

## تعیین الگوی حساسیت ضد میکروبی و توزیع ژن bla CTX-M در سویه‌های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه‌های بالینی به روش فنوتیپی و PCR

سمیه وفایی<sup>۱</sup>، دکتر رضا میرنژاد<sup>۲</sup>، دکتر نور امیرمظفری<sup>۳</sup>

### 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 (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 (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI انجام گردید و حداقل غلظت بازدارندگی برای سفی‌پیم و سفنازیدیم 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 سفنازیدیم 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 نیز ۲۰ 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 بستری شده 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 جدا شده 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 میکروبی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، ایران

## مقدمه

اسیتوباکتر 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 (۱-۲). امروزه به علت خاصیت کلینیکی قابل توجه آن در کسب مقاومت دارویی، به عنوان یکی از میکروارگانیزم‌های 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 آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام باعث غیر فعال شدن آن‌ها شده‌اند و توانسته‌اند به این کلاس از آنتی بیوتیک‌ها مقاومت یابند. امروزه انواع جدیدی از آنزیم‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (Extended-spectrum beta-lactamases یا ESBL) کشف شده‌اند (۵). مطالعات El salabi و همکاران نشان داد که آنزیم‌های ESBL در اسیتوباکتر بومانی مرتبط با پلاسمید و کروموزوم هستند و سویه‌های مقاوم می‌توانند مجموعه‌ای از ژن‌های کدکننده‌ی مقاومت نسبت به چند خانواده‌ی آنتی بیوتیکی، را هم زمان حمل کنند و حتی این مقاومت را به یکدیگر انتقال دهند؛ به طوری که امروزه گسترش این گونه اسیتوباکتر 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 سفی‌پیم) نام‌گذاری شده است و از طرفی نیز سفالوتین یا سفالوریدین را بهتر از بنزیل پنی سیلین هیدرولیز می‌کند (۷-۹).

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

## روش‌ها

در این مطالعه‌ی توصیفی و مقطعی، ۵۰۰ نمونه‌ی بالینی شامل ادرار، خون، زخم پوست، ترشه و نمونه‌های جداشده از دستگاه تنفسی و نواحی دچار سوختگی، از بیماران بستری در بیمارستان‌های امام خمینی، میلاد و بقیه‌اله (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 سانتی‌گراد انکوبه

آزمایشات بالا سویه‌ی استاندارد اشریشیا کلی ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و سویه‌ی استاندارد اسیتوباکتر 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 می شود (۱۰)، آزمون تعیین حداقل غلظت بازدارندگی دارو (Minimum inhibitory concentration یا MIC) برای آنتی بیوتیک های سفی پیم، سفنازیدیم و سفوتاکسیم به روش رقت سازی متوالی (Serial dilution) انجام شد.

همچنین با توجه به دستورالعمل NCCLS (National Committee of Clinical and Laboratory Standard) جهت تعیین تولید آنزیم های ESBL از روش غربالگری دیسک ترکیبی استفاده گردید. بدین صورت که بعد از کشت باکتری روی محیط مولر هیتتون آگار، چهار دیسک سفنازیدیم، سفوتاکسیم، سفنازیدیم- کلاولانیک اسید و سفوتاکسیم- کلاولانیک اسید با فاصله‌ی ۱۵ میلی متر از یکدیگر روی آن‌ها قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد، در صورت افزایش بیش از ۵ میلی متر در قطر هاله‌ی هر کدام از آنتی بیوتیک‌های فوق در ترکیب با کلاولانیک اسید نسبت به آنتی بیوتیک به تنهایی، میکروارگانسیم 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 آماده سازی الگو در روش PCR استخراج شد. سپس توالی پرایمر bla CTX-M-II که پیش از این توسط Kim و

گردیدند. پس از ۲۴ ساعت، با آزمایش مستقیم (رنگ آمیزی گرم) وجود کوکو باسیل های گرم منفی اسیتوباکتر به طریقه ی میکروسکوپی تأیید شدند. سپس جهت تشخیص گونه های مختلف اسیتوباکتر تست های بیوشیمیائی IMViC، اوره آز، TSI، OF، کاتالاز و اکسیداز و رشد در ۳۷ و ۴۲ درجه‌ی سانتی گراد انجام شد. سپس ایزوله‌ها در محیط نوترینت برات حاوی ۵۰ درصد گلیسرول در ۸۰- درجه‌ی سانتی گراد نگهداری شدند.

