



## بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین فراوانی اسینتوباکترهای تولیدکننده

### کارباینامز در نمونه های بیماران با استفاده از آزمون فنوتیپی هوج

پگاه شکیب ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، رشید رمضانزاده ۶، ۷\*

۱. دانشجوی دوره دکترای اپیدمیولوژی باکتری‌ها، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
۲. دانشجوی دوره دکترای اپیدمیولوژی باکتری، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
۳. دانشجوی دوره دکترای اپیدمیولوژی باکتری‌ها، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
۴. کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
۵. دانشجوی دوره پزشکی عمومی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
۶. دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
۷. \*نویسنده مسئول، دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

atrop\_t51@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۴/۰۶/۲۶ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۰۸/۲۳)

**زمینه و هدف:** اسینتوباکترها امروزه به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند کارباینامها مقاوم می‌باشند. یکی از عوامل ایجاد کننده بروز مقاومت به کارباینامها تولید شدن آنزیم کارباینامز توسط این باکتری است. هدف از این پژوهش تعیین میزان فراوانی کارباینامز در اسینتوباکتر و تعیین الگوی مقاومتی آن می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۳۳ ایزوله‌ی اسینتوباکتر از بیمارستان‌های آموزشی شهر سنندج در طی یک دوره ۹ ماهه در سال ۱۳۹۲ جمع آوری شدند. سپس ایزوله‌های اسینتوباکتر با روش‌های بیوشیمیایی مجدداً تعیین هویت و تأیید شدند. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی بوسیله روش انتشار از دیسک انجام گرفت. همچنین با استفاده از آزمون فنوتیپی هوج و طبق دستورالعمل CLSI ایزوله‌های تولید کننده آنزیم کارباینامز شناسایی و جداسازی شدند. از آزمون t-test و نرم افزار SPSS18 جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد ( $p < 0/05$ ).

**یافته‌ها:** بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به سفتریاکسون (۱۰۰ درصد) و سفوتاکسیم (۱۰۰ درصد) بود و ۲۶ (۷۸/۷۸ درصد) ایزوله اسینتوباکتر تولید کننده آنزیم کارباینامز بودند. بر اساس نتایج آماری بین جنس (زن و مرد) و مقاومت آنتی-بیوتیکی ارتباط معنی داری وجود نداشت ( $p > 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** اسینتوباکترهای جداسازی شده از بیماران در مطالعه ما به آنتی‌بیوتیک مقاوم و مولد کارباینامز بودند، بنابراین تعیین برنامه‌های مناسب جهت کنترل و پیشگیری از شیوع اسینتوباکترها با مقاومت دارویی لازم می‌باشد.

**کلید واژه‌ها:** اسینتوباکتر، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کارباینامز، آزمون هوج

#### مقدمه

ها پاتوژن‌های فرصت طلب بوده و از جمله عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی محسوب شده و می‌توانند علت پنومونی، عفونت خون، مننژیت و عفونت‌های ادراری بویژه در بیماران با نقص سیستم ایمنی باشند (۲).

اسینتوباکترها کوکوباسیل‌های گرم منفی، غیر متحرک، هوازی اجباری و غیر تخمیری هستند. این باکتری یک ارگانسیم محیطی است و می‌توان آن را از منابع مختلف آب، خاک و محیط بیمارستان جدا نمود (۱). اسینتوباکتر

