A Phenotypic and Genotypic Study of Colistin *arn* Resistance Regulator Gene Classes in Acinetobacter Baumannii isolated from Clinical Cases using Multiplex PCR

Farnoosh Karimi
M.Sc. Student of Molecular Biology,Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran,Farnooshkarimi95@yahoo.com
Kumarss Amini*
Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran,dr_kumarss_amini@yahoo.com
Gholamreza Javadi
Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran, alaleleila@gmail.com

Abstract

Introduction: Colistin is considered as the last line of treatment in nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*. Nowadays, with the elucidation of resistance transition mechanisms through *arn* genes, a new drug resistance pattern has been observed in *Acinetobacter baumannii* isolates. The aim of this study was to investigate the phenotypic and genotypic roles of the genes for regulating resistance to Colistin (*arn*) in strains isolated from clinical cases.

Materials and methods: To conduct this descriptive study, after obtaining the written consent, 400 clinical samples were collected from patients admitted to Hazrat-e-Rasoul Hospital in Tehran. After the identification of the isolates using biochemical methods and *16srDNA* analysis, the antibiotic resistance pattern of the isolates was determined by disk diffusion and molecular methods (to detect *arnT*, *arnB* genes).

Results: Sixty *Acinetobacter baumannii* strains were isolated from 400 samples. The results of antibiotic resistance analysis showed that, in most cases, more than 38% of blood samples had Acinetobacter species. Also, no Acinetobacter was found in any of the spinal cord specimens, which showed the lowest infection rate ($p < 0.05$). There was also a significant difference between the antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates to Colistin and other antibiotics ($p < 0.05$). In addition, Colistin resistant strains had *arnB* and *arnT* genes, which were considered statistically significant ($p < 0.05$) compared to other strains.

Discussion and conclusion: Since Colistin is used as the last line of treatment, increased resistance to it can lead to increased mortality and hospital costs. Therefore, the application of new therapeutic regimens and greater sensitivity to the timely diagnosis and control of nosocomial infections seems necessary.

Key words: Colistin, Acinetobacter, Resistance, *Arn* Gene

* Corresponding author
Received: December 25, 2019 / **Accepted:** April 25, 2020

فصل‌نامه زیست شناسی میکروارگانیسم ها
معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان
سال نهم، شماره ۳٤، تابستان ۱۳۹۹، صص ۱۳-۲۱
نوع مقاله: پژوهشی
تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۱۰/٤ ، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/٦

مطالعهٔ فنوتیپی و ژنوتیپی کلاس‌های ژن تنظیم‌گر مقاومت به کولیستین (*arn*) در *اسینتوباکتر بومانی* جداشده از موارد بالینی به روش PCR چندگانه

فرنوش کریمی: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران، Farnooshkarimi95@yahoo.com

کیومرث امینی*: دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران، dr_kumarss_amini@yahoo.com

غلامرضا جوادی: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران، alaleleila@gmail.com

چکیده

مقدمه: کولیستین آخرین خط درمان در عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *اسینتوباکتر بومانی* به شمار می‌آید. امروزه با روشن‌شدن سازوکار انتقال مقاومت از طریق ژن‌های *arn*، بروز الگوی مقاومت دارویی جدید در جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مشاهده شده است. در مطالعهٔ حاضر سعی شد به بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی کلاس‌های ژن تنظیم‌گر مقاومت به کولیستین (***arn***) در گونه‌های جداشده از موارد بالینی پرداخته شود.

مواد و روش‌ها: به‌منظور انجام این مطالعهٔ توصیفی، پس‌از دریافت رضایت کتبی، تعداد ۴۰۰ نمونهٔ بالینی از بیماران بستری در بیمارستان حضرت رسول تهران جمع‌آوری شد. پس‌از شناسایی جدایه‌ها با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و بررسی *16S rDNA*، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها به دو روش انتشار دیسک و روش مولکولی (برای ردیابی ژن‌های *arnB* و *arnT*) تعیین شد.

