

بررسی فراوانی ژن های *bla_{CTX-M}* *bla_{VEB}* *bla_{PER}* و *tetA* *tetB* در ایزوله های بالینی اسیتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های تهران در سال ۱۳۹۶-۱۳۹۷

امید عزیزی^{۱*}، فرشته شاهچراغی^۳

- ۱- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران
- ۲- مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران
- ۳- گروه باکتریولوژی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: عفونت ها و فراوانی ناشی از اسیتوباکتر بومانی مقاوم به چندین دارو شایع بوده و در دهه های اخیر در سراسر جهان گزارش شده است. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ژن های *bla_{CTX-M}*، *bla_{VEB}*، *bla_{PER}* و *tetA*، *tetB* در ایزوله های بالینی اسیتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بستری بیمارستان های تهران در سال ۱۳۹۶-۱۳۹۷ انجام شد.

روش ها: در مجموع ۶۵ ایزوله اسیتوباکتر بومانی از نمونه های بالینی جمع آوری شد. تست حساسیت به آنتی بیوتیک ها با روش انتشار دیسک بر اساس دستورالعمل CLSI و وجود ژن های *bla_{CTX-M}*، *bla_{VEB}*، *bla_{PER}* و *tetA*، *tetB* توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام گرفت.

نتایج: تمامی نمونه ها به جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، پیراسیلین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و تتراسایکلین مقاوم بودند. مقاومت ایزوله ها به مینوسیکلین و ایمی پنم به ترتیب ۸۹ درصد و ۸۵ درصد بود. تمام ایزوله ها به عنوان مقاوم به چند آنتی بیوتیک شناخته شدند. ژن های *tetA*، *tetB*، *bla_{CTX-M}* و *bla_{PER}* به ترتیب در ۷۵/۳ درصد، ۴۳ درصد، ۳۵/۳ درصد، ۷۶/۹ درصد و ۶۱/۵ درصد ایزوله ها شناسایی شدند.

نتیجه گیری: بر اساس این مطالعه فراوانی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های اسیتوباکتر بومانی بالا بوده و توجه به جداسازی و شناسایی این باکتری در آزمایشگاه های بالینی و بیمارستان ها ضروری به نظر می رسد.

کلیدواژه ها: اسیتوباکتر، مقاومت آنتی بیوتیکی، بتالاکتاماز

*آدرس نویسنده مسئول: خراسان رضوی، تربت حیدریه، خیابان فردوسی شمالی، خیابان رازی، معاونت آموزشی پژوهشی

دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه

آدرس پست الکترونیک: Azizi-omid@outlook.com

مقدمه

جنس اسینتوباکتر (*Acinetobacter*) کوکوباسیل گرم منفی غیر تخمیری متعلق به خانواده موراکسلاسه (*Moraxellaceae*) است که به صورت گسترده در محیط وجود داشته و در دستگاه تنفسی، دستگاه ادراری تناسلی و پوست به عنوان یک باکتری فرصت طلب یافت می شود (۱). اسینتوباکتر بومانی (*A.baumannii*) مهمترین گونه در این جنس است که یک کوکوباسیل هوازی گرم منفی فرصت طلب و عامل مهم عفونت های بیمارستانی است. این باکتری بر روی سطوح و دستگاه های بیمارستانی و حتی در شرایط خشک و محیط های نامناسب برای چندین روز زنده می ماند و از عفونت های مختلف بیمارستانی مانند سیتی سمی، پنومونی، اندوکاردیت، مننژیت، عفونت های پوست و زخم و عفونت های مرتبط با دستگاه ادراری جدا شده است (۲).

در حال حاضر عفونت ناشی از اسینتوباکتر بومانی با توجه به ظهور سویه های مقاوم به چند دارو (Multiple drug resistance) به سختی به درمان پاسخ می دهد (۲). این باکتری عامل ۱۰-۲ درصد از تمام عفونت های باکتری های گرم منفی و ۹ درصد از کل عفونت های بیمارستانی است (۳). به علت مقاومت چند دارویی، درمان عفونت های ناشی از اسینتوباکتر بومانی مشکل بوده و منجر به ۲۳ درصد مرگ و میر بیماران بستری در بیمارستان و ۴۳ درصد بیماران بستری در بخش واحد مراقبت های ویژه (Intensive care unite) شده است (۴).

