# شیوع متالوبتالاکتاماز در بین گونه‌های آسینتوباکتر جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های منتخب شهر کرج (۱۳۸۹)

دکتر ابوالفضل محبی* دکتر صمد آقایی* دکتر محمد محمدزاده** مهناز توکلی***

* استادیار گروه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
** دکترای میکروب‌شناسی دانشگاه شهید بهشتی تهران
*** کارشناس ارشد میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

آدرس نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه شهید بهشتی، گروه میکروب‌شناسی، تلفن ۰۹۱۲۶۷۶۷۹۹۵
Email: q_m1984@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۹

**چکیده**

**زمینه:** گونه‌های آسینتوباکتر مقاوم به ایمی‌پنم تولیدکننده متالوبتالاکتاماز به عنوان یکی از با اهمیت‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی گزارش شده‌اند و یک مشکل درمانی مهم در سراسر جهان هستند.

**هدف:** مطالعه به منظور تعیین شیوع متالوبتالاکتاماز در میان گونه‌های آسینتوباکتر مقاوم به ایمی‌پنم جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های منتخب شهر کرج انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی۱۴۰ ایزوله آسینتوباکتر در۶ ماهه اول سال ۱۳۸۹ از نمونه‌های بالینی که به آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های کرج ارسال شده بودند، انتخاب و از نظر مقاومت به ایمی‌پنم بررسی شدند. تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز با استفاده از روش‌های فنوتیپی انتشار دیسک ترکیبی، سینرژی دابل دیسک و آزمون Hodge مطالعه شد. سپس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های متالوبتالاکتاماز مثبت توسط روش انتشار دیسک با دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف طبق دستور کار مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) انجام شد.

**یافته‌ها:** از ۱۴۰ ایزوله آسینتوباکتر ۲۹ نمونه (۲۰/۷٪) به ایمی‌پنم مقاوم بودند که از بین آن‌ها ۲۴ نمونه (۱۷/۴۵٪) از نظر متالوبتالاکتاماز با روش‌های فنوتیپی مثبت بودند.

**نتیجه‌گیری:** یافته‌های مطالعه حاکی از رشد گسترده عفونت‌های بیمارستانی توسط آسینتوباکترهای مقاوم به چند دارو در این منطقه است که می‌تواند مشکل بزرگی در درمان آنتی بیوتیکی بیماران باشد.

**کلیدواژه‌ها:** اسینتوباکتر، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ایمی‌پنم، متالوبتالاکتاماز، عفونت بیمارستانی

## مقدمه:

پیدایش وکشف کرباپنم‌ها پیشرفت بزرگی در زمینه درمان آنتی‌بیوتیکی است. به دلیل فعالیت وسیع این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها و پایداری آن‌ها نسبت به بتالاکتامازها، امروزه از آن‌ها برای درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های گرم منفی مقاوم به سفالوسپورین یا پنی‌سیلین استفاده می‌شود. کرباپنم‌ها موفق‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی هستند که نسبتاً از دسترس مقاومت باکتریایی در امان مانده‌اند. اما مقاومت روزافزون و گسترده اکتسابی نسبت به کرباپنم‌ها مشکل بالینی حادی را به وجود آورده است. آسینتوباکترها باکتری‌های گرم منفی، هوازی و غیرمتحرکی هستند که اغلب بر روی پوست کلونیزه می‌شوند و یکی از عوامل تشکیل‌دهنده عفونت‌های بیمارستانی مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند.[۱و۲]

در سال‌های اخیر مقاومت به کرباپنم‌ها در گونه‌های آسینتوباکتر به شدت رو به افزایش است.[۱و۳] یکی از مقاومت‌ها در این باکتری‌ها به وسیله کلاس III

Archive of SID

www.SID.ir

(تقسیم‌بندی Bush , 1998) یا کلاس II (تقسیم‌بندی Ambler) بتالاکتامازها انجام می‌شود که تحت عنوان متالوبتالاکتاماز (MBLs) شناخته می‌شوند. این آنزیم‌ها تقریباً توانایی هیدرولیز تمام آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به جز آزترئونام را دارند. همچنین متالوبتالاکتامازها برای فعالیت خود به کاتیون‌های دو ظرفیتی فلز روی ($Zn^{++}$) احتیاج دارند و در شرایط آزمایشگاهی در حضور عوامل شلاته‌کننده فلزی مثل اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) مهار می‌شوند.[۳] هدف از انجام این مطالعه تعیین شیوع متالوبتالاکتاماز در میان گونه‌های آسینتوباکتر مقاوم به ایمی‌پنم جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های منتخب شهر کرج بود.