امروزه مطالعات نشان داده‌اند که اسینتوباکترها با مکانیسم‌های مختلف آنزیمی و غیر آنزیمی به اکثر آنتی-بیوتیک‌ها مانند فلوروکینولون‌ها، سفالوسپورین‌ها، آمینوگلیکوزیدها و کارباپنم‌ها مقاومت می‌باشند (۳، ۴). از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی که برای درمان عفونت‌های ناشی از اسینتوباکتر به کار می‌رود کارباپنم‌هایی مانند ایمپنم، مروپنم و ارتاپنم می‌باشند. از عوامل ایجاد مقاومت به کارباپنم‌ها می‌توان از کاهش نفوذپذیری غشا به آنتی‌بیوتیک که ناشی از موتاسیون‌های پورین است و پمپ‌های تراوشی در ترکیب با بتالاکتامازها را نام برد. یکی از آنزیم‌های بتالاکتامازی کارباپنمازها می‌باشند که باعث تجزیه کارباپنم‌ها و در نتیجه ایجاد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشند (۵-۸). روش‌های مختلف مولکولی و فنوتیپی جهت جداسازی ایزوله‌های تولید کننده کارباپنماز وجود دارد. با توجه به سهولت و هزینه کم در مراکز بهداشتی و درمانی روش‌های فنوتیپی بیش‌تر مورد استفاده می‌باشد. یکی از روش‌های فنوتیپی تقریباً رایج آزمون فنوتیپی هوج است. مطالعات گذشته نشان داده است که آزمون هوج در شرایطی که روش‌های مولکولی مقدور نیست جهت تشخیص ایزوله‌های تولیدکننده کارباپنماز مناسب می‌باشد (۹-۱۱). با توجه به شیوع بالای اسینتوباکترهای تولید کننده کارباپنماز در نقاط مختلف، تعیین شیوع ایزوله‌های تولید کننده کارباپنماز جهت درمان صحیح عفونت‌های ناشی از این باکتری در این مراکز امری ضروری می‌باشد. هدف از این پژوهش بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین میزان فراوانی اسینتوباکترهای تولیدکننده کارباپنماز با استفاده از آزمون فنوتیپی هوج می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

جمع آوری و شناسایی نمونه‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی در سال ۱۳۹۲ هرچند وقت یکبار نمونه‌گیری از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های منتخب سنج (بعثت و توحید) انجام شد. نمونه‌های مختلف شامل خون، ادرار، زخم و راه هوایی اصلی (تراکنه) بودند. بطور کلی تعداد ۳۳ ایزوله اسینتوباکتر طی مدت نمونه‌گیری جمع-آوری و در بیمارستان جدا سازی شدند. ایزوله‌های

انگلستان) بودند. آزمون هوج: برای جداسازی ایزوله‌های تولید کننده کارباپنماز مطابق با دستورالعمل CLSI آزمون هوج انجام گرفت. ابتدا سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند از ایزوله استاندارد حساس به ایمپنم اش‌ریشیا کلی ATCC 2592 آماده و سپس رقت ۱/۱۰ آن در محیط مولر هینتون برات (Merck، آلمان) تهیه شد. سپس ۱۱ پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار در نظر گرفته شد و سوسپانسیون رقیق شده را بر روی آن بصورت چمنی کشت داده و بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق،



بر روی باکتری اشريشيا کلي ATCC 25922 حساس به دیسک ارتاپنم کشت داده شده است. اشريشيا کلي به ارتاپنم حساس بوده و در اطراف همه دیسک‌ها هاله عدم رشد در اطراف دیسک دیده می‌شود، اما اسینتوباکترهای مقاوم رشد کرده و رشدشان تا نزدیک دیسک ادامه می‌یابد، بنابراین اطراف باکتری حساس اشريشياکلي هاله عدم رشد بصورت برگ شبدری مشاهده می‌شود. از طرفی اسینتوباکترهای حساس رشد نکرده از آنجایی که رشدشان اطراف دیسک متوقف می‌شود هاله برگ شبدری را اطراف باکتری حساس اشريشياکلي نشان نمی‌دهند (شکل ۱). نمونه‌های کارباپنماز مثبت به ترتیب ۲۰ (۶۰/۶۰ درصد) نمونه در مردان و ۶ (۱۸/۱۸ درصد) نمونه در زنان گزارش شدند. همچنین بیش‌ترین مقاومت آنتی-بیوتیکی به سفتریاکسون (۱۰۰ درصد) و سفوتاکسیم (۱۰۰ درصد) و کم‌ترین میزان مقاومت آنتی-بیوتیکی به توبرامایسین (۶۶/۶۶ درصد) مشاهده شد (جدول ۱). نتایج آماری نشان داد که بین جنس و مقاومت آنتی بیوتیکی ارتباط معنی داری وجود نداشت ( $p > 0.05$ ).

