مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۳، خرداد ۱۳۹۶
صفحه: ۲۵۱-۲۴۱

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.3, Jun 2017
Pages: 241-251

بررسی ژنوتایپینگ و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های اسینتوباکتربومانی جداشده از بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی شهرکرد به روش Pulsed- Field Gel Electrophorsis

ابوالفضل قلی‌پور[۱]، نجمه انصاری[۲]، محمدصادق دماوندی[۳]، محمد ربیعی[۳]، رضا میرنژاد[۴*]

خلاصه

مقدمه: اسینتوباکتربومانی از باکتری‌های ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی در بخش مراقبت‌های ویژه در بیمارستان‌ها محسوب می‌شود و می‌تواند باعث عفونت‌های گوناگون بیمارستانی نظیر باکتریمی، مننژیت، پنومونی و عفونت مجاری ادراری شود. تکنیک‌های مولکولی مختلفی برای ژنوتایپینگ میکروارگانیسم‌ها وجود دارد که در بین آن‌ها PFGE به عنوان روش استاندارد طلایی برای ساب تایپینگ بسیاری از باکتری‌ها معرفی شده است. هدف از این مطالعه تعیین تیپ‌های مولکولی سویه‌های اسینتوباکتربومانی با روش Pulsed- Field Gel Electrophoreses و همچنین تعیین ارتباط بین تیپ‌های شایع موجود و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها است.

روش بررسی: در این بررسی توصیفی– تحلیلی تعداد ۵۰ باکتری اسینتوباکتربومانی به کمک روش‌های کشت و تست‌های بیوشیمیایی شناسایی و تائید شدند. سپس باکتری‌های شناسایی‌شده با استفاده از PFGE مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج تیپ بندی آن‌ها با نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها مقایسه گردید.

نتایج: نتایج به دست آمده نشان داد که تمام ایزوله‌ها دارای مقاومت چندگانه هستند. بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های توبرامایسین (۵۲ درصد)، جنتامایسین (۳۶ درصد) و مروپنم (۳۲ درصد) مشاهده گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های اسینتوباکتربومانی جداشده از بیمارستان‌های شهر شهرکرد شامل ۷ الگوی ژنتیکی مختلف بودند که ۲ تا از این الگوها اسپورادیک بود. همچنین الگوهای ژنوتیپی در هر بیمارستان با یکدیگر متفاوت بود.

نتیجه‌گیری: با استفاده از روش PFGE، هرچند تنوع در میان سویه‌های اسینتوباکتربومانی در شهر شهرکرد مشاهده شد، ولی هیچ سویه اپیدمیکی در میان آن‌ها مشاهده نگردید. از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج نیز این الگوها با هم متفاوت بودند.

واژه‌های کلیدی: ژنوتایپینگ، اسینتوباکتربومانی، Pulsed- Field Gel Electrophorese

۱- استادیار، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۲- دانشجوی PhD، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۳،۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزکی شهرکرد
۵- دانشیار، مرکزتحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۶۹۷۲۰۶۷ پست الکترونیکی: rmirnejad@bmsu.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۸

مقدمه

اسینتوباکتر ازجمله اسینتوباکتربومانی شامل دسته‌ای از باکتری‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب در بیمارستان‌ها می‌باشند که روزبه‌روز تعداد آن‌ها در حال افزایش است. بیماران مورد هدف این باکتری‌ها بیشتر افراد آسیب‌پذیر بستری‌شده در بیمارستان، افرادی که دارای ضعف سیستم ایمنی هستند و افرادی که یکپارچگی پوستشان و مجاری هوایی آن‌ها دچار اختلال شده است، است. ازاین‌رو این باکتری‌ها می‌توانند طیف وسیعی از عفونت‌ها شامل پنومونی اکتسابی، عفونت خون، عفونت پوست و بافت‌های نرم آسیب‌دیده، عفونت ادراری، مننژیت، اندوکاردیت و التهاب صفاق ایجاد نمایند (۳-۱). مهم‌تر از همه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری‌ها به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های معمول است که درنتیجه، مشکلات زیادی را در درمان این باکتری به وجود آورده است. این باکتری عامل عفونت‌های بیمارستانی، به‌ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه است (۴).

آگاهی از اصول اپیدمیولوژی جمعیت‌های میکروبی در میکروب‌شناسی پزشکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. افزایش سویه‌های باکتریایی بیماری‌زا، افزایش روش‌های جدید انتقال ارگانیسم‌ها به میزبان‌های مورد نظر و توسعه مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها عامل مهمی جهت شناسایی و مانیتورینگ منشأ و نحوه انتشار سویه‌های یک گونه بوده است (۵). نتایج مطالعات نشان داده است که سویه‌های اسینتوباکتربومانی که به چند دارو مقاوم (MDR) می‌باشند سبب ایجاد اپیدمی‌هایی در بخش‌های مختلف بیمارستان و ناتوانی در امر درمان بیماران بستری در ICU شده‌اند. مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که امروزه بیشتر عفونت‌های کلینیکی ناشی از اسینتوباکتربومانی، ناشی از سویه‌های مقاوم به چند دارو بوده و این سویه‌ها در حال گسترش می‌باشند (۸-۶).