بعد از تعیین هویت گونه‌های اسیتوباکتر، 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 هیتتون برات کشت داده شد و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد انکوبه شد. سپس با استفاده از سوآپ استریل بر روی محیط مولر هیتتون آگار پخش گردید. سپس دیسک‌های آنتی بیوتیک به فاصله‌ی استاندارد قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد، قطر هاله‌ی عدم رشد برای هر آنتی بیوتیک اندازه‌گیری گردید و نتایج برای هر آنتی بیوتیک مطابق با دستورالعمل مربوطه ثبت شد. در این مطالعه ۴ دیسک آنتی بیوتیکی مختلف از شرکت MAST (Mast Diagnostics, Mast group Ltd., Merseyside, UK) مورد استفاده قرار گرفت که شامل: سفی پیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم) بودند. جهت کنترل کیفی

آلمان) با توجه به برنامه های پنج قسمتی زیر انجام شد: مرحله ی Initial denaturation به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه ی سانتی گراد صورت گرفت، مرحله ی Denaturation به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه ی سانتی گراد، مرحله ی Annealing به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۹/۲ سانتی گراد، مرحله ی Extension به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه ی سانتی گراد، ۳۰ سیکل تکرار گردیدند و مرحله ی Final extension به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه ی سانتی گراد 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 رنگ آمیزی 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. داده های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ی ۱۳ (version 13, SPSS Inc., Chicago, IL) و با کمک آزمون های آمار توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

همکاران استفاده شده بود (جدول ۱) مورد آزمایش قرار گرفت (۱۱). لازم به ذکر است که قبل از انجام کار با استفاده از نرم افزارهایی مانند *In silico*، واکنش PCR برای ژن مورد نظر شبیه سازی شد و مناسب بودن پرایمر و قطعه ای که باید به عنوان محصول PCR به دست آید با این نرم افزار تأیید گردید.



شکل ۱. ایجاد هاله ی 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 ۲ X، غلظت ۱/۵ میلی مول  $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر (۰/۵ میکروگرم) DNA، ۰/۱۵ میلی مول 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)

جدول ۱. توالی پرایمر مورد استفاده جهت PCR (Polymerase chain reaction) ژن bla<sub>CTX-M-II</sub>

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی ۵' به ۳'
bla <sub>CTX-M-II-F</sub>	5'-ACC-GCC-GAT-AAT-TCG-CAG-A-<T>-3'
bla <sub>CTX-M-II-R</sub>	5'-GAT-ATC-GTT-GGT-GGT-GCC-ATA-<A>-3'