در سال های اخیر، نوع سویه های مقاوم به چند دارویی اسینتوباکتر بومانی به طور فزاینده ای از عفونت های بیمارستانی مختلفی جدا شده است و این سویه ها در حال گسترش به مناطق جغرافیایی جدید می باشند (۵). افزایش قابل توجه مقاومت آنتی بیوتیکی در سراسر جهان از سال ۲۰۰۴ تا کنون مورد توجه قرار گرفته است، بطوریکه بالاترین میزان مقاومت اسینتوباکتر بومانی در سال ۲۰۰۹ برای سفتریاکسون (۸۳/۶ درصد)، پپراسیلین- تازوباکتام (۸۲٪)، و سفنازیدیم (۸۰/۳٪) در خاورمیانه بوده است. همچنین افزایش مقاومت برای همه آنتی بیوتیک ها در ایزوله های جمع آوری شده از برخی مناطق آسیا و اقیانوس آرام، محدوده ای از افزایش ۱۹/۱٪ مقاومت به

سفنازیدیم تا ۳۸/۹٪ مقاومت به لووفلوکساسین گزارش شده است (۶).

اسینتوباکتر بومانی به صورت ذاتی توانایی تولید اگزاسیلینازهای کلاس D (متعلق به آنزیم های گروه OXA-51-like که حدود ۴۰ واریانت سکانشی دارند) و سفالوسپورینازهای AmpC غیر القایی را دارد (۷). عمومی ترین شکل آنزیمی مقاومت به کرباپنم ها، ژن های *bla_{OXA-23}*، *bla_{OXA-40}*، *bla_{OXA-51}* می باشند. این ژن ها در بیشتر مناطق دنیا 58 و *bla_{OXA-51}* گزارش شده اند (۸). بتا-لاکتامازهای وسیع الطیف (Extended-spectrum β -lactamases) کلاس A غیر از مشتقات TEM و SHV مانند PER، VEB و CTX-M در ایزوله های اسینتوباکتر از اروپا و آسیا گزارش شده اند (۹). ژن *bla_{PER-1}* ابتدا در سودوموناس آئروژینوزا یافت شد. پس از آن به طور گسترده در اسینتوباکتر نیز مشاهده گردید. بر اساس توالی های آمینواسیدی تیپ های مختلفی از این ژن وجود دارد (۱۰).

ژن *bla_{VEB-1}* ابتدا در جریان شیوع سویه های کلونال اسینتوباکتر بومانی در ICU یکی از بیمارستان های فرانسه مشاهده شد (۱۱). ژن های بتا-لاکتاماز (*bla*) یا بر روی کروموزوم قرار دارند و یا در عناصر متحرک که معمولاً بر روی اینتگرون ها واقع شده اند، یافت می شوند. هر سه ژن های *bla_{PER}*، *bla_{VEB}* و *bla_{CTX-M}* بر روی عناصر متحرک ژنتیکی مانند اینتگرون ها مشاهده شده اند (۱۲).

پمپاژ دارو به بیرون از باکتری توسط مکانیسم های افلاکس نیز مرتبط با ویژگی MDR است. چندین پمپ افلاکس Tet عامل مقاومت به تتراسایکلین توسط ایزوله های کلینیکی اسینتوباکتر بومانی کسب می شوند. TetA و TetB شایع ترین آنها هستند. TetA در مقاومت به تتراسایکلین و TetB علاوه بر تتراسایکلین در پمپ مینوسایکلین نیز نقش دارد (۱۳). ژن *tet(B)* در حداقل ۵۰ درصد و *tet(A)* نیز بین ۱۴ و ۴۶ درصد ایزوله های اسینتوباکتر بومانی مقاوم به تتراسایکلین یافت شده است (۱۴، ۱۵). این ژن ها بیشتر بر روی پلاسمید قرار داشته و توسط عناصر متحرک ژنتیکی حمل می شوند (۱۶). این مطالعه با هدف ارزیابی فراوانی ژن های *bla_{PER}*، *bla_{VEB}*، *bla_{CTX-M}*، *tetA* و *tetB* در ایزوله های بالینی اسینتوباکتر

استفاده از پنس‌های استریل برداشت و بر روی محیط کشت قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی-گراد گرماگذاری شده و در نهایت قطر هاله عدم رشد اندازه-گیری و نتایج با استفاده از معیارهای CLSI تفسیر شدند (۱۸). از سویه *Escherichia coli* ATCC 25922 به عنوان سویه کنترل استفاده گردید.