برای مشخص نمودن سویه‌های شایع مختلف در سطح جامعه بایستی نمونه‌های ایزوله شده با روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی تعیین تیپ گردند. از آنجایی که روش‌های تایپینگ فنوتیپی از روش‌های سنتی بوده که محصولات بیان یک ژن یا ژن‌های خاصی را دنبال می‌کنند، می‌توانند تحت تأثیر شرایط محیطی قرار گیرند و درنتیجه از کارایی پایینی برخوردارند؛ بنابراین امروزه بیشتر از روش‌های ژنتیکی که کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند استفاده می‌شود (۹). روش‌های ژنتیکی مثل تکنیک‌های (Repetitive Extragenic Palindromic Seqence-Based PCR (Rep-PCR، انگشت‌نگاری اسید نوکلئیک، آنالیز سکانس DNA کروموزوم و ژل الکتروفورز در میدان الکتریکی ضربان دار یا Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) ابزارهای مهمی جهت تایپ‌بندی گونه‌های مختلف میکروبی می‌باشند. از بین روش‌های ژنتیکی، آنالیز ژنوم کروموزومی از طریق PFGE با اینکه روش پرزحمت و گرانی است ولی در حال حاضر یکی از بهترین روش‌های تایپ‌بندی است، چرا که دارای قدرت افتراق‌دهی و تکرارپذیری بالا است. به عبارتی این روش به عنوان روش استاندارد طلایی برای ساب تایپینگ بسیاری از باکتری‌ها از جمله اشریشیاکلی، کلبسیلا، کلستریدیوم، انتروباکتر، نایسریا و اسینتوباکتر معرفی شده است (۱۰،۱۱).

از آنجایی که تایپینگ باکتری‌ها اطلاعات ما را در راستای شناسایی اصول اپیدمیولوژی و انتشار بسیاری از بیماری‌های باکتریایی افزایش می‌دهد (۹) و نظر به اینکه تاکنون در خصوص ژنوتایپینگ استرین‌های اسینتوباکتربومانی جداشده از بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی شهرکرد مطالعه‌ای به روش PFGE انجام نشده است این مطالعه طراحی‌شده است.

روش بررسی

پژوهش حاضر از نوع مطالعات توصیفی- تحلیلی بوده که پس از کسب مجوز از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شد. طی مدت‌زمان ۶ ماه تعداد ۲۵۰ نمونه بالینی شامل نمونه‌های خون، ترشحات تنفسی، ادرار، زخم پوست و تراشه از بیمارستان‌های هاجر و کاشانی جمع‌آوری گردید که از این میان تعداد ۵۰ ایزوله اسینتوباکتربومانی شناسایی گردید. نمونه‌های بیمارستانی از بیمارانی اخذ شد که این بیماران پس از ۷۲-۴۸ ساعت بعد از

بستری شدن در بیمارستان دچار عفونت شده بودند. نمونه با استفاده از پرسشنامه و گرفتن عدم سابقه بستری و عفونت بیمارستانی طی ۷۲ ساعت گذشته و همچنین آزمایش بیماران در بدو ورود به بیمارستان تهیه شد.

نمونه‌های مذکور از بیمارانی که حداقل به مدت سه روز در این بیمارستان‌ها بستری‌شده بودند و عفونت را در محیط بیمارستان کسب کرده بودند جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌ها روی محیط EMB کشت داده‌شده و باکتری‌های اسینتوباکتربومانی به کمک آزمایش‌های مرسوم میکروسکوپی و بیوشیمیایی شناسایی و تایید شدند. برای اطمینان از صحت جنس و گونه باکتری، تست‌های استاندارد باکتری‌شناسی شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز، واکنش روی محیط TSI، توانایی استفاده از سیترات به عنوان تنها منبع کربن، حرکت، اندول منفی، عدم تولید پیگمان، اکسید نمودن گلوکز در محیط OF و رشد در دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

برای بررسی تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های موردمطالعه به روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) روی محیط مولر هینتون آگار (شرکت مرک، آلمان)، طبق پروتوکل CLSI (۱۲) و با استفاده از دیسک‌های: سفتازیدیم (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۱۰ µg)، پی پیراسیلین/تازوباکتام (۱۰/۱۰۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، ایمی‌پنم (۱۰ µg)، سولباکتام/آمپی‌سیلین (۱۰/۱۰ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg)، توبرامایسین (۱۰ µg)، آزترونام (۳۰ µg)، مروپنم (۱۰ µg)، سفپیم (۳۰ µg)، افلوکساسین (۵ µg) و نورفلوکساسین (۱۰ µg) تهیه شده از شرکت Mast انگلستان (Mast, Merseyside, UK) انجام شد.

برای انجام PFGE از پروتکل زیر استفاده شد (۱۳). باکتری‌های اسینتوباکتربومانی جداشده از نمونه‌ها روی محیط مولر هینتون آگار (شرکت مرک، آلمان) کشت داده شدند، در مرحله بعد تعدادی از کلنی‌های تک جداشده در ۲۰۰ میکرولیتر بافر (TE Tris-HCl–EDTA) حل‌شده و سوسپانسیونی تهیه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با ۲۰۰ میکرولیتر melting agarose Low (شرکت اینویتروژن، امریکا) مخلوط و پلاک تهیه گردید.