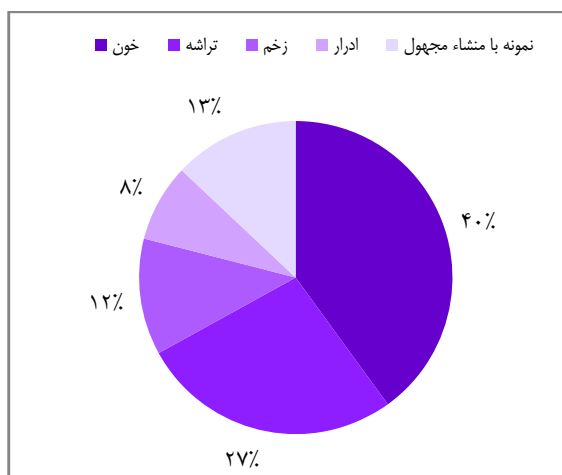
## یافته‌ها

در این تحقیق از ۱۳۰ نمونه‌ی اسیتوباکتر ایزوله شده از ۵۰۰ نمونه‌ی بیماران بستری، ۱۰۰ نمونه (۷۶/۹ درصد) به عنوان اسیتوباکتر بومانی، ۲۲ نمونه (۱۶/۹ درصد) اسیتوباکتر لوفی و ۸ نمونه (۶/۲ درصد) سایر گونه‌های اسیتوباکتر بودند. درصد فراوانی ایزوله‌های اسیتوباکتر بومانی در نمونه‌های مختلف بالینی در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس دسته‌بندی دیگر نیز می‌توان گفت ۴۰ نمونه از بخش مراقبت‌های ویژه، ۳۰ نمونه از بخش عفونی، ۲۰ نمونه از اورژانس و ۱۰ نمونه از سایر بخش‌ها ایزوله شد. درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۱۰۰ ایزوله‌ی اسیتوباکتر بومانی در شکل ۳ نشان داده شده است.

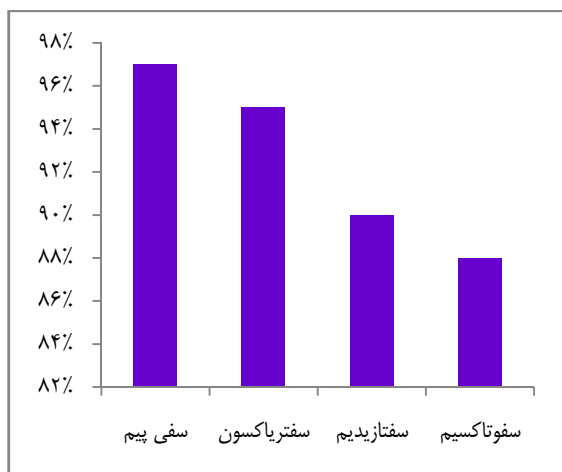
از مجموع ایزوله‌های مورد مطالعه حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفی‌پیم در ۹۱ درصد، نسبت به سفنازیدیم در ۸۴ درصد و نسبت به سفوتاکسیم در ۸۰ درصد از نمونه‌ها،  $MIC \leq 128$  میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش گردید (جدول ۲).

همچنین بر طبق نتایج آزمون دیسک ترکیبی ۲۰ درصد سویه‌ها مولد آنزیم ESBL بودند. در آزمایش PCR از مجموع ۱۰۰ ایزوله‌ی اسیتوباکتر بومانی ۱۹ درصد سویه‌ها حامل ژن bla CTX-M-II

بودند (شکل ۴).



شکل ۲. درصد فراوانی سویه‌های اسیتوباکتر 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، سفنازیدیم و سفوتاکسیم در ایزوله‌های اسیتوباکتر بومانی

MIC	آنتی‌بیوتیک		سفی‌پیم		سفتنازیدیم		سفتواکسیم	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۸	۶	۶٪	۶	۶٪	۴	۴٪	۴	۴٪
۱۶	۰	۰٪	۰	۰٪	۰	۰٪	۲	۲٪
۳۲	۰	۰٪	۰	۰٪	۰	۰٪	۰	۰٪
۶۴	۳	۳٪	۳	۳٪	۱۰	۱۰٪	۹	۹٪
۱۲۸	۴۰	۴۰٪	۴۰	۴۰٪	۰	۰٪	۵	۵٪

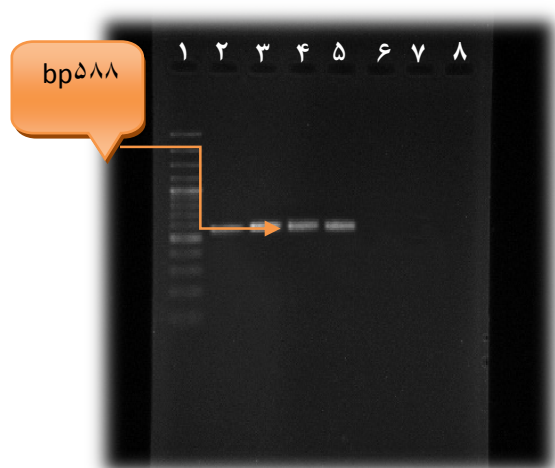
سویه‌های مولد ESBL و بررسی شیوع آنزیم بتالاکتامازی CTX-M-II در سویه‌های اسپیتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه های بالینی به روش فنوتیپی و ژنوتیپی انجام گردید.

