Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

Study of drug resistance and *ompA* gene existence in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates

Ebrahim Babapour[1], Azam Haddadi[1], Reza Mirnejad[2], Seyed-Abdolhamid Angaji[3], Nour Amirmozafari[4]

1. Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical of Sciences. Tehran, Iran
3. Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
4. Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Downloaded from ijmm.ir at 18:43 +0430 on Friday August 18th 2017

Article Information

Article history:
Received: 2016/05/29
Accepted: 2017/01/21
Available online: 2017/03/16

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2017; 11(1): 30-38

Corresponding author at:

Dr. Nour Amirmozafari

Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: 0989123877988

Email:
amirmozafari@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: *Acinetobacter baumannii* is one of the most important multi drug-resistant species associated with nosocomial infections. Several factors involve in resistance to drug and its pathogenicity. Of these factors, OmpA protein plays a crucial role. Therefore, the aim of current research was to assess resistance to drug and also *ompA* gene existence in *A. baumannii* isolated from clinical sources.

Materials and Methods: Firstly, clinical samples were collected from Imam Khomeini, Milad and Motahari Hospitals during 2015-2016 years and the final confirmation were done by using biochemical methods. Afterwards, susceptibilities to antibiotics of different classes were determined by disc diffusion method and presence of *ompA* gene was checked by using PCR method and verified by sequencing.

Results: The results show that of 650 clinical samples, 156 (24%) of isolates were formed of *A .baumannii* and mostly showed resistance to different classes of antibiotics. 92.95% of isolates were multi drug resistance (MDR) and finally 86.53% were extremely drug resistance (XDR). All of them contained *ompA* gene.

Conclusions: Existence of multi drug resistance in most isolates as well as presence of *ompA* in all samples can cause bacterial virulence and drug resistance. It seems essential to provide continuous monitoring and determination of antibiotic susceptibility of clinical *A . baumannii*, decrease the moral and material damage caused by the bacteria.

KeyWords: *Acinetobacter baumannii*, Multi Drug Resistance, *ompA* gene

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Final

How to cite this article:

Babapour E, Haddadi A, Mirnejad R, Angaji SA, Amirmozafari N. Study of drug resistance and *ompA* gene existence in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (1): 30-38

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۱ – فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

بررسی مقاومت دارویی و وجود ژن *ompA* در ایزوله‌های کلینیکی *اسینتوباکتر بومانی*

ابراهیم باباپور[۱]، اعظم حدادی[۱]، رضا میرنژاد[۲]، سید عبدالحمید انگجی[۳]، نور امیرمظفری[۴]

۱. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران
۳. گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران، ایران
۴. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۰۹
پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۰۲
انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۱۲/۲۶
موضوع:
باکتری‌شناسی پزشکی

IJMM 1396; 11(1): 30-38

نویسنده مسئول:
دکتر نور امیر مظفری

گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۲۳۸۷۷۹۸۸

پست الکترونیک:
amirmozafari@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: *اسینتوباکتر بومانی* یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی مقاوم به چند دارو می‌باشد. عوامل مختلفی در مقاوم شدن این باکتری‌ها در برابر داروها و بیماری‌زایی آن نقش دارند، یکی از مهم‌ترین این عوامل وجود پروتئین *OmpA* در این باکتری‌ها می‌باشد. بنابراین در این تحقیق ضمن بررسی مقاومت دارویی، وجود ژن *ompA* در ایزوله‌های کلینیکی *اسینتوباکتر بومانی* مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار: ابتدا ۶۵۰ نمونه بالینی در طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ از سه بیمارستان امام خمینی (ره)، میلاد و مطهری تهران جمع‌آوری گردید و از طریق روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی تائید نهائی *اسینتوباکتر بومانی* انجام شد. سپس مقاومت آنتی‌بیوتیکی از طریق روش دیسک دیفیوژن و از طریق روش **PCR** وجود ژن ***ompA*** بررسی و برای تائید نهایی ژن موردنظر تعیین توالی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که از ۶۵۰ نمونه بدست آمده از بیماران، ۱۵۶ (۲۴٪) ایزوله را *اسینتوباکتر بومانی* تشکیل می‌دهد که اغلب این باکتری‌ها نسبت به کلاس های مختلف آنتی‌بیوتیکی مقاوم می‌باشند. ۹۲/۹۵٪ از ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* مورد بررسی در این مطالعه، مقاوم به چند دارو و ۸۶/۵۳٪ از ایزوله‌ها extremely drug resistance (XDR) بودند. نتایج همچنین نشان داد ۱۰۰٪ ایزوله‌های بالینی جداشده دارای ژن *ompA* می‌باشند.

نتیجه‌گیری: اغلب سویه‌های ایزوله شده دارای مقاومت چند دارویی می‌باشند و ژن *ompA* که به‌طور گسترده‌ای در این باکتری‌ها دیده می‌شود که می‌تواند یکی از دلایل افزایش مقاومت و بیماری‌زایی در این باکتری باشد، لذا لازم است تا ضمن پایش مستمر و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی این باکتری از زیان‌های مادی و معنوی ناشی از این باکتری کاسته شود.

