بررسی فنوتیپی جدایه های *اسینتوباکتر بومانی* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) در مراجعه کنندگان به یک بیمارستان نظامی استان گیلان

علی صالح نیا سماک[1*] و دکتر فرشاد نجومی[2]

[1] **ایران، رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی**

[2] **ایران، رشت، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی**

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

اسینتوباکتر ، نوعی کوکوباسیل گرم منفی غیرتخمیری است که بعد از سودوموناس آئروژینوزا به عنوان دومین عامل اصلی عفونتهای بیمارستانی مطرح است. آنزیمهای بتالاکتاماز این باکتریها بسیار متنوع بوده و دائماً در حال موتاسیونهای نقطه ای هستندکه باعث ظهور بتالاکتامازهای وسیع الطیف شده است. در این مطالعه که در یک دوره هشت ماهه صورت گرفته، پس از تأیید هویت سویه های *اسینتوباکتر* به وسیله آزمونهای باکتریولوژیک ، الگوی مقاومت دارویی جدایه ها و تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف توسط آنها به روش انتشار دیسک در آگار مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۵۰ سویه از گونه *اسینتوباکتر بومانی* و ۱۵ سویه از دیگر گونه های *اسینتوباکتر* از بیماران جدا سازی شد. بیشترین فراوانی مقاومت در جدایه های *اسینتوباکتر بومانی* به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک سفپیم (۱۰۰ درصد)و کمترین آن مربوط به سفکسیم- کلاولانیک اسید(۵۰ درصد) بود. *اسینتوباکتر* با الگوی مقاومت چندگانه به عنوان یک مشکل روزافزون برای مراکز پزشکی در سراسر دنیا مطرح است که مهم ترین دلیل آن ، مصرف غیر ضروری و بیش از حد آنتی بیوتیکها، خصوصاً آنتی بیوتیکهای بتالاکتام می باشد..

واژه های کلیدی: *اسینتوباکتر بومانی*، بتالاکتاماز وسیع الطیف، مقاومت دارویی،عفونت بیمارستانی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۶۰۶۱۹۷۳ ، پست الکترونیکی: ali.salehnia68@gmail.com

مقدمه

اعضای جنس *اسینتوباکتر* (*Acinetobacter*)، باکتریهای گرم منفی بصورت کوکسی یا کوکوباسیل هستند که قدرت تخمیر ندارند. این باکتریها نیازمندیهای غذایی کمی برای رشد داشته و می توانند در شرایط نامساعد، سطوح خشک و همچنین محیط آبی بمدت طولانی زنده بمانند. با وجود اینکه این باکتریها معمولاً از ویرولانس پایینی برخوردارند ، اما از طریق تجهیزات مرتبط با دستگاه تنفسی و کاتترهای آلوده موجب طیف وسیعی از عفونتها می گردند. مشکل عمده در عفونتهای ناشی از *اسینتوباکتر* مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیکهای بتالاکتام است(۱). مهم ترین گونه این جنس، *اسینتوباکتر بومانی* (*A.baumanni*) است که می تواند عفونتهای بیمارستانی مجرای ادراری ، عفونتهای زخم و حتی سپتی سمی ایجاد نماید. این باکتری به عوامل ضدمیکروبی بسیار مقاوم است که این مقاومت می تواند ذاتی و یا اکتسابی باشد. اکثر سویه های *A.baumanni* به آمپی‌سیلین، آموکسی سیلین- کلاولانیک اسید، پنی‌سیلینهای ضد استافیلوکوکی، سفالوسپورینهای با طیف وسیع (به جز سفتازیدیم و سفی پیم)، تتراسایکلین، ماکرولیدها، ریفامپین و کلرامفنیکل مقاوم هستند. عفونت با اسینتوباکتر معمولاً بیماران ناتوان یا افراد دچار بیماریهای زمینه ای افراد بستری در بخش سوختگی یا بخش مراقبتهای ویژه و مبتلایان به نقص