نتایج: تعداد ۶۰ سویهٔ *اسینتوباکتر بومانی* از ۴۰۰ نمونهٔ گرفته‌شده جدا شد. مطابق نتایج بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، در بیشترین حالت، بیش از ۳۸ درصد نمونه‌های خون دارای گونهٔ *اسینتوباکتر بومانی* بودند و در هیچ نمونهٔ مغزی‌نخاعی، *اسینتوباکتر بومانی* یافت نشد و کمترین نسبت آلودگی را نشان داد ($P<0.05$)؛ همچنین اختلاف آماری معناداری بین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* به کولیستین و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مشاهده شد ($P<0.05$)؛ علاوه‌براین، سویه‌های مقاوم به کولیستین دارای ژن‌های *arnB* و *arnT* بودند که در مقایسه با سایر سویه‌ها ازنظر آماری معنادار بود ($P<0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: باتوجه‌به اینکه کولیستین آخرین خط درمان است، افزایش مقاومت به آن می‌تواند به افزایش مرگ‌ومیر و هزینه‌های بیمارستانی منجر شود؛ ازاین‌رو، به‌کارگیری رژیم‌های درمانی جدید و حساسیت بیشتر در تشخیص به‌موقع و کنترل عفونت‌های بیمارستانی امری ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: کولیستین، *اسینتوباکتر*، مقاومت، *arn*

---

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2020, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.
Doi: 10.22108/bjm.2020.120342.1248

مقدمه

اسینتوباکتر بومانی (Acinetobacter baumannii)، باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب و ازجمله باکتری‌های گرم منفی، هوازی و غیرتخمیری است که به‌شکل کوکسی یا کوکوباسیل دیده می‌شود. ازآنجاکه این گونهٔ باکتریایی نیازمندی‌های غذایی اندکی برای رشد دارد، می‌تواند به‌مدت طولانی در شرایط نامساعد، سطوح خشک و همچنین محیط آبی زنده بماند (۱). *اسینتوباکتر* در بسیاری منابع ازجمله شیر پاستوریزه‌شده، غذاهای یخ‌زده، هوای بیمارستان، لباس شسته‌شده، لارنگوسکوپ، کاتتر آنژیوگرافی، ونتیلاتورها، بالشت‌های بیمارستانی و صابون‌ها مشاهده شده است و مقاومت آن به برخی شوینده‌های شیمیایی همچون کلرهگزیدین سبب شده است از علل مهم عفونت‌های بیمارستانی به شمار آید. تعدادی از گونه‌های *اسینتوباکتر* مستقیما در عفونت‌های انسانی دخالت دارند که مهم‌ترین آنها، *اسینتوباکتر بومانی* است (۲). مطالعه‌های همه‌گیرشناسی (Epidemiology) اثبات کرده‌اند این باکتری به‌ندرت سبب بروز عفونت‌های سخت در افراد دارای سطح ایمنی طبیعی می‌شود، اما در گروه‌های مختلف مستعد عفونت‌های فرصت‌طلب همچون افراد بستری در بخش مراقبت‌های ویژهٔ بیمارستان، افراد دارای نقص ایمنی یا سوختگی وسیع و سالمندان سبب ایجاد عفونت‌های مجاری ادراری، مننژیت، اندوکاردیت، پریتونیت، عفونت‌های زخم و عفونت پوست می‌شود (۳).

امروزه علاوه‌بر فساد مواد غذایی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو (MDR) از مهم‌ترین عوامل عفونت بیمارستانی به شمار می‌آید. مطالعه‌ها نشان می‌دهند مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این سویه‌ها به‌واسطهٔ سازوکارهای اکتسابی و ذاتی همچون تغییر آنزیمی، جهش در ژن‌های هدف، تغییر نفوذپذیری غشای خارجی، افزایش بیان افلاکس پمپ‌ها و انتقال ژن‌های مقاومت دارویی منتقل‌شونده با عناصر ژنتیکی متحرک (مانند ترانسپوزون‌ها) رخ می‌دهد (۱)؛ در این بین، کولیستین از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های ضد *اسینتوباکتر* است که امروزه، مقاومت علیه آن مدنظر قرار گرفته است. این دارو، نوعی آنتی‌بیوتیک از دستهٔ پلی‌میکسین است که غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی را تخریب می‌کند و دارای آثار وابسته به غلظت باکتری‌کش بر *اسینتوباکتر بومانی* است. اگرچه مطالعه‌های اخیر مقاومت *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به پلی‌میکسین‌ها را در شرایط بالینی و آزمایشگاهی نشان می‌دهند، سازوکارهای این مقاومت هنوز ناشناخته است. دستهٔ ژنی *arnBCADTEF* پروتئینی را تولید می‌کند که نقش اساسی در تنظیم مقاومت به کولیستین دارد (۴ و ۵).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مقاوم به چند کلاس مختلف آنتی‌بیوتیکی همچون بتالاکتام‌ها، آمینوگلوکوزیدها و فلوئوروکینولون‌ها سبب افزایش طول مدت بستری و هزینه‌های درمانی و نهایتا افزایش میزان مرگ‌ومیر افراد می‌شود. درمان عفونت‌های ناشی از این عامل بیماری‌زا به‌علت مقاومت درخور توجه آن به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار دشوار است و میزان مرگ‌ومیر بیماران آلوده را به ۴۳ درصد و در