کلمات کلیدی: *اسینتوباکتر بومانی*، مقاومت چند دارویی، ژن *ompA*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

اسینتوباکتر بومانی یکی از مهم‌ترین گونه‌های در ارتباط با عفونت‌های بیمارستانی ازجمله *پنومونی* در ارتباط با ونتیلاتورها، باکتریمی، عفونت‌های مجاری ادراری، عفونت‌های زخم، پوست و مننژیت می‌باشد. طی دهه‌های گذشته این باکتری به اغلب داروهای ضد میکروبی ازجمله سفالوسپورین های وسیع الطیف، پنی‌سیلین‌ها، کارباپنم ها، فلوروکینولون ها و آمینوگلیکوزیدها مقاوم شده است (۱،۲). چندین مکانیسم مقاومت مختلف در ایجاد فنوتیپ مقاوم به چند دارو در *اسینتوباکتر بومانی* نقش دارند، کاهش نفوذپذیری پروتئین غشای خارجی (Outer Membrane Protein or OMP)، از دست دادن ژن‌های کد کننده پورین‌ها، تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده دارو، بیان بیش‌ازحد پمپ‌های دفع دارو و کسب عناصر ژنتیکی حمل‌کننده عوامل ایجاد مقاومت ازجمله پلاسمیدها، اینتگرون‌ها و ترانسپوزون‌ها و جزایر مقاومت ازجمله این مکانیسم‌ها هستند (۱).

باکتری‌های گرم منفی به‌طورمعمول پروتئین‌های پورینی متنوعی را در سطح غشای خارجی‌شان بیان می‌کنند که در

Downloaded from ijmm.ir at 18:43 +0430 on Friday August 18th 2017

قابلیت نفوذپذیری سلولی تأثیر دارند، OmpA یکی از فراوان‌ترین این پروتئین‌ها می‌باشد (۳). پروتئین غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی سبب مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تطابق با محیط و بیماری‌زایی در سلول میزبان می‌شود. انواعی از پروتئین‌های غشاء خارجی از خانواده OmpA به نام $OmpA_{Ab}$ در *اسینتوباکتر بومانی* شناسایی‌شده است (۴،۵).

OmpA یک پورین از نوع بتا – باریل (β-barrel porin) است که توالی آن در گونه مختلف باکتریایی بسیار حفاظت‌شده است و در *اسینتوباکتر بومانی* در شرایط آزمایشگاهی (in vitro model systems) خصوصیات بیولوژیکی متنوع را نشان می‌دهد (۳،۶). این پروتئین فراوان‌ترین پروتئین سطحی باکتری است که در اتصال و تهاجم به سلول‌های اپی تلیال و القاء آپوپتوزیس در مراحل اولیه عفونت *اسینتوباکتر بومانی* نقش دارد (۷). علاوه بر این، OmpA با مقاومت آنتی بیوتیکی در ارتباط است. گرچه مطالعاتی دخالت OmpA را به‌عنوان عامل مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام نشان داده‌اند، اما هنوز نقش این پروتئین در مقاومت ضد میکروبی به‌روشنی مشخص نشده است، از طرفی مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در استفاده از داروها جهت درمان بیماران تأثیر نامطلوبی خواهد گذاشت (۱،۸).

بنابراین در این تحقیق ضمن بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود ژن *ompA* در ایزوله‌های کلینیکی *اسینتوباکتر بومانی* مورد ارزیابی قرار داده شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی ایزوله‌ها

این مطالعه به‌صورت توصیفی- تحلیلی در طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ بر روی ۶۵۰ نمونه گرفته‌شده از بیمارانی که حداقل سه تا هفت روز از زمان بستری شد آن‌ها در بیمارستان‌های امام خمینی (ره)، میلاد و مطهری تهران می‌گذشت، انجام شد. در طی این دوره نمونه‌های بالینی مختلفی شامل خون، ادرار، خلط، سوند، مایع مغزی- نخاعی (CSF)، BAL، ترشحات زخم و سوختگی جمع‌آوری و در داخل محیط انتقالی BHI براث به آزمایشگاه منتقل گردید.

شناسایی اولیه جنس *اسینتوباکتر* از طریق کشت و آزمایش‌های مختلف بیوشیمیایی و سپس برای تأیید نهایی وجود ژن *bla* $_{OXA-51}$-like که به‌طور ذاتی در تمامی سویه‌های این باکتری وجود دارد، استفاده گردید.

