Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 8, Number 4 (12-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Prevalence PER and VEB beta-lactamase Genes among *Acinetobacter baumannii* Isolated from Patients in Tehran by PCR

Abbas Nazari Monazam[1], Seyyed Reza Hosseini Doust[1], Reza Mirnejad[2]

1. Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University. Tehran, Iran.
2. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Article Information

Article history:
Received:2014/03/18
Accepted:2014/05/20
Available online:2014/12/08

Article Subject:
Molecular Microbiology

IJMM 1393; 8(4): P 28-35

Corresponding author at:

Dr. Reza Mirnejad

Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email:
rmirnejad@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: According to numerous reports of infections caused by spectrum beta lactamases (ESBLs) producing *Acinetobacter baumannii* in our country in recent years, this study was performed to define the antibiotic susceptibility patterns and detect the prevalence *PER* and *VEB* beta-lactamase genes among *A.baumannii* isolated from patients in Tehran by PCR.

Materials and Methods: 100 *A.baumannii* clinical isolates collected from various hospitals in Tehran during a year, using special culture media and biochemical tests were identified. The antibiograms of the isolates against 11 antibiotics by disk diffusion method (Disk diffusion) according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines was performed. Then minimum inhibitory concentrations (MIC) was determined for cefepime and ceftazidime and for the identification of ESBL-producing strains was used in combination disk method, and finally to assess the prevalence of *PER* and *VEB* beta-lactamase genes using specific primers PCR was performed.

Results: Antibiograms results showed that the greatest resistance to the antibiotics amikacin, cefepime, and less resistance to polymyxin B were obtained. Rates of multi-drug resistant strains of about 70% was achieved. Of the isolates studied, the MIC of ceftazidime in 84% and for cefepime in 91% were ≥ 128 µg/ml. The results of the combined-disk test demonstrated that 20% of samples were ESBL positive. The PCR results showed that 47% and 32% of our isolates had *PER* and *VEB* genes respectively.

Conclusions: Regarding to existence of *PER* and *VEB* genes in this bacterium and possibility of transformation of these genes to the other bacteria, reconsideration in antibiotics consumption patterns and more attention to nosocomial infections control criteria are inevitable.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Polymerase Chain Reaction, VEB beta-lactamase, PER beta-lactamase

Copyright © 2014 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Nazari Monazam A, Hosseini Doust S, Mirnejad R. Prevalence PER and VEB beta-lactamase Genes among Acinetobacter baumannii Isolated from Patients in Tehran by PCR. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (4) :28-35

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۸ – شماره ۴ – زمستان ۱۳۹۳

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز *PER* و *VEB* در *اسینتوباکتر بومانی* ایزوله شده از بیماران شهر تهران به روش مولکولی PCR

عباس نظری مقدم[۱]، سید رضا حسینی دوست[۱]، رضا میرنژاد[۲]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران.

۲. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۳/۰۶/۲۸

پذیرش:۱۳۹۳/۰۷/۱۲

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۹/۱۰

موضوع:

میکروب‌شناسی مولکولی

IJMM 1393; 8(4): P 28-35

نویسنده مسئول:

دکتر رضا میرنژاد

مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران.

تلفن: ۰۲۱-۸۲۴۸۲۵۵۴

پست الکترونیک:

rmirnejad@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: با توجه به اهمیت گزارش‌های فراوان از عفونت‌های ناشی از *اسینتوباکتر بومانی* مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سال‌های اخیر در کشورمان، این مطالعه باهدف تعیین مقاومت پادزیستی و تعیین فراوانی ژنهای کد کننده ی بتالاکتامازهای*PER* و *VEB* در ایزوله ی *اسینتوباکتر بومانی* از بیماران بیمارستان‌های تهران با روش PCR انجام شد.

مواد و روش کار: ۱۰۰ ایزوله ی بالینی *اسینتوباکتر بومانی* جمع آوری شده از بیمارستان های مختلف شهر تهران طی یک سال، با استفاده از محیط های کشت اختصاصی و تست های بیوشیمیایی شناسایی شدند. آنتی بیوگرام با ۱۱ پادزیست مختلف با روش انتشار دیسک (Disk diffusion) بر اساس دستورالعمل CLIS انجام شد. در مرحله ی بعد MIC پادزیست های سفی پیم و سفتازیدیم انجام و جهت شناسایی سویه های مولد ESBL روش دیسک ترکیبی مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت برای بررسی شیوع ژنهای بتالاکتاماز *PER* و *VEB* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، PCR انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که بیشترین مقاومت به ترتیب مربوط به پادزیست های آمیکاسین و سفی پیم و کمترین مقاومت مربوط به پادزیست پلی میکسین *B* بود. میزان مقاومت چند دارویی در این سویه ها حدود ۷۰٪ و از مجموع ایزوله های مورد مطالعه حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفتازیدیم در ۸٤٪ از نمونه ها *MIC≥۱۲۸ μg/ml* و نسبت به سفی پیم در ۹۱٪ از نمونه ها *MIC≥ ۱۲۸μg/ml* بود. برطبق نتایج آزمون دیسک ترکیبی نیز۲۰٪ سویه ها مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند. نتایج *PCR* جهت شناسایی سویه های حاوی ژن های مقاومت نشان داد که ژن های *PER* و *VEB* به ترتیب ٤۷٪ و۳۲٪ است.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه ژنهای*PER* و *VEB* در این باکتری شناسائی شده و امکان انتقال آنها به دیگر باکتریها وجود دارد، لذا توصیه می گردد در الگو مصرف آنتی بیوتیک ها تجدید نظر گردد و به معیارهای کنترل عفونت‌های بیمارستانی توجه بیشتر شود.