برخی کشورهای جهان سوم به ۷۵ درصد می‌رساند (۶ و ۷).

مطالعه‌ها روی سطوح و الگوهای مختلف حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مختلف *اسینتوباکتر بومانی* در مناطق مختلف جهان و ایران نشان می‌دهند سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* در مقایسه با سایر گونه‌های *اسینتوباکتر*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری دارند. باوجود نمونه‌های پراکندهٔ عفونت *اسنتیوباکتر*، شیوع عفونت بیمارستانی ناشی از سویه‌های *اسنتیوباکتر بومانی* به‌طور گسترده در مقاله‌های همه‌گیرشناسی (Epidemiology) گزارش و به نگرانی فزاینده‌ای در بیمارستان‌ها تبدیل شده است (۵). سیستم‌های طبقه‌بندی متعددی برای تعیین منشأ عفونت و روش گسترش گونه‌ها توسعه یافته‌اند که از طبقه‌بندی فنوتیپی اولیه (طبقه‌بندی بر اساس یافته‌های سرم‌شناسی و طبقه‌بندی باکتریوسین) تا روش‌های مولکولی معتبرتر مانند طبقه‌بندی ریبوزومی، تحلیل چندریختی‌های طول محدودیت در DNA کروموزومی از طریق PFGE تعیین اثر PNR، ARDRA، تحلیل DNA چندریختی تکثیرشدهٔ تصادفی AFLP، PCR منطقهٔ محدودیت کمیاب (IRS-PCR) و PCR مبتنی بر توالی متقارن برون زاد تکراری (REP-PCR) را شامل می‌شوند. اگرچه تمام روش‌های یادشده درصدهایی از تمایز را میان جدایه‌های بالینی نشان می‌دهند، در حال حاضر هیچ روش استاندارد توافق‌شده‌ای برای دسته‌بندی *اسینتوباکتر بومانی* بر اساس الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی وجود ندارد (۸ و ۹).

ازآنجاکه شناسایی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در هر منطقه از مهم‌ترین عوامل جلوگیری از گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی است، مطالعهٔ حاضر می‌کوشد به بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی تعیین میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توزیع ژن تنظیم‌گر مقاوم به کولیستین (*arn*) در باکتری *اسینتوباکتر بومانی* جداشده از نمونه‌های بالینی (خون، ترشحات تنفسی، ادرار، زخم پوست) به روش Multiplex PCR و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک بپردازد.

مواد و روش‌ها

جمعیت مطالعه و جداسازی باکتری: به‌منظور انجام این مطالعهٔ توصیفی- مقطعی، تعداد ۴۰۰ نمونهٔ بالینی شامل خون (۱۴۰ نمونه)، ترشحات تنفسی (۱۲۲ نمونه)، ادرار (۵۹ نمونه)، مایع مغزی‌نخاعی (۴۰ نمونه)، خلط (۲۰ نمونه) و زخم (۱۹ نمونه) طی مدت سه ماه (مهر تا دی ۹۷) از بیماران بستری در بیمارستان حضرت رسول (تهران) جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی تحقیقاتی پاسارگاد منتقل شد. بیمارانی شرایط مطالعه را داشتند که رضایت‌نامهٔ کتبی را به‌منظور موافقت با انجام مطالعه روی نمونه امضا کرده بودند و در پروندهٔ آنها تأیید شده بود که عفونت بیمارستانی دارند. نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه و سپس رنگ‌آمیزی گرم شدند تا وجود کوکوباسیل‌های گرم منفی *اسینتوباکتر* تأیید شود. به‌منظور شناسایی گونه‌های مختلف *اسینتوباکتر*، آزمون‌های بیوشیمیایی IMVIC، اوره‌آز، SIM، MRVP، OF، TSI، کاتالاز و اکسیداز و رشد در ۳۷ و ۴۲ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شدند. گونه‌هایی که نتایج آزمون‌های کاتالاز، سیترات و اوره‌آز آنها مثبت و لاکتوز، اکسیداز، اندول، H2S، MRVP آنها منفی و بدون حرکت بودند، *اسینتوباکتر بومانی* در نظر گرفته شدند و در محیط پپتون‌واتر (۳۰ درصد گلیسرول) و دمای منفی ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. تأیید قطعی گونه‌ها با ردیابی قطعهٔ ژنی *16S rDNA* طبق