شناسایی مولکولی ایزوله‌ها به روش PCR

به‌منظور تأیید جدایه‌های احتمالی *اسینتوباکتر بومانی* ازدیاد ژن *bla* $_{OXA-51}$-like با روش PCR مطابق با روش تورتون (Turton) و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام گردید (۹). برای انجام PCR ابتدا ژنوم باکتری‌هایی که بر اساس تست‌های بیوشیمیایی *اسینتوباکتر بومانی* تشخیص داده‌شدند به روش جوشاندن اصلاح‌شده (Boiling method) استخراج شد. پرایمرهای مورداستفاده برای تکثیر ژن *bla* $_{OXA-51}$-like در جدول ۱ نشان داده‌شده است و برای نمونه‌هایی که تست PCR آن‌ها منفی می‌شد عمل PCR برای بار دوم تکرار می‌گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: یک میکرولیتر DNA هدف، ۱۲/۵ µL مستر میکس رنگی 2X از شرکت سینا کلون (ترکیب مستر میکس 1X، شامل Tris-HCl 0.5 M، MgCl2 1.5 mM، dATP 0.2 mM، dCTP 0.2 mM، dGTP 0.2 mM، dTTP 0.2 mM و (Taq 0.04 Units/ µL) و ۱ µL از هر پرایمر رفت‌وبرگشت و ۹/۵ µL آب مقطر دو بار تقطیر و هر برنامه PCR شامل ۳۰ چرخه تکثیر و تحت شرایط زیر بود. دناتوراسیون اولیه ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ °C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ °C به مدت ۶۰ ثانیه، تکثیر در دمای۷۲ °C به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه و درنهایت ۶ میکرولیتر از هر یک از محصولات تکثیر یافته به روش PCR، با DNA safe stain رنگ‌آمیزی و در ژل آگارز ۱/۲٪ در داخل تانک الکتروفورز (پویا پژوهش، ایران) حاوی بافر TBE 0.5x به مدت ۴۰دقیقه در ولتاژ ۸۰V الکترفورز گردید در پایان با دستگاه UV transilluminator (UVP, Germany) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی باندهای حاصل از محصول PCR از DNA ladder به‌اندازه ۵۰ یا ۱۰۰ جفت باز استفاده گردید.

تعیین حساسیت ایزوله‌های باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

در این تحقیق حساسیت ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به یازده آنتی‌بیوتیک مختلف شامل: پیپراسیلین ۱۰۰ میکروگرم (PIP 100)، سفتریاکسون ۳۰ میکروگرم (CRO 30)، سفی پیم ۳۰ میکروگرم (FEP 30) ، ایمی پینم ۱۰ میکروگرم

Downloaded from ijmm.ir at 18:43 +0430 on Friday August 18th 2017

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 18:43 +0430 on Friday August 18th 2017

(IPM 10)، پلی میکسین B (PB 300)، جنتامایسین ۱۰ میکروگرم (GM 10)، تتراسایکلین ۳۰ میکروگرم (TE 30)، سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم (CP5)، سولفامتوکسازول– تری متوپریم ۷۵ میکروگرم (SXT75)، تیکارسیلین ۷۵ میکروگرم (TIC75) و تیکارسیلین-کلاوولانیک اسید ۷۵/۱۰ میکروگرم (TCC75/10) تهیه شده از شرکت Rosco Diagnostica و با روش انتشار دیسک در محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک آلمان) و بر اساس دستورالعمل CLSI (2014) انجام گردید و از سویه‌های رفرانس *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و *Escherichia coli* ATCC 25922 برای کنترل دیسک‌های آنتی بیوگرام استفاده شد (۱۰).

بررسی وجود بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) از طریق آزمون دیسک ترکیبی

جهت تعیین تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) از روش غربالگری دیسک ترکیبی یا Combined Disk Test (CDT) استفاده گردید. بدین‌صورت که بعد از کشت باکتری روی محیط مولر هینتون آمار، دو دیسک تیکارسلین و تیکارسلین–کلاوولانیک اسید بر روی محیط مولرهینتون آگار قرار داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، در صورت مشاهده افزایش بیش از ۵ میلی‌متر در قطر هاله عدم رشد تیکارسلین–کلاوولانیک اسید در مقایسه با تیکارسلین، باکتری مورد آزمایش به‌عنوان تولیدکننده ESBL و در غیر این صورت، ESBL منفی گزارش می‌شدند. از سویه رفرانس *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 13883، $ESBLs^+$ نیز برای کنترل دیسک‌های آنتی‌بیوگرام استفاده شد (۱۰).

آزمون PCR و تعیین توالی ژن *ompA*

از روش PCR برای بررسی وجود ژن‌های مربوط به پروتئین غشای خارجی یا *ompA* در ایزوله‌های باکتریایی و سویه استاندارد *اسینتوباکتر بومانی* ATCC 19606 (به‌عنوان کنترل مثبت حاوی ژن‌های موردنظر) استفاده شد. فهرست پرایمرهای مورداستفاده جهت تکثیر ژن مذکور در جدول ۱ آمده است. پرایمرهای رفت‌وبرگشت این ژن با استفاده توالی ژن *ompA* مربوط به *اسینتوباکتر بومانی* ATCC 19606 موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار Primer-3 طراحی و پس از انجام بلاست در سایت NCBI به شرکت پیشگام بیوتکنولوژی سفارش و تهیه گردید.

برای انجام PCR ژن *ompA* نیز همانند ازدیاد ژن *bla* $_{OXA-51}$-like عمل شد با این تفاوت که از پرایمرهای اختصاصی ژن *ompA* استفاده گردید. شرایط PCR برای ژن *ompA* به شرح زیر بود:

هر واکنش PCR شامل ۳۰ چرخه تکثیر و تحت شرایط زیر بود؛ دناتوراسیون اولیه ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ °C به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۹ °C به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ °C به مدت ۴۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه (جدول ۱).

جدول ۱: پرایمر های مورداستفاده برای تکثیر ژن *bla* $_{OXA-51}$-like و ژن *ompA*

نام ژن	توالی پرایمر	طول محصول تکثیر یافته (bp)	رفرانس
bla $_{OXA}$-51-like	F(5'- TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3') F(5'- TGGATTGCACTTCATCTTGG-3')	۳۵۳ bp	۹
ompA	F (5'- CTTGGTGGTCACTTGAAGCC-3') R (5'- GTGTGACCTTCGATACGTGC-3')	۲۳۰ bp	این مطالعه

پس از پایان واکنش PCR محصولات تکثیر یافته از هر ژن الکتروفورز و سپس با دستگاه UV transilluminator موردبررسی قرار گرفتند.

