

مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های بالینی *Acinetobacter baumannii* در حضور مهارکننده پمپ تراوشی

پریسا نیک آسا^۱، احیا عبدی عالی^{۲*}، محمدعلی بهار^۳، وحید نیکنام^۴

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی از دانشکده علوم پایه دانشگاه الزهرا (س)

۲. دکترای میکروبیولوژی پزشکی، استادیار دانشکده علوم پایه دانشگاه الزهرا (س)

۳. دکترای ایمونولوژی پزشکی، دانشیار بیمارستان شهید مطهری تهران

۴. دکترای فیزیولوژی گیاهی، استادیار دانشکده علوم پایه دانشگاه تهران

* نشانی برای مکاتبه: تهران، میدان ونک، ده ونک، گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه الزهرا (س) تلفن ۸۸۰۵۸۹۱۲
abdialya@alzahra.ac.ir
پذیرش مقاله: تیر هشتاد و هفت پذیرش برای چاپ: شهریور هشتاد و هفت

چکیده

سابقه و هدف: گونه های *Acinetobacter* به ویژه *A. baumannii*، پاتوژن های فرصت طلب مهمی هستند که عامل انواع عفونت های بیمارستانی به شمار می روند. گونه مذکور با دارا بودن مقاومت ذاتی به آنتی بیوتیک ها و توانایی پذیرش ژن های کدکننده مقاومت، به عنوان یکی از میکروارگانیسم های شاخص مطرح است. یکی از انواع مکانیسم های مقاومت در این باکتری بیان پمپ های تراوشی (*Efflux*) می باشد. هدف از انجام پروژه حاضر بررسی مقاومت *A. baumannii* نسبت به آنتی بیوتیک های رایج درمانی و نقش پمپ تراوشی در میزان مقاومت سویه های بالینی است.

روش کار: در مدت ۹ ماه ۶۵ سویه *Acinetobacter* از نمونه های بالینی مختلف زخم، ادرار، خلط، خون و مغزاستخوان از سه بیمارستان تهران جمع آوری گردید و توسط تست های بیوشیمیایی تعیین گونه شدند. ابتدا تست حساسیت آنتی بیوتیک به روش انتشار در آگار (*Kirby-Bauer*) نسبت به ۱۲ آنتی بیوتیک و سپس تست حساسیت ضد میکروبی به روش میکرودایلوشن به شش آنتی بیوتیک رایج درمانی بررسی شد و نتایج به صورت *MIC* بدست آمد. در مرحله آخر برای بررسی نقش افلاکس در میزان مقاومت باکتری، *MIC* در حضور *CCCP* به عنوان مهارکننده پمپ های تراوشی بر روی ۲۰ سویه مقاوم به بیش از ده آنتی بیوتیک، تعیین شد. یافته ها: تنها گونه جدا شده *A. baumannii* بود. اکثر سویه های این گونه به عنوان سویه های دارای مقاومت چندگانه دارویی (*MDR*) شناخته شدند. میزان ($\mu\text{g/ml}$) *MIC* برای آنتی بیوتیک های سفنازیدیم، جنتامیسین، آمیکاسین، سفپیم، سیپروفلوکساسین، و افلوکساسین به ترتیب بیشتر از ۲۵۶، ۶۴، ۶۴، ۳۲، ۱۶ و ۸ گزارش شد. *CCCP* میزان *MIC* را در سویه های مورد بررسی حداقل یک رقت کاهش داد.

نتیجه گیری: سویه های *A. baumannii*، مقاومت بسیار بالایی به آنتی بیوتیک های درمانی دارند و با توجه به کاهش میزان *MIC* در حضور ماده مهارکننده پمپ های تراوشی در سویه های مورد بررسی، احتمال بیان سیستم های تراوشی فعال و نقش آنها در بالا بردن میزان مقاومت این باکتری ها وجود دارد.

واژگان کلیدی: *Acinetobacter baumannii* *MIC* پمپ های تراوشی

مقدمه

تنفسی در بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه (ICU) می باشد. اغلب درمان چنین عفونت هایی به علت مقاومت گسترده این باکتری ها به گروه های زیادی از آنتی بیوتیک های درمانی، برای پزشکان بسیار مشکل است (۱ و ۲). سویه های *A. baumannii* به لحاظ مقاومت ذاتی به اکثر آنتی بیوتیک ها و همچنین توانایی بالای پذیرش عوامل ژنتیکی مقاومت بسیار شناخته شده اند (۳). مقاومت ذاتی این باکتری ها می تواند در نتیجه اثر متقابل کاهش نفوذپذیری غشای خارجی و بیان سیستم های تراوشی فعال صورت گیرد (۴).