روش یادشده در مطالعهٔ قبلی (۱۰) و طی واکنش PCR انجام شد.

آزمون تعیین حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها: مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (شرکت پادتن طب، ایران) بر اساس CLSI (۲۰۱۸) (۱۱) و به روش انتشار دیسک در محیط مولرهینتون‌آگار ارزیابی شد. گفتنی است از سویهٔ استاندارد *اسینتوباکتر بومانی* *ATCC* 23155 برای شاهد مثبت و از سویهٔ استاندارد *اشریشیا کلی* *ATCC* 12475 برای شاهد منفی کیفیت آنتی‌بیوگرام استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌های آزمون‌شده در جدول ۱ دیده می‌شوند. سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند روی محیط مولرهینتون‌آگار تلقیح شد؛ پس‌از گذاشتن دیسک‌ها در محیط‌کشت و ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، نتایج بررسی قطر هالهٔ رشدنکردن با جدول CLSI تفسیر شدند.

مراحل مولکولی: در مطالعهٔ حاضر، جداسازی DNA با استفاده از کیت اختصاصی جداسازی DNA (سیناژن، ایران) و باتوجه‌به دستورعمل سازنده انجام شد؛ سپس به‌منظور بررسی کمی و کیفی DNA جداشده، روش‌های اسپکتروفتومتری با نانودراپ و الکتروفورز در ژل انجام شدند و کمیت و کیفیت مناسب ژنوم جداشده در تمام نمونه‌ها تأیید شد. آغازگرهای استفاده‌شده (ماکروژن، ایران) برای ردیابی ژن‌های *arnB* و *arnT* در جدول ۲ دیده می‌شوند که با نرم‌افزار Gene runner طراحی و در سایت NCBI بلاست شدند.

آزمون Multiplex PCR با مقادیر ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix 2x (Amplicon)، ۰/۸ میکرولیتر از هر آغازگر (جدول ۲) با غلظت ۱۰ پیکومول‌برمیکرولیتر و ۴ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) برای هر واکنش در مراحل دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحلهٔ اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و مرحلهٔ تکثیر در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و پس‌از ۳۵ چرخه، مرحلهٔ تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

جدول ۱- دیسک‌های استفاده‌شده برای آزمون آنتی‌بیوگرام و تفسیر قطر هالهٔ رشدنکردن بر اساس میلی‌متر

آنتی‌بیوتیک/غلظت بر اساس میکروگرم	حساس	حدواسط	مقاوم
کولیستین ۱۰	۱۱	-	۱۰
سفتریاکسون ۳۰	≥۲۱	۲۰-۱۴	≤۱۳
سیپروفلوکساسین ۳۰	≥۲۱	۲۰-۱۶	≤۱۵
پیپیراسیلین ۱۰۰	≥۲۱	۲۰-۱۸	≤۱۷
آمیکاسین ۳۰	≥۱۷	۱۶-۱۵	≤۱۴
آمپی‌سیلین ۱۰	≥۱۵	۱۴-۱۲	≤۱۱
سفوتاکسیم ۳۰	≥۲۳	۲۲-۱۵	≤۱۴
سفتازیدیم ۳۰	≥۱۸	۱۵-۱۷	≤۱۴
توبرامایسین ۱۰	≥۱۵	۱۴-۱۳	≤۱۲
مروپنم ۱۰	≥۲۱	۲۰-۱۸	≤۱۷
ایمی‌پنم ۱۰	≥۱۶	۱۵-۱۴	≤۱۳