کلمات کلیدی : *اسینتوباکتر بومانی*، *PCR*، *بتالاکتاماز VEB*، *بتالاکتاماز PER*

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

مقدمه

یکی از چهار جنس خانواده نایسریا که کوکوباسیل های کوتاه تقریبا گرد، گرم منفی، اکسیداز منفی، بدون تحرک و هوازی اجباری و فرصت طلب در حال گسترش، اسینتوباکترها هستند. این باکتری ها انتشار وسیعی در طبیعت داشته و می توانند از منابع گوناگونی جدا شوند، لیکن بیمارستان ها، منشا سویه های بیماری زا مقاوم به چند دارو آن می باشند (۱).

گونه *اسینتوباکتر بومانی* که شایع ترین در این جنس می باشد سبب عفونت ادراری، پنومونی، مننژیت، عفونت گردش

خون، باکتریوری مرتبط با کاتتر، اورتریت و دیالیز مداوم صفاقی، مرتبط با پریتونیت و زخم شده و همچنین عامل اصلی عفونت بیمارستانی مخصوصاً در بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه می باشد (۲). در سال های اخیر میزان کلونیزاسیون *اسینتوباکتر بومانی* در افراد بستری شده در بیمارستان بویژه آن‌ها که درمان پادزیستی وسیع و یا ضد سرطان دریافت کرده اند در حال افزایش است (۳). توانایی غیرعادی *اسینتوباکتر بومانی* در بقای طولانی مدت در تمام محیط بیمارستان می باشد (۴). *اسینتوباکتر بومانی* می تواند در سطوح مختلف در بیمارستان‌ها از جمله کاتتر و دیگر تجهیزات پزشکی زنده بماند که همین امر عامل گسترش بیمارستانی این باکتری می باشد (۵). میزان بالای مقاومت چند دارویی و همچنین مقاومت دارویی وسیع (*PDR*) Pandrug-resistant و (MDR) Multidrug-resistant) در *اسینتوباکتر بومانی*، این مساله را به موضوعی فرامنطقه ای و جهانی تبدیل کرده است (۶). ایزوله های MDR اسینتوباکتر در طی دهه گذشته مشکلات فراوانی را در امر درمان عفونت ها پدید آورده اند. امروزه ایزوله های با طیف مقاومت بیشتری نیز مشاهده شده است که آن‌ها را اصطلاحاً PDR می نامند. این ایزوله ها، باکتری هایی هستند که به تمام داروهای ضد میکروبی در دسترس بجز کلیستین و پلی میکسین B مقاومند (۷, ۸). اخیراً سازگاری ایزوله های کلینیکی اسینتوباکتر با پادزیست‌ها، منتهی به ایجاد ایزوله های XDR (Extreme drug resistance) نیز شده است (۹). این ایزوله ها عملاً نسبت به تمامی پادزیست‌ها مقاومت نشان می دهند. وجود این ایزوله‌ها با طولانی شدن مدت بستری شدن، افزایش هزینه ها و در نهایت مرگ و میر بیماران رابطه معنی داری دارد (۱۰).

مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی در *اسینتوباکتر بومانی*، همیشه بخشی از سیر تکاملی باکتری به عنوان ابزار رقابت و بقای آنها در بین باکتری های تولید کننده پادزیست تلقی شده است (۱۱, ۱۲). بطوری که مهمترین وسیله ی مقاومت *اسینتوباکتر بومانی* در برابر پادزیست‌های بتالاکتام، تولید و آزادسازی انواع آنزیم های بتالاکتاماز می‌باشد به طوریکه تاکنون بیش از ۷۰۰ نوع آنزیم شناسایی و تعیین هویت شده اند (۱۳). بنابراین، استفاده از عوامل ضد میکروبی بخصوص پادزیست‌ها علیه باکتری‌ها باعث اتخاذ روش‌های ماهرانه و مناسب در راستای حفظ بقای آنها گردیده است. از این روش ها می‌توان به کسب و ظهور ژن‌های جدید مثل *PER* و*VEB* اشاره نمود (۱۴, ۱۵).