ایمنی را گرفتار می سازد. یکی از داروهایی که در سراسر دنیا برای درمان عفونتهای ناشی از این باکتری به کار می رود، آنتی بیوتیکهای خانواده بتالاکتام می باشند، اما جدایه هایی از این باکتری با تولید آنزیمهای بتالاکتاماز باعث غیرفعال شدن آنتی بیوتیکهای فوق می شوند(۳ و ۴)آنزیمهای بتالاکتاماز تولید شده توسط جدایه های مختلف *اسینتوباکتر بومانی* بسیار متنوع هستند که از جمله آنها می توان به بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) اشاره نمود (۱، ۲، ۷ و ۸). میزان کلونیزاسیون اسینتوباکتر بومانی در افراد بستری در بیمارستان، به ویژه در کسانی که مدت بستری شـدن آنها به درازا کشیده و یا داروهای ضد میکروبی وسیع الطیف و یا ضد سرطان دریافت داشته اند، در حال افزایش است. پنومونی اکتسابی از بیمارستان هنوز به عنوان غالب ترین بیماری ایجاد شده توسط این ارگانیسم مطرح است، با این وجود عفونتهای مختلف مانند باکتریمی، سپتیسمی، اندوکاردیت، عفونت محل جراحی، عفونت مجاری ادراری، منتژیت، عفونت سیستم عصبی مرکزی، بافت نرم و استخوان نیز در یک دهه اخیر گزارش شده است (۲، ۵، ۶ و ۱۰) درمان عفونتهای ناشی از *اسینتوباکتر بومانی* با مقاومت دارویی چندگانه، به یک مسئله جهانی و نگرانی مهم تبدیل شده است. بتالاکتامازهای وسیع الطیف در *اسینتوباکتر بومانی* مرتبط با پلاسمید وکروموزوم بوده و سویه های مقاوم قادر هستند مجموعه ای از ژنهای کد کننده مقاومت نسبت به چند خانواده آنتی بیوتیکی را به طور همزمان حمل کنند و حتی این مقاومت را به یکدیگر انتقال دهند. امروزه گسترش این جدایه های *اسینتوباکتر بومانی* با مقاومت چندگانه، صرفاً محدود به بیمارستانهای یک شهر نمی شود و در مقیاس ملی نیز مهم می باشند. هدف از انجام مطالعه حاضر ، بررسی شیوع عفونتهای بیمارستانی ناشی از جدایه های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف این باکتری در میان افراد نظامی بستری در یکی از بیمارستانهای نیروی دریایی و وابستگان آنها بوده است.