از تکنیک کلونی PCR و بدون نیاز به استخراج DNA جهت تکثیر ژن‌های *bla_{PER}*، *bla_{VEB}*، *bla_{CTX-M}* و *tetA* استفاده شد (۱۹). مواد مورد نیاز برای PCR با حجم و غلظت‌های زیر برای نمونه‌ها آماده گردید: ۲۰۰ mM از dNTPs، ۱۰ pM از پرایمرهای رفت و برگشت، mM U Taq polymerase (Ampliqon، ۰/۸ MgCl₂ Denmark) و ۵۰ ng از DNA الگو در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر. PCR در دستگاه گرادیانت Gradient thermal cycler (Biometra-T gradient, Biometra GmbH, Gottingen, Germany) با برنامه: واسرشت شدن اولیه در ۹۴ درجه سانتی-گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در ۹۴ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۵ ثانیه، اتصال پرایمرها به مدت ۳۵ ثانیه در دماهای ذکر شده در جدول ۱، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۰ ثانیه و گسترش پایانی در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۶ دقیقه انجام گرفت. سویه های اسینتوباکتر بومانی ATCC 19606 به عنوان کنترل مثبت و اشریشیا کولی DH5α به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفتند. پس از پایان PCR، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز یک درصد محتوی ۵ میکرولیتر اتیدیوم بروماید ۱۰ میلی-گرم/میلی-لیتر در کنار DNA مارکر ۱۵۰۰-۱۰۰۰ الکتروفورز شدند. پس از الکتروفورز با استفاده از دستگاه ژل داک (U.V Trans illuminator)، وجود باندهای مورد نظر بررسی و عکس برداری بعمل آمد.

از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ جهت انجام تحلیل‌های آماری استفاده گردید و ارتباط بین وجود ژن‌های مورد بررسی و مقاومت آنتی بیوتیکی با آزمون کای دو بررسی گردید. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

بومانی جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های تهران در سال ۱۳۹۷-۱۳۹۶ انجام شد.

روش‌ها

این مطالعه توصیفی به روش مقطعی بر روی ۳۰۰ نمونه بالینی موجود شامل نمونه ادرار، خلط، خون، زخم و کاتتر بیماران بستری در بیمارستان‌های امام حسین (ع) و شهید مدرس تهران در شش ماهه اول سال ۱۳۹۶ انجام گردید.

نمونه‌های گرفته شده پس از انتقال به آزمایشگاه بر روی محیط بلاد آگار و مک کانگی آگار (سیگما) کشت شدند. پس از یک شبانه‌روز انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کلونی‌های خالص رشد کرده با استفاده از دیسک اکسیداز (تترا متیل پارافنیل دی آمین هیدروکلراید) مورد بررسی قرار گرفت و همزمان این کلونی‌ها بر روی محیط‌های افتراقی مانند TSI و SIM کشت داده شدند. از باکتری سودوموناس آئروژینوزا به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. تایید تشخیص اسینتوباکتر بومانی بر اساس تست حرکت، واکنش قلیا/قلیا در محیط TSI، اکسیداز منفی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase chain reaction) ژن *bla_{OXA-51}* صورت گرفت (۱۷). جهت تکثیر ژن *bla_{OXA-51}* از پرایمرهای مندرج در جدول ۱ و دمای ۵۶ درجه سانتی-گراد برای اتصال پرایمرها استفاده گردید (جدول ۱).