جدول ۲- آغازگرهای استفاده‌شده در مطالعهٔ حاضر

توالی آغازگر	اندازهٔ محصول	ژن هدف
F=5′- ATAATCGGCGACAGGATAGC -3′ R=5′- CAGTATCGGTCAGTGGCTGT-3′	۱۴۷ جفت باز	*arnT*

arnB	۱۰۴۰ جفت باز	F=5′- CTAGGAATTCCACGCCAAGGACGCCAAC -3′ R=5′- CTAGGGATCCCCGGGAGAATGGCAGAAAGTC -3′
16S rDNA	۲۰۰ جفت باز	F=5′ CATTATCACGGTAATTAGTG-3′ R=5′- AGAGCACTGTGCACTTAAG-3′

به‌منظور تکثیر قطعه‌های ژنی مطالعه‌شده از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) و برای ردیابی قطعهٔ ژنی تکثیریافته در PCR از الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز استفاده شد. در این مرحله، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR مربوط به هر مرحله از آزمایش در حضور نشانگر ۱۰۰ جفت بازی DNA (سیناژن، ایران) به‌مدت حدود ۳۲ دقیقه روی ژل آگارز ۱/۵ درصد دارای اتیدیوم‌بروماید در ولتاژ ثابت ۷۶ ولت الکتروفورز شد و سپس ژل به‌دست‌آمده با دستگاه ژل داک مشاهده و از آن عکس‌برداری شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری: داده‌های حاصل با نرم‌افزار آماری SPSS، نسخهٔ ۲۱ و مدل‌های آماری مجذور کای و دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد تحلیل شدند.

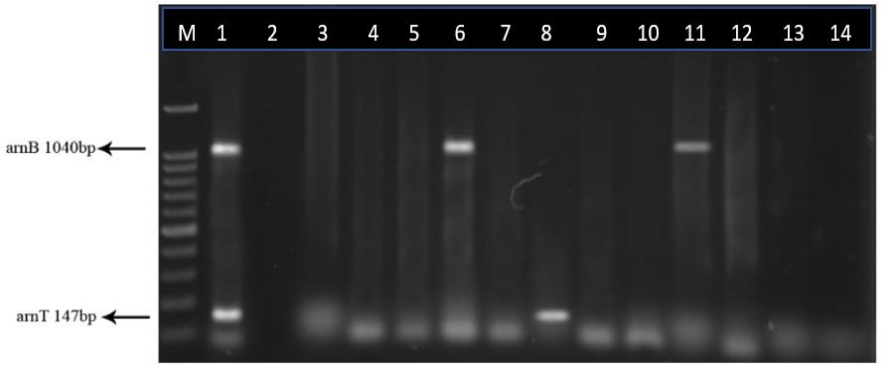
نتایج

در مطالعهٔ حاضر، ۶۰ سویه *استینوباکتر بومانی* از ۴۰۰ نمونهٔ گرفته‌شده از بیماران بستری در بیمارستان به دست آمد. مطابق داده‌ها در بیشترین حالت، بیش از ۳۸ درصد نمونه‌های خون دارای گونهٔ *استینوباکتر بومانی* بودند و *استینوباکتر بومانی* در هیچ نمونهٔ مغزی‌نخاعی یافت نشد و کمترین نسبت آلودگی را نشان داد ($P<0.05$). در مرحلهٔ بعد، تمام سویه‌های *استینوباکتر بومانی* جداشده برای تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در حضور آنتی‌بیوتیک‌های هدف مطالعهٔ حاضر به روش انتشار دیسک بررسی شدند (جدول ۳). نتایج آماری نشان دادند اختلاف آماری معناداری بین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استینوباکتر بومانی* به کولیستین و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد ($P<0.05$).

جدول ۳- نتایج آنتی‌بیوگرام سویه‌های *استینوباکتر بومانی*

	تعداد و درصد سویه‌ها بر اساس تفسیر CLSI					
مادهٔ ضدمیکروبی	Sensitive		Intermediate		Resistance	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
کولیستین	۵۸	۹۶	۰	۰	۲	۳/۳
سفتریاکسون	۷	۱۱/۶	۰	۰	۵۲	۸۶
سیپروفلوکساسین	۱۱	۱۸/۳	۰	۰	۴۸	۸۰
پیپیراسیلین	۷	۱۱/۶	۲	۳/۳	۵۰	۸۳/۳
آمیکاسین	۳	۵	۱	۱/۶	۵۵	۹۱/۶
آمپی‌سیلین	۵۵	۹۱/۶	۳	۵	۲	۳/۳
سفوتاکسیم	۱۰	۱۶/۶	۰	۰	۵۰	۸۳/۳
سفتازیدیم	۴	۶/۶۶	۰	۰	۵۶	۹۳/۳
سفیکسیم	۶	۱۰	۰	۰	۵۴	۹۰
مروپنم	۷	۱۱/۶	۲	۳/۳	۵۰	۸۳/۳
ایمی‌پنم	۰	۰	۷	۱۱/۶	۵۲	۸۶