## * مواد و روش‌ها:

در این مطالعه توصیفی ۱۴۰ آسینتوباکتر ارسال شده به آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های منتخب کرج جمع‌آوری شدند. این نمونه‌های بالینی از بیمارانی که در مدت ۶ ماهه اول سال ۱۳۸۹ به این بیمارستان‌ها مراجعه کرده بودند، جدا شده بودند. باکتری‌های گونه آسینتوباکتر با توجه به رشد در محیط مک کانکی آگار و تخمیر لاکتوز منفی و با استفاده از آزمون‌های اکسیداز منفی، الگوی Alk/Alk در محیط TSI، عدم تحرک در محیط SIM و آزمون لام مرطوب، عدم تولید پیگمان و DNase منفی از نمونه‌های بالینی شامل خلط، زخم، خون و مایعات بدن جدا شدند. سپس غلظت نیم مک فارلند از نمونه‌های مورد نظر تهیه و روی محیط مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. در محیط دیسک ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم(محصول شرکت Mast انگلستان) قرار داده شد و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.سپس قطر هاله عدم رشد با جدول استاندارد شرکت Mast مقایسه و باکتری‌های مقاوم جداسازی شدند.[۴]

برای آزمون Hodge test از سویه اشرشیاکولی ATCC ۲۵۹۲۲ که سویه حساس به ایمی‌پنم می‌باشد غلظت نیم مک فارلند تهیه و روی محیط مولر هینتون آگارکشت چمنی داده شد. پس از چند دقیقه یک دیسک ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم در مرکز محیط قرار داده شد. سپس از سودوموناس آئروژینوزا سویه ATCC ۲۷۵۸۳ به عنوان سویه متالوبتالاکتاماز مثبت، از کنار پلیت تا نزدیک دیسک ایمی‌پنم و در سه جهت دیگر با زاویه ۹۰ درجه ۳ نمونه مورد آزمایش به همان صورت کشت شعاعی داده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به وجود آمدن ساختار شبیه برگ شبدر نشان‌دهنده مثبت بودن تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده کرباپنم شامل متالوبتالاکتاماز و کرباپنماز است.[۵و۶]

در روش دیسک دیفیوژن ترکیبی، غلظت نیم مک‌فارلند از نمونه‌های مقاوم به ایمی‌پنم تهیه و روی محیط مولر هینتون آگار کشت چمنی داده شد. پس از چند دقیقه دو عدد دیسک ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم با فاصله قرار داده شد. روی یکی از دیسک‌ها ۱۰ میکرولیتر EDTA ۰/۵ مولار ریخته و به مدت ۱۸تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس هاله عدم رشد دیسک ایمی‌پنم و دیسک ایمی‌پنم +EDTA با یکدیگر مقایسه شدند و نمونه‌هایی که هاله عدم رشد دیسک ایمی‌پنم +EDTA آن ۷ میلی‌متر بیش‌تر از دیسک ایمی‌پنم بود به عنوان متالوبتالاکتاماز مثبت در نظر گرفته شدند.[۷و۸]

در آزمون دابل دیسک سینرژی، غلظت نیم مک‌فارلند از نمونه‌های مقاوم به ایمی‌پنم تهیه و روی محیط مولر هینتون آگار کشت چمنی داده شد. پس از چند دقیقه، یک دیسک ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم روی محیط و یک دیسک بلانک در فاصله ۱۰ تا ۲۵ میلی‌متری آن قرار داده شد. سپس ۵ میکرولیتر از EDTA ۰/۵ مولار روی دیسک بلانک ریخته و محیط به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، رشد باکتری در جهت مخالف دیسک ایمی‌پنم و عدم رشد آن در جهت دیسک حاوی EDTA به عنوان مقاومت به واسطه متالوبتالاکتاماز در نظر گرفته شد.[۹و۱۰]