یک دیسک ارتاپنم ۱۰ میکروگرمی در وسط پلیت قرار داده شد. بر روی هر پلیت سه ایزوله اسینتوباکتر با سواپ روی محیط مولر هینتون آگار از مرکز به سمت لبه پلیت کشت خطی داده شد به طوری که به دیسک برخورد نکنند. پلیت‌های کشت داده شده بمدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از اتمام مدت انکوباسیون هاله عدم رشد برگ شبدری مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

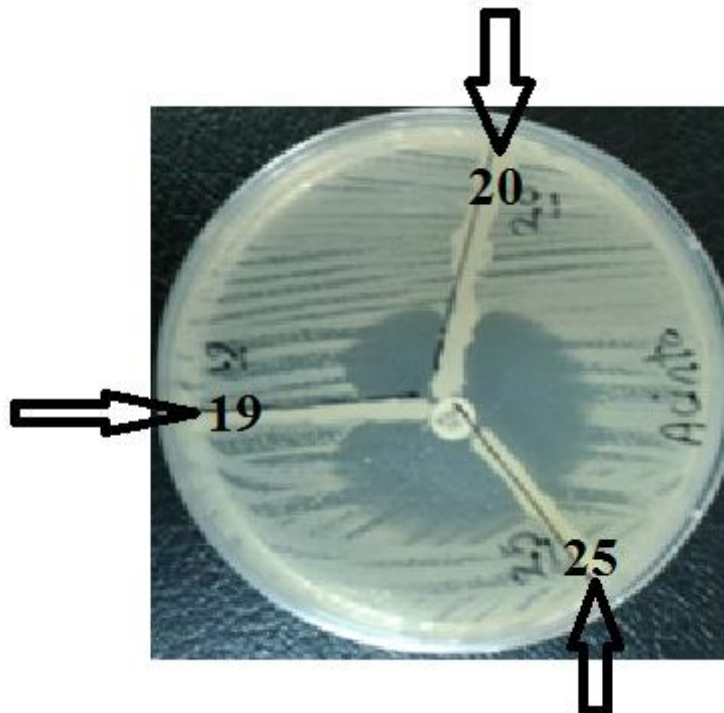
در این پژوهش از آزمون t-test و جدول تعیین فراوانی با استفاده از نرم افزار SPSS18 (SPSS Inc, Chicago, USA II) جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد ( $p < 0.05$ ).

### یافته‌ها

از ۳۳ اسینتوباکتر جمع آوری شده ۲۶ (۷۸/۷۸ درصد) ایزوله، تولید کننده آنزیم کارباپنماز بودند و هاله‌های عدم رشد در اطراف این ایزوله‌ها بصورت برگ شبدری مشاهده شدند. در این آزمون باکتری مورد سنجش (اسینتوباکتر)

جدول ۱: نتایج آنتی‌بیوگرام ایزوله‌های اسینتوباکتر مطالعه شده (۳۳ ایزوله) با روش انتشار از دیسک

آنتی بیوتیک	مقاوم		حساس		نیمه حساس	
	تعداد ایزوله	درصد مقاومت	تعداد ایزوله	درصد حساسیت	تعداد ایزوله	درصد نیمه حساس
سیپروفلوکساسین	۳۱	۹۳/۹۳	۱	۳/۰۳	۱	۳/۰۳
سفتریاکسون	۳۳	۱۰۰	-	-	-	-
سفوتاکسیم	۳۳	۱۰۰	-	-	-	-
سفتازیدیم	۳۲	۹۶/۹۶	۱	۳/۰۳	-	-
توبرامایسین	۲۲	۶۶/۶۶	۸	۲۴/۲۴	۳	۹/۰۹
جنتامایسین	۳۱	-	۲	۶/۰۶	-	-
آمیکاسین	۳۳	۱۰۰	۱	۳/۰۳	۲۹	۸۷/۸۷
ایمی پنم	۲۳	۶۹/۶۹	۶	۱۸/۱۸	۴	۱۲/۱۲
کلیستین	-	-	۳۳	۱۰۰	-	-



شکل ۱: نتایج آزمون هوج، نمونه‌های شماره ۱۹ و ۲۰ کارباینامز مثبت و نمونه شماره ۲۵ کارباینامز منفی

### بحث و نتیجه گیری

وجود مقاومت به انواع آنتی بیوتیک‌ها در اسینتوباکترها سبب بروز عدم موفقیت درمانی و طولانی شدن دوره درمان در انواع عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری می‌شود (۱۴). نتایج مطالعه ما مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های اسینتوباکتر را به انواع آنتی بیوتیک‌ها نشان داده است، همچنین آزمون هوج نشان داد که میزان ایزوله‌های اسینتوباکتر تولید کننده کارباینامز ۷۸/۷۸ درصد بود. در پژوهش فرهنگی و همکاران از ۴۸ ایزوله‌ی اسینتوباکتر بومانی، ۶۲/۷ درصد با مقاومت چند مواجه بودند و بیش‌ترین مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آمیکاسین مشاهده شد. در مطالعه حاضر بیش‌ترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی به سفتریاکسون و سفوتاکسیم بود. مقاومت به چند آنتی بیوتیک یکی از خصوصیات باکتری اسینتوباکتر می‌باشد که در تحقیقات مختلف ثابت شده است، اما تفاوتی که در میزان و نوع مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف در انواع مطالعات وجود دارد می‌تواند از فاکتورهای محیطی و الگوهای مختلف استفاده از عوامل ضد میکروبی منشأ گرفته باشد (۱۵). در مطالعه جعفری و همکارانش ایزوله‌های اسینتوباکتر به حداقل سه گروه از