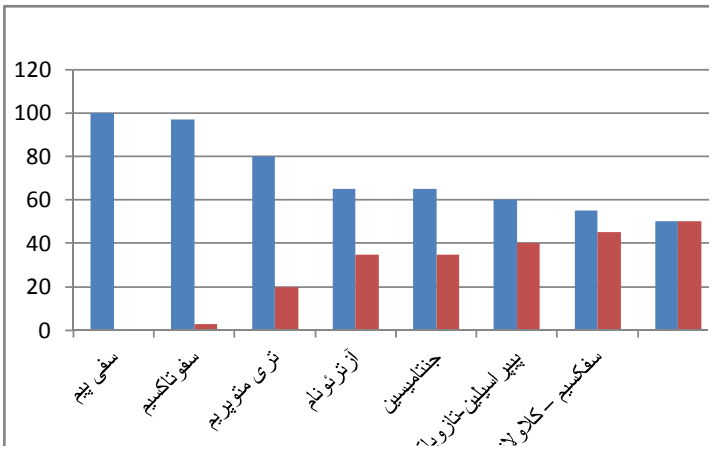
مواد و روشها

تعداد و جامعه مورد مطالعه: در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه از بیماران بخش مراقبتهای ویژه (نمونه ها از خون ، ترشحات تنفسی، سوندها، زخم و ونتیلاتور) جمع آوری گردید. نمونه گیری توسط سواب استریل آغشته به سرم فیزیولوژی استریل انجام شد، در آزمایشگاه هر نمونه به طور جداگانه روی محیطهای Blood Agar (مرک آلمان)، Mac Conkey Agar (مرک آلمان) و BHI Agar (مرک آلمان) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید. پس از ۲۴ ساعت، با انجام رنگ آمیزی گرم وجود کوکوباسیلهای گرم منفی اسینتوباکتر بررسی شد. سپس جهت تشخیص باکتریولوژیک و تأیید هویت جدایه ها از تستهای بیوشیمیایی کاتالاز، سیتوکروم اکسیداز ، اکسیداسیون قند گلوکز در محیط OF آزمون سیترات، بررسی الگوی رشد بر روی محیط TSI Agar و بررسی تولید پیگمان استفاده گردید. جهت تأیید فنوتیپی تولید آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) از روش غربالگری دیسک ترکیبی استفاده شد. بدین صورت که بعد از کشت باکتری روی محیط مولر هینتون آگار، چهار دیسک سفتریاکسون، سفیکسیم، سفتریاکسون- کلاولانیک اسید و سفیکسیم- کلاولانیک اسید با فاصله ۱۵ میلی متر از یکدیگر روی آنها قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت گرما گذاری پلیتها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مشاهده افزایش بیش از ۵ میلی متر در قطر هاله عدم رشد هر کدام ازآنتی بیوتیکهای فوق در ترکیب با کلاولانیک اسید نسبت به آنتی بیوتیک تنها، حکایت از تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف داشت. پس از شناسایی و تأیید جدایه های مولد این نوع بتالاکتامازها، آنتی بیوگرام به روش انتشار دیسک در محیط مولر هینتون آگار و با استفاده از دیسکهای حاوی آنتی بیوتیکهای سفپیم (۱۰ میکروگرم) ، سفوتاکسیم(۳۰ میکروگرم) ،پیپراسیلین-تازوباکتام (۱۰۰ میکروگرم) ، جنتامیسین (۳۰

میکروگرم) ، تری متوپریم (۵۰ میکروگرم) و آزترئونام (۱۰ میکروگرم) شرکت MAST انگلستان انجام گردید.

نتایج

در این مطالعه ۵۰ سویه *اسینتوباکتر بومانی* و ۱۵ سویه از دیگر گونه های *اسینتوباکتر* از بیماران جدا گشت. *اسینتوباکتر بومانی* روی محیطهای کشت مورد استفاده به خوبی رشد کرده و اندازه کلنیهای آنها بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرماگذاری به قطر ۲ تا ۳ میلی متر بود. این باکتری همچنین پیگمان زرد کم رنگ تا سفید متمایل به خاکستری را در محیط BHI Agarتولید نمود اما این کلنیها در محیط کشت بلاد آگار توانایی تولید پیگمان نداشتند. بی ترین جدایه ها از نمونه های خونی بودند. بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی در ۵۰ جدایه *اسینتوباکتر بومانی* به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک هایسفیپیم (۱۰۰ درصد) سفوتاکسیم (۹۷ درصد)، تری متوپریم (۸۰ درصد)، آزترئونام (۶۵ درصد)، جنتامیسین (۶۵ درصد)، پیپراسیلین–تازوباکتام (۶۰ درصد)، سفتریاکسون – کلاولانیک اسید (۵۵ درصد)، و سفیکسیم– کلاولانیک اسید (۵۰ درصد) بو (نمودار ۱).



نمودار ۱– نتایج به دست آمده از تست آنتی بیوگرام سویه های *A.baumanii* جدا شده از نمونه های کلینیکی در بیمارستان نظامی گیلان

از ۵۰ جدایه *اسینتوباکتر بومانی* ،۲۵ جدایه از خون، ۱۰جدایه از زخم، ۱۰ جدایه از ادرار و ۵ جدایه از خلط جداسازی شد. ۲۵ جدایه متعلق به بخش مراقبتهای ویژه ،۱۵ نمونه از بخش عفونی، ۵ نمونه از اورژانس و ۵ نمونه از سایر بخشها بود. هیچ سویه ای از *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به همه آنتی بیوتیکها جدا نشد.

بحث

در طول دو دهه گذشته *اسینتوباکتر بومانی* جایگاه مهمی در بین عوامل مولد عفونتهای بیمارستانی پیدا کرده است. در حال حاضر این باکتری به عنوان یکی از مشکلات عمده در بخش مراقبتهای ویژه شناخته می شود که این موضوع در ارتباط با تعدد عفونتها و توسعه شاخصهای مقاومت متعدد به گروههای اصلی آنتی بیوتیکهاست (۷).

سویه های مقاوم به چند دارو و تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف این باکتری، عامل بیماریهای عفونی جدی در بخشهای مختلف بیمارستانی و در افراد بستری می باشند و درمان این چنین عفونتهایی به علت مقاومت گسترده شان نسبت به داروهای ضد میکروبی با مشکلات جدی مواجه است. این مطالعه با هدف تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی سویه های مولد بتالاکتاماز های وسیع الطیف در سویه های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از نمونه های بالینی به روش فنوتیپی انجام گردید. در این تحقیق ۸۵/۲ درصد جدایه‌ها متعلق به گونه *اسینتوباکتر بومانی* و ۱۴/۸ درصد جدایه ها از سایر گونه ها بودند.

در این مطالعه همانند بررسی Bayugo و همکاراندر سال ۲۰۰۲ (۴) و Joshi و همکارانش در سال ۲۰۰۳ (۱۰) که نشان دادند میزان مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی در حال افزایش می باشد و میزان مقاومت را ۴۵تا ۷۵ درصد گزارش نمودند،۷۰ درصد از جدایه هایهای *اسینتوباکتر بومانی* فنوتیپ مقاومت چندگانه را نشان دادند.

در این مطالعه ۲۷ درصد سویه ها مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند که با مطالعه دیهم در دزفول در سال ۱۳۹۰ (۱۱) و مطالعه شاهچراغی و همکاران در سال ۱۳۹۰ (۶) در تهران و مطالعه Sinha و همکاران در سال ۲۰۰۷ در هندوستان(۱۲)، قرابت نزدیکی دارد، در حالی که با مطالعه هاشمی زاده و همکارانش (۵) که در سال ۱۳۸۷ در شیراز انجام شده است، متفاوت می باشد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضرو موارد مشابه شیوع *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو و تولید کننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف درکشور ایران خصوصاً در بیمارستانها در حال گسترش می باشد و خطر مهم و جدی برای بیماران بستری محسوب می گردد. به همین دلیل تشخیص و غربالگری بیماران ناقل باکتریهای مولد آنزیمهای بتالاکتاماز و استفاده صحیح از آنتی بیوتیکها خصوصاً پنی سیلینها و سفالوسپورینها، استریل نمودن تجهیزات و محیط اتاقهای بستری بیماران و گزارش مرتب و ماهانه در مورد جدایه های مقاوم بیمارستانی به پزشکان نیز از موارد مهم کنترل و ممانعت از انتشار سویه های مقاوم در بیمارستانها می باشند.

مکانیسمهای دیگری غیر از بتالاکتاماز های وسیع الطیف مانند پمپهای ترشحی و تغییر در پورینها سبب مقاومت *اسینتوباکتر بومانی* می گردند، که شناسایی سریع و ردیابی این جدایه ها نقش مهمی در جلوگیری از گسترش آنها دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پرسنل محترم آزمایشگاه و بخشICU بیمارستان نیروی دریایی آجا و گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی آجا تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1- Bayug S, Zeana C, Sahni J, Della-Latta P, El-Sadr W, Larson E. (2002). Prevalence and antimicrobial patterns of *Acinetobacter baumanii* on hands and nares of hospital personnel and patients:the iceberg phenomena again. Heart Lung.; 31(5): 382-90.

2- Deiham B, Halvaee. (2012). The pattern of drug resistance *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical specimens and phenotypic identified Extended –Spectrum Beta-Lactamases producing. Iran J Med Sci. .:37(3) : 267.