گونه های *Acinetobacter* به ویژه *A. baumannii*، پاتوژن های فرصت طلب مهمی هستند. گونه ژنومی ۲ این جنس (*A. baumannii*) مقام دوم را پس از *P. aeruginosa* در بین پاتوژن های غیر تخمیری (*Multi- MDR*) (*drug resistant*) در ایجاد عفونت های بیمارستانی دارد. این باکتری ها می توانند عامل باکتری می، عفونت دستگاه ادراری و مننژیت ثانویه باشند و در واقع نقش اصلی آنها ایجاد پنومونی بیمارستانی به ویژه پنومونی وابسته به دستگاه

جدول ۱. تست های بیوشیمیایی لازم برای شناسایی *A.baumannii*

<i>A.baumannii</i>	تست بیوشیمیایی
-	اکسیداز
+	کاتالاز
+	Mac
-	همولیز
Alk/NC	TSI
Oxi	Oxidative-Fermentation (O-F)
-	بایل اسکولین
+	مالونات
+	آرژنین دهیدرولاز
(-) +	اورنیتین دکربوکسیلاز
-	فنیل آلانین دامیناز
+	رشد در ۴۲ درجه
-	SIM
+	سیترات

یافته ها

با توجه به نتایج حاصل از انجام تست های بیوشیمیایی بر روی ۶۵ سویه بالینی *Acinetobacter* و تشخیص تمامی آنها به عنوان *A.baumannii* (جدول ۱)، این گونه شایع ترین گونه جنس *Acinetobacter* شناخته شد. مقاومت آنتی بیوتیکی حاصل از آنتی بیوگرام سویه های بالینی *A.baumannii* بدین شرح می باشد: آمیکاسین (۸۱/۵ درصد)، آمپی سیلین-سولباکتام (۳۳/۸ درصد)، سفنازیدیم (۹۲/۳ درصد)، سیپروفلوکساسین (۷۹/۷ درصد)، کلیستین (۱/۶ درصد) کوتریموکسازول (۹۲/۲ درصد)، جنتامیسین (۸۵/۹ درصد)، ایمی پنم (۴۲/۲ درصد)، کانامایسین (۹۳/۷ درصد)، افلوکساسین (۷۸/۵ درصد)، پپراسیلین (۹۶/۹ درصد) و توبرامایسین (۷۳/۸ درصد) (نمودار ۱). همانطور که مشاهده می شود سویه های ایرانی *A.baumannii* به اغلب آنتی بیوتیک های درمانی مقاومت نشان می دهند. ۲۲ آنتی بیوتیک مختلف به دست آمده از نتایج آنتی بیوگرام سویه های *A.baumannii* در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از MIC بر حسب (µg/ml) برای آنتی بیوتیک های سفنازیدیم، جنتامیسین، آمیکاسین، سفپیم، سیپروفلوکساسین و افلوکساسین به ترتیب بیشتر از ۲۵۶، ۶۴، ۶۴، ۳۲، ۱۶ و ۸ گزارش شد. همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می شود میزان MIC در حضور CCCP در سویه های MDR بررسی شده حداقل یک مرتبه کاهش نشان می دهد.

مهمترین مکانیسم های مقاومت در این باکتری ها تولید آنزیم های β-لاکتاماز و آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها می باشد. به علاوه بیان کاهش یافته پروتئین های غشای خارجی، موتاسیون در توپوایزومرازها و افزایش بیان پمپ های تراوشی نقش مهمی در مقاومت آنتی بیوتیکی ایفا می کنند (۳). دو سیستم تراوشی فعال نوع RND-resistance (nodulation-cell division) به نام های AdeABC و AdeDE در گونه های *Acinetobacter* شناسایی شده اند (۵). افلاکس فعال باعث افزایش میزان MIC عوامل ضد میکروبی می شود. بنابراین میزان MIC سوبستراهای آنتی بیوتیکی این پمپ ها در حضور مواد تخریب کننده گرادیان الکتروشیمیایی یون های پروتون در غشا و در نتیجه مهار پمپ های تراوشی استفاده کننده از نیروی محرکه پروتونی، کاهش می یابد (۶). در این پروژه مقاومت *A.baumannii* نسبت به ۱۲ آنتی بیوتیک رایج بررسی شد و نقش پمپ تراوشی در میزان مقاومت سویه های بالینی مورد مطالعه قرار گرفت.