آنتی بیوتیک‌ها مقاوم بودند و به اصطلاح دارای مقاومت دارویی چندگانه (MDR) Multi Drug Resistant بودند و روش سریال دایلوژن در این مطالعه نشان داد که مقاومت ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی به ایمی پنم، مروپنم و سیپروفلوکساسین به ترتیب ۴۰/۹، ۶۰ و ۷/۷۷ درصد بود. در مطالعه ما مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین (۹۳/۹۳ درصد) و به ایمی پنم (۶۹/۶۹ درصد) بود از مطالعه Jafari بیش‌تر می‌باشد. الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری‌هایی جدا شده از بیماران ممکن است به طور گسترده‌ای از یک کشور به کشور دیگر و یا حتی در مناطق مختلف یک کشور متفاوت باشد (۱۶). در مطالعه حاجی هاشمی و همکاران به روش آزمون فنوتیپی هوج نشان داد که از ۳۶ نمونه کلبسیلا پنومونیه، ۳۰ مورد کارباینامز مثبت بوده و هاله برگ شبدری در اطراف نمونه‌های کشت داده شده مشاهده شد (۹). Balan در هند و کمالی کاخکی در ایران به روش آزمون فنوتیپی هوج بر روی انتروباکتریاسه‌ها نشان دادند که به ترتیب ۲۸ و ۷۲/۵ درصد از ایزوله‌ها کارباینامز مثبت بودند (۱۷ و ۱۸). Cury و همکارانش روش‌های

### تشکر و قدردانی

این مقاله بر گرفته از پایان نامه آقای سامان زمانی، دانشجوی رشته پزشکی عمومی می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان از حمایت معاونت آموزش و تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی کردستان صمیمانه تقدیر و تشکر به عمل می‌آورند.

### تعارض منافع

تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

هوج و PCR<sup>1</sup> را برای بررسی تولید کارباپنماز به کار بردند، در این مطالعه ۱۵۲۱ ایزوله انتروباکتریاسه مورد بررسی قرار گرفتند که ۳۵ درصد ایزوله‌ها در روش هوج و ۳۰ درصد آن‌ها در روش PCR تولید کننده کارباپنماز تشخیص داده شدند، نتایج این مطالعه ویژگی آزمون هوج را ۸۱ درصد گزارش نمود که نشان می‌دهد این روش برای تشخیص سریع تولید کارباپنماز قابل اعتماد می‌باشد (۱۹). اعضای خانواده انتروباکتریاسه به راحتی از طرق مختلف بخصوص آب، غذا و دست‌های آلوده بین انسان و محیط در حال انتقال می‌باشند و به این ترتیب قابلیت کسب عناصر ژنتیکی متحرک مانند پلاسمید و ترانسپوزان که حامل ژن‌های مقاومت می‌باشند را دارند. همچنین ممکن است باکتری دوز غیر کشنده‌ای از دارو را دریافت کرده و تحت فشار انتخابی سازگار و مقاوم شده باشد (۱۸). تولید کارباپنماز مهم‌ترین عامل مقاومت به کارباپنم است و از آنجایی که این ژن‌های تولید کننده این آنزیم بر روی پلاسمید قرار دارد به راحتی میان باکتری‌های گرم منفی در حال انتقال است (۲۲ - ۲۰). کارباپنم‌ها از جمله آنتی بیوتیک‌های مؤثر بر علیه باکتری‌های گرم منفی می‌باشند، اما امروزه مقاومت در مقابل این گروه از آنتی بیوتیک‌ها یک مشکل جدی در حیطه بالینی در سراسر جهان بشمار می‌آید. بنابراین استفاده از آزمون‌های غربالگری ساده گام مهم در نظارت بر ایزوله‌های مقاوم در حال ظهور است (۱۷). با توجه به اینکه آزمون فنوتیپی هوج و همچنین انتشار از دیسک، آزمون‌هایی سریع و کم هزینه برای تشخیص ایزوله‌های مقاوم به آنتی بیوتیک می‌باشند، در بررسی‌های اولیه تعیین و سنجش مقاومت آنتی بیوتیکی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند و انجام این آزمون‌ها به مراکز بهداشتی و درمانی توصیه می‌گردد.