از آنجایی که پرایمر این ژن توسط محقق طراحی گردیده بود برای اطمینان، علاوه بر اینکه از سویه استاندارد *اسینتوباکتر بومانی* ATCC19606 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید، محصول PCR یکی از ایزوله‌های جداسازی شده نیز برای تعیین توالی به شرکت بیونیر کشور کره جنوبی ارسال گردید.

آنالیز آماری

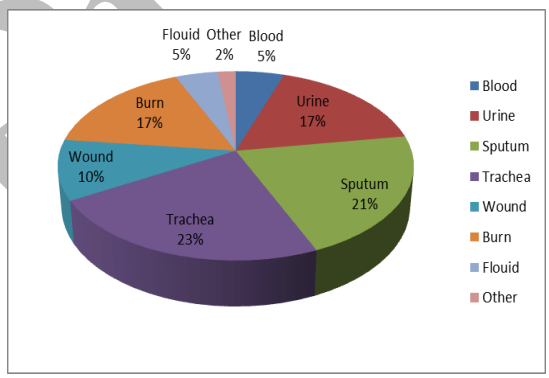
از نرم‌افزار SPSS 23 (IBM) و آزمون مربع کای استفاده شد. هر آزمایش سه مرتبه، تکرار می‌گردید. مقادیر $P\leq ۰/۰۵$ به‌عنوان شاخص معنی‌دار بودن در نظر گرفته می‌شدند.

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 18:43 +0430 on Friday August 18th 2017

یافته‌ها

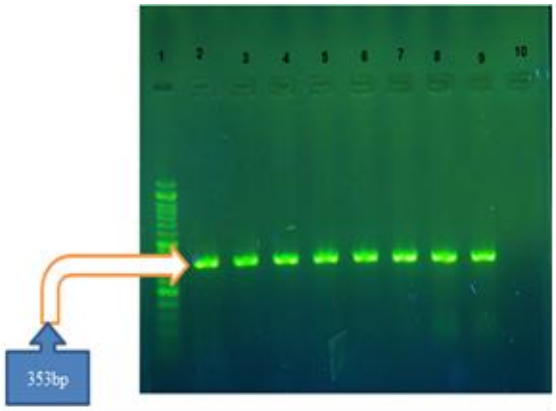
نتایج حاصل از بررسی تست‌های بیوشیمیایی نشان داد از ۶۵۰ نمونه ارسالی به آزمایشگاه، ۱۹۵ باکتری از سویه‌های مختلف اسینتوباکتر بودند که از این تعداد ۱۵۶ نمونه *اسینتوباکتر بومانی*، ۲۷ نمونه *اسینتوباکتر لوفی* ۱۲ نمونه نیز از سایر گونه‌های اسینتوباکتر بودند (*اسینتوباکتر لوفی* برخلاف *اسینتوباکتر بومانی* توانایی تولید اسید از قندهای گلوکز، گزیلوز، سوکروز، گالاکتوز، مانوز، رامنوز و لاکتوز را ندارد و همچنین فاقد ژن *bla* OXA-51-like هست). از ۱۵۶ ایزوله به‌دست‌آمده نهایی ۸۳ نمونه مربوط به زنان و ۷۳ نمونه مربوط به آقایان بود. این نمونه‌ها، از گروه سنی بین ۲ تا ۷۵ سال بودند. بیشترین ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* جمع‌آوری‌شده مربوط به تراشه با ۲۳٪ از نمونه‌ها، خلط ۲۱٪، ادرار ۱۷٪، سوختگی تقریباً ۱۷٪، زخم ۱۰٪ و سایر مایعات ۴٪ بود. سه نمونه نیز دارای منشأ نامشخص بودند (نمودار ۱).



نمودار ۱: تعداد و درصد نمونه‌های *استنوباکتر بومانی* جمع‌آوری‌شده از منابع کلینیکی مختلف

نتایج PCR جهت بررسی وجود ژن *bla* OXA-51-like

تمام نمونه‌های که در روش بیوشیمیایی *اسینتوباکتر بومانی* تشخیص داده شدند، ازنظر دارا بودن ژن *bla* OXA-51-like مورد آزمایش PCR قرار گرفتند. نتایج حاصل از PCR داد که همه ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی شده (۱۰۰٪) دارای ژن اگزاسلیناز بودند (شکل ۱).



شکل ۱: نتایج مربوط به محصول PCR ژن *bla* OXA-51-like *اسینتوباکتر بومانی* (چاهک شماره ۱) Ladder 50bp، چاهک‌های شماره ۲ تا ۸ ایزوله‌های بالینی، (چاهک شماره ۹) کنترل مثبت *اسینتوباکتر بومانی* ATCC 19606 و (چاهک شماره ۱۰) کنترل منفی

نتایج حاصل از روش دیسک دیفیوژن برای تمام ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی*

بعد از تعیین هویت گونه‌های اسینتوباکتر، جهت تعیین فنوتیپ مقاومت دارویی از روش دیسک دیفیوژن مطابق با معیار CLSI استفاده گردید.

بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جداشده با روش انتشار دیسک از نظر آماری، مقاومت بالایی را نسبت به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش، به‌جز پلی میکسین B نشان داد.

نتایج حاصل از تست آنتی بیوگرام نشان داد که بالاترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های پیپراسیلین ۱۰۰ میکروگرم با ۹۵/۵۱٪ و کمترین مقاومت بعد از پلی میکسین B مربوط به تتراسایکلین ۳۰ میکروگرم با ۷۲/۴۴٪ می‌باشد (جدول ۲). نتایج نشان داد تمام ایزوله‌ها نسبت به پلی میکسین B (PB 300) و تقریباً ۲۰٪ نمونه‌ها نیز نسبت به تتراسایکلین حساس هستند. این نتایج نشان داد که، ۹۲/۹۵٪ از ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* موردبررسی در این مطالعه، MDR و ۸۶/۵۳٪ از ایزوله‌ها XDR بودند، ولی هیچ *اسینتوباکتر بومانی* Pan drug resistant (PDR) مثبتی در بین ایزوله‌های موردبررسی وجود نداشت. تقریباً ۶۰٪ از ایزوله به ۱۰ آنتی‌بیوتیک از ۱۱ آنتی‌بیوتیک مورد آزمایش مقاوم بودند و فقط ۵ ایزوله از ۱۵۶ ایزوله به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش، حساس بودند (جدول ۲).

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 18:43 +0430 on Friday August 18th 2017

جدول ۲: نتایج حاصل تست آنتی بیوگرام، به‌صورت حساس یا S، نیمه حساس یا I و مقاوم یا R

Type of Antibiotic	R (%)	I (%)	S (%)
Piperacilin (PIP100)	۱۴۹(۹۵/۵۱)	۲(۱/۲۸)	۵(۳/۲۱)
Ceftriaxone (CRO 30)	۱۴۸(۹۴/۸۷)	۳(۱/۹۲)	۵(۳/۲۱)
Cefepime (FEP 30)	۱۴۷(۹۱/۲۳)	۲(۱/۲۸)	۷(۴/۴۹)
Imipenem (IPM 10)	۱۴۲(۹۱/۰۳)	۲(۱/۲۸)	۱۲(۷/۶۹)
Polymyxin B (PB 300)			۱۵۶(۱۰۰)
Gentamicin (GM 10)	۱۳۰(۸۳/۳۳)	۵(۳/۲۱)	۲۱(۱۳/۴۶)
Tetracycline (TE 30)	۱۱۳(۷۲/۴۴)	۱۳(۸/۳۳)	۳۰(۱۹/۲۳)
Ciprofloxacin (CP 5)	۱۴۰(۸۹/۷۵)	۳(۱/۹۲)	۱۳(۸/۳۳)
sulfamethoxazole-Trimethoprim (SXT 75)	۱۳۹(۸۹/۱۰)	۲(۱/۲۸)	۱۵(۹/۶۲)
Ticarcilin (TIC 75)	۱۴۶(۹۳/۵۹)	۲(۱/۲۸)	۸(۵/۱۳)
Ticarcilin-clavulanic acid (75/10)	۱۴۲(۹۱/۰۳)	۵(۳/۲۱)	۹(۵/۷۶)

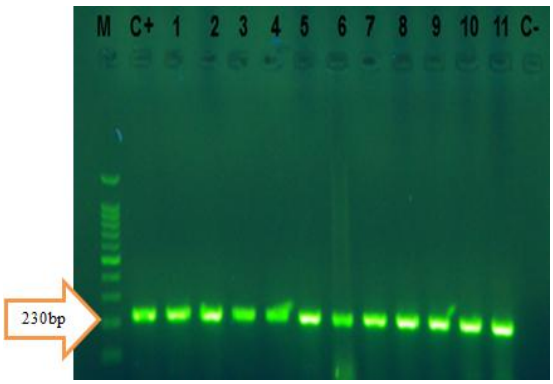
S: Sensitive; I: Intermediate; R: Resistance

نتایج حاصل وجود بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) از طریق آزمون دیسک ترکیبی

بر اساس نتایج آزمون دیسک ترکیبی، حدود ۵٪ از ایزوله‌ها (۸ ایزوله) مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند.

نتایج حاصل آزمون PCR برای بررسی وجود ژن *ompA*

نتایج حاصل از PCR نشان داد که، همه ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی شده (۱۰۰٪) برای ژن *ompA* مثبت هستند. اندازه باند برای قطعه تکثیرشده ژن *ompA* ۲۳۰ جفت بازی بود (شکل ۲).