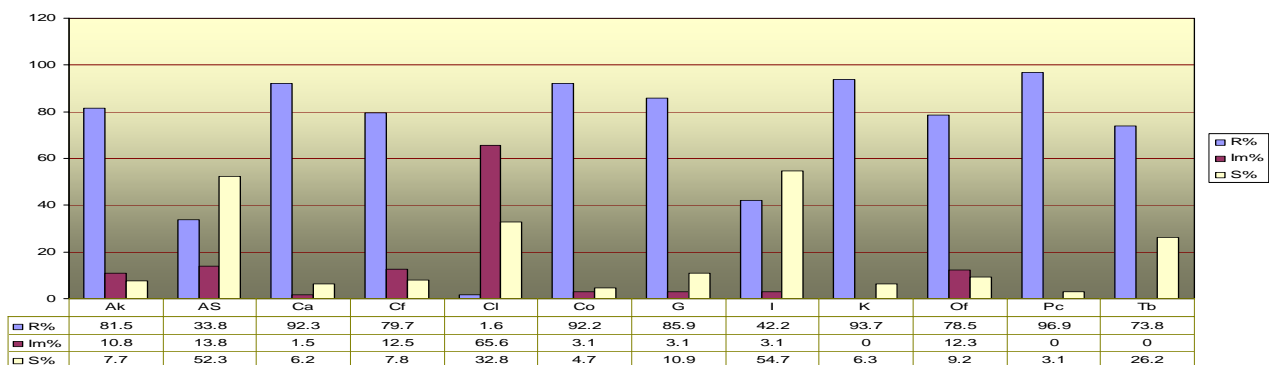
روش کار

۶۵ سویه کلینیکی *Acinetobacter* از نمونه های بالینی مختلف زخم، ادرار، خون، خلط و مغز استخوان در طی ۹ ماه از سه بیمارستان در تهران جمع آوری و پس از تایید توسط تست های بیوشیمیایی که در جدول ۱ آمده است، تعیین گونه شد. تست حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار در آگار Kirby-bauer برای ۱۲ آنتی بیوتیک بر روی تمامی سویه ها انجام شد (۷). در مرحله بعد حساسیت سویه های کلینیکی *A.baumannii* به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، آمیکاسین، جنتامیسین، سفنازیدیم و سفپیم با روش تهیه رقت های متوالی استاندارد (Broth serial dilution) در محیط MHB (Merck) با تعداد 10^6 Cfu/ml باکتری اندازه گیری شد (۹و۸). سپس روش میکرودايلوشن در حضور ماده مهارکننده سیستم های تراوشی کربونیل سیانید m-کلروفنیل هیدرازون (CCCP) با غلظت نهایی ۳۰ µM بر روی سویه های مقاوم به بیش از ده آنتی بیوتیک انجام شد (۱۰). نتایج به عنوان MIC بدست آمد که نشان دهنده غلظتی از آنتی بیوتیک است که در حضور و غیاب CCCP رشد قابل مشاهده با چشم غیر مسلح را پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ C درجه مهار می کند.

جدول ۲. فراوانی آنتی بیوتیک های بدست آمده از نتایج آنتی بیوگرام در بین سویه های *A.baumannii*