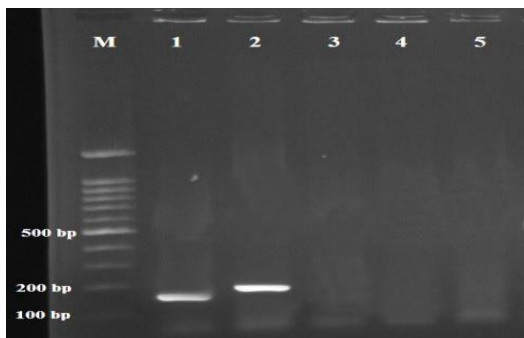
در این مطالعه تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن آگار (Kirby-Bauer) بر اساس دستورالعمل‌های CLSI (۱۸) برای آنتی بیوتیک‌های (هایمدیا- هندوستان) ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، پپراسیلین (۱۰۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم) و مینوسایکلین (۳۰ میکروگرم) انجام گرفت. سوسپانسیون تلقیحی باکتری جهت انجام آنتی بیوگرام معادل لوله ۰/۵ مک فارلند تهیه و با استفاده از سواب استریل از سوسپانسیون باکتری برداشت و بر روی محیط مولر هینتون (هایمدیا- هندوستان) آگار در سه جهت بصورت چمنی کشت داده شدند. پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگه داشته شدند تا رطوبت اضافی موجود در محیط از بین برود. پس از آن دیسک‌های آنتی بیوتیکی با

در این مطالعه، در مجموع ۶۵ ایزوله اسیتوباکتر بومانی مقاوم به چندین دارو از بین ۳۰۰ نمونه اولیه جداسازی گردید. از مجموع ۶۵ ایزوله اسیتوباکتر بومانی ۱۸ (۷/۷٪) نفر از بیماران

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده برحسب توالی، دمای اتصال و اندازه باند محصول PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر (5'→3')	دمای اتصال (سانتی-گراد)	اندازه محصول (bp)	منبع
blaOXA-51	F- TAATGCTTTGATCGGCCTTG R-TGGATTGCACTTCATCTTGG	۵۶	۳۲۴	(۲۰)
blaVEB	F-CGACTTCCATTTCCCGATGC R-GGACTCTGCAACAAATACGC	۵۵	۶۴۳	(۲۱)
blaPER	F-ATGAATGTCATTATAAAAAGC R-AATTTGGGCTTAGGGCAGAA	۵۶	۹۲۵	
blaCTX	F: CGCTTTGCGATGTGCAG R: ACCGCGATATCGTTGGT	۶۰	۵۵۱	
tetA	F-GCGCGATCTGGTTCACCTCG R-AGTCGACAGYRGC GCCGGC	۶۲	۱۶۴	(۲)
tetB	F-TACGTGAATTTATTGCTTCGG R-ATACAGCATCCAAAGCGCAC	۵۲	۲۰۶	

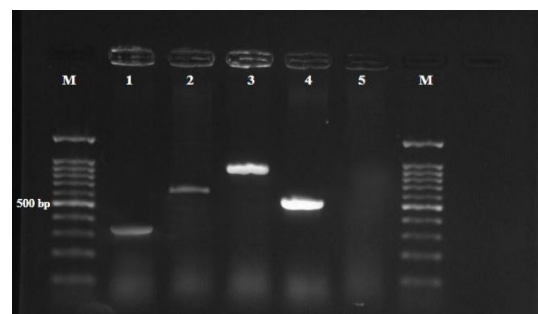
آنتی بیوگرام همه ۶۵ ایزوله اسینتوباکتر بومانی به عنوان مقاوم به چند دارو شناسایی شدند، چرا که بر اساس تعریف حداقل به سه کلاس آنتی بیوتیکی مقاومت نشان دادند (۲۰). نتایج PCR نشان داد که ژن *bla_{OXA-51}* با اندازه باند ۳۲۴ bp به عنوان نشانگر ژنتیکی تشخیص اسینتوباکتر بومانی در همه ایزوله‌ها مثبت گردید (شکل ۱).



شکل ۲. الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد برای محصول PCR ژن *tetA* با اندازه ۳۲۴ bp (چاهک ۱) و ژن *tetB* با اندازه ۲۰۶ bp (چاهک ۲)؛ M، مارکر DNA ladder ۱۰۰ bp؛ چاهک ۳ و ۴، نمونه‌های منفی؛ چاهک ۵، کنترل منفی، *E. coli* DH5a.