شکل ۲: نتایج مربوط به محصول PCR ژن *ompA* *اسینتوباکتر بومانی*، چاهک M: Marker 100bp، چاهک C+: کنترل مثبت *اسینتوباکتر بومانی* ATCC 19606، و چاهک‌های شماره ۱ تا ۱۱ ایزوله‌های بالینی، و چاهک C-: کنترل منفی، اندازه قطعه تکثیرشده ۲۳۰ جفت باز هست

بحث

امروزه شیوع عفونت‌های ناشی از *استینوباکتر بومانی* در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها، ازجمله ICU، سوختگی و بخش ریوی به لحاظ ایجاد مرگ‌ومیر و ناراحتی‌های طولانی‌مدت به‌عنوان یکی از مسائل عمده بهداشتی در سراسر جهان به‌ویژه کشورهای درحال‌توسعه از اهمیت بسیار زیادی برخوردار هست (۱،۱۱). ازجمله ویژگی‌های خاص این باکتری می‌توان به پراکندگی وسیع و توانایی آن در جهت سازگاری و مانده گاری و بقاء در محیط بیمارستان و مقاومت ذاتی آن نسبت به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های رایج و توانایی کسب سریع مقاومت نسبت به بتا- لاکتام های وسیع الطیف اشاره نمود (۲). به همین دلیل از این باکتری، به‌عنوان یک پاتوژن بسیار موفق در برابر هرگونه روش درمانی و مواد پاک‌کننده یاد می‌شود. این ویژگی‌های منحصربه‌فرد، سبب شده است، تا روندهای پیشگیری و کنترل عفونت ناشی از آن به یک مسئله مهم بهداشتی در بسیاری از کشورها ازجمله ایران تبدیل گردد (۱۲-۱۴)، لذا این مطالعه با هدف تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی وجود ژن *ompA* انجام شده است.

همان‌طوری که نتایج این مطالعه نشان داد از ۶۵۰ نمونه ارسالی به آزمایشگاه ۱۹۵ نمونه، گونه‌های مختلف اسینتوباکتر بودند که از این تعداد ۱۵۶ ایزوله (۸۰٪) به‌عنوان *اسینتوباکتر بومانی*، ۲۷ ایزوله (۱۳/۸٪) *اسینتوباکتر لوفی* و ۱۲ ایزوله نیز از سایر گونه‌های اسینتوباکتر بودند که تقریباً مشابه نتایج حاصل از مطالعه Vafaei و همکاران (۲۰۱۲-۲۰۱۱) است که طی آن گزارش نمودند از ۱۳۰ ایزوله کلینیکی جداشده ۷۶/۹٪

Final Proof

اسینتوباکتر بومانی و ۱۶/۹٪ *اسینتوباکترلوفی* و ۶/۲٪ از سایر گونه‌ها می‌باشند (۱۴). همچنین بامطالعه Constantiniu و همکارانش (۲۰۰۴-۲۰۰۱) که ۷۱٪ از ایزوله‌ها را *اسینتوباکتر بومانی* و ۲۹٪ را *اسینتوباکتر لوفی* گزارش نموده بودند، مطابقت دارد (۱۵). آنالیز نتایج همچنین نشان داد که بیشترین ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* مربوط به تراشه ۲۷٪ و بعدازآن نیز به ترتیب بیشترین نمونه‌های مربوط به خلط (۲۱٪)، ادرار (۱۷٪)، سوختگی (۱۷٪)، زخم (۱۰٪) بودند که بامطالعه Vafaei و همکاران و Rahmani و همکاران مطابقت دارد (۱۴،۱۶).

در مطالعه حاضر برای شناسایی جنس و گونه از تست‌های فنوتیپی و ژنوتیپی (*bla* $_{OXA-51}$-like) استفاده شد که کاملاً نتایج یکدیگر را تأیید کردند. تمامی نمونه‌هایی که با تست فنوتیپی به‌عنوان *اسینتوباکتر بومانی* شناسایی شدند با تست PCR، ۱۰۰٪ ژن*bla* $_{OXA-51}$-like را داشتند. که با مطالعات Asadollahi و همکاران (۲۰۰۹) و Ardebili و همکاران (۲۰۱۴) و Rahmani و همکاران که اعلام کردند ۱۰۰٪ ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* دارای ژن*bla* $_{OXA-51}$-like هستند، مطابقت دارد (۲،۱۶،۱۷).

نتایج این مطالعه با نتایج حاصل از مطالعه Asadollahi و همکاران که اعلام کرد، اکثر سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جداشده در ایران نسبت به داروهای خط اول درمان شامل آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین، آمیکاسین) سفتازیدیم، فلوروکینولون ها (سپیروفلوکساسین) و کارباپنم ها (ایمی پنم و مروپنم) مقاومت نشان می‌دهند، مطابقت دارد (۱۷). در مطالعه Ardebili و همکاران نیز مشخص شد که به‌طورکلی ۵۴٪ از ایزوله‌ها حداقل نسبت به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاومت چندگانه (MDR) نشان دادند و فراوانی مقاومت نسبت به جنتامایسین ۶۴٪ و سپیروفلوکساسین و سفتازیدیم ۸۸٪ می‌باشد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد (۲). نتایج حاصل از آنتی بیوگرام در مطالعه حاضر نیز تقریباً با مطالعات Vafaei و همکاران، که مقاومت به سفتریاکسون ۹۵٪ ایمی پنم ۷۶٪ جنتامایسین ۶۳٪ و تتراسایکلین را ۵۱٪ و حساسیت به پلی میکسین B را ۱۰۰٪ گزارش نمودند، و همچنین با تحقیق Rahmani و همکاران که مقاومت به سولفامتوکسازول ۹۰٪ ایمی پنم ۹۲٪ جنتامایسین ۸۴٪ و تتراسایکلین ۸۹٪ بیان نمودند، مطابقت دارد (۱۴،۱۶). این تحقیق همچنین بامطالعه Mak که موثرترین دارو را پلی میکسین B معرفی می‌کند مطابقت دارد (۱۸). مطالعات اخیر در ایران نشان می‌دهد روند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به‌طور قابل‌توجی رو به افزایش است. به‌طوری‌که میزان مقاومت به ایمی پنم که در سال ۲۰۰۸، ۴۹/۳٪ گزارش‌شده بود در سال ۲۰۱۳، ۷۹/۸٪ و در این مطالعه به ۹۱٪ رسیده است که بامطالعه Hujer و همکاران مطابقت دارد (۱۹).