در این تحقیق ۷۶/۹ درصد از ایزوله‌ها اسپیتوباکتر بومانی، ۲۳/۱ درصد اسپیتوباکتر لوفی و سایر اسپیتوباکترها بودند که کمابیش مشابه مطالعه‌ی Constantiniu و همکاران بود. آن‌ها گزارش نمودند از ۲۴ ایزوله‌ی کلینیکی جدا شده، ۷۱ درصد اسپیتوباکتر بومانی و ۲۹ درصد اسپیتوباکتر لوفی بودند (۱۲). همچنین مطالعه‌ی حاضر مشابه مطالعه‌ی Rit و همکاران بود که نشان دادند از میان ۴۱۸۰ ایزوله‌ی کلینیکی ۷۴/۰۲ درصد به عنوان اسپیتوباکتر بومانی و مابقی آن‌ها به عنوان اسپیتوباکتر لوفی و سایر گونه‌های اسپیتوباکتر 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 اسپیتوباکتر بومانی نسبت به اکثر آنتی بیوتیک های مصرفی مقاوم شده اند. از طرفی نتایج مطالعه‌ی ما هنوز نشان داد که سویه های اسپیتوباکتر بومانی مقاومت بسیار بالایی نسبت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه و همچنین MIC بسیار بالایی نسبت به سفی پیم، سفنازیدیم و سفوتاکسیم دارند.

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

بر خلاف مطالعه‌ی توسط شاهچراغی و همکاران



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 امپلی فای شده‌ی ژن blaCTX-M-II

(bp588) در سویه‌ی استاندارد

ردیف ۳-۵: محصولات امپلی فای شده از نمونه‌های بالینی مورد بررسی

ردیف ۶: محصولات امپلی فای شده‌ی ایزوله شده‌ی فاقد ژن

blaCTX-M-II از نمونه‌های بالینی

ردیف ۷-۸: فاقد نمونه

## بحث

اسپیتوباکتر 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 (۱-۲). با توجه به این که عوامل محیطی و الگوهای مختلف استفاده از عوامل 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

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 بستری شده محسوب می‌گردد و امکان درمان با آن‌ها را از بین برده است. بنابراین شناسایی و ایزولاسیون بیماران ناقل باکتری‌های 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، می‌توان 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 بقیه‌اله (عج)، گروه میکروبی‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تشکر و قدردانی می‌گردد.

صورت گرفت که در آن MIC نسبت به سفتازیدیم در ۷۹ ایزوله (۸۳/۱ درصد) ایزوله  $\geq 64$  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 ذکر شده می‌تواند به دلیل نوع نمونه‌های مورد بررسی و نوع دیسک آنتی‌بیوتیکی مصرفی و اجرای آنتی‌بیوگرام باشد.

نتایج بررسی میزان MIC نسبت به سفتازیدیم در سویه‌های اسیتوباکتر بومانی در این مطالعه با نتایج مطالعات انجام گرفته در کشور کره و در کشور تایوان کمابیش هم‌خوانی داشت (۲۰-۲۱).

برطبق نتایج آزمون دیسک ترکیبی جهت غربالگری سویه‌های مولد ESBL، در این مطالعه ۲۰ درصد سویه‌ها مولد این آنزیم بودند که با مطالعات دیبهم 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). می‌توان گفت که این اختلاف به این دلیل می‌تواند باشد که مصرف بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به پیدایش سویه‌هایی با مقاومت بالا در این بیمارستان‌ها

## 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. Diomedei 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  $\beta$ -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, Riesenberk 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, Halvae. 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].



## 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<sup>1</sup>, Reza Mirnejad PhD<sup>2</sup>, Noor Amirmozafari PhD<sup>3</sup>

### 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  $\beta$ -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 *bla*CTX-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  $\mu$ g/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  $\beta$ -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