نتایج PCR دو ژن *tetA* و *tetB* (شکل ۲) در ۶۵ ایزوله اسینتوباکتر بومانی مورد مطالعه به ترتیب ۴۹ (۷۵/۳٪) و ۲۸

بستری شده دارای علائم عفونت تنفسی، ۲۸ (۴۳/۱٪) مورد از نمونه ادرار، ۵ (۷/۷٪) مورد از نمونه خون و ۱۴ (۲۱/۵٪) مورد از نمونه های حاصل از کاتترها و نمونه‌های جراحی جدا شدند.



شکل ۱. الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد برای محصول PCR ژن های *bla_{OXA-51}* با اندازه ۳۲۴ bp (چاهک ۱)؛ *bla_{VEB}* با اندازه ۶۴۳ bp (چاهک ۲)؛ *bla_{PER}* با اندازه ۹۲۵ bp (چاهک ۳) و *bla_{CTX}* با اندازه ۵۵۱ bp (چاهک ۴). M، مارکر DNA ladder ۱۰۰ bp؛ چاهک ۵، کنترل منفی، *E. coli* DH5a.

نتایج حاصل از انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن نشان داد که تمامی ایزوله‌ها به آنتی بیوتیک-های جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، پیراسیلین، سفنازیدیم، سفوتاکسیم و تتراسایکلین مقاومت دارند. مقاومت به مینوسیکلین در ۵۸ (۸۹٪) ایزوله و مقاومت به ایمی پنم در ۵۵ (۸۵٪) ایزوله مشاهده گردید. بر اساس یافته‌های حاصل از

کاهش مقاومت در مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از تفاوت در محل جمع‌آوری نمونه، تعداد نمونه‌های مورد مطالعه و حتی کاهش مصرف آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین در بیمارستان‌های مطالعه شده باشد.

از آنجایی که ایزوله‌های مقاوم به کرباپنم اسینتوباکتر بومانی در حال افزایش است لازم است که مکانیسم مقاومت به کرباپنم‌ها جهت مدیریت بهتر این ایزوله‌ها روشن شود. مکانیسم‌های مقاومت شامل هر دو تغییرات خودبخودی (بیان پایین پورین-های افلاکس دارو، تغییر در پروتئین‌های متصل شونده به پنی سیلین و یا افزایش پمپ‌های افلاکس) و یا کسب ژن‌ها از طریق انتقال افقی ژن می‌باشد (۲۸). ژن *bla_{OXA-51}* در اسینتوباکتر بومانی بر روی کروموزوم قرار دارد. آنزیم OXA-51 فعالیت کرباپنمازی ضعیفی دارد، اما اضافه شدن توالی الحاقی *ISAb_{a1}* در انتهای 5' ژن *bla_{OXA-51}* منجر به بیان بالای آن می‌گردد و این افزایش بیان سبب مقاومت به کرباپنم‌ها می‌شود (۲۹). در مطالعه حاضر مقاومت به ایمی پنم می‌تواند ناشی از وجود ژن *bla_{OXA-51}* همراه با *ISAb_{a1}* و سایر ژن‌ها و مکانیسم‌های دیگر باشد و این نیاز به انجام مطالعه بیشتر در این زمینه دارد. گزارش‌های مشابه دیگری در این مورد وجود دارد (۳۰، ۳۱). کرباپنم‌ها به طور گسترده برای درمان اسینتوباکتر بومانی MDR استفاده می‌شوند و مطالعه حاضر نشان می‌دهد که این ایزوله‌ها اکنون مقاوم شده‌اند. این آنتی بیوتیک‌ها دیگر کاملاً موثر نبوده و بنابراین درمان انتخابی باید به سمت درمان ترکیبی تغییر پیدا کند. درمان ترکیبی انتخابی برای درمان ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی مقاوم به کرباپنم‌ها شامل کرباپنم به همراه کولیسین یا ریفامپین است (۳۲).