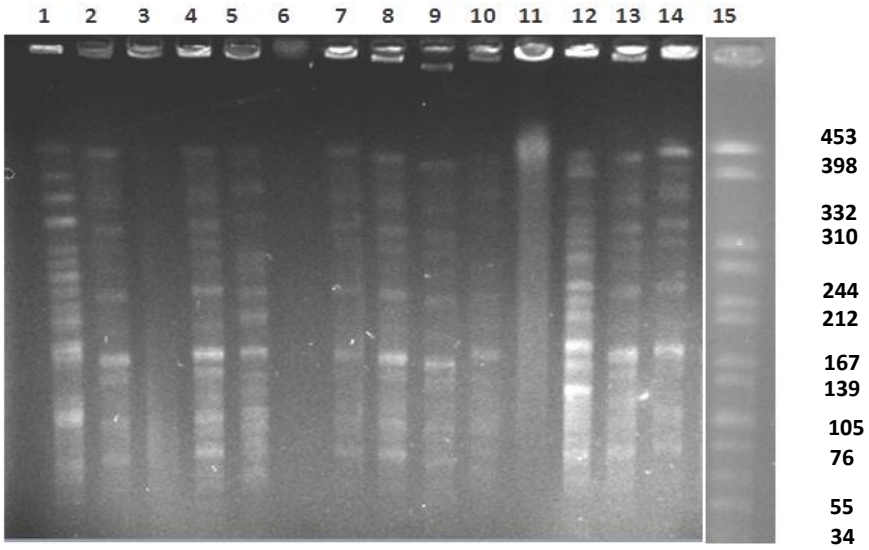
در مرحله بعد به این پلاک‌ها بافر (ES پروتئینار K، سارکوزین، EDTA) (شرکت مرک، آلمان) اضافه شد تا DNA باکتریایی آزاد شود. در مرحله بعد پلاک‌ها ۳ بار با آب و ۲ بار با بافر (TE تریس و EDTA) شسته شدند. سپس واکنش هضم آنزیمی کروموزوم باکتریایی به کمک آنزیم ApaI (شرکت فرمنتاز، آمریکا) و در حجم ۱۰۰ میکرولیتر و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد تا منطقه خاصی از DNA را برش دهد. سرانجام الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ (شرکت مرک، آلمان) در دستگاه CHEF DRII (بیوراد، آمریکا) و با استفاده از بافر (TBE 0.5 X) و برنامه زمان سوئیچ اولیه ۵ ثانیه، زمان سوئیچ نهایی ۱۳ ثانیه و زمان اجرا ۲۰ ساعت در (V /cm2) ۶ انجام شد. سپس، ژل در اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و پس از شستشو در دستگاه Gel Doc(Biotech) مورد بررسی و تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. پروفایل باندهای DNA با کمک نرم‌افزار Gelclust با استفاده از الگوریتم Dice (ماتریس فاصله) آنالیز و بر اساس خوشه‌بندی UPGMA خوشه‌بندی (Clustering) کلون‌ها انجام گردید.

نتایج

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های اسینتوباکتربومانی جداشده برحسب نوع آنتی‌بیوتیک در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تمام ایزوله‌ها دارای مقاومت چندگانه بودند. بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های توبرامایسین (۵۲ درصد)، جنتامایسین (۳۶ درصد) و مروپنم (۳۲ درصد) مشاهده گردید. مقاومت به کارباپنم‌ها (ایمی‌پنم و مروپنم) که یکی از داروهای مهم در درمان عفونت‌های اسینتوباکترهای مقاوم به چند دارو می‌باشند به ترتیب ۷۸ و ۴۴ درصد بوده است. همچنین تمام ایزوله‌ها به سفالوسپورین‌ها (سفتازیدیم و سفیم) مقاوم بودند.

جدول ۱: الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ۵۰ گونه اسینتوباکتر جداشده از بیماران بیمارستان‌های هاجر و کاشانی

الگوی مقاومت نوع آنتی‌بیوتیک	حساس تعداد (درصد)	حد واسط تعداد (درصد)	مقاوم
سفتازیدیم (۳۰ µg)	۰(۰)	۰(۰)	۵۰(۱۰۰)
سیپروفلوکساسین (۱۰ µg)	۴(۸)	۰(۰)	۴۶(۹۲)
پی پیراسیلین/تازوباکتام (۱۰/۱۰۰ µg)	۹(۱۸)	۱۷(۳۴)	۲۴(۴۸)
جنتامایسین (۱۰ µg)	۱۸(۳۶)	۰(۰)	۳۲(۶۴)
ایمی پنم (۱۰ µg)	۵(۱۰)	۶(۱۲)	۳۹(۷۸)
سولباکتام/آمپی‌سیلین (۱۰/۱۰ µg)	۶(۱۲)	۱۶(۲۶)	۳۱(۶۲)
آمیکاسین (۳۰ µg)	۳(۶)	۲(۴)	۴۵(۹۰)
توبرامایسین (۱۰ µg)	۲۶(۵۲)	۱۰(۲۰)	۱۴(۲۸)
آزترونام (۳۰ µg)	۰(۰)	۱(۲)	۴۹(۹۸)
مروپنم (۱۰ µg)	۱۶(۳۲)	۱۲(۲۴)	۲۲(۴۴)
سفپیم (۳۰ µg)	۰(۰)	۰(۰)	۵۰(۱۰۰)
افلوکساسین (۵ µg)	۲(۴)	۲(۴)	۴۶(۹۲)
نورفلوکساسین (۱۰ µg)	۲(۴)	۰(۰)	۴۸(۹۶)