نتایج آزمون Multiplex PCR: نتایج آزمون Multiplex PCR نشان دادند از مجموع ۶۰ سویهٔ *استینوباکتر بومانی*، ۱۵ درصد سویه‌ها (۹ سویه) ژن *arn B* و ۱۰ درصد سویه‌ها (۶ سویه) ژن *arn T* را دارند. بررسی آماری نشان داد سویه‌های مقاوم به کولیستین دارای ژن‌های *arnB* و *arnT* هستند که ازنظر آماری در مقایسه با سایر سویه‌ها معنادار تلقی می‌شود ($P<0.05$) (شکل ۱).



شکل ۱- نتیجهٔ آزمایش Multiplex-PCR روی تعدادی از جدایه‌ها که به‌ترتیب از چپ به راست عبارتند از: M. نشانگر DNA ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱. شاهد مثبت، ستون ۲. شاهد منفی، ستون‌های ۳ تا ۱۴. محصولات PCR نمونه‌ها

بحث

گسترش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و عفونت‌های بیمارستانی از مهم‌ترین مشکلاتی است که ساختارهای بهداشتی در جهان را درگیر کرده است و پیش‌بینی می‌شود به مشکل اول سازمان بهداشت جهانی طی سال‌های آینده تبدیل شود. *استینوباکتر بومانی*، باکتری مقاوم در برابر شرایط سخت محیطی و بیماری‌زای فرصت‌طلبی است که از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌آید (۱۲) و گسترش ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه، مشکل مهمی در درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری است (۲). در مطالعهٔ حاضر با تعیین میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی، توزیع ژن تنظیم‌گر مقاوم به کولیستین (*arn*) در باکتری *استینوباکتر بومانی* جداشده از نمونه‌های بالینی بررسی شد. نتایج نشان دادند جدایه‌های بررسی‌شده مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی این مطالعه دارند، اما حساسیت آنها به‌طور معناداری نسبت به کولیستین بیشتر از سایر آنتی بیوتیک‌ها است.

مطالعه‌های بسیاری به بررسی سطح حساسیت و مقاومت *استینوباکتر بومانی* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج همچون مروپنم، کلرامفنیکل و نیتروفورانتوئین در ایران و جهان پرداخته‌اند و نتایج تقریبا یکسانی را به دست آورده‌اند (۱۳). برخی مطالعه‌ها نیز آنتی‌بیوتیک‌های مشابه با مطالعهٔ حاضر را بررسی کرده‌اند. در مطالعهٔ Ayan و همکاران، ۵۲ سویه مطالعه شدند (۱۴) و تمام جدایه‌ها به پیپراسیلین، سیپروفلوکساسین و سفتریاکسون مقاوم بودند و حساسیت نسبت به آمیکاسین در ۷۴ درصد جدایه‌ها مشاهده شد. در مطالعهٔ حاضر، مقاومت به پیپراسیلین، سیپروفلوکساسین و سفتریاکسون بیش از ۸۰ درصد بود، اما مقاومت به آمیکاسین در ۹۱ درصد نمونه‌ها مشاهده شد؛ تفاوت در حساسیت نسبت به آمیکاسین را می‌توان به تفاوت جغرافیایی نسبت داد. Yun و همکاران طی

مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶، مقاومت به کولیستین را در حیوانات و جمعیت انسانی چینی مشاهده و اثبات کردند (۱۵). در مطالعه‌ای که Smolyakov و همکاران به‌منظور بررسی عفونت‌های ناشی از *اسینتوباکتر بومانی* با مقاومت دارویی چندگانه انجام دادند، مشخص شد ۹۳ درصد سویه‌ها به ایمی‌پنم و تمام سویه‌ها به کولسیتین و آمپی‌سیلین- سولباکتام حساس هستند (۱۶). در مطالعهٔ حاضر نیز حساسیت سویه‌ها به آمپی‌سیلین اثبات شد، اما مقاومت ۸۶ درصدی نسبت به ایمی‌پنم مشاهده شد که در تضاد با مطالعهٔ یادشده است و به نظر می‌رسد زمان و جغرافیای نمونه‌برداری در این تفاوت مؤثر باشند.