در مطالعه حاضر ESBLs مورد بررسی قرار گرفته شامل *bla_{VEB-1}* در ۲۳ مورد (۳۵/۳٪)، *bla_{CTXm}* در ۵۰ مورد (۷۶/۹٪) و *bla_{PER-1}* در ۴۰ مورد (۶۱/۱٪) ایزوله‌ها شناسایی شدند. در مطالعه بادمستی (۳۳) ژن *bla_{PER-1}* در ۴۴٪ ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی مورد بررسی مشاهده گردید. در مطالعه ای که قبلاً صورت گرفته (۳۴) مشخص شد که بین وجود ژن *bla_{PER-1}* و میزان تشکیل بیوفیلم در اسینتوباکتر بومانی ارتباط معناداری وجود دارد. بنابراین ژن‌های بتالاکتاماز علاوه

(۴۳٪) بودند. ژن‌های *bla_{VEB-1}* در ۲۳ (۳۵/۳٪)، *bla_{CTXm}* در ۵۰ (۷۶/۹٪) و *bla_{PER-1}* در ۴۰ (۶۱/۵٪) ایزوله شناسایی گردید. بررسی نتایج PCR و آنتی‌بیوگرام در آزمون کای‌دو نشان داد بین وجود ژن‌های *tetA* و *tetB* و مقاومت به تتراسایکلین و مینوسایکلین رابطه معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.02$)، به طوری که سویه‌های دارای این ژن‌ها مقاومت بیشتری نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها نشان دادند. همچنین بر اساس آزمون کای‌دو بین وجود ESBLs و مقاومت به سایر آنتی بیوتیک‌ها نیز ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.02$).

بحث

با توجه به اینکه جداسازی اسینتوباکتر بومانی از طیف وسیعی از عفونت‌ها به طور روز افزون افزایش یافته و با میزان مرگومیر بالا همراه است، امروزه در میان پاتوژن‌های مهم بیمارستانی قرار می‌گیرد. فنوتیپ MDR این باکتری نقش مهمی در پایداری و گسترش میکروارگانیسم در محیط بیمارستان دارد (۲۱).

حساسیت آنتی بیوتیکی برای آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، پیراسیلین، سفنازیدیم، سفوتاکسیم و تتراسایکلین نشان داد که تمامی ایزوله‌ها مقاومت کامل دارند. همچنین مقاومت به مینوسیکلین در ۵۸ ایزوله (۸۹٪) و مقاومت به ایمی پنم در ۵۵ ایزوله (۸۵٪) مشاهده گردید. ایزوله‌های MDR اسینتوباکتر بومانی از شیوع‌های بیمارستانی بوئژه ICU در سراسر جهان (۲۲) و همچنین از ایران (۲۴، ۲۳) جدا شده‌اند. مطالعات صورت گرفته در سایر مناطق جهان نیز با این یافته مشابه می‌باشند (۲۵). در مطالعه رهبر و همکاران مقاومت اسینتوباکتر بومانی به سفتریاکسون، سفنازیدیم، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین به ترتیب ۹۱٪، ۸۴٪، ۸۵٪ و ۹۰٪ گزارش گردید (۲۶). نتایج تحقیق حاضر با مطالعه رهبر و همکاران حاکی از افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های اسینتوباکتر بومانی در بیمارستان‌های کشور است.

دو ژن *tetA* و *tetB* کدکننده افلاکس پمپ بوده و از عوامل مقاومت به تتراسایکلین و مینوسایکلین هستند. بین وجود این ژن‌ها، *tetA* (۷۵/۳٪) و *tetB* (۴۳/۲۸٪) و مقاومت به این آنتی بیوتیک‌ها ارتباط معنی‌داری مشاهده گردید. در مطالعه‌ی صورت گرفته توسط اسدالهی و همکاران در سال ۲۰۱۲، شیوع ژن *tetA* ۹۵/۵٪ و *tetB* ۶۵٪ گزارش گردیده است (۲۷). این

متحرک ژنتیکی مانند اینتگرون‌ها قرار دارند و می‌توانند به راحتی در بین باکتری‌های یک گونه و یا از یک جنس به جنس دیگر با مکانیسم انتقال افقی ژن‌ها در محیط بیمارستان انتقال پیدا کنند و سبب انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی شوند. خودداری از مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها می‌تواند در پیشگیری از گسترش مقاومت در این باکتری موثر باشد. از طرفی شناسایی ایزوله‌های MDR اسینتوباکتر بومانی تولیدکننده ESBLs در آزمایشگاه‌های میکروب شناسی پزشکی ضروری به نظر می‌رسد.