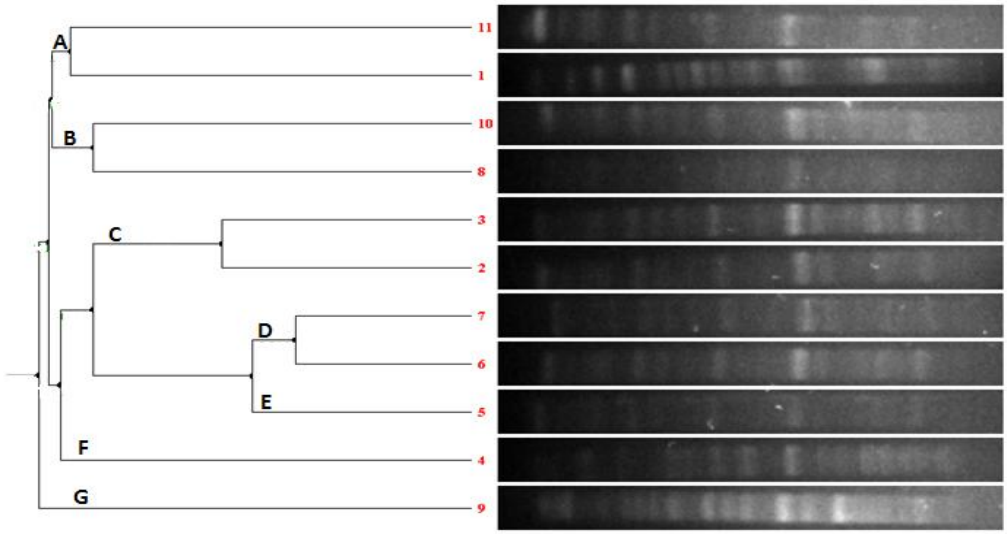


شکل ۱: الگوهای PFGE سویه‌های اسینتو باکتر بومانی ایزوله شده از بیماران برش خورده با آنزیم APa.

ردیف ۱: Strain 1، ردیف ۲: Strain 2، ردیف ۳: بدون نمونه، ردیف ۴: Strain ۳، ردیف ۵: Strain ۴، ردیف ۶: بدون نمونه، ردیف ۷: Strain 5، ردیف ۸: Strain 6، ردیف ۹: Strain 7، ردیف ۱۰: Strain 8، ردیف ۱۱: بدون نمونه، ردیف ۱۲: Strain ۹، ردیف ۱۳: Strain ۱۰، ردیف ۱۴: Strain 11، ردیف ۱۵: DNA باکتری Salmonella enterica serovar Braenderup H9812 برش خورده با آنزیم Xba I به عنوان Ladder (kbp).

پس از انجام PFGE و مشاهده باندها (شکل ۱)، نتایج مورد آنالیز دقیق قرار گرفت و نمودار دندروگرام رسم گردید (نمودار ۱). با توجه به نتایج حاصل از PFGE نمونه‌های اسینتوباکتربومانی جداشده از بیماران بستری در بیمارستان‌های هاجر و کاشانی شهرکرد استنباط می‌شود که ۷ الگوی ژنتیکی متفاوت از این باکتری در بیمارستان‌های مذکور وجود دارد. الگوی ژنتیکی F (strain4) و الگوی ژنتیکی G (strain9) از نمونه‌های اسپورادیک بوده و قرابت ژنتیکی

زیادی با بقیه گروه‌ها نداشتند. الگوی ژنتیکی A (strain1, 11) هر دوسویه فقط در بیمارستان هاجر (بخش‌های اطفال و زنان) دیده شده‌اند و به دلیل اینکه قرابت ژنتیکی این دو سویه بسیار زیاد است احتمالاً منشأ ژنتیکی مشترکی داشته‌اند. الگوی ژنتیکی B (strain8,10) هر دو فقط در بیمارستان هاجر (در بخش‌های اطفال و ICU) دیده شده‌اند و به دلیل قرابت ژنتیکی بسیار شدید با توجه به نمودار می‌توان نتیجه گرفت که این دو احتمالاً منشأ ژنتیکی یکسانی داشته‌اند که با توجه به تعداد بسیار بیشتر بیماران در بخش ICU احتمالاً این باکتری از بخش ICU وارد بخش اطفال شده است. الگوی ژنتیکی C (strain2,3) هر دو سویه فقط در بیمارستان کاشانی (ICU و داخلی) دیده شده و به دلیل اینکه قرابت ژنتیکی این دو سویه بسیار زیاد است احتمالاً منشأ ژنتیکی مشترکی داشته‌اند. الگوی ژنتیکی D (strain6,7) هر دوی این سویه‌ها فقط در بیمارستان هاجر در بخش‌های داخلی و ICU مشاهده شدند. همان‌طور که در نمودار دندروگرام مشاهده می‌گردد، این سویه‌ها قرابت ژنتیکی بسیار بالایی با هم داشته، لذا احتمالاً منشأ ژنتیکی آن‌ها یکسان باشد. الگوی ژنتیکی E (strain5) فقط در بخش‌های اطفال و زنان بیمارستان کاشانی دیده شده است. در رابطه با الگوهای E,D همان‌طور که در نمودار دندروگرام قابل‌مشاهده است قرابت ژنتیکی بالایی بین این دو گروه دیده می‌شود و با توجه به لیست بیماران هر دو این گروه‌ها از بیمارستان هاجر جدا شده‌اند بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود احتمالاً منشأ ژنتیکی مشترک داشته‌اند.