در مطالعهٔ دیگری، Tavakol و همکاران به ردیابی شایع‌ترین ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جداشده از عفونت‌های بیمارستانی پرداختند و در راستای داده‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه تأیید کردند استفاده از روش‌های مولکولی به‌ویژه Multiplex PCR در کنار آزمون آنتی‌بیوگرام، روش مناسبی برای تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و کنترل عفونت *اسینتوباکتر بومانی* است (۱۰، ۱۲ و ۱۷)؛ ازاین‌رو، Multiplex PCR استفاده شد که در مطالعه‌های مختلف نشان داده شده است توانایی تولید اطلاعات بیشتر با کمترین میزان نمونه را نسبت به روش‌های سنتی و PCR معمولی دارد، زمان بسیار کمتری مصرف می‌کند، مقرون‌به‌صرفه است و موجب افزایش دقت در تحلیل داده‌ها می‌شود (۱۸ و ۱۹). مطالعهٔ حاضر نشان داد وجود ژن‌های دستهٔ ژنی *arn* می‌تواند به بروز مقاومت نسبت به کولیستین در *اسینتوباکتر بومانی* منجر شود که در راستای مطالعه‌های دیگر است، اما تاکنون این موضوع به‌طور اختصاصی در مطالعه‌ای بررسی نشده است. ارتباط بین فنوتیپ مقاومت و حضور توالی نوکلئوتیدی در جدایه‌ها بررسی و مشاهده شد اختلافی بین آنها وجود ندارد. مطالعهٔ دانشمندان روی جمعیت ایرانی نشان داده است بیشتر جدایه‌های *اسینتوباکتر* به سفالوسپورین‌های نسل سوم، تیکارسیلین- آزترونام و تیکارسیلین- کلاولانیک‌اسید مقاوم و به کولیستین حساس هستند و مطالعهٔ حاضر در تأیید مطالعه‌های پیشین در این زمینه است (۱۲ و ۲۰-۲۲). گفتنی است باوجود حساسیت باکتری‌ها به کولسیتین (آخرین خط درمان)، مقادیری از مقاومت در این گونه‌ها مشاهده می‌شود؛ علاوه‌براین، ژن‌های مقاومت چندگانه می‌توانند روی ژن‌های حدت *arn* قرار گیرند و برای نمونه، از باکتری های روده‌ای به سویه‌های دیگر همچون *اسینتوباکتر بومانی* منتقل شوند.

نتیجه‌گیری

ازآنجاکه کولیستین در آخرین خط درمان استفاده می‌شود، افزایش مقاومت به آن زنگ خطری برای سیستم‌های بهداشتی به‌ویژه در ردهٔ دامپزشکی است. باتوجه‌به مصرف این دارو در دامپزشکی، به نظر می‌رسد انتقال مقاومت از باکتری‌های روده‌ای به *اسینتوباکتر* سبب نگرانی بیشتری است و ازاین‌رو، به‌کارگیری رژیم‌های درمانی جدید و حساسیت بیشتر در تشخیص به‌موقع و کنترل عفونت‌های بیمارستانی و دامپزشکی امری ضروری به نظر می‌رسد.

References

(1) Harding CM., Hennon SW., Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nature Reviews Microbiology* 2018; 16(2): 91-102.

(2) Mirshekar M., Shahcheraghi F., Azizi O., Solgi H., Badmasti F. Diversity of class 1

extensive drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from hospitalized patients in Southwestern Iran. *Le infezioni in medicina: rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive* 2018; 26(1): 67-76.

(4) Logan LK., Gandra S., Trett A., Weinstein RA., Laxminarayan R. *Acinetobacter baumannii* resistance trends in children in the United States, 1999–2012. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* 2018; 8(2): 136-142.

(5) Bhamidimarri SP., Zahn M., Prajapati JD., Schleberger C., Söderholm S., Hoover J., et al. A multidisciplinary approach toward identification of antibiotic scaffolds for *Acinetobacter baumannii*. *Structure* 2019; 27(2): 268-280.