Archive of SID

www.SID.ir

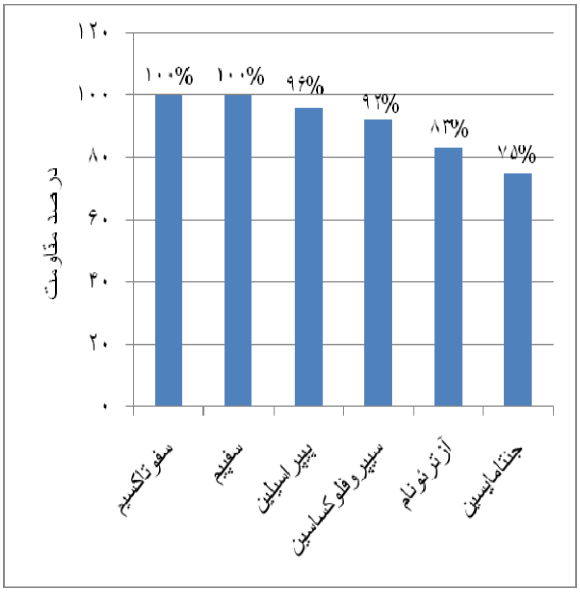
برای انجام آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن، نیم مک‌فارلند از نمونه‌های مقاوم تهیه و روی محیط مولر هینتون آگار کشت چمنی داده شد. پس از چند دقیقه دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (محصول شرکت Mast انگلستان) شامل سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، پیپراسیلین، آزترئونام، سفوتاکسیم و سفپیم روی محیط قرار داده شدند و به مدت ۱۸ تا۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از این مدت هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد و با جدول استاندارد شرکت Mast مقایسه شد.[۱۱-۱۳]

***یافته‌ها:**

از بین ۱۶۳ نمونه آسینتوباکتر گرفته شده از آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های کرج، ۱۴۰ سویه آسینتوباکتر مورد تأیید قرار گرفت که از میان ۱۴۰ نمونه آسینتوباکتر مورد آزمایش ۲۹ باکتری (۲۰/۷ درصد) به ایمی‌پنم مقاوم بود که تمامی ۲۹ نمونه طبق آزمون Hodge تولیدکننده کرباپنماز بودند. در حالی که فقط ۲۴ نمونه (۱۷/۴ درصد) طبق روش‌های دیسک دیفیوژن ترکیبی و دابل دیسک سینرژی از نظر تولید متالوبتالاکتاماز مثبت شدند و ۵ نمونه (۳/۶ درصد) مقاومت به واسطه کرباپنمازی غیر از متالوبتالاکتاماز داشتند. در نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام ایزوله‌های متالوبتالاکتاماز مثبت، تمام ۲۴ ایزوله (۱۰۰ درصد) به سفوتاکسیم و سفپیم، ۲۳ نمونه به پیپراسیلین، ۲۲ نمونه به سیپروفلوکساسین،۲۰ نمونه به آزترئونام و ۱۸ نمونه به جنتامایسین مقاوم بودند، همچنین۱۰ نمونه به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند (نمودار شماره ۱).

در میان ۲۴ نمونه متالوبتالاکتاماز مثبت، ۵۶ درصد مربوط به مردان و ۴۴ درصد مربوط به زنان بود. توزیع نوع نمونه‌ها عبارت بود از: خلط ۵۶ درصد، ادرار ۱۲ درصد، زخم ۱۲ درصد، خون ۸ درصد، نمونه‌های جدا شده از کاتتر ۸ درصد، مایع مغزی نخاعی ۴ درصد. نمونه‌های مقاوم بخش مراقبت‌های ویژه ۶۸ درصد و سایر بخش‌ها ۳۲ درصد بود.

**نمودار۱- درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های آسینتوباکتر متالوبتالاکتاماز مثبت**




*** بحث و نتیجه‌گیری:**

مطالعه حاضر نشان داد ۱۷/۴ درصد آسینتوباکترهای جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های شهر کرج در سال ۱۳۸۹ به واسطه متالوبتالاکتاماز نسبت به ایمی‌پنم مقاوم بودند که حاکی از گسترش شیوع این نوع مقاومت در این منطقه بود.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۰ توسط لی و همکاران در کره انجام شد، ۹ درصد از نمونه‌های جدا شده آسینتوباکتر متالوبتالاکتاماز تولید می‌کردند.[۱۴] در مطالعه یونگ و همکاران نیز در همین کشور در سال ۲۰۰۶، حدود ۲۶/۵ درصد از نمونه‌های جدا شده آسینتوباکتر تولیدکننده متالوبتالاکتاماز بودند.[۸]