ژن *VEB*، اولین بار در *اشریشیاکلی* یک آنزیم همراه یک ژن دیگر بنام *VEB*-1 در بیماری از ویتنام گزارش شده بود و پس از آن در تایلند در سویه های سودوموناس نیز یافت شده است و تاکنون سه تیپ از این آنزیم شناخته شده است (۱۶). بتالاکتاماز نوع *PER* نیز فقط در حدود ۲۷٪-۲۵٪ با بتالاکتامازهای شناخته شده *TEM*، *SHV* شباهت دارند و بطور موثری پنی سیلین ها و سفالوسپورین‌ها را هیدرولیز نموده و توسط اسید کلاوولانیک مهار می شود. بتالاکتامازهای تیپ*1* - *PER* اولین بار در سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* در بیماران ترکیه گزارش شده است و در ۶۰ ٪ سویه های مقاوم به سفتازیدیم *اسینتوباکتر بومانی* نیز گزارش شده است (۱۷). این اولین آنزیم شناخته شده در *اسنیتوباکتر بومانی* است که می تواند سفالوسپورین های نسل ۴ بجز سفتازیدیم و سفوتاکسیم را هیدرولیز کند و یک آنزیم وابسته بدان یعنی *PER*-2 که ۸۶ ٪ همولوژی با *PER*- 1 دارد در میان سویه های *سالمونلا انتریکا* در آرژانتین یافت شده است و تاکنون۳ تیپ از *PER* شناسایی شده است (۱۷). *PER-2* درحدود ۸۶٪ با *PER- 1* شباهت دارد و از سروار *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *پروتئوس میرابیلیس* و *ویبریو کلرا* بدست آمد که فقط در آمریکای جنوبی یافت گردید (۱۸). جالب توجه آن است که در حالیکه *PER* و *VEB*معمولاً به عنوان طبقه ۲ بتالاکتاماز در انتروباکتریاسه ها در نظر گرفته شده اند، مطالعه مختلف از حضور آنها در *اسینتوباکتر بومانی* به عنوان یک عامل شایع عفونت بیمارستانی حکایت دارد (۱۹).

افزایش موارد عفونت با *اسینتوباکتر بومانی* و مقاومت آن به چندین عامل ضد میکروبی (مانند بتالاکتام های وسیع الطیف، کارباپنم ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون ها) و عفونت هایی که در سیستم عصبی مرکزی، پوست، بافتهای نرم و استخوان ایجاد می کند تمایل به شناسایی *اسینتوباکتر بومانی* در دو بعد علمی و عمومی شدیدا افزایش داده است. مکانیسم های دقیقی که نشان دهنده آغاز و پیشرفت شیوع عفونت های *اسینتوباکتر بومانی* باشد هنوز مشخص نشده است. دلایل فوق از جمله علل اساسی در انجام مطالعه شناسایی *اسینتوباکتر بومانی*، بررسی الگو مقاومت پادزیستی و بررسی فراوانی مولکولی بتالاکتاماز *VEB* و

PER در ایزوله های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* به روش مولکولی PCR بود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه ها

این مطالعه ی به صورت توصیفی- آزمایشگاهی، بر روی ۵۰۰ نمونه خون، ادرار، پوست، زخم، تراشه و نمونه های جداشده از دستگاه تنفسی بیماران، که بیش از ۴۸ ساعت در بخش های مختلف بیمارستان های شهر تهران (بیمارستانهای بقیه ا...(عج)، میلاد، امام خمینی و ...) بستری بوده و دچار عفونت شده بودند، در طی سالهای ۱۳۹۲-۱۳۹۱ انجام پذیرفت. نمونه ها در محیط BHI براث به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

جداسازی باکتری ها

پس از ارسال نمونه ها به آزمایشگاه، از محیط مک کانکی آگار و بلاد آگار (مرک-آلمان) حاوی ۵٪ خون گوسفند برای جداسازی اولیه باکتری استفاده گردید. هم چنین برای شناسائی ایزوله ها تا حد گونه از تست های بیوشیمیایی شامل اوره آز، اکسیداسیون – تخمیر (OF)، SIM، MRVP، TSI و همچنین تست های کاتالاز و اکسیداز و سیمون سیترات، باکتری ها جدا و تعیین هویت گردیدند. رشد در ۳۷ و ۴۲ درجه سلسیوس، نیز از جمله تست هایی بود که جهت تشخیص گونه های مختلف اسینتوباکتر انجام شد.

تعیین حساسیت پادزیستی به روش انتشار از دیسک (Disk Diffusion)

این تست مطابق استاندارد [M100-S22 CLSI 2012] انجام گردید (**۲۰**). در این مطالعه از پادزیست های آمپی سیلین-سولباکتام (۲۰ µg)، سفتریاکسون (۳۰ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg)، ایمی پنم (۱۰ µg)، پیپراسیلین - تازوباکتام (۱۱۰ µg)، توبرامایسین(۱۰ µg)، سفی پیم(۳۰ µg)، جنتامایسین (۱۲ µg)، مروپنم (۱۰ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg) و پلی میکسین B (۳۰۰µg) تهیه شده از شرکت MAST (Mast DiagnosticsMast group Ltd., Merseyside, UK) استفاده گردید. بعد از آنتی بیوگرام، اندازه ی هاله مطابق با استاندارد CLSI تعیین شده و به صورت حساس، نیمه حساس (متوسط) و مقاوم گزارش شد. جهت کنترل کیفی آزمایشات بالا از سویه ی استاندارد *اشریشیا کلی* ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و سویه استاندارد *اسینتوباکتر بومانی*ATCC 19606 به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند.

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

مطابق با دستورالعمل CLSI به منظورتعیین حداقل غلظت پادزیستی که مانع رشد باکتری می شود، آزمون MIC برای پادزیست های سفی پیم و سفتازیدیم به روش رقت سازی متوالی (Serial Dilution) انجام شد(۲۰).

روش دیسک ترکیبی جهت سنجش تولید ESBLs

برای تشخیص تولید آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) از روش غربالگری دیسک ترکیبی استفاده گردید. بدین صورت که بعد از کشت باکتری روی محیط مولر هینتون آگار، چهار دیسک سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم–کلاوولانیک اسید و سفوتاکسیم-کلاوولانیک اسید دیسک با فاصله ی ۱۵میلی متر از یکدیگر روی آن قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، پلیت ها مورد بررسی قرار گرفته و افزایش بیش از ۵ میلیمتر در قطرهاله هرکدام از پادزیست های فوق در ترکیب با کلاوولانیک اسید نسبت به پادزیست تنها، ارگانیسم تولید کننده ESBL و در غیر این صورت ارگانیسم ESBL منفی گزارش می شدند(**۲۰**).

شناسائی مولکولی بتالاکتامازهای *PER* و *VEB* به روش مولکولی PCR

در این تحقیق جهت بررسی مولکولی حضور ژن *PER* و *VEB* در نمونه ها از پرایمرهای زیر استفاده شدند(جدول ۱)(**۲۱**).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تعیین حضور ژن های PER و VEB (۲۱)

PER-F	**5´-ATGAATGTCATTATAAAAGC-3´**
PER-R	**5´-TTAATTTGGGCTTAGGGCAGAA-3´**
VEB-F	**5´-GGAACAACTTTGACGATTGA-3´**
VEB-R	**5´-CCCTGTTTTATGAGCAACAA-3´**

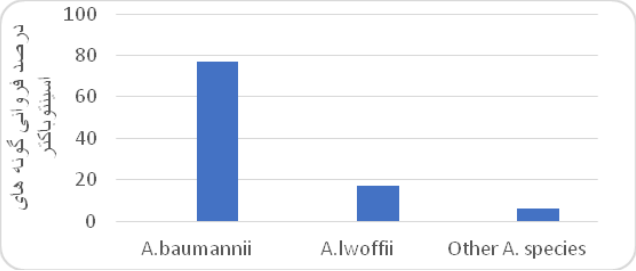
جدول ۲: شرایط واکنش PCR

PER	واسرشت اولیه	واسرشت	اتصال	ساخت	ساخت پایانی
دما (°C)	۹۴	۹۴	۵۵/۵	۷۲	۷۲
زمان	۱۰ دقیقه	۱۳ دقیقه	۱ دقیقه	۱ دقیقه	۵ دقیقه
VEB	واسرشت اولیه	واسرشت	اتصال	ساخت	ساخت پایانی
دما (°C)	۹۴	۹۴	۵۳/۵	۷۲	۷۲
زمان	۱۰ دقیقه	۱۳ دقیقه	۱ دقیقه	۱ دقیقه	۵ دقیقه

پس از استخراج ژنوم نمونه های بالینی به روش Boiling واکنش PCR در حجم نهائی ۲۵µL در نظر گرفته شد. هر نمونه شامل: 2X Master mix ۹ µL (ساخته کمپانی Ampliqon III کشور دانمارک) و حاوی ۱ µL (1.5mM $MgCl_2$، ۲۰mM dNTP) (۱۵-۲۰ ng/µL) DNA الگو، ۱ µL از پرایمر های VEB و PER شامل ۱۰pmol از هر پرایمر R و F (جدول ۱) و آب مقطر دوبار تقطیر استریل تا حجم۲۵ µL بود. با هر سری آزمایش PCR، یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی در نظر گرفته شد. برنامه دمایی برای هر دو ژن نیز در جدول ۲ آمده است. برنامه دمایی ۳۰ چرخه ادامه پیدا کرد. محصولات PCR، پس از انجام واکنش بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز و برای تائید نهائی سکانس گردیدند.

یافته ها

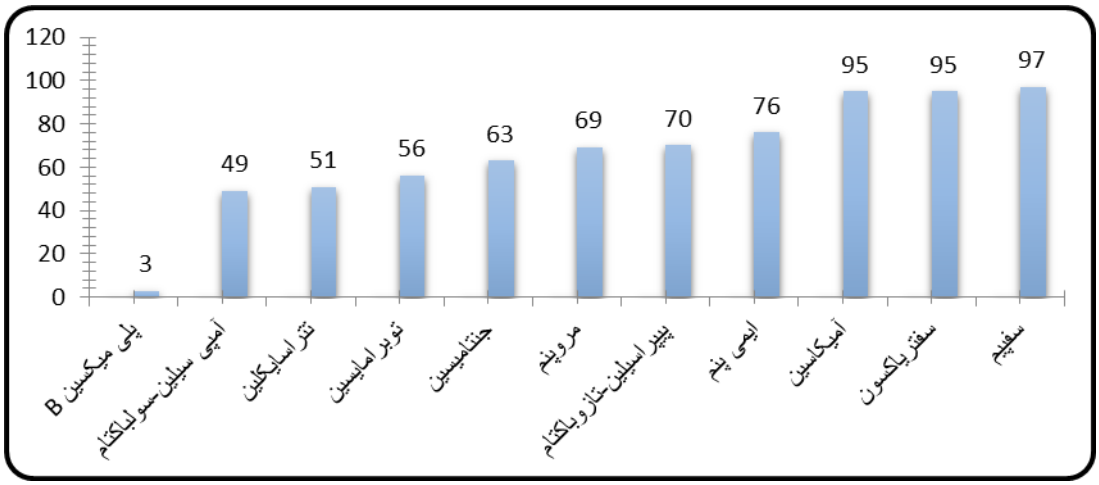
در مطالعه حاضر ۱۳۰ نمونه اسینتوباکتر ایزوله شده از ۵۰۰ نمونه بیماران بستری بدست آمد. ۱۰۰ نمونه (۷۶/۹٪) به عنوان *اسینتوباکتر بومانی* تعیین هویت شدند و ۲۲ نمونه (۱۶/۹٪) *اسینتوباکتر لوفی* و ۸ نمونه (۶/۲٪) سایر گونه های اسینتوباکتر بود که در نمودار ۱ آورده شده است. ۴۰ نمونه از بخش مراقبت های ویژه، ۳۰ نمونه از بخش عفونی، ۲۰ نمونه از اورژانس و ۱۰ نمونه از سایر بخش ها ایزوله شد، که بیشترین میزان مربوط به بخش مراقبت های ویژه بود. در این میان سویه ها از ۴۰ نمونه ی خون (۴۰٪) ، ۲۷ نمونه تراشه (۲۷٪)، ۱۲ نمونه زخم (۱۲٪) ، ۸ نمونه ادرار (۸٪)، و ۱۳ نمونه (۱۳٪) مجهول ایزوله شدند.



نمودار ۱: فراوانی گونه های اسینتوباکتر جدا شده از نمونه های کلینیکی مورد بررسی

تست حساسیت پادزیستی

همانطورکه در نمودار ۲ نشان داده شده است اغلب ایزوله به سفپ یم، سفتریاکسون و آمیکاسین مقاوم بودند و کمترین مقاومت به پادزیست پلی میکسین B نشان دادند. از تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی *اسینتوباکتر بومانی*بدست آمده، ۲۰٪ *اسینتوباکتر بومانی*ها، تنها به یک پادزیست مقاوم بودند. ۱۰٪ نمونه ها به تنها به ۲ پادزیست مقاومت داشتند، اما ۷۰٪ نمونه به ۳ پادزیست و یا بیشتر مقاومت کامل نشان دادند. بر طبق نتایج آزمون دیسک ترکیبی ۲۰٪ سویه ها مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند. از مجموع ایزوله های مورد مطالعه حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفتازیدیم در ۸۴٪ از نمونه ها MIC ≤ 128 µg/ml و نسبت به سفی پیم در ۹۱٪ از نمونه ها MIC ≤ 128 µg/ml گزارش گردید.



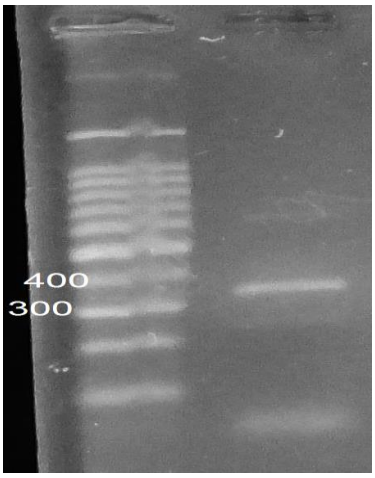
نمودار ۲: درصد مقاومت مشاهده شده در بین ایزوله های جدا شده از بیماران

نتایج بدست آمده در بررسی ژن VEB به وسیله تکنیک PCR

با استفاده از پرایمر های اختصاصیVEB، وجود یا عدم وجود این ژن در ایزوله ها با استفاده از PCR بررسی شد. نتایج به دست آمده به این صورت بود : ۳۲ مورد از ایزوله ها یا به عبارت دیگر ۳۲٪ از نمونه های مورد بررسی دارای این ژن بودند (شکل ۱).

نتایج بدست آمده در بررسی ژن PER به وسیله تکنیک PCR

با استفاده از دو جفت پرایمر PER-R و PER-F و انجام PCR وجود یا عدم وجود ژن PER در نمونه های جدا شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج PCR جهت شناسایی سویه های حاوی ژن PER نشان داد که ۴۷ مورد (۴۷٪) از ایزوله ها دارای ژن PER بودند (شکل ۲).



شکل ۱: الکتروفورز محصول تکثیر شده ی ژن VEB در سویه های اسینتوباکتر بومانی با PCR. ردیف یک مارکر (۱۰۰ bp DNA ladder)، ردیف ۲: محصول تکثیر شده ژنVEB با اندازه ۳۷۰ جفت باز در سویه استاندارد

شکل ۱ : الکتروفورز محصول تکثیر شده ی ژن PER در سویه های اسینتوباکتر بومانی با PCR. ردیف ۲-۱: محصول تکثیر شده ژنPER با اندازه ۹۳۳ جفت باز در سویه استاندارد و نمونه بالینی.ردیف۳: کنترل منفی و ردیف ۴: مارکر (100 bp DNA ladder.

بحث

اسینتوباکتر بومانی، پاتوژن فرصت طلب با قدرت بیماری زائی بالا و یکی از عوامل عفونت های بیمارستانی در طی سه دهه گذشته است. درمان این باکتری به خصوص سویه های مقاوم به چند دارو از بیمارستان و مولدین بتالاکتامازهای وسیع الطیف آن، به علت مقاومت گسترده شان نسبت به داروهای ضد میکروبی با مشکل مواجه است. طی ۳۰ سال قبل پادزیست های بتالاکتام جدید بسیاری تهیه شدند که در برابر فعالیت های هیدرولیزی بتالاکتامازها مقاوم بودند، اما با بکارگیری هر گروه جدید جهت درمان بیماران، بتالاکتامازهای جدید بوجود می آیند که نسبت به آن گروه جدید داروها مقاومت نشان می دهند. احتمالا مصرف بیش از اندازه پادزیست های جدید جهت درمان بیماران و فشار انتخابی بر باکتریها بر تولید بتالاکتامازهای جدید توسط باکتری-ها موثر است. امروزه این نوع از مقاومت دارویی رشد زیادی داشته و به علت غیر فعال سازی طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام به ویژه سفالوسپورین های نسل سوم و منوباکتام ها مشکلات فراوانی را در درمان عفونت های میکروبی ایجاد کرده اند. با توجه به این که فاکتورهای محیطی و الگوهای مختلف استفاده از عوامل ضد میکروبی در ایجاد و گسترش این سویه ها در نقاط مختلف دنیا نقش دارند و با توجه به این که داشتن اطلاعات در زمینه میزان شیوع این نوع آنزیم ها و الگوی پادزیستی در کنترل، پیشگیری و درمان عفونت های ناشی از *اسینتوباکتر بومانی* حائز اهمیت هستند، لذا این مطالعه با هدف تعیین مقاومت پادزیستی و فراوانی سویه های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف و بررسی شیوع آنزیم بتالاکتامازی PER و VEB در سویه های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از نمونه های بالینی به روش ژنوتیپی انجام گردید.

در این مطالعه از ۱۳۰ نمونه اسینتوباکتر شناسایی شده ۷۶/۹٪ ایزوله ها *اسینتوباکتر بومانی* و ۲۳/۱٪ *اسینتوباکتر لوفی* و سایر اسینتوباکترها بودند که تقریبا مشابه مطالعه Constantiniu و همکارانش در طی سالهای ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۴ بود که گزارش نمودند از ۲۴ ایزوله های کلینیکی جدا شده، ۷۱٪ *اسینتوباکتر بومانی* و ۲۹٪ *اسینتوباکتر لوفی* بودند (۲۲) و همچنین مشابه مطالعه ی Rit و همکارانش در سال ۲۰۱۲ بود که نشان دادند از میان ۴۱۸۰ ایزوله ی کلینیکی ۷۴/۰۲ ٪ به عنوان *اسینتوباکتر بومانی* و مابقی به عنوان *اسینتوباکتر لوفی* و سایر گونه های اسینتوباکتر شناخته شده اند (۲۳). مطالعات مختلفی مانند Perez و همکارانش در سال ۲۰۰۷ (۲۴)، هم چنین مطالعات Begum و همکارانش در سال ۲۰۱۴ (۲۵) و Hasan و همکارانش در سال ۲۰۱۴ نشان دهنده این مطلب می باشند که سویه های مختلف *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به اکثر پادزیست های مصرفی مقاوم شده اند (۲۶) و از طرفی نیز نتایج مطالعه ی حاضر هم نشان داد که سویه های *اسینتوباکتر بومانی* مقاومت بسیار بالایی نسبت به پادزیست های مورد مطالعه و همچنین MIC بسیار بالایی نسبت به سفی پیم و سفتازیدیم دارند.

در این مطالعه، همانند مطالعات Dally و همکارانش در سال ۲۰۱۳ (۲۷) و Kamalbeik و همکارانش در سال ۲۰۱۴ مشخص گردید که اغلب سویه ها به سفتازیدیم و سفی پیم مقاوم بودند (۲۸). برخلاف مطالعه ای که در سال ۱۳۸۸ توسط Shahcheraghi و همکارانش صورت گرفت که حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفتازیدیم در ۷۹ (۸۳/۱٪) ایزوله MIC ≥ 64 µg/ml بود. در این مطالعه حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفتازیدیم در ۸۴٪ از نمونه ها MIC ≥ 128 µg/ml بود (۲۹). عدم تطابق نتایج این بررسی با مطالعه ذکر شده می تواند بدلیل نوع نمونه های مورد بررسی و نوع دیسک پادزیستی مصرفی و اجرای روش باشد. نتایج بررسی میزان حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفتازیدیم در سویه های

اسینتوباکتر بومانی در این مطالعه با نتایج مطالعات انجام گرفته در کشور کره و در کشور تایوان تقریبا همخوانی داشت (۳۰). برطبق نتایج آزمون دیسک ترکیبی جهت غربالگری سویه های مولد بتالاکتاماز های وسیع الطیف در این مطالعه ۲۰٪ سویه ها مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف بودندکه با مطالعه Shahcheraghi و همکارانش در سال ۱۳۸۸ در تهران (۲۹) و مطالعه Sinha و همکارانش که در سال ۲۰۰۷ در هندوستان (۳۱)، که بر روی مولدین ESBL صورت گرفته بود، هم خوانی دارد، در حالی که با مطالعه Maleki و همکارانش (۳۲) که در سال ۲۰۱۴ در شیراز انجام دادند و میزان فراوانیESBL را ۴۴٪ اعلام کردند، متفاوت می باشد. یافته های مطالعه حاضر نشان داد که مقاومت پادزیستی در *اسینتوباکتر بومانی*های مورد مطالعه بالا بوده است که با مطالعه Joshi که میزان *اسینتوباکتر بومانی*MDR را ۷۵٪ گزارش داده بود همخوانی داشت (۳۳)، اما برخلاف مطالعه ی حاضر، Bahador و همکارانش میزان *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو را ۴۵٪ گزارش داده است که احتمالا دلیل آن موقعیت مختلف جغرافیایی و استفاده غیر یکسان از پادزیست ها بوده است (۳۴).

نتایج این مطالعه تا حدودی همانند بررسی Aubert و همکاران در تایلند در فاصله ۲۰۰۱-۱۹۹۸ بود که میزان فراوانی ژن *VEB* را ۳۳٪ گزارش نمودند (۳۵). همچنین میزان فراوانی ژن *PER* بدست آمده در مطالعه حاضر همانند نتایج مطالعه Kim می باشد که در کشور کره در سال ۲۰۰۸ انجام شده است(۳۶).

افزایش مقاومت به سفالوسپورین های وسیع الطیف خطر بسیار بزرگی مخصوصا برای بیماران بستری شده محسوب می گردد و امکان درمان با آن ها را از بین برده است، لذا شناسایی و ایزولاسیون بیماران ناقل باکتری های مولدESBL، انتخاب صحیح پادزیست ها، شناسایی سویه های مولد انواع آنزیم های بتالاکتامازی از سایر موارد مهم کنترل و ممانعت از انتشار سویه های مقاوم در بیمارستان ها می باشند. هم چنین با توجه به اینکه در مطالعه حاضر تنها ۲۰٪ از ایزوله ها مولد ESBL بودند می توان گفت در این باکتری مکانیسم های دیگری غیر از بتالاکتامازهای وسیع الطیف سبب مقاومت می گردند، که شناسایی سریع و ردیابی این سویه ها نقش مهمی در جلوگیری از گسترش آن‌ها دارد.

تشکر و قدردانی

از همه عزیزانی که ما را در انجام این پژوهش یاری نموده اند، کمال تشکر و قدردانی را می نماییم.

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. Acinetobacter baumannii: an emerging opportunistic pathogen. Virulence. 2012;3(3):243-50.
2. McConnell MJ, Actis L, Pachon J. Acinetobacter baumannii: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol Rev. 2013;37(2):130-55.
3. Al-Hassan L, El Mehallawy H, Amyes SG. Diversity in Acinetobacter baumannii isolates from paediatric cancer patients in Egypt. Clin Microbiol Infect. 2013;19(11):1082-8.
4. Fukuta Y, Muder RR, Agha ME, Clarke LG, Wagener MM, Hensler AM, et al. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii among cancer patients. Am J Infect Control. 2013;41(12):1249-52.
5. Vahdani P, Yaghoubi T, Aminzadeh Z. Hospital acquired antibiotic-resistant acinetobacter baumannii infections in a 400-bed hospital in Tehran, Iran. Int J Prev Med. 2011;2(3):127-30.
6. Mostofi S, Mirnejad R, Masjedian F. Multi-drug resistance in Acinetobacter baumannii strains isolated from clinical specimens from three hospitals in Tehran-Iran. African Journal of Microbiology Research. 2011; 5(7): 3579-583.
7. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008;21(3):538-82.
8. Valencia R, Arroyo LA, Conde M, Aldana JM, Torres MJ, Fernandez-Cuenca F, et al. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant Acinetobacter baumannii in a tertiary care university hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009;30(3):257-63.
9. Park YK, Peck KR, Cheong HS, Chung DR, Song JH, Ko KS. Extreme drug resistance in Acinetobacter baumannii infections in intensive care units, South Korea. Emerg Infect Dis. 2009;15(8):1325-7.
10. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR ,et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Lancet Infect Dis. 2006;6(9):589-601.