3- Feizabadi. M. M, Fathollahzadeh. B, Taherikalani. M. (2008). Animicrobial Susceptibility Patterns and Distribution of bla – oxa Genes Among *Acinetobacter spp*. Isolated from at Tehran Hospitals. Jpn J Infect Dis.; 274 – 278.

4- Hashemizadeh Z, zargani AB, Emami A, Rahimi MJ. (2010). *Acinetobacter* antibiotic resistance and frequency of ESBL-producing strains in ICU patients of Namazi Hospital (2008-2009). The Journal of Qazvin University of Medical Sciences & Health Services.;14(2): 47-53.(In Persian).

5- Joshi, S.G, Litake G.M, Niphadkar K.B,Ghole V.S,(2003). Multidrug resistant *Acinetobacter baumanni*i isolates from a teaching hospital. J. Infect. Chemother. : 9(2): 187-90.

6- Kyle P, Suzanne C. Cannegieter, Tanny J. van der Reijden, Beppie van Strijen, DavidM. You, Britta S. Babel, Andrew I. Philip, and Lenie Dijkeshoorn ,(2011). Diversity and Clinical Impact of *Acinetobacter baumannii* Colonization and infection at a Military medical Center. J. Clin Microbiol.; 49(1): 159 Æ 66.

7- Rahbar M, Hajia M. (2006). Detection and quantitation of the etiologic agents of ventilator –associated pneumonia in endotracheal tube aspirates from patients in Iran. Infect Control Hosp Epidemiol.; 27(8): 884 – 885

8- Shahcheraghi F, Abbasalipour M, Feizabadi MM, Ebrahimipour GH, Akbari N. (2011). Isolation and genetic characterization of metallo-β-lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. Iran Journal of Microbiology.;3(2):68-74.

9- Sinha M, Srinivasa H. (2007). Mechanism of resistance to crabapenem- resistant *Acinetobacter* solates from clinical sample. Ind J Med Microbiol.;25:121–125.

10- Valencia, R. et al. (2009) .Nosocomial outbreak of infection with pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. Infect. Control Hosp. Epidemiol.:30, 257–263

11- Wareham DW, Bean DC, Khanna P, Hennessy EM, Krahe D, Millar A. (2008). Bloodstream infection due to *Acinetobacter spp*: epidemiology, risk factors and impact of multi – drug resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 27: 607 – 612.

12- Zandi H, Taghipoor SH, Amirpoor S. (2007). Study of Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter* strains Isolated from Blood Cultures. IJOH.; 36(1)

Phenotypic study of Extended-spectrum Beta lactamase (ESBL) producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in patients reffered to a military hospital in Guilan province

Saleh Nia Samak A.[1] and Nojoomi F.[2]

[1] Dept. of Microbiology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Rasht, I.R. of Iran

[2] Dept. of Bacteriology, Aja University of Medical Sciences, Rasht, I.R. of Iran

Abstract

Acinetobacter is a kind of non-fermentative gram-negative cocobacilli which is considered as the second major cause of hospitalized infections after *Pseudomonas aeruginosa*. The Beta lactamase enzymes of these bacteria are very diverse and their constantly point mutations have led to the emergence of Extended-spectrum Beta lactamases (ESBLs). In this study, which took place in a period of eight months, after confirmation of the identity of *Acinetobacter* strains by bacteriological tests, the pattern of drug resistance of the isolates and the production of ESBLs by them was investigated by Agar disk diffusion method. In this study, 50 strains of *Acinetobacter baumannii* and 15 strains of other *Acinetobacter* species were isolated from patients. The highest frequency of drug resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates was related to Cefipime (100%), and the lowest was related to Cefixime-Clavulanic acid (50%). *Acinetobacter* with Multiple Resistance Patterns are a growing problem for medical centers around the world and the most important reason for this is the unnecessary and over-consumption of drugs, especially Beta lactam antibiotics.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, Extended-spectrum Beta lactamase, Drug resistance, Hospitalized infection