نمودار ۱: گروه‌بندی ایزوله‌های اسینتوباکتربومانی‌های ایزوله شده از بیمارستان‌های مختلف شهر شهرکرد با کمک نرم‌افزار Gelclust و با استفاده از الگوریتم Dice

پس از رسم نمودار دندروگرام، نتایج با باکتری‌های اسینتوباکتربومانی جداشده از بیماران بخش‌های مختلف تطابق داده شد (جدول ۲). از ۵۰ ایزوله اسینتوباکتر از دو بیمارستان هاجر و کاشانی ۷ الگوی ژنتیکی (A-E) شناسایی شد. گروه A شامل ۸ ایزوله از بیمارستان هاجر که ۳ ایزوله از بخش اطفال و ۵ ایزوله از بخش زنان می‌باشند. گروه B با ۱۱ ایزوله و گروه C با ۱۵ ایزوله دارای بیشترین فراوانی می‌باشند. گروه D شامل ۶ ایزوله از بخش داخلی و ICU بیمارستان هاجر جدا شدند. گروه‌های F و G با الگوی ژنتیکی اسپورادیک هر کدام دارای دو ایزوله بودند.

جدول ۲: تطابق الگوهای ژنتیکی حاصل از دندروگرام و شماره بیماران بخش‌های مختلف

الگوی ژنتیکی	شماره بیماران	بیمارستان/ بخش
گروه A(strain 1, 11)	۱۰، ۱۱، ۱۲ (strain 1) ۴۱، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۴۵ و ۴۶	هاجر/ اطفال (strain11) هاجر / زنان
گروه B(strain 8, 10)	۱۳ و ۱۴(strain 8) ۸،۷،۶،۵،۴،۳،۲،۱ و ۹ (strain 10)	هاجر/ اطفال هاجر/ ICU
گروه C (strain 2, 3) ICU	۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۲۶، ۲۷، ۲۸ و ۲۹(strain 2) ۱۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۵، ۳۶ و ۳۷(strain 3)	کاشانی / داخلی و ICU کاشانی / داخلی و
گروه D (strain 6, 7) ICU	۲۰، ۲۱، ۲۲ و ۲۳ (strain 6) ۲۴ و ۲۵ (strain 7)	هاجر / داخلی و ICU هاجر / داخلی و
گروه E(strain 5)	۳۸، ۳۹، ۴۰، ۴۱، ۴۷ و ۴۸(strain 5)	هاجر / اطفال و زنان
گروه F (strain4)	۳۳ و ۳۴ (strain 4)	کاشانی / داخلی
گروه G (strain 9)	۴۹ و ۵۰ (strain 9)	هاجر / اطفال

در رابطه با بحث مقاومت آنتی‌بیوتیکی و انطباق نتایج حاصل از دندروگرام با نتایج آنتی‌بیوگرام نتایج زیر حاصل شد: همه گروه‌های باکتری اسینتوباکتربومانی جداشده از بیمارستان‌های هاجر و کاشانی به سفی‌پیم و سفتازیدیم مقاومت نشان داده‌اند. بیش از ۹۸٪ از گروه‌ها به ازترونام مقاوم بوده‌اند. تمام گروه‌ها به غیر از گروه F نسبت به نورفلوکساسین مقاومت نشان داده‌اند. تمام گروه‌ها به غیر از گروه G نسبت به افلوکساسین مقاومت نشان داده‌اند. حساسیت به سیپروفلوکساسین فقط در گروه A دیده شده و بقیه گروه‌ها مقاوم بوده‌اند. مقاومت به آمپی‌سیلین- سولباکتام فقط در گروه E, G دیده شد. مقاومت به توبرامایسین فقط در گروه‌های B, C دیده شد. مقاومت به مروپنم فقط در گروه B دیده شد.

بحث

اسینتوباکتربومانی یک پاتوژن گرم منفی است که موجب عفونت‌های مجاری ادراری، عفونت‌های زخم، مننژیت، اندوکاردیت، پریتونیت، عفونت پوست و بافت نرم می‌شود. در حال حاضر به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت بیمارستانی مطرح بوده و سویه‌های با مقاومت داروئی چندگانه مشکلات درمانی فراوانی را در درمان بیماران آلوده به این ارگانیسم‌ها ایجاد کرده است (۱۴). الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های پاتوژن بیمارستانی در مناطق مختلف یک کشور با توجه به موقعیت جغرافیایی، منطقه‌ای، سویه باکتری و میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها متفاوت می‌باشد. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که صد در صد ایزوله‌ها اسینتوباکتربومانی دارای مقاومت چندگانه هستند که این میزان بالاتر از یافته‌های به دست آمده از مطالعات مشابه است. این موضوع بیانگر افزایش جدی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های اسینتوباکتربومانی در ایزوله‌های بیمارستان‌های شهرکرد است. به عنوان مثال در یک بررسی در اصفهان ۸۵ درصد نمونه‌ها مقاومت نسبت به چند دارو را نشان دادند (۱۵). همچنین در مطالعه دیگری که توسط Joshi و همکاران در هند و مستوفی و همکاران در ایران انجام شد ۷۵ درصد ایزوله‌های اسینتوباکتربومانی داری مقاومت چندگانه بودند (۱۶،۱۷).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها در مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم (۱۰۰ درصد)، سفپیم (۱۰۰ درصد)، آزترونام (۹۸ درصد)، نورفلوکساسین (۹۶ درصد)، افلوکساسین (۹۲ درصد)، سیپروفلوکساسین (۹۲ درصد) و آمیکاسین (۹۰ درصد) بوده درحالی‌که بیشترین حساسیت به ترتیب در برابر آنتی‌بیوتیک‌های توبرامایسین (۵۲ درصد)، جنتامایسین (۳۶ درصد) و مروپنم (۳۲ درصد) مشاهده گردید. در مطالعه صورت گرفته توسط رهبر و همکاران در تهران روی اسینتوباکتر، ایزوله‌ها به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه شامل سفوتاکسیم (۹۰/۹ درصد)، جنتامایسین (۸۵/۲ درصد)، پیپراسیلین (۹۰/۹ درصد) و آمیکاسین (۸۵/۲ درصد) مقاومت نشان داده‌اند (۱۸). در یک بررسی مشابه در تهران توسط شاهچراغی و همکاران، صد درصد ایزوله‌های اسینتوباکتربومانی به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم و مروپنم و ۹۶ درصد به آزترونام، ۹۵ درصد به پیپراسیلین/ تازوباکتام، ۹۰ درصد به سفپیم و ۸۴ درصد به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (۱۹). دو مطالعه اخیر از نظر مقاومت ایزوله‌های اسینتوباکتر تقریباً مشابه نتایج مطالعه حاضر است که نشان‌دهنده افزایش فراوانی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در نقاط مختلف کشور است. این موضوع زنگ خطر را برای درمان این سویه‌های بسیار مقاوم به‌شدت به صدا در آورده است. همچنین مطالعات انجام شده در دیگر نقاط جهان نشان‌دهنده افزایش رو به رشد سویه‌های مقاوم بیمارستانی حتی در کشورهای توسعه یافته می‌باشند. به عنوان مثال مطالعه انجام شده توسط Dent و همکاران در امریکا میزان مقاومت سویه‌های اسینتوباکتر به ایمی‌پنم ۲۹ درصد و از طرفی ۴۱ درصد ایزوله‌ها به آمینوگلیکوزیدها، سفالوسپورین‌ها و کینولون‌ها مقاوم بوده‌اند (۲۰). در مطالعه انجام شده توسط Andriamanantena و همکاران در ماداگاسکار روی ایزوله‌های اسینتوباکتر، میزان مقاومت به توبرامایسین ۳۳ درصد و آمیکاسین ۵۳ درصد گزارش شده است (۲۱).

PFGE توسط بسیاری از دانشمندان به عنوان استاندارد طلایی برای تایپینگ مولکولی باکتری‌ها مطرح شده است. PFGE یکی از بهترین روش‌هایی است که برای تیپ بندی و مطالعات اپیدمیولوژی در مناطق مختلف کاربرد دارد. این روش با قدرت تکرارپذیری و افتراق بالایی که دارد برای تمام پاتوژن‌های انسانی قابل استفاده است (۲۲). در مطالعه حاضر، بر اساس نتایج به دست آمده از روش PFGE مشخص گردید که هفت الگوی ژنتیکی متفاوت در بیمارستان‌های شهرکرد وجود دارد که میزان مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها در گروه‌های مختلف متفاوت است. بر همین اساس تمام گروه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم و سفتازیدیم مقاوم بودند؛ و بیش از ۹۸ درصد از گروه‌ها به آزترونام مقاوم بوده‌اند. مقاومت به آمپی‌سیلین- سولباکتام فقط در گروه‌های E,G دیده شد و مقاومت به مروپنم فقط در گروه B دیده شد؛ که مشابه نتایج مطالعه انجام شده توسط فراهانی و همکاران در تهران می‌باشد که در آن مطالعه ۷ الگوی ژنتیکی یافت شده بود و همه گروه‌ها به سفپیم و سفتازیدیم مقاوم بودند (۲۳)؛ اما با مطالعه انجام شده توسط انوری‌نژاد و همکاران در شیراز متفاوت است. در مطالعه انوری‌نژاد و همکاران ۴۷ الگوی ژنتیکی به دست آمده که ۹۰ درصد ایزوله‌ها به آزترونام و سفتازیدیم مقاوم بودند (۲۴)؛ و در مطالعه انجام شده توسط Mezzatesta و همکاران در ایتالیا به وسیله روش PFGE چهار الگوی ژنتیکی متفاوت شناسایی شد و همه ایزوله‌ها نسبت به سفتازیدیم و پیپراسیلین مقاوم بودند (۲۵) که متفاوت با نتایج این مطالعه است. آنالیز دندروگرام حاصل از تایپینگ ایزوله‌ها نشان داد که دو گروه B (۱۱ ایزوله از ۵۰ ایزوله) و C (۱۵ ایزوله از ۵۰ ایزوله) دارای بیشترین فراوانی در بین سایر الگوهای ژنتیکی می‌باشند و دارای الگوی ژنتیکی مشابه بوده که خود نشان‌دهنده وجود ارتباط ژنتیکی نزدیک مابین آن‌ها است و شاید یکی از دلایل این ارتباط منشأ جغرافیایی ایزوله‌ها باشد که تماماً از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهرکرد جداسازی شده‌اند؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که الگوهای مسئول در شیوع عفونت در یک بیمارستان با هم قرابت ژنتیکی دارند. در مطالعه انجام شده توسط رضایی و همکاران در تبریز ۶ الگوی ژنتیکی (A-F) شناسایی گردید که

مشابه مطالعه ما گروه B با ۱۹ ایزوله و گروه C با ۱۸ ایزوله دارای بیشترین فراوانی بودند (۲۶).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه در حال حاضر مؤثرترین آنتی‌بیوتیک برای درمان عفونت‌های ناشی از اسینتوباکتربومانی توبرامایسین، مروپنم و جنتامایسین می‌باشند که هنوز میزان مقاومت نسبت به آن‌ها کمتر است. با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، تشخیص سریع و به‌موقع سویه‌های مقاوم به‌منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می‌رسد. بالاتر بودن درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل مصرف وسیع آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها و نیز مصرف بی‌رویه و خودسرانه داروها در جامعه باشد. از طرف دیگر کیفیت دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی و نیز تکنیک‌های مورد استفاده جهت تعیین حساسیت در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی نیز تفاوت نتایج در نواحی جغرافیایی مختلف حتی در درون یک کشور را سبب می‌شوند؛ بنابراین پیشنهاد می‌گردد جهت بررسی ارتباط کلونال انواع سویه‌های اسینتوباکتر نیاز به بررسی دقیق‌تر مولکولی در مناطق مختلف کشور است تا بتوان در خصوص کلون‌های ژنتیکی در حال گردش اسینتوباکتر در سطح کشور اظهار نظر نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان از کلیه افرادی که در طول انجام این تحقیق به ما یاری رسانده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

1- Kong BH, Hanifah YA, Yusof MY, Thong KL. ***Antimicrobial susceptibility profiling and genomic diversity of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolates from a teaching hospital in Malaysia.*** Jpn J Infect Dis 2011; 64(4): 337-40.

2- Yang YS, Lee YT, Wang YC, Chiu CH, Kuo SC, Sun JR, et al. ***Molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible Acinetobacter nosocomial is in a medical center in Taiwan.*** Inf, Gen and Evol 2015; 31: 305-11.

3- Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. ***Acinetobacter baumannii: An emerging opportunistic pathogen.*** Virulence 2012; 3(3): 243-250.

4- Zhao S, Jiang D, Xu P. ***An investigation of drug-resistant Acinetobacter baumannii infections in a comprehensive hospital of East China.*** Ann Clin Microbiol Antimicrob 2015; 14: 7.

5- Laupland KB, Church DL. ***Population-Based Epidemiology and Microbiology of Community-Onset Bloodstream Infections.*** Clin Microbiol Rev 2014; 27(4): 647-664.

6- Tsakiridou E, Makris D, Daniil Z. ***Acinetobacter baumannii Infection in Prior ICU Bed Occupants Is an Independent Risk Factor for Subsequent Cases of Ventilator-Associated Pneumonia.*** BioMed Research International 2014; 193516.

7- Mohajeri P, Farahani A, Feizabadi MM, Norozi B. ***Clonal evolution multi-drug resistant Acinetobacter baumannii by pulsed-field gel electrophoresis.*** Ind J Med Microbiol 2015; 33(1): 87-91.

8- Chopra T, Marchaim D, Awali RA. ***Epidemiology of Bloodstream Infections Caused by Acinetobacter baumannii and Impact of Drug Resistance to both Carbapenems and Ampicillin-Sulbactam on Clinical Outcomes.*** Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(12): 6270-6275.

9- Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. ***Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection.*** Clin Microbiol Rev 2006; 19(3): 512-530.

10- Adzitey F, Huda N, Ali GRR. ***Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks.*** 3 Biotech 2013; 3(2): 97-107.

11- Golab N, Khaki P, Noorbakhsh F. ***Molecular Typing of Salmonella Isolates in Poultry by Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Iran.*** Int J Enteric Pathog 2014; 2(4): e21485.

12- Wayne P. ***Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty first informational supplements Document.*** Clinical and Laboratory Standards Institute 2011; M100-S21. CLSI.

13- Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, et al. ***Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of Acinetobacter baumannii.*** J Clin Microbiol 2005; 43(9): 4328-35.

14- Arivett BA, Fiester SE, Ream DC. ***Draft Genome of the Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii Strain A155 Clinical Isolate.*** Genome Announc 2015; 3(2): e00212-15.

15- Karbasizade V, Heidari L. ***Antimicrobial resistance of Acinetobacter baumannii isolated from Intensive Care Units of Isfahan hospitals.*** J Isfahan Med Sci 2012; 191(30): 759-763.

16- Joshi SG, Litake GM, Niphadkar KB, Ghole VS. ***Multidrug resistant Acinetobacter baumannii isolates from a teaching hospital.*** J Infect Chemother 2003; 9(2): 187-190.

17- Mostofi S, Mirnejad R, Masjedian F. ***Multi-drug resistance in Acinetobacter baumannii strains isolated from clinical specimens from three hospitals in Tehran-Iran.*** Afr J Microbiol Res 2011; 5(21): 3579-583.

18- 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; 53: 290-3.

19- Shahcheraghi F, Abbasalipour M, Feizabadi M, Ebrahimipour G, Akbari N. ***Isolation and genetic characterization of metallo-β-lactamase and carbapenamase producing strains of Acinetobacter baumannii from patients at Tehran hospitals.*** Iran J Microbiol 2011; 3(2): 68-74.

20- Dent LL, Marshall DR, Pratap S. ***Multidrug resistant Acinetobacter baumannii: a descriptive study in a city hospital.*** BMC Infect Dis 2010; 10: 196.

21- Andriamanantena TS, Ratsima E, Rakotonirina HC. ***Dissemination of multidrug resistant Acinetobacter baumannii in various hospitals of Antananarivo Madagascar.*** Ann Clin Microbiol Antimicrob 2010; 30: 9-17.

22- Bae IK, Kim J, Sun JYH. ***Comparison of pulsed-field gel electrophoresis & repetitive sequence-based PCR methods for molecular epidemiological studies of Escherichia coli clinical isolates.*** Indian J Med Res 2014; 140(5): 679-685.

23- Farahani N, Mirnejad R, Ahmadi Z, Amirmozafari N, Masjedian F. ***Molecular Typing of Acinetobacter Baumannii Clinical Strains in Tehran by Pulsed-Field Gel Electrophoresis.*** JFUMS 2013; 2 (4): 259-265.

24- Anvarinejad M, Japoni A, Davarpanah MA, Mahmudi H, Mammina C, Vazin A. ***Phenotypic and Molecular Epidemiology Acinetobacter calcoaceticus baumannii Complex Strains Spread at Nemazee Hospital of Shiraz, Iran.*** Jundishapur J of Microbiol 2015; 8(6): e19180.

25- Mezzatesta ML, D'Andrea MM, Migliavacca R, Giani T, Gona F, Nucleo E, et al. ***Epidemiological characterization and distribution of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates in Italy.*** Clin Microb and Inf 2012; 18 (2): 160-66.

26- Rezaee D, Zarrini G, Ahangarzadeh Rezaee M. ***Antibiotic Susceptibility and Molecular Typing by REP-PCR among Acinetobacter baumannii Isolates.*** J of Ardabil Uni of Med Sci 2014; 14(1): 28-36.

Genotyping and antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients hospitalized in teaching hospitals of Shahrekord by Pulsed- Field Gel Electrophorsis

Abolfazl Gholipur [1], Najmeh Ansari [2], Mohamad Sadegh Damavandi [3], Mohamad Rabiei [4], Reza Mirnezhad [*5]

[1,3,4] Department of Microbiology and Immunology, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

[2] Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

[5] Department of Bacteriology, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 28 Oct 2016 **Accepted:** 16 Feb 2017

Abstract

Introduction: Acinetobacters especially *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in hospitals intensive care units and can cause a variety of hospital infections such as bacteremia, meningitis, pneumonia and urinary tract infections. There are several molecular techniques for microbial genotyping, among them Pulsed- Field Gel Electrophoreses is introduced as the gold standard for sub typing of bacteria. The aim of this study was investigating the molecular typing of *A. baumannii* strains with PFGE as well as the relationship between common types available and their antibiotic resistance.

Methods: In this descriptive - analysis study, 50 *Acinetobacter baumannii* were confirmed with cultivation methods and biochemical tests. Then, bacteria were detected using PFGE typing and the results were compared with the results of antibiotic resistance.

Results: The results showed that all isolates had multiple resistance. The highest sensitivity was observed for tobramycin (52%), gentamicin (36%) and moropenem (32%).The results of this study showed that *A. baumannii* strains isolated from Shahrekord hospitals were in seven different genetic patterns that two of these patterns were sporadic and the genetic patterns were different in each hospital.

Conclusion: Although variations among strains of *Acinetobacter baumannii* were observed by using PFGE in Shahrekord, but no epidemic strain was detected among them. In terms of resistance to commonly used antibiotics were also different patterns.

Keywords: Genotyping, *Acinetobacter baumannii*, Pulsed- Field Gel Electrophorsis

This paper should be cited as:

Gholipur A, Ansari N, Damavandi MS, Rabiei M, Mirnezhad R. **Genotyping and antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients hospitalized in teaching hospitals of Shahrekord by Pulsed- Field Gel Electrophorsis.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(3): 241-51.

***Corresponding author: Tel: +98-21-82482554, email: rmirnejad@bmsu.ac.ir**