در مطالعه پیمانی و همکاران در سال ۱۳۸۹ در تبریز، از بین ۱۰۰ نمونه جدا شده آسینتوباکتر بومانی، ۶۳ نمونه به کرباپنم مقاوم بودند که ۳۱ نمونه (۴۹ درصد) به واسطه متالوبتالاکتاماز مقاومت داشتند.[۱۵] همچنین در

Archive of SID

www.SID.ir

یک مطالعه که توسط انور و همکـاران در سـال ۲۰۱۰ در بنگلادش انجام شد، ۴۴/۸ درصد از نمونه‌های جـدا شـده آسینتوباکتر بومانی مقاوم به ایمی‌پنم از نظر آزمـون‌هـای فنـوتیپی تولیدکننـده متالوبتالاکتامـاز بودنـد.[۱۶] در سـال ۲۰۱۱ نیز کومار و همکاران در هندوستان گزارش نمودنـد که ۲۱ درصد از آسـینتوباکترهای مقـاوم بـه ایمـی‌پـنم و مـروپنم جـدا شـده از بخـش مراقبـت‌هـای ویـژه حامـل متالوبتالاکتامازهـــا بودنـــد و ۹۵ درصـــد نمونـــه‌هـــای متالوبتالاکتاماز مثبت، مقاومت چند دارویی داشتند.[۱۷]

در تحقیق حاضر اکثر نمونه‌ها از بخش مراقبـت‌هـای ویژه و اکثر آن‌ها از نمونه خلط و ترشحات تنفسـی بودنـد که می‌تواند به علت استفاده بی‌رویه ایمی‌پنم برای درمان بیماران بستری در این بخش‌ها باشد. همچنین اکثـر ایـن نمونه‌ها در آزمون آنتی‌بیوگرام نسبت به بقیه خانواده‌هـای آنتی‌بیوتیکی همچون فلوروکینولون‌هـا، آمینوگلیکوزیـدها، سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم، پنی‌سیلین‌های ضد سودوموناسی و حتی آزترئونام نیز مقاوم بودند که بیان‌گـر وجود مکانیسم‌های دیگر مقاومت در این نمونه‌هاست. به طوری که می‌تـوان آن‌هـا را بـه عنـوان آسـینتوباکترهای دارای مقاومت چنددارویی در نظر گرفت.

بـا توجـه بـه ایـن کـه ایمـی‌پـنم یکـی از عمـده آنتـی‌بیوتیـک‌هـایی اسـت کـه پزشـکان بـرای درمـان عفونت‌هایی که به درمان سخت پاسخ مـی‌دهنـد تجـویز می‌کنند، گسترش مقاومت به این آنتی‌بیوتیـک مـی‌توانـد بسیار نگران‌کننده باشد. بنابراین انجام آزمون‌هـای سـاده فنوتیپی برای شناسایی سویه‌های تولیدکننده این آنزیم‌هـا می‌تواند پزشکان را در تجویز رژیم صحیح آنتـی‌بیـوتیکی یاری کند.

## * سپاس‌گزاری:

از شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسـلامی واحـد کـرج جهـت تـأمین بودجـه ایـن طـرح تحقیقـاتی و همکـاری کارکنان آزمایشگاه بیمارستان‌های البرز، کسـری، قـائم و شهید مدنی کرج تقدیر می‌شود.

## * مراجع:

1. Hoffmann MS, Eber MR, Laxminarayan R. Increasing resistance of acinetobacter species to imipenem in United States hospitals, 1999-2006. Infect Control Hosp Epidemiol 2010 Feb; 31 (2): 196-7

2. Dugal S, Fernandes A. Carbapenem hydrolysing metallo– b– lactamase: a review. International Journal of Current Pharmaceutical Research 2011; 3 (3): 9-16

3. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo – beta – lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005 Apr; 18 (2): 306-25

4. Forbes BA, Sanm DF, Weissfeld AS. Bailey & Scott diagnostic microbiology. 12th ed. United states: Academic Press of Elsevier; 2007. 364-8

5. Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing gram- negative bacilli in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2006 Sep; 44 (9): 3139-44

6. Qu TT, Zhang JL, Wang J, et al. Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo – beta – lactamase – producing Pseudomonas aeruginosa strains in China. J Clin Microbiol 2009 Apr; 47 (4): 1136-42

7. Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V. Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo – beta – lactamase production in clinical isolates. Indian J Med Res 2005 Jun; 121 (6): 780-3

8. Yong D, Choi YS, Roh KH, et al. Increasing prevalence and diversity of metallo – beta – lactamases in Pseudomonas spp., Acinetobacter spp., and Enterobacteriaceae from Korea. Antimicrob Agents Chemother 2006 May; 50 (5): 1884-6

Archive of SID

www.SID.ir

9. Saderi H, Karimi Z, Owlia P, et al. Phenotypic detection of metallo - beta - lactamase producing Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burned patients. Iranian Journal of Pathology 2008; 3 (1): 20-4

10. Shahcheraghi F, Sadat Nikbin V, Feizabadi MM. Identification and genetic characterization of metallo– beta– lactamase–producing strains of Pseudomonas aeruginosa in Tehran, Iran. New Microbiological 2010; 33: 243-8

11. Karthika RU, Srinivasa RR, Suchismita S. Phenotypic and genotypic assays for detecting the prevalence of metallo– β–lactamases in clinical isolates of Acinetobacter baumannii from a South Indian tertiary care hospital. Journal of Medical Microbiology 2009; 58: 430-5

12. Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo–beta–lactamases in routine clinical testing. J Clin Microbiol 2002 Aug; 40 (8): 2755-9

13. Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, et al. IMP – 4, a novel metallo– beta– lactamase from nosocomial Acinetobacter spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. Antimicrob Agents Chemother 2001 Mar; 45 (3): 710-4

14. Lee K, Chong Y, Shin HB, et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo – beta – lactamase – producing strains of Pseudomonas and Acinetobacter species. Clin Microbiol Infect 2001 Feb; 7 (2): 88-91

15. Peymani A, Nahaei MR, Farajnia S, et al. High prevalence of metallo– beta– lactamase-producing acinetobacter baumannii in a teaching hospital in Tabriz, Iran. Jpn J Infect Dis 2011; 64 (1): 69-71

16. Anwar S, Amin R. Phenotype detection of metallo – beta – lactamase among the imipenem resistant psudomonas and asintobacter in the tertiary care hospitals of Dhaka city. BMC proc 2011; 5 (1): 92

17. Kumar AV, Pillai VS, Dinesh KR. The phenotypic detection of carbapenemase in meropenem resistant Acinetobacter Calcoaceticus – Baumannii complex in a tertiary care hospital in south India. Journal of Clinical and Diagnostic Research 2011; 5 (2): 223-6

Archive of SID

www.SID.ir

# Prevalence of metallo-β-lactamase among imipenem-resistant Acinetobacter spp. isolated from selected hospitals in Karaj (2010)

A. Mohebi* S. Aghaei* M. Mohammadzadeh** M. Tavakoli***

*Assistant Professor of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj, Iran
**Ph.D. in Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
***MSc. in Microbiology, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

## Abstract

**Background:** Imipenem-resistant Acinetobacter spp. resulting from metallo-β-lactamase (MBLs)-producing strains have been reported to be among important causes of nosocomial infections and of serious therapeutic problem worldwide.

**Objective:** To determine the prevalence of metallo-β-lactamase among imipenem-resistant Acinetobacter isolates based on phenotypic methods.

**Methods:** This was an descriptive study in which 140 clinical isolates of Acinetobacter spp. were initially tested for imipenem susceptibility and later for metallo-β-lactamase production using combined disk diffusion, double disk synergy test, and Hodge test during 2010. Antibiotic susceptibility of positive metallo-β-lactamase isolates were further evaluated by disk diffusion technique using CLSI methodology.

**Findings:** Of 140 isolates, 29 (20.7%) were imipenem-resistant Acinetobacter. Positive phonetypic test for metallo-β-lactamase was 24 (17.1%).

**Conclusion:** The result of this study is indicative of growing number of nosocomial infections associated with multidrug-resistant Acinetobacter spp. in this region leading to difficulties in antibiotic therapy.

**Keywords:** Acinetobacter, Antibiotic-Resistant, Imipenem, Metallo-β-Lactamase, Nosocomial Infections

**Corresponding Address:** Mohammad Mohammadzadeh, Department of Microbiology, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
**Email:** q_m1984@yahoo.com
**Tel:** +98-912-6767995
**Received:** 8 March 2011
**Accepted:** 20 Dec 2011

Archive of SID

www.SID.ir