(6) Mertins S., Higgins PG., Rodríguez MG., Borlon C., Gilleman Q., Mertens P., et al. Generation and selection of antibodies for a novel immunochromatographic lateral flow test to rapidly identify OXA-23-like-mediated carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Journal of Medical Microbiology 2019; 1021-1032.

(7) Correa A., del Campo R., Escandón-Vargas K., Perenguez M., Rodríguez-Baños M., Hernandez-Gomez C., et al. Distinct genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Colombian hospitals. *Microbial Drug Resistance* 2018; 24(1): 48-54.

(8) Yagnik KJ., Kalyatanda G., Cannella AP., Archibald LK. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* associated with extrinsic contamination of ultrasound gel in a tertiary centre burn unit. *Infection Prevention in Practice* 2019; 1(2): 100009.

(9) Wood CR., Mack LE., Actis LA. An update on the *Acinetobacter baumannii* regulatory circuitry. Trends in Microbiology 2018; 26(7): 560-562.

integrons, and disruption of carO and dacD by insertion sequences among *Acinetobacter baumannii* isolates in Tehran, Iran. *Microbial Drug Resistance* 2018; 24(4): 359-366.

(3) Soltani B., Heidari H., Ebrahim-Saraie HS., Hadi N., Mardaneh J., Motamedifar M. Molecular characteristics of multiple and

(10) Tavakol M., Momtaz H., Mohajeri P., Shokoohizadeh L., Tajbakhsh E. Genotyping and distribution of putative virulence factors and antibiotic resistance genes of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from raw meat. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 2018; 7(1): 120-126.

(11) Córdova-Espinoza MG., Arana EDH., Giono-Cerezo S., Atanacio EGS., Tapia EC., Vázquez LIC., et al. First report of new clonal groups ST706 and ST1088 from MDR *Klebsiella pneumoniae* Mexican strains. *bioRxiv* 2019: 616334.

(12) Moradi J., Hashemi FB., Bahador A. Antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* in Iran: a systemic review of the published literature. *Osong public Health and Research Perspectives* 2015; 6(2): 79-86.

(13) Kulengowski B., Burgess DS. Imipenem/relebactam activity compared to other antimicrobials against non-MBL-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from an academic medical center. *Pathogens and disease* 2019; 77(4): ftz040.

(14) Ayan M., Durmaz R., Aktas E., Durmaz B. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *Journal of Hospital Infection* 2003; 54(1): 39-45.

(15) Liu Y-Y., Wang Y., Walsh TR., Yi L-X., Zhang R., Spencer J., et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and

molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases* 2016; 16(2): 161-168.

(16) Smolyakov R., Borer A., Riesenberg 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. *Journal of Hospital Infection* 2003; 54(1): 32-38.

(17) Ostadi Y., Rezai AA., Moghadampour M., Faghri J. The involvement of drug efflux system in amikacin resistance of multiple drug resistant *Acintobacter baumannii* isolates in Isfahan, Iran. *Journal of Medical Bacteriology* 2019; 8(1, 2): 13-20.

(18) Edwards MC., Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Research* 1994; 3(4): S65-S75.

(19) Barratt K., Anderson TP., Fahey JA., Jennings LC., Werno AM., Murdoch DR. Comparison of the fast track diagnostics respiratory 21 and Seegene Allplex multiplex polymerase chain reaction assays for the detection of respiratory viruses. *British Journal of Biomedical Science* 2017; 74(2): 85-89.

(20) Peymani A., Nahaei M-R., Farajnia S., Hasani A., Mirsalehian A., Sohrabi N., et al. High prevalence of metallo-b-lactamase-producing acinetobacter baumannii in a teaching hospital in Tabriz, Iran. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2011; 64(1): 69-71.

(21) Safari M., Saidijam M., Bahador A., Jafari R., Alikhani MY. High prevalence of multidrug resistance and metallo-beta-lactamase (MβL) producing Acinetobacter baumannii isolated from patients in ICU wards, Hamadan, Iran. *Journal of Research in Health Sciences* 2013; 13(2): 162-167.

(22) Beigverdi R., Sattari-Maraji A., Emaneini M., Jabalameli F. Status of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii harboring carbapenemase: First systematic review and meta-analysis from Iran. Infection, Genetics and Evolution 2019; 73: 433-443.