<sup>1</sup> Polymerase Chain Reaction

## References

1. Kesselring J. Multiple sclerosis. Camberidge Univ. Press, UK, 1997.
2. Hooman HA. Multivariate data analysis in scientific research. 2nd ed. Tehran: Peik Farhang. 2006; 379-85. (Persian)
3. Black JM, Hawks JH. Medical-surgical nursing: clinical management for positive outcomes. 8th ed. St. Louis Saunders/Elsevier; 2009.
4. Brunner LS, Smeltzer SC, Bare BG, Hinkle JL. Brunner & Suddarth's textbook of edicalsurgical nursing. 12th ed. Wolters Kluwer Health; 2010.
5. Ghaem H, Haghighi AB. The impact of disability, fatigue and sleep quality on quality of life in multiple sclerosis. Ann Indian Acad Neurol. 2008; 11:236-41.
6. Ferreira-Valente MA, Pais-Ribeiro JL, Jensen MP. Psychometric properties of the portuguese version of the Pain Self-Efficacy Questionnaire. Acta Reumatol Port. 2011;36(3):260-7.
7. Miller A, Dishon S. Health-related quality of life in multiple sclerosis: The impact of disability, gender and employment status. Qual Life Res. 2006; 15:259-71.
8. Ghaffari S, Ahmadi F, Nabavi M, Memarian R. The effect of progressive muscle relaxation on depression, anxiety and stress in patients with multiple sclerosis. Shahid Beheshti Univ J Research Med 2008; 32(1):45-53. (Persian)
9. Potagas C, Mitsonis C, Watier L, Dellatolas G, Retziou A, Mitropoulos PA, et al. Influence of anxiety and reported tressful life events on relapses in multiple sclersis: a prospective study. Int MS J 2008; 14 (9): 1262–1268.
10. Dehgan A, Mohammad Khan S, Memariyan R. Prevalence of stress, anxiety and depression in patients with Multiple sclerosis. Alborz University of Medical Sciences J 2013; 2(2): 82-88. (Persian)
11. Beiske AG, Svensson E, Sandanger I, Czujko B, Pedersen ED, Aarseth J, Myhr K. M. Depression and anxiety amongst multiple sclerosis patients. Eur J Neurol 2008; 15(2): 239-45.
12. Ketelslegers A, Catsman-Berrevoets E, Boon M, Eikelenboom M, Stroink, Neuteboom RF. Fatigue and depression in children with multiple sclerosis and monophasic variants. Eur J Paediatr Neurol 2010; 14(4): 320-5.



## Survey on Antibiotic Resistance Pattern and Prevalence Determination of Carbapenemase-Producing Acinetobacter in Patient Samples, Using Hodge phenotypic Test

*Pegah Shakib*<sup>1,2,3</sup>, *Samaneh Rouhi*<sup>1,2,3</sup>, *Amjad Ahmadi*<sup>4</sup>, *Saman Zamani*<sup>5</sup>, *Rashid Ramazanzadeh*<sup>6,7\*</sup>

1. PhD Student, Student Research committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.
2. PhD Student, Cellular&Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.
3. PhD Student, Department of Microbiology, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.
4. MSc, Department of Microbiology, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.
5. MD Student, Student Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.
6. Associate Professor, Cellular&Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.
7. Associate Professor, Department of Microbiology, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

**Corresponding author:** Rashid Ramazanzadeh, Cellular&Molecular Research Center and Department of Microbiology, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, Tel: +989143104424 (Email: atrop\_t51@yahoo.com)

(Received September 17, 2015 Accepted November 14, 2015)

**Background and Aims:** Nowadays, Acinetobacter is resistant to a wide range of antibiotics. One reason for resistance to carbapenems, is carbapenemase enzyme production by this bacterium. The research aimed to determine the prevalence rate of carbapenemases in Acinetobacter and antibiotic resistance patterns.

**Materials and Methods:** In this cross-sectional study, 33 Acinetobacters were collected during a 9 month period, tertiary Hospitals of Sanandaj in 2013. Then, isolated Acinetobacters were proved and identified using biochemