مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۵۲/هفته دوم آبان ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۳/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۸

تعیین الگوی حساسیت ضد میکروبی و توزیع ژن bla CTX-M در سویه‌های اسینتوباکتر بومانی جداشده از نمونه‌های بالینی به روش فنوتیپی وPCR

سمیه وفایی[۱]، دکتر رضا میرنژاد[۲]، دکتر نور امیرمظفری[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: امروزه سوش‌های اسینتوباکتر بومانی مقاوم دارو به عنوان یکی از پاتوژن‌های فرصت‌طلب مشکل‌آفرین، به ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه در جهان مطرح می‌باشند. این مطالعه به منظور تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی اسینتوباکتر بومانی و فراوانی سویه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف Extended-spectrum beta-lactamase یا ESBL) و بررسی شیوع آنزیم بتالاکتامازی CTX-M-II انجام شد.

روش‌ها: این مطالعه در سه بیمارستان بزرگ شهر تهران بر روی ۵۰۰ نمونه‌ی کلینیکی طی مدت یک سال انجام شد. پس از شناسایی سویه‌های اسینتوباکتر بومانی تست حساسیت بر روی ۱۳۰ ایزوله‌ی اسینتوباکتر، که بیشتر مربوط به نمونه‌های خون بودند، نسبت به ۴ آنتی‌بیوتیک مختلف با استفاده از روش انتشار دیسک (Disk diffusion) کربی بائر و بر اساس دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام گردید و حداقل غلظت بازدارندگی برای سفی‌پیم و سفتازیدیم و سفوتاکسیم تعیین گردید. جهت شناسایی سویه‌های مولد ESBL روش دیسک ترکیبی و جهت شناسایی سویه‌های حاوی ژن‌های مقاومت، تست PCR (Polymerase chain reaction) برای ژن کدکننده‌ی آنزیم بتالاکتامازی CTX-M-II انجام گردید.

یافته‌ها: بیشترین مقاومت را به سفی‌پیم، سفتریاکسون از خود نشان دادند و حداقل غلظت بازدارندگی نسبت به سفی‌پیم در ۹۱ درصد، نسبت به سفتازیدیم در ۸۴ درصد و نسبت به سفوتاکسیم در ۸۰ درصد از نمونه‌ها MIC (Minimum inhibitory concentration) بیشتر از ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بر طبق نتایج آزمون دیسک ترکیبی نیز۲۰ درصد سویه‌ها ESBL بودند. نتایج PCR نشان داد که ۱۹ درصد از ایزوله‌ها حامل ژن کدکننده‌ی آنزیم بتالاکتامازی CTX-M-II بودند.

نتیجه‌گیری: اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو در ایران در حال گسترش می‌باشد و خطر مهمی برای بیماران بستری‌شده محسوب می‌گردد. با توجه به مطالعه‌ی حاضر در این باکتری مکانیسم‌های دیگری غیر از تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مانند پمپ‌های ترشحی و تغییر در پورین‌ها نیز سبب مقاومت می‌گردند، که باید مورد توجه قرار گیرند.

واژگان کلیدی: اسینتوباکتر بومانی، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، آنتی‌بیوگرام، دیسک ترکیبی، CTX-M-II

ارجاع: وفایی سمیه، میرنژاد رضا، امیرمظفری نور. **تعیین الگوی حساسیت ضد میکروبی و توزیع ژن bla CTX-M در سویه‌های اسینتوباکتر بومانی جداشده از نمونه‌های بالینی به روش فنوتیپی و PCR**. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۵۲): ۱۴۵۱-۱۴۴۳

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رضا میرنژاد
Email: rmirnejad@yahoo.com

مقدمه

اسینتوباکتر بومانی کوکوباسیل گرم منفی و عامل عفونت‌های مختلف بیمارستانی می‌باشد که در محیط بیمارستان پراکنده است، مدت زمان زیادی آن جا زنده می‌ماند و به راحتی در میان بیماران منتقل می‌گردد (۲-۱). امروزه به علت خاصیت کلینیکی قابل توجه آن در کسب مقاومت دارویی، به عنوان یکی از میکروارگانیسم‌های تهدیدکننده‌ی زندگی بیماران و مقاوم نسبت به درمان با داروهای ضد میکروبی در نظر گرفته می‌شود (۳).

یکی از داروهایی که در سراسر دنیا برای درمان عفونت‌های این باکتری کاربرد گسترده‌ای دارد، داروهای خانواده‌ی بتالاکتام‌ها می‌باشند (۴)، اما این باکتری‌ها با تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز از طریق هیدرولیز هسته‌ی مرکزی در آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام باعث غیر فعال شدن آن‌ها شده‌اند و توانسته‌اند به این کلاس از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت یابند. امروزه انواع جدیدی از آنزیم‌های بتالاکتامازهای وسیع الطیف (Extended-spectrum beta-lactamases یا ESBL) کشف شده‌اند (۵). مطالعات El salabi و همکاران نشان داد که آنزیم‌های ESBL در اسینتوباکتر بومانی مرتبط با پلاسمید و کروموزوم هستند و سویه‌های مقاوم می‌توانند مجموعه‌ای از ژن‌های کدکننده‌ی مقاومت نسبت به چند خانواده‌ی آنتی‌بیوتیکی، را هم زمان حمل کنند و حتی این مقاومت را به یکدیگر انتقال دهند.؛ به طوری که امروزه گسترش این گونه اسینتوباکتر بومانی‌های مقاوم، فقط محدود به بیمارستان‌های یک شهر نمی‌شوند و در مقیاس ملی نیز مهم می‌باشند (۶).

یکی از شایع‌ترین آنزیم‌های بتالاکتامازی، آنزیم CTX-M-II (Conotoxin MII) می‌باشد. این آنزیم به کلاس مولکولی A آمبلر (Ambler Class A) و زیر گروه ۲be در طبقه‌بندی Bush (Bush functional group 2be) تعلق دارد. این آنزیم به علت فعالیت بیشتر خود در برابر سفوتاکسیم نسبت به دیگر سوبستراهای اکسی‌ایمینو بتالاکتام‌ها (به عنوان مثال سفتازیدیم، سفتریاکسون یا سفی پیم) نام‌گذاری شده است و ازطرفی نیز سفالوتین یا سفالوریدین را بهتر از بنزیل پنی سیلین هیدرولیز می‌کنند (۹-۷).

با توجه به این که داشتن اطلاعات در زمینه‌ی میزان شیوع این نوع آنزیم‌ها و الگوی آنتی‌بیوتیکی در کنترل، پیشگیری و درمان عفونت‌های ناشی از اسینتوباکتر بومانی حائز اهمیت هستند (۲-۱)، این مطالعه با هدف تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی سویه‌های مولد ESBL در سویه‌های اسینتوباکتر بومانی جداشده از نمونه های بالینی به روش فنوتیپی و ژنوتیپی انجام گردید.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی توصیفی و مقطعی، ۵۰۰ نمونه‌ی بالینی شامل ادرار، خون، زخم پوست، تراشه و نمونه‌های جداشده از دستگاه تنفسی و نواحی دچار سوختگی، از بیماران بستری در بیمارستان‌های امام خمینی، میلاد و بقیه اله (عج) طی مدت یک سال تهیه شد و در محیط BHI (Brain-heart infusion) به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

در آزمایشگاه هر نمونه روی محیط‌های بلاد، مک‌کانکی، BHI و نوترینت آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد انکوبه

گردیدند. پس از ۲۴ ساعت، با آزمایش مستقیم (رنگ‌آمیزی گرم) وجود کوکو باسیل‌های گرم منفی اسینتوباکتر به طریقه ی میکروسکوپی تأیید شدند. سپس جهت تشخیص گونه های مختلف اسینتوباکتر تست‌های بیوشیمیائی IMViC، اوره‌آز، TSI، OF، کاتالاز و اکسیداز و رشد در ۳۷ و ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. سپس ایزوله‌ها در محیط نوترینت براث حاوی ۵۰ درصد گلیسرول در ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بعد از تعیین هویت گونه‌های اسینتوباکتر، جهت تعیین فنوتیپ مقاومت دارویی از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش کربی بائر و طبق دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards institute) استفاده گردید (۱۰). به طور خلاصه ابتدا باکتری در محیط مولر هینتون براث کشت داده شد و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس با استفاده از سوآپ استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار پخش گردید. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به فاصله ی استاندارد قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، قطر هاله‌ی عدم رشد برای هر آنتی‌بیوتیک اندازه‌گیری گردید و نتایج برای هر آنتی‌بیوتیک مطابق با دستورالعمل مربوطه ثبت شد. در این مطالعه ۴ دیسک آنتی‌بیوتیکی مختلف از شرکت MAST (Mast Diagnostics, Mast group Ltd., Merseyside, UK) مورد استفاده قرار گرفت که شامل: سفی‌پیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) بودند. جهت کنترل کیفی آزمایشات بالا سویه‌ی استاندارد اشریشیا کلی ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و سویه‌ی استاندارد اسینتوباکتر بومانی ATCC 19606 به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند.

مطابق با دستورالعمل CLSI به منظور تعیین حداقل غلظت آنتی بیوتیکی که مانع رشد باکتری می‌شود (۱۰)، آزمون تعیین حداقل غلظت بازدارندگی دارو (Minimum inhibitory concentration یا MIC) برای آنتی بیوتیک های سفی پیم، سفتازیدیم و سفوتاکسیم به روش رقت‌سازی متوالی (Serial dilution) انجام شد.

همچنین با توجه به دستورالعمل NCCLS (National Committee of Clinical and Laboratory Standard) جهت تعیین تولید آنزیم‌های 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- کلاولانیک اسید و سفوتاکسیم- کلاولانیک اسید با فاصله‌ی ۱۵ میلی‌متر از یکدیگر روی آن‌ها قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، در صورت افزایش بیش از ۵ میلی‌متر در قطر هاله‌ی هر کدام ازآنتی‌بیوتیک‌های فوق در ترکیب با کلاولانیک اسید نسبت به آنتی بیوتیک به تنهایی، میکروارگانیسم تولیدکننده‌ی ESBL و در غیر این صورت ESBL منفی گزارش شد (شکل ۱).

در این مطالعه، DNA با استفاده از روش Boiling و کیت شرکت Roche آلمان جهت آماده‌سازی الگو در روش PCR استخراج شد. سپس توالی پرایمر bla CTX-M-II که پیش از این توسط Kim و

همکاران استفاده شده بود (جدول ۱) مورد آزمایش قرار گرفت (۱۱). لازم به ذکر است که قبل از انجام کار با استفاده از نرم‌افزارهایی مانند In silico، واکنش PCR برای ژن مورد نظر شبیه‌سازی شد و مناسب بودن پرایمر و قطعه‌ای که باید به عنوان محصول PCR به دست آید با این نرم‌افزار تأیید گردید.

شکل ۱. ایجاد هاله‌ی عدم رشد در روش غربالگری دیسک ترکیبی

در این مطالعه برای هر یک از مخلوط های واکنش PCR از ۱۵ میکرولیتر Master mix 1 X (Ampliqon III دانمارک) که شامل بافر PCR X ۲، غلظت ۱/۵ میلی‌مول MgCl2، ۱ میکرولیتر (۰/۵ میکروگرم) DNA، ۰/۱۵ میلی‌مول dNTP، ۱/۲۵ واحد Taq DNA polymerase بود، استفاده شد. ۲۰ پیکومول از پرایمر forward و reverse را با آب مقطر به ۳۰ میکرولیتر رساندیم. تست PCR در سیستم GenAmp (دستگاه Harburg، Eppendorf آلمان) با توجه به برنامه های پنج قسمتی زیر انجام شد: مرحله‌ی Initial denaturation به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت، مرحله‌ی Denaturation به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، مرحله‌ی Annealing به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۹/۲ سانتی‌گراد، مرحله‌ی Extension به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ سیکل تکرار گردیدند و مرحله‌ی Final extension به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گردید. سپس برای تجزیه و تحلیل محصولات PCR از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با بافر 1 X TBE و رنگ‌آمیزی توسط SYBERgreen و تجسم در زیر نور ماورای بنفش استفاده شد. در نهایت، محصول PCR به منظور تأیید صحت نتایج حاصله از آن تعیین توالی(Sequencing) گردید.

در این مطالعه از سوش P. aeruginosa (GenBank AY168635) که فاقد این ژن است و در مطالعات قبلی به عنوان کنترل منفی اثبات شده است و سوش E. coli (ref. H042680216) که واجد ژن مورد نظر بود، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

داده‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۳ (version 13, SPSS Inc., Chicago, IL) و با کمک آزمون‌های آمار توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

جدول ۱. توالی پرایمر مورد استفاده جهت PCR (Polymerase chain reaction) ژن $bla_{CTX-M-II}$

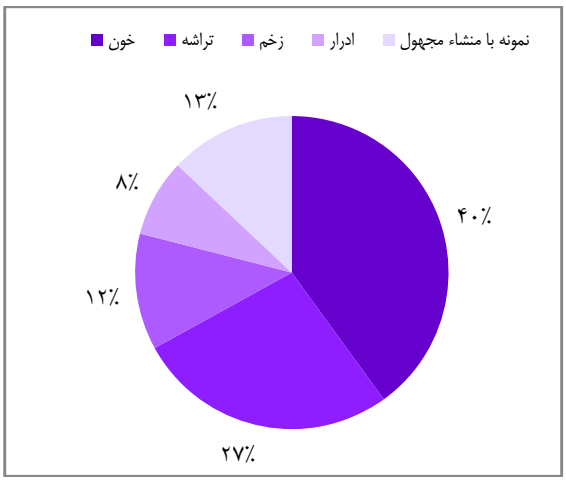
پرایمر	توالی نوکئوتیدی '۵ به '۳
$bla_{CTX-M-II-F}$	5'-ACC-GCC-GAT-AAT-TCG-CAG-A -<T>-3'
$bla_{CTX-M-II-R}$	5'-GAT-ATC-GTT-GGT-GGT-GCC-ATA -<A >-3'

یافته‌ها

در این تحقیق از ۱۳۰ نمونه ی اسینتوباکتر ایزوله شده از ۵۰۰ نمونه‌ی بیماران بستری، ۱۰۰ نمونه (۷۶/۹ درصد) به عنوان اسینتوباکتر بومانی، ۲۲ نمونه (۱۶/۹ درصد) اسینتوباکتر لوفی و ۸ نمونه (۶/۲ درصد) سایر گونه‌های اسینتوباکتر بودند. درصد فراوانی ایزوله های اسینتوباکتر بومانی در نمونه های مختلف بالینی در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس دسته بندی دیگر نیز می توان گفت 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. درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۱۰۰ ایزوله‌ی اسینتوباکتر بومانی در شکل ۳ نشان داده شده است.

از مجموع ایزوله های مورد مطالعه حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفی پیم در ۹۱ درصد، نسبت به سفتازیدیم در ۸۴ درصد و نسبت به سفوتاکسیم در ۸۰ درصد از نمونه‌ها، MIC ≤ ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش گردید (جدول ۲).

همچنین بر طبق نتایج آزمون دیسک ترکیبی ۲۰ درصد سویه‌ها مولد آنزیم ESBL بودند. در آزمایش PCR از مجموع ۱۰۰ ایزوله ی اسینتوباکتر بومانی ۱۹ درصد سویه‌ها حامل ژن bla CTX-M-II بودند (شکل ۴).

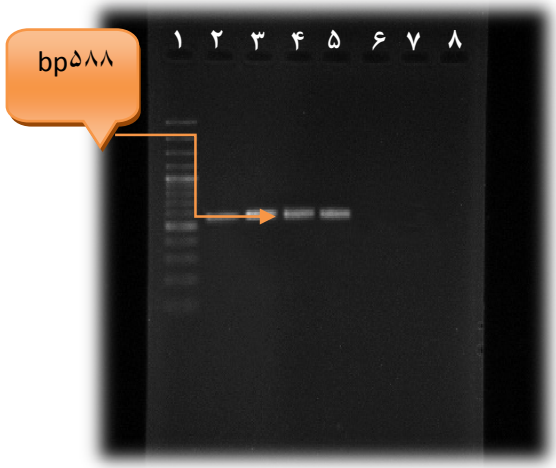


شکل ۲. درصد فراوانی سویه‌های اسینتوباکتر بومانی جداشده از نمونه‌های مختلف بالینی

شکل ۳. تفکیک ایزوله‌های کلینیکی مورد بررسی بر حسب مقاومت به آنتی‌بیوتیک مورد استفاده

جدول ۲. حداقل غلظت بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌های سفی‌پیم، سفتازیدیم و سفوتاکسیم در ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی

آنتی‌بیوتیک	سفی‌پیم		سفتازیدیم		سفوتاکسیم	
MIC	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۸	۶	۶	۶	۶	۴	۴
۱۶	۰	۰	۰	۰	۲	۲
۳۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۶۴	۳	۳	۱۰	۱۰	۹	۹
۱۲۸	۴۰	۴۰	۰	۰	۵	۵



شکل ۴. الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR (Polymerase chain reaction) ژن blaCTX-M-II در سویه‌های Acinetobacter baumannii
ردیف ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA ladder
ردیف ۲: محصولات امپلی‌فای‌شده‌ی ژن blaCTX-M-II (bp588) در سویه‌ی استاندارد
ردیف ۵-۳: محصولات امپلی‌فای‌شده از نمونه‌های بالینی مورد بررسی
ردیف ۶: محصولات امپلی‌فای‌شده‌ی ایزوله‌شده‌ی فاقد ژن blaCTX-M-II از نمونه‌های بالینی
ردیف ۸-۷: فاقد نمونه

بحث

اسینتوباکتر بومانی، پاتوژن فرصت طلب با قدرت بیماری‌زایی بالا و یکی از عوامل عفونت‌های بیمارستانی طی ۳۰ سال گذشته می باشد. درمان این باکتری به خصوص سویه های مقاوم به چند دارو و مولدین ESBL، به علت مقاومت گسترده نسبت به داروهای ضد میکروبی با مشکل مواجه است (۲-۱). با توجه به این که عوامل محیطی و الگوهای مختلف استفاده ازعوامل ضد میکروبی در ایجاد و گسترش این سویه ها در نقاط مختلف دنیا نقش دارند، این مطالعه با هدف تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی سویه‌های مولد ESBL و بررسی شیوع آنزیم بتالاکتامازی CTX-M-II در سویه‌های اسینتوباکتر بومانی جداشده از نمونه های بالینی به روش فنوتیپی و ژنوتیپی انجام گردید.

در این تحقیق ۷۶/۹ درصد از ایزوله ها اسینتوباکتر بومانی، ۲۳/۱ درصد اسینتوباکتر لوفی و سایر اسینتوباکترها بودند که کمابیش مشابه مطالعه‌ی Constantiniu و همکاران بود. آن‌ها گزارش نمودند از ۲۴ ایزوله‌ی کلینیکی جداشده، ۷۱ درصد اسینتوباکتر بومانی و ۲۹ درصد اسینتوباکتر لوفی بودند (۱۲). همچنین مطالعه ی حاضر مشابه مطالعه‌ی Rit و همکاران بود که نشان دادند از میان ۴۱۸۰ ایزوله ی کلینیکی ۷۴/۰۲ درصد به عنوان اسینتوباکتر بومانی و مابقی آن ها به عنوان اسینتوباکترلوفی و سایر گونه‌های اسینتوباکتر شناخته شدند (۱۳).

مطالعات مختلفی مانند مطالعه‌ی Bassetti و همکاران (۱۴)، Leung و همکاران (۱۵) و Michalopoulos و همکاران (۱۶) مؤید این مطلب می باشند که سویه های مختلف اسینتوباکتر بومانی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی مقاوم شده‌اند. از طرفی نتایج مطالعه‌ی ما هنیز نشان داد که سویه های اسینتوباکتر بومانی مقاومت بسیار بالایی نسبت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه و همچنین MIC بسیار بالایی نسبت به سفی پیم، سفتازیدیم و سفوتاکسیم دارند.

ر این مطالعه همانند مطالعات Wang و همکاران (۱۷) و Smolyakov و همکاران (۱۸) مشخص گردید که اغلب سویه‌ها به سفتازیدیم و سفی‌پیم، مقاوم بودند.

بر خلاف مطالعه ای توسط شاهچراغی و همکاران

صورت گرفت که در آن MIC نسبت به سفتازیدیم در ۷۹ ایزوله (۸۳/۱ درصد) ایزوله ۶۴ ≤ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (۱۹)، در این مطالعه MIC نسبت به سفتازیدیم در ۸۴ درصد از نمونه‌ها بیشتر از ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. عدم تطابق نتایج این بررسی با مطالعه‌ی ذکرشده می‌تواند به دلیل نوع نمونه های مورد بررسی و نوع دیسک آنتی بیوتیکی مصرفی و اجرای آنتی‌بیوگرام باشد.

نتایج بررسی میزان MIC نسبت به سفتازیدیم در سویه های اسینتوباکتر بومانی در این مطالعه با نتایج مطالعات انجام‌گرفته در کشور کره و در کشور تایوان کمابیش هم‌خوانی داشت (۲۱-۲۰).

برطبق نتایج آزمون دیسک ترکیبی جهت غربالگری سویه‌های مولد ESBL، در این مطالعه ۲۰ درصد سویه‌ها مولد این آنزیم بودند که با مطالعات دیهم و حلوایی در دزفول (۲۲)، شاهچراغی و همکاران در تهران (۱۹)، Sinha و همکاران در هندوستان (۲۳)، Celenza و همکاران در آمریکای جنوبی (۲۴) که بر روی مولدین ESBL صورت گرفته بود، هم‌خوانی داشت، در حالی که با مطالعه‌ی هاشمی‌زاده و همکاران که در شیراز انجام دادند و فراوانی ESBL را ۴۴ درصد اعلام کردند، متفاوت بود (۲۵).

درصد فراوانی شیوع CTX-M-II در این مطالعه بر خلاف مطالعه‌ی شاهچراغی و همکاران بود میزان انتشار آن را ۱/۲ درصد اعلام کرده بودند (۱۹). می توان گفت که این اختلاف به این دلیل می تواند باشد که مصرف بی رویه‌ی آنتی بیوتیک‌ها منجر به پیدایش سویه هایی با مقاومت بالا در این بیمارستان ها شده است.

ولی نتایج این مطالعه تا حدودی همانند بررسی Celenza و همکاران بود که میزان فراوانی CTX-M-II را ۳۰/۴ درصد گزارش نمودند (۲۴). افزایش مقاومت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف خطر بسیار بزرگی به خصوص برای بیماران بستری‌شده محسوب می‌گردد و امکان درمان با آن‌ها را از بین برده است. بنابراین شناسایی و ایزولاسیون بیماران ناقل باکتری های مولد ESBL، انتخاب صحیح آنتی‌بیوتیک‌ها، شناسایی سویه‌های مولد انواع آنزیم‌های بتالاکتامازی از سایر موارد مهم کنترل و ممانعت از انتشار سویه‌های مقاوم در بیمارستان‌ها می‌باشند. همچنین با توجه به این که در مطالعه‌ی حاضر تنها ۲۰ درصد از ایزوله‌ها مولد ESBL و ۱۹ درصد از آن‌ها حاوی ژن مقاومت به bla CTX-M-II بودند، می توان گفت در این باکتری مکانیسم‌های دیگری غیر از بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مانند پمپ‌های ترشحی و تغییر در پورین‌ها نیز سبب مقاومت می‌گردند، که شناسایی سریع و ردیابی این سویه‌ها نقش مهمی در جلوگیری از گسترش آن‌ها دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پرسنل محترم آزمایشگاه مرکز تحقیقاتی بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، گروه میکروب‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 21(3): 538-82.
2. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis 2005; 41(6): 848-54.
3. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of Acinetobacter baumannii in health care facilities. Clin Infect Dis 2006; 42(5): 692-9.
4. Diomedi A. Acinetobacter baumannii pandrug-resistant: update in epidemiological and antimicrobial managing issues. Rev Chilena Infectol 2005; 22(4): 298-320. [In Spanish].
5. Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. Trends Microbiol 2006; 14(9): 413-20.
6. El SA, Walsh TR, Chouchani C. Extended spectrum beta-lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. Crit Rev Microbiol 2013; 39(2): 113-22.
7. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(1): 1-14.
8. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(3): 969-76.
9. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980; 289(1036): 321-31.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
11. Kim J, Jeon S, Rhie H, Lee B, Park M, Lee H, et al. Rapid detection of extended spectrum β-Lactamase (ESBL) for Enterobacteriaceae by use of a Multiplex PCR-based Method. Infection and Chemotherapy 2009; 41(3): 181-4.
12. Constantiniu S, Romaniuc A, Iancu SL, Filimon R, Tarasi I. Cultural and biochemical characteristics of Acinetobacter spp. Strains isolated from hospital units. The Journal of preventive Medicine 2004; 12(3-4): 35-42.
13. 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.
14. Bassetti M, Righi E, Esposito S, Petrosillo N, Nicolini L. Drug treatment for multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections. Future Microbiol 2008; 3(6): 649-60.
15. Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH, Lo KF, Ho PL. Fulminant community-acquired Acinetobacter baumannii pneumonia as a distinct clinical syndrome. Chest 2006; 129(1): 102-9.
16. Michalopoulos A, Falagas ME. Treatment of Acinetobacter infections. Expert Opin Pharmacother 2010; 11(5): 779-88.
17. Wang SH, Sheng WH, Chang YY, Wang LH, Lin HC, Chen ML, et al. Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant Acinetobacter baumannii in a surgical intensive care unit. J Hosp Infect 2003; 53(2): 97-102.
18. Smolyakov R, Borer A, Riesenberg K, Schlaeffer F, Alkan M, Porath A, et al. Nosocomial multi-drug resistant Acinetobacter baumannii bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. J Hosp Infect 2003; 54(1): 32-8.
19. Shahcheraghi F, Akbari Shahmirzadi N, Abbas Alipour Bashash M, Jabari H, Amir Mozafari N. Detection of blaCTX ,blaTEM Beta-Lactamases gene in clinical isolates of Acinetobacter spp from selected Tehran hospitals. Iran J Med Microbiol 2009; 3(1): 1-9. [In Persian].
20. Huang LY, Chen TL, Lu PL, Tsai CA, Cho WL, Chang FY, et al. Dissemination of multidrug-resistant, class 1 integron-carrying Acinetobacter baumannii isolates in Taiwan. Clin Microbiol Infect 2008; 14(11): 1010-9.
21. 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.
22. Deiham B, Halvaee. The pattern of drug resistance Acinetobacter baumannii isolated from clinical specimens and phenotypic identified extended –spectrum beta-lactamases producing. Iran J Med Sci 2012 ; 37(3) : 267.
23. 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.
24. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. J Antimicrob Chemother 2006; 57(5): 975-8.
25. Hashemizadeh Z, Zargani AB, Emami A, Rahimi MJ. Acinetobacter antibiotic resistance and frequency of ESBL-producing strains in ICU patients of Namazi Hospital (2008-2009). J Qazvin Univ Med Sci 2010; 14(2): 47-53. [In Persian].

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 31, No. 252, 2nd Week, November 2013

Received: 05.06.2013

Accepted: 30.08.2013

Determining the Patterns of Antimicrobial Susceptibility and the Distribution of *bla*CTX-M Genes in Strains of *Acinetobacter Baumannii* Isolated from Clinical Samples

Somayeh Vafaei MSc[1], Reza Mirnejad PhD[2], Noor Amirmozafari PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Nowadays, multidrug resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii (A. baumannii)* strains are as one of the problematic opportunistic pathogens, especially in intensive care units in the world. The purpose of current study was to define the antibiotic susceptibility patterns and detect the prevalence of producing strains of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) and the appearance of betalactamase CTX-M-II enzymes in *A. baumannii* strains.

Methods: This study was conducted in 3 major hospitals in Tehran, Iran, on 500 clinical samples during one year. After the identification of isolates in species, test sensitivity was carried out to 4 antibiotics by using the disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines; also minimum inhibitory concentrations (MIC) was determined for cefepime, cefotaxime and ceftazidime; and finally, to identify the producing strains of ESBL, phenotypic method of combined-disk was used and then, isolates were considered for presence of blaCTX-M-II gene by polymerase chain reaction (PCR) assay.

Findings: 130 *Acinetobacter* species were isolated from the patients. The majority of isolates was from blood specimens and revealed the highest resistance to cefepime and ceftriaxone. The MIC of cefepime in 91%, for ceftazidime in 84%, and for cefotaxime in 80% of the studied isolates was more than 128 µg/ml. The results of the combined-disk test demonstrated that 20% of samples were ESBL positive. The PCR results showed that 19% of our isolates had bla CTX-M-II gene.

Conclusion: Multidrug resistant (MDR) *A. baumannii* is widespread in Iran and is considered as hazard risk for hospitalized patients; also by virtue of the results of this survey, there are more significant mechanisms than ESBL bacteria such as secretory pumps and changes in purine resistance which causes more resistance, too, and should be consider.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Extended-spectrum β-lactamase (ESBL), Antibiogram, Combined-disk, CTX-M-II gene

Citation: Vafaei S, Mirnejad R, Amirmozafari N. **Determining the Patterns of Antimicrobial Susceptibility and the Distribution of *bla*CTX-M Genes in Strains of *Acinetobacter Baumannii* Isolated from Clinical Samples.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(252): 1443-51

1- Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Reza Mirnejad PhD, Email: rmirnejad@yahoo.com