تعداد سویه	آنتی بیوتیک	پروفیل مقاومت (آنتی بیوتیک)
۲	-	۱
۱	Pc	۲
۱	Ca, G, Pc	۳
۱	Co, G, K, Pc, Tb	۴
۴	Ak, As, Cl, Cf, Of, I	۵
۲	Ca, Cf, Of, K, Pc, Co	۶
۱	Ak, Co, G, I, K, Pc, Tb	۷
۴	Ak, Ca, Cf, Of, Co, K, Pc	۸
۱	Ak, Ca, Co, G, K, Pc, Tb	۹
۱	Ak, Ca, Co, G, K, Pc, Tb, Cf	۱۰
۱	Ak, Ca, Co, G, I, K, Pc, Tb	۱۱
۱	Ak, Ca, Co, G, K, Pc, Cf, Of	۱۲
۱	Ca, G, K, Pc, Co, Cf, Of, As	۱۳
۱	Ak, Ca, Cf, G, K, Of, Pc, As, I	۱۴
۱۹	Ak, Ca, Cf, G, K, Of, Pc, Tb, Co	۱۵
۲	Ak, Ca, Cf, G, K, Of, Pc, As, Co	۱۶
۱	Ak, Ca, Cf, G, K, Of, Pc, Co, I	۱۷
۱	Ak, Ca, G, K, Pc, As, I, Co, Tb	۱۸
۱	Ak, Ca, G, K, Pc, As, I, Co, Cf, Of	۱۹
۱	Ak, Ca, G, K, Pc, As, Co, Cf, Of, Tb	۲۰
۷	Ak, Ca, G, K, Pc, I, Co, Cf, Of, Tb	۲۱
۱۱	Ak, Ca, G, K, Pc, I, Co, Cf, Of, Tb, As	۲۲

Ak: آمیکاسین، AS: آمپی سیلین-سولباکتام، Ca: سفنازیدیم، Cf: سیپروفلوکساسین، Cl: کلیستین، Co: کوتریموکسازول، G: جنتامیسین، I: ایمپنم، K: کانامایسین، Of: افلوکساسین، Pc: پیپراسیلین، Tb: توبرامایسین.

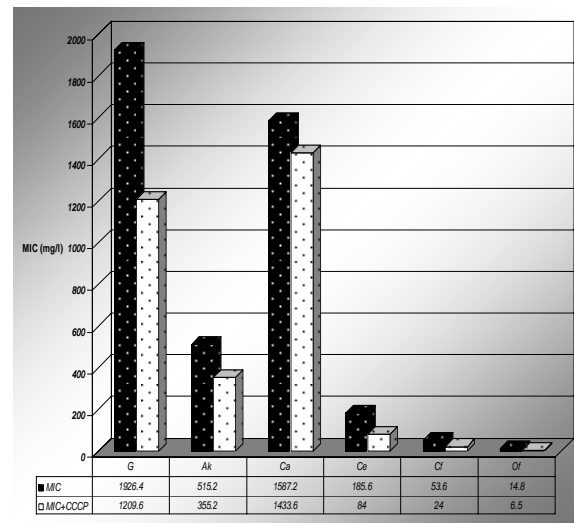


نمودار ۱. نتایج حاصل از آنتی بیوگرام ۱۲ آنتی بیوتیک رایج درمانی بر روی سویه های *A.baumannii*

Ak: آمیکاسین، AS: آمپی سیلین-سولباکتام، Ca: سفنازیدیم، Cf: سیپروفلوکساسین، Cl: کلیستین، Co: کوتریموکسازول، G: جنتامیسین، I: ایمپنم، K: کانامایسین، Of: افلوکساسین، Pc: پیپراسیلین، Tb: توبرامایسین. S: حساس؛ Im: حساس نسبی؛ R: مقاوم.

مطالعات نشان داده‌اند که سویه‌های کلینیکی *Acinetobacter* هنوز تا حد زیادی به آمپی‌سیلین-سولباکتام حساس باقی مانده‌اند با این حال متاسفانه ظهور مقاومت به سولباکتام در سویه‌های *A.baumannii* دیده می‌شود. به این ترتیب کلیستین (از انواع پلی‌میکسین‌ها) به عنوان تنها جایگزین درمان باقی مانده است ولی به علت عوارض جانبی ناشی از این آنتی‌بیوتیک استفاده از آن محدود می‌باشد (۱۳-۱۱).