References

1. Marti S, Rodriguez-Bano J, Catel-Ferreira M, Jouenne T, Vila J, Seifert H, et al. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC research notes*. 2011;4:5.
2. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(12):4114-4123.
3. Sahu PK, Iyer PS, Oak AM, Pardesi KR, Chopade BA. Characterization of eDNA from the clinical strain *Acinetobacter baumannii* AIIMS 7 and its role in biofilm formation. *The Scientific World Journal*. 2012;2012: 973436.
4. Falagas ME, Kopterides P, Siempos II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infection among critically ill patients. *Clinical infectious diseases*. 2006;43(3):389.
5. Gootz TD, Marra A. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant threat. *Expert review of anti-infective therapy*. 2008;6(3):309-325.
6. Morfin-Otero R, Dowzicky MJ. Changes in MIC within a global collection of *Acinetobacter baumannii* collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial, 2004 to 2009. *Clinical therapeutics*. 2012;34(1):101-112.

بر مقاومت آنتی بیوتیکی می‌توانند بر روی سایر فاکتورهای ویروالانس هم تاثیر مستقیمی داشته باشند.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که میزان فراوانی ژن‌های عامل مقاوم به *tetB tetA* و بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (*bla_{PER-1}* و *bla_{CTXm}*, *bla_{VEB-1}*) در ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی بسیار بالا و از عوامل ایجادکننده فنوتیپ MDR و مقاومت به آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین و خانواده بتالاکتام می‌باشند. به طور کلی این ژن‌ها بر روی عناصر

7. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;35(3):219-226.

8. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006;12(9):826-836.

9. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(1):178-82.

10. Tada T, Shrestha S, Shimada K, Ohara H, Sherchand JB, Pokhrel BM, Kirikae T. PER-8, a Novel Extended-Spectrum β -Lactamase PER Variant, from an *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolate in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Feb 23;61(3).

11. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol*. 2003 Aug;41(8):3542-7.

12. Opal MS, Pop-Vicas A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell GL, Bennett JE & Dolin

- R: Principles and Practice of Infectious Diseases. 7 ed: Elsevier; 2010; 88-92.
13. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2007 Jun;59(6):1210-5.
 15. Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM, Olsen JE, Dalsgaard A. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. J Med Microbiol. 2000 Oct;49(10):929-36.
 16. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Mar;55(3):947-53.
 17. Azizi O, Shakibaie MR, Badmasti F, Modarresi F, Ramazanzadeh R, Mansouri S, Shahcheraghi F. Class 1 integrons in non-clonal multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from Iran, description of the new *bla*IMP-55 allele in In1243. J Med Microbiol. 2016 Sep;65(9):928-36.
 18. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement: M100-S20. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne PA: USA; 2016.
 19. Woodman ME, Savage CR, Arnold WK, Stevenson B. Direct PCR of Intact Bacteria (Colony PCR). Curr Protoc Microbiol. 2016 Aug 12;42:A.3D.1-7.
 20. Manchanda V, Sanchaita S, Singh N. Multidrug resistant *Acinetobacter*. J Glob Infect Dis. 2010 Sep;2(3):291-304.
 21. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nature Reviews Microbiology. 2007;5(12):939-951.
 22. Higuchi S, Shikata M, Chiba M, Hoshino K, Gotoh N. Characteristics of antibiotic resistance and sequence type of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Japan and the antibacterial activity of DS-8587. Journal of infection and chemotherapy. 2014;20(4):256-261.
 23. 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 Pacific journal of tropical biomedicine. 2013;3(2):140-145.
 24. Noori M, Karimi A, Fallah F, Hashemi A, Alimehr S, Goudarzi H, et al. High Prevalence of Metallo-beta-lactamase Producing *Acinetobacter baumannii* Isolated From Two Hospitals of Tehran, Iran. Archives of Pediatric Infectious Diseases. 2014; 2(1):22-28.
 25. Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, Hujer KM, Lavender H, Jamison JJ, et al. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of bacteriology. 2008;190(24):8053-8064.
 26. Rahbar M, Mehrgan H, Aliakbari NH. Prevalence of antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* in a 1000-bed tertiary care hospital in Tehran, Iran. Indian J Pathol Microbiol. 2010 Apr-Jun;53(2):290-3.
 27. Asadollahi P, Akbari M, Soroush S, Taherikalani M, Asadollahi K. Antimicrobial resistance patterns and their encoding genes among *Acinetobacter baumannii* strains isolated from burned patients. Burns. 2012 Dec;38(8):1198-203.
 28. Paton R, Miles R, Hood J, Amyes S. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. International journal of antimicrobial agents. 1993;2(2):81-87.
 29. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of ISAbal in expression of OXA

carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS microbiology letters. 2006;258(1):72-77.

30. Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. Journal of clinical microbiology. 2005;43(5):2241-2245.

31. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2009;63(1):55-59.

32. Petrosillo N, Chinello P, Proietti M, Cecchini L, Masala M, Franchi C, et al.

Combined colistin and rifampicin therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: clinical outcome and adverse events. Clinical Microbiology and Infection. 2005;11(8):682-683.

33. Badmasti F, Siadat SD, Bouzari S, Ajdary S, Shahcheraghi F. Molecular detection of genes related to biofilm formation in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical settings. Journal of medical microbiology. 2015;64(5):559-564.

34. Azizi O, Shahcheraghi F, Salimizand H, Modarresi F, Shakibaie MR. Molecular Analysis and Expression of *bap* Gene in Biofilm-Forming Multi-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Rep Biochem Mol Biol. 2016 Oct;5(1):62-72.

The Frequency of bla_{PER} , bla_{VEB} , bla_{CTX-M} , $tetA$ and $tetB$ genes among *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospitalized patients in Tehran

Omid Azizi^{1,2*}, Fereshteh Shahcheraghi³

- 1- Department of Laboratory Sciences, School of Paramedical Sciences, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran
- 2- Health Sciences Research Center, Torbat Heydariyeh University of Medical Science, Torbat Heydariyeh, Iran
- 3- Department of Bacteriology, Microbiology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

***Corresponding Address:** Torbat Heydariyeh University of Medical Science, Torbat Heydariyeh, Iran
Email address: Azizi-omid@outlook.com

Abstract

Background & Aim: Infections and outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* are prevalent and have been reported worldwide over the past twenty or more years. Beta-lactamase genes including bla_{PER} , bla_{VEB} and bla_{CTX-M} confer resistance to beta-lactam antibiotics and $tetA$ and $tetB$ are responsible for resistance to tetracycline in such bacteria.

Methods: A total of 65 isolates of *A. Baumannii* from clinical samples were collected. Antimicrobial susceptibility testing was performed by the disk diffusion method according to the CLSI guideline and the presence of bla_{OXA-51} , $tetA$, $tetB$, bla_{VEB} , bla_{CTX} and bla_{PER} were screened via the polymerase chain reaction (PCR).

Results: The isolates were 100% resistant to gentamicin, ciprofloxacin, piperacillin, cefotaxime, ceftazidime and tetracycline. Resistance to minocycline and imipenem stood at 89% and 85%, respectively. All isolates were identified as multi-drug resistant (MDR). The genes $tetA$, $tetB$, bla_{VEB} , bla_{CTX} and bla_{PER} were detected in 75.3%, 43%, 35.3%, 76.9% and 61.5% of isolates, respectively.

Conclusion: This study revealed the high prevalence of antimicrobial resistance genes amongst *Acinetobacter baumannii* and thus confirms the need for isolating and identifying them in clinical laboratory and hospital settings.

Keywords: *Acinetobacter*, Antibiotic resistance, Beta-lactamase