11. 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.
12. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: mechanisms of virulence and resistance. Int J Antimicrob Agents. 2010; 35(3):219-26.
13. Mirnejad R, Dehghani M, Masjedian F, Imani Fooladi AA, Haghighat S. Antimicrobial Susceptibility Patterns and Distribution of BlaKPC Genes among A. baumannii Isolated from Patients at Tehran - Iran Hospitals. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2012; 6(2):707-12
14. Vafaei S, Mirnejad R, Amirmozafari N. Determining the Patterns of Antimicrobial Susceptibility and the Distribution of blaCTX-M Genes in Strains of Acinetobacter Baumannii Isolated from Clinical Samples. J Isfahan Med Sch 2013; 31(252): 1443-51.
15. Farajnia S, Azhari F, Alikhani MY, Hosseini MK, Peymani A, Sohrabi N. Prevalence of PER and VEB Type Extended Spectrum Betalactamases among Multidrug Resistant Acinetobacter baumannii Isolates in North-West of Iran. Iran J Basic Med Sci. 2013;16(6):751-5.
16. Naas T, Coignard B, Carbonne A, Blanckaert K, Bajolet O, Bernet C, et al. VEB-1 Extended-spectrum beta-lactamase-producing Acinetobacter baumannii, France. Emerg Infect Dis. 2006;12(8):1214-22.
17. Pasteran F, Rapoport M, Petroni A, Faccone D, Corso A, Galas M, et al. Emergence of PER-2 and VEB-1a in Acinetobacter baumannii Strains in the Americas. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(9):3222-4.
18. Al-Hassan L, El Mahallawy H, Amyes SG. First report of bla(PER-3) in Acinetobacter baumannii. Int J Antimicrob Agents. 2013;41(1):93-4.
19. Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, Hujer KM, Lavender H, Jamison JJ, et al. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. J Bacteriol. 2008;190(24):8053-64.
20. Swenson JM, Killgore GE, Tenover FC. Antimicrobial susceptibility testing of Acinetobacter spp. by NCCLS broth microdilution and disk diffusion methods. J Clin Microbiol. 2004;42(11):5102-8.
21. Alikhani MY, Karimi Tabar Z, Mihani F, Kalantar E, Karami P, Sadeghi M, et al. Antimicrobial Resistance Patterns and Prevalence of blaPER-1 and blaVEB-1 Genes Among ESBL-producing Pseudomonas aeruginosa Isolates in West of Iran. Jundishapur J Microbiol. 2014;7(1):e8888.
22. Constantiniu S, Romaniuc A, Chiriac R, Berea C, Kalis O, Rezus E, et al. Antibacterial antibodies for some enterobacteria in sera of patients with reactive arthritis and other rheumatoid diseases. Roum Arch Microbiol Immunol. 2008;67(1-2):30-5.
23. Rit K, Saha R. Multidrug-resistant acinetobacter infection and their susceptibility patterns in a tertiary care hospital. Niger Med J. 2012;53(3):126-8.
24. 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.
25. Begum S, Hasan F, Hussain S, Ali Shah A. Prevalence of multi drug resistant Acinetobacter baumannii in the clinical samples from Tertiary Care Hospital in Islamabad, Pakistan. Pak J Med Sci. 2013;29(5):1253-8.
26. Hasan B, Perveen K, Olsen B, Zahra R. Emergence of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in hospitals in Pakistan .J Med Microbiol. 2014;63(Pt 1):50-5.
27. Dally S, Lemuth K, Kaase M, Rupp S, Knabbe C, Weile J. DNA microarray for genotyping antibiotic resistance determinants in Acinetobacter baumannii clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(10):4761-8.
28. Kamalbeik S, Talaie H, Mahdavinejad A, Karimi A, Salimi A. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infection in intensive care unit patients in a hospital with building construction: is there an association? Korean J Anesthesiol. 2014;66(4):295-9.
29. Shahcheraghi F, Abbasalipour M, Feizabadi M, Ebrahimipour G, Akbari N. Isolation and genetic characterization of metallo-beta-lactamase and carbapenamase producing strains of Acinetobacter baumannii from patients at Tehran hospitals. Iran J Microbiol. 2011;3(2):68-74.
30. Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, et al. High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing Acinetobacter spp. in Korea. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(5):1749-51.
31. Sinha M, Srinivasa H, Macaden R. Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in Acinetobacter species. Indian J Med Res. 2007;126(1):63-7.
32. Maleki MH, Sekawi Z, Soroush S, Azizi-Jalilian F, Asadollahi K, Mohammadi S, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of tetracycline resistant Acinetobacter baumannii isolates from nosocomial infections at Tehran hospitals. Iran J Basic Med Sci. 2014;17(1):21-6.
33. Joshi SG, Litake GM, Ghole VS, Niphadkar KB. Plasmid-borne extended-spectrum beta-lactamase in a clinical isolate of Acinetobacter baumannii. J Med Microbiol. 2003;52(Pt 12):1125-7.
34. Bahador A, Taheri M, Pourakbari B, Hashemizadeh Z, Rostami H, Mansoori N, et al. Emergence of rifampicin, tigecycline, and colistin-resistant Acinetobacter baumannii in Iran; spreading of MDR strains of novel International Clone variants. Microb Drug Resist. 2013;19(5):397-406.
35. Aubert D, Girlich D, Naas T, Nagarajan S, Nordmann P. Functional and structural characterization of the genetic environment of an extended-spectrum beta-lactamase blaVEB gene from a Pseudomonas aeruginosa isolate obtained in India. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(9):3284-90.
36. Kim JW, Heo ST, Jin JS, Choi CH, Lee YC, Jeong YG, et al. Characterization of Acinetobacter baumannii carrying bla(OXA-23), bla(PER-1) and armA in a Korean hospital. Clin Microbiol Infect. 2008;14(7):716-8.