نتایج مطالعه حاضر در این پروژه نیز مقاومت بالای سویه‌های *A.baumannii* را به آنتی‌بیوتیک‌های درمانی نشان می‌دهد و همانند سایر کشورها در ایران نیز شاهد افزایش مقاومت این باکتری به ایمپنم (۴۲/۲ درصد سویه‌ها) و آمپی‌سیلین-سولباکتام (۳۳/۸ درصد سویه‌ها) می‌باشیم. بنابراین طبق نتایج بدست آمده بهترین آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های ناشی از *A.baumannii* در ایران آمپی‌سیلین-سولباکتام و ایمپنم می‌باشد و همچنین تجویز کلیستین می‌تواند برای بیماران به خصوص برای بیماران دارای نقص کلیوی با احتیاط کامل صورت گیرد. نتایج MIC گزارش شده از سایر کشورها مانند ایتالیا و آمریکا در مقایسه با نتایج ما نشان می‌دهد که متاسفانه میزان مقاومت سویه‌های *A.baumannii* در ایران نسبت به کشورهای مذکور بالاتر می‌باشد. مکانیسم افلاکس در این باکتری تا کنون بسیار کم مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است و شناخته شده‌ترین نوع افلاکس در این نوع باکتری (*A.baumannii*) پمپ AdeABC نوع RND می‌باشد (۱). این پمپ توسط نیروی محرکه پروتونی غشا، توانایی تراوش سوبسترا به خارج از غشای سیتوپلاسمی را دارد، در نتیجه توسط مواد مهارکننده پمپ‌هایی که از نیروی محرکه پروتونی برای تراوش مواد ضد میکروبی استفاده می‌کنند می‌توان این پمپ تراوشی را غیرفعال نمود. در پژوهش حاضر برای این کار از CCCP که تخریب‌کننده گرادیان الکتروشیمیایی یون‌های پروتون در غشای باکتری است استفاده شد و همانطور که انتظار می‌رفت MIC در سویه‌های MDR مورد بررسی در حضور CCCP کاهش نشان داد که می‌تواند نشان‌دهنده حضور پمپ‌های تراوشی در این باکتری باشد.



نمودار ۲. میزان MIC در حضور و غیاب ماده مهارکننده پمپ تراوشی (CCCP با غلظت ۳۰ μM).

Ak: آمیکاسین، AS: آمپی‌سیلین-سولباکتام، Ca: سفتازیدیم، Cf: سیپروفلوکساسین، Cl: کلیستین، CO: کوتریموکسازول، G: جنتامیسین، I: ایمپنم، K: کانامایسین، Of: افلوکساسین، Pc: پیپراسیلین، Tb: توبرامایسین.

بحث

گونه‌های *Acinetobacter* به خصوص *A.baumannii* نقش بسیار مهمی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی ایفا می‌کنند. این باکتری به علت داشتن توانایی بالا در کسب ژن‌های مقاومت تقریباً به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاومت نشان می‌دهد به طوری که تا چندی پیش داروهای پیشنهادی برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها، پنی‌سیلین‌های وسیع الطیف و کرباپنم‌ها بودند که امروزه نتایج حاصل از تحقیقات در کشورهای مختلف افزایش مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد.

REFERENCES

1. Magnet, S., Courvalin, P., and T, Lambert. Resistance-Nudulation-Cell Division-Type Efflux Pump Involved in Aminoglycoside Resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents. chemother.* 2001. 12: 3375-3380.
2. Bergogne, B.E, and K.J, Towner. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996. p.148-165.
3. Bonomo, A.R, and Szabo, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* 2006. 43: 49-56
4. Vila, J., Marti, S, and S.C, Javier. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007. P: 1-6.

5. Chu, Y.W., Chau, S.L, and E.T, Houang. Presence of active efflux systems AdeABC, AdeDE and AdeXYZ in different Acinetobacter genomic DNA groups. J.M.M. 2006.477-8.
6. Piddock, J.V, and M.M, Johnson. Accumulation of 10 Fluoroquinolones by wild-type of efflux mutant *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial. Agents. Chemother. 2002. 46: 813-820.
7. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test; Approved Standard–Ninth Edition, CLSI / NCCLS M2-A9.26-1.
8. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard–Seventh Edition, CLSI / NCCLS M7-A7.26-2.
9. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, CLSI / NCCLS M100-S16. 26-3.
10. Paulsen, I.T., Brown, M.H, and R.A, Skurray. Proton-dependent multidrug efflux system. Microbiol. Rev. 1996. 575-608.
11. Higgins, G.p., Wisplinghoff, H., Stefanik, D, and H, Seifert. 2004. In vitro activity of the B-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with B-lactamase against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. Antimicrob. Agents. Chemother. 5:1586-92.
12. Mubareka, S, and E, Rubinstein. 2005. Aerosolized colistin for the treatment of nosocomial pneumonia due to multidrug-resistant gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. Bio. Med. Central. 9: 29-30.
13. Katragkou, A, and E, Roilides. 2005. Successful treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* central nervous system infections with colistin. J. Clin. Microbiol. 9: 4916-17.