد بوده است. همچنین در بررسی دیگری که در سال ۲۰۰۶ در چین انجام شد تعداد نمونه‌های TEM مثبت ۲۶/۱ درصد گزارش شد. در حالیکه در مطالعه ما این مقادیر به ترتیب۱۲/۸و۱/۲ درصد است(۲۷،۲۶).

نتیجه گیری:

با توجه به اینکه اکثریت ایزوله‌های مورد مطالعه مقاوم به بتالاکتام‌ها می‌باشند برای درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از

این باکتری استفاده از بتالاکتام‌ها توصیه نمی‌شود. حضور ژن‌های bla_{TEM} و bla_{CTX} در این ایزوله‌ها بسیار قابل توجه است. همانند دیگر کشورها، سویه‌های مولد ESBL اسینتوباکتر در ایران نیز در حال گسترش است. ژن‌های مقاومت بر روی عناصر ژنتیکی قابل انتقال قرار دارند که می‌توانند از یک سویه مقاوم به دیگر سویه‌ها انتقال یابند و مقاومت را در بیمارستان یا دیگر محیط‌های درمانی منتشر نمایند. لذا، مدیریت صحیح مصرف آنتی بیوتیک‌ها و اتخاذ تدابیر لازم در رعایت استانداردهای مراقبت‌های بهداشتی می‌تواند باعث جلوگیری از گسترش مقاومت به دیگر بیماران بستری و یا وسایل بیمارستانی شود. همچنین شناسایی سریع و رد یابی سویه‌های مولد این آنزیم‌ها می‌تواند گامی مهم در درمان عفونت‌های ناشی از آنها و جلوگیری از گسترش آنها باشد.

تقدیر و تشکر:

از زحمات خانم وجیهه نیک بین و خانم فهیمه شورج که ما را در انجام این تحقیق یاری نموده اند تشکر می شود. همچنین تشکر ویژه خود را از زحمات مسئولین و کارکنان آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های شریعتی ، بقیه الله ، امام خمینی ،و مصطفی خمینی تهران اعلام می‌داریم.

فهرست مراجع:

1.Babay H , Kambal A, Al-Anazy A, Saidu A, Aziz Sh. *Acinetobacter* Blood Stream Infection in a Teaching Hospital - Riyadh,Saudi Arabia. *Kuwait Med J* 2003; **35** (3): 196-2011

2. Smith PW. Seasonal incidence of Acinetobacter infection. *J Infect Dis* 1979;**140**:275-6.

3. McDonald LC, Banerjee SN, Jarvis WR. Seasonal variation of Acinetobacter infections: *Clin Infect Dis* 1987-1996. 1999;**29**:1133-7.

4.Hsueh P, Teng L, Chen CH , Chen W, Yu Ch, Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg Infect Dis*. 2002; **8** (8).:827-831

5. Sinha M , H. Srinivasa & R. Macaden. Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in Acinetobacter species. *Indian J Med Res* 2007; **126**: 63-67

6. Naas T, Coignard B, Carbonne A, Blanckaert K**.** VEB-1 Extended-Spectrum β-Lactamase–producing *Acinetobacter baumannii*, France1. *Emerg Infec Dis*. t 2006; **12** (8) P: 1214-1220

7. Schreckenberger PC, Daneshvar MI,Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter,Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella,*and other nonfermentative gramnegative rods. In: Murray PR, Baron EJ,Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds.Manual of clinical microbiology. 9th ed.Washington, DC: ASM Press, 2007; pp:770-802.

8. Carey RB, Banerjee SN, Srinivasan A. Multidrug-resistant Acinetobacter infections, 1995-2004. Presented at the 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco,September. 2006;pp: 27–30.

9. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006;**43**: 2:49-56.

10. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM**,** Sommers HM. *Diagnostic Microbiology*, 3rd ed, Philadelphia; Lippincott, 1990; pp:90-102 , 473-484.

11. Singh S. Extended-Spectrum beta-Lactamases: An overview, *Diagnostic Laboratory Services*. ,Hawaii ,INC.1999 ;pp:.1-3

12. Bergogne-Berezin E, Fridman H ,Bendinelli M , Acinetobacter biology and pathogenesis, New York , Springer, 2008 ; pp 1,14,120-124

13. Gerner-Smidt P. Acinetobacter: epidemiological and taxonomic aspects. *APMIS* 1994; **102** (Suppl 47) : 1-42.

14. *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U.S. service members, . *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;**53**:1063-6.

15. Tong MJ. Septic complications of war wounds. *JAMA*1972; **219**:1044–7.

16. Washington W, Elmer K, Stephen A, William J, Gary P, Paul S *et.al* . Organisms that are nonmotile and oxidase negative , genus: Acinetobacter ,in : *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 6th ed, illustrated, United States of America ,Lippincott Williams & Wilkins. 2005; pp: 353-359

17. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing,15th informational supplement (M100-s15). National Committee For Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2005.

18. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial

susceptibility testing for bacteria that grow aerobically, 2000; M7-A5, ed.NCCLS, Villanova, Pa.

19. Paterson DL, and Bonomo RA. Extended-Spectrum beta-Lactamases:a clinical update. *Clin Microbiol Rev* ,2005; **18** (4): 657-86.
20. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the national committee for clinical laboratory standards Extended-Spectrum beta-Lactamase detection Methods, *J Clin Microbiology*, 2001; **39**:(8): 2864-2872
21. Yu Y,Yang Q, Xu X, Kong H, Xu G and Zhong B**,** Typing and characterization of carbapenem resistant *Acinetobacter calcoaceticus –baumannii* complex in a Chinese hospital, *J Med Microbiol* 2004; **53**: 653–656
22. Pagani L, Amico E, Migliavacca R, D'Andrea M, Giacobone E, Amicosante G*, et al*. Multiple CTX-Mtype extended-spectrum _-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in Northern Italy. *J. Clin. Microbiol*. 2003; **41:**4264–4269.
23. Lee.S, Joong Kim.N, Choi. S, Kim. T, Chung. J, Ryu. W, *et al*. Risk Factors for Acquisition of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*: a Case-Control Study, *Antimicrob Agents Chemother*,2004; **48**(1):224-228
24. Poirel L, Karim A, Mercat A, Le Thomas I, Vahaboglu H, Richard C, *et al.* Extended-spectrum -lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. J Antimicrob Chemother 1999; **43**: 157–165
25. Sinha M, Srinivasa H, Macaden R, Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter* species*, Indian J Med Res* 2007; 126: 63-67

۲۶. سعادتیان فریور آرزو،نوروزی جمیله،امامی . میزان فراوانی اسینتوباکتر در بخش مراقبت‌های ویژه جراحی مجتمع رسول اکرم ،*مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان*.جلد چهارم ،شماره چهار- ب، زمستان ۸۴، صص ۳۴۲-۳۴۷

27. Hujer K , Hujer A , Hulten E, Bajaksouzian S , Adams J, Donskey C, *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**, No. 12, p. 4114–4123
28. JIN Hui, XU Xiao-min, MI Zu-huang, MOU Yi . LIU Pei, Drug-resistant gene based genotyping for *Acinetobacter baumannii* in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial settings**,** *Chinese Medl J* 2009;**122**(3):301-306
29. Celenza . G, Pellegrini. C, Caccamo. M, Segatore. B, Amicosante. G and Perilli. M, Spread of blaCTX-M-type and blaPER-2 b-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals *J Antimicrob Chemother,* 2006; **57**: 975–978
30. chen. Ch , Young. T, Huang . Ch,Predictive biomarkers for drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates with bla_{TEM-1} Amp C –type bla and integrase 1 genotypes, *J Microbiol Immunol Infect*,2006;**39**:372-379