این مطالعه همچنین با مطالعات Wang و همکارانش و Smolyakov و همکارانش که اعلام نمودند، اغلب سویه‌ها به آمیکاسین،آمپی‌سیلین-سولباکتام، سفتازیدیم، سفی پیم، جنتامایسین، ایمی پنم، مروپنم، پیپراسیلین-تازوباکتام مقاوم، ولی به پلی میکسین B حساس بودند، نیز مطابقت دارد (۲۰،۲۱). نتایج حاصل دیسک ترکیبی تیکارسلین و تیکارسلین -کلاوولانیک اسید نشان داد که تقریباً ۵٪ از نمونه‌های ایزوله شده ESBLs مثبت هستند. درصد فراوانی مولدین ESBL در این مطالعه بامطالعه Shakibaie و همکارانش در تهران (۱۸/۹٪) و مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ توسط Sinha در هند، که بر روی مولدین ESBLs انجام گرفت، متفاوت هست (۲۲،۲۳). عدم تطابق نتایج این بررسی با مطالعات ذکرشده می‌تواند به دلیل نوع نمونه‌های موردبررسی و نوع دیسک آنتی‌بیوتیکی مصرفی باشد. از طرفی این باکتری‌ها از مکانیسم‌های مختلفی برای مقاومت در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها بهره می‌برند. همچنین می‌توان گفت که این اختلاف می‌تواند به دلیل زمان مطالعه و همچنین به دلیل مصرف بی‌رویه این آنتی‌بیوتیک‌ها باشد که باعث پیدایش سویه‌های با مقاومت بالا در این بیمارستان‌ها شده است. همان‌طوری که در بخش مقدمه ذکر شد، *اسینتوباکتر بومانی* دارای یک پروتئین غشایی به‌شدت حفاظت‌شده بنام OmpA است که نقش‌های متعددی در تعامل با میزبان در طول عفونت دارا است. یکی از نقش‌های مهم این پروتئین افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی هست. پروتئین‌های غشاء خارجی از خانواده OmpA در سویه‌های *اسینتوباکتر* شناسایی‌شده است. این پروتئین فراوان‌ترین پروتئین سطحی باکتری است که در مقاومت آنتی‌بیوتیکی و اتصال و تهاجم به سلول‌های اپی‌تلیال *اسینتوباکتر بومانی* نقش دارد (۱،۷). از آنجایی که نقش این پروتئین در بیماریزایی *اسینتوباکتر بومانی* و مقاومت دارویی غیرقابل‌انکار است، وجود ژن *ompA*، از طریق روش PCR موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تمامی ایزوله‌های موردبررسی (۱۰۰٪) دارای ژن *ompA* می‌باشند.

Downloaded from ijmm.ir at 18:43 +0430 on Friday August 18th 2017

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 18:43 +0430 on Friday August 18th 2017

در مطالعه Smani و همکاران گزارش گردید، که حذف ژن کنترل‌کننده *ompA* سبب کاهش ۴ تا ۸ برابری میزان MIC نسبت به کلرامفنیکل، نالیدکسیک اسید و آزترونام در مقایسه با تیپ وحشی می‌شود، درواقع Smani و همکاران برای اولین بار نقش OmpA در مقاومت دارویی *اسینتوباکتر بومانی* نشان دادند. این اولین توصیف دخالت OmpA در مقاومت ضد میکروبی در *اسینتوباکتر بومانی* از طریق تخریب ژن *ompA* بود. اگرچه مکانیسمی که OmpA از طریق آن سبب مقاومت در برابر ترکیبات ضد میکروبی می‌شود، دقیقاً مشخص نشده است، ولی امکان دارد که OmpA در بیرون راندن ترکیبات ضد میکروبی از فضای پری‌پلاسمی به همراه دو سیستم دفع دارویی Major Facilitator Superfamily (MFS) و Resistance-Nodulation-Division (RND) در این رابطه نقش داشته باشند (۱).

در مطالعه McConnell و همکارانش بیان شد، در باکتری *اشریشیاکلی* و *سیتروباکتر فروندی* افزایش بیان OmpA هومولوک به ترتیب سبب کاهش حساسیت به تتراسایکلین و کارباپنم‌ها می‌شود (۳). در مطالعه Sugawara و همکاران نفوذپذیری منافذی که توسط OmpA در سطح غشای *اسینتوباکتر بومانی* ایجاد می‌شود، ۷۰ مرتبه کمتر از نفوذپذیری منافذ ایجاد توسط پروتئین OmpA در *اشریشیاکلی* و پروتئین OprF در *سودوموناس آئروژینوزا* هست. که این نیز می‌تواند در افزایش مقاومت دارویی در این باکتری نیز مؤثر باشد (۲۴). نفوذپذیری کم این پورین‌ها، همراه با حضور β لاکتاماز و پمپ‌های دفع داروها، مانند AdeABC و AdeIJK، به نظر می‌رسد برای سطوح بالایی از مقاومت ذاتی به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری است (۲۴).

اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو با فراوانی نسبتاً بالایی در بخش‌های مختلف بیمارستانی حضور دارد که می‌تواند سبب افزایش میزان ناخوشی و یا مرگ‌ومیر در بیماران آلوده گردد. به نظر می‌رسد وجود پروتئین غشای خارجی در افزایش مقاومت دارویی مؤثر باشد. بنابراین لازم است تا مطالعات نظارتی به‌طور پیوسته صورت گیرد و اطلاعات حاصله از بررسی‌های نظارتی در انتخاب روند درمانی مناسب برعلیه میکروارگانیسم کمک کند تا مناسب‌ترین دارو برای درمان تجربی مورداستفاده قرار گیرد و با توجه به فراوانی پروتئین غشای خارجی و نقش مهم آن در پاتوژنز بررسی آن به‌عنوان یک هدف درمانی و ایجاد ایمنی نیز پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله، سپاس و تشکر خود را از پرسنل بیمارستان بیمارستان‌های امام خمینی، میلاد و مطهری که در جمع‌آوری نمونه‌ها نهایت همکاری را داشته‌اند اعلام می‌دارند و با سپاس ازمسئولین دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج که اجرای تحقیق نهایت همکاری را نمودند.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Smani Y, Fàbrega A, Roca I, Sánchez-Encinales V, Vila J, Pachón J. Role of OmpA in the Multidrug Resistance Phenotype of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(3): 1806–8.
2. Ardebili A, Rastegar Lari A, Talebi M. Correlation of ciprofloxacin resistance with the AdeABC efflux system *in Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Ann Lab Med 2014; 34(6): 433-38.
3. McConnell MJ, Pachón J. Expression, purification, and refolding of biologically active *Acinetobacter baumannii* OmpA from *Escherichia coli* inclusion bodies. Protein Expr Purif 2011; 77(1): 98-103.
4. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. Infect Immun 2009; 77(8): 3150-60.
5. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012; 18(3): 268-81.
6. Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Fernández-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, *et al*. Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol 2004; 25(10): 819-24.
7. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, et al. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 18:43 +0430 on Friday August 18th 2017

apoptosis of epithelial cells. Cell Microbiol 2005; 7(8): 1127-38.

8. Choi C, Lee J, Lee Y, Park T, Lee Je. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. BMC Microbiol 2008; 8(216): 1-11.

9. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla $_{OXA-51}$-like carbapenemase gene intrinsic to this species J Clin Microbiol 2006; 44: 2974-76.

10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fourth Informational Supplement; 2014.

11. Bayram Y, parlak M, Aypak C, Bayram I. Three–year reviwe of bacteriological profile and antibiogram of burn wound isolates in Van Turkey. Int J Med Sci2013; 10(1): 19-23.

12. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of Acinetobacter. Clin Microbiol Infect 2005; 11(11): 868-73.

13. Neonakis IK, Spandidos DA, Petinaki E. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. Int J Antimicrob Agents 2011; 37(2): 102-9.

14. Vafaei S, Mirnejad R, Amirmozafari N, Imani Foladi A, Masjedian F. Broad-spectrum beta-lactamases and frequency of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical samples by phenotypic methods. Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine 2013; 6: 39-44 [in Persian].

15. Constantiniu S, Romaniuc A, Iancu, SL, Filimon R, Tarași I. Cultural and biochemical characteristics of Acinetobacter spp. Strains isolated from hospital units. J Prev Med 2004; 12: 35-42

16. Rahmani M, Yaghoubnezhad-Zangeneh G, Oshaghi M, Talebi M, Amirmozafari N. Identification of five phylogenic groups of carbapenemase (bla $_{OXA-23,24,51,58,143}$) in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical samples in Iran by multiplex PCR. Der Pharma Chemica 2015; 7(7): 11-16.

17. Asadollahi P, Akbari M, Soroush S, Taherikalani M, Asadollahi K, Sayehmiri K, et al. Antimicrobial resistance patterns and their encoding genes among Acinetobacter baumannii strains isolated from burned patients. Burns 2012; 38(8): 1198–203.

18. Mak JK, Kim MJ, Pham J, Tapsall J, White PA. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother 2009; 63(1):47-54.

19. 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(12): 4114-23.

20. Wang DH, Sheng EH, Chang YY, Wang LH, Lin HC, Chen ML, et al. Health care- associated outbreak due to pan- drug resist ant Acinetobacter baumannii in a surgical unit. j Hosp Infect 2003; 53(2): 97-102.

21. Smolyakov R, Borer A, Riesenberg K, Schlaeffer F, Alkan M, Porath A, et al. Nosocomial multi-drug resistant Acinetobacter baumannii blood stream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. J Hosp Infect 2003; 54(1): 32-8.

22. Shakibaie M R, 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): 1-8.

23. Sinha M, Srinivasa H, Macaden R. Antibiotic resistance profile and Extended spectrum beta-lactamase production in Acinetobacter species. Indian J Med Res 2007; 126(1): 63-67.

24. Sugawara E, Nikaido H. OmpA is the principal nonspecific slow porin of Acinetobacter baumannii. J Bacteriol 2012; 194(15): 4089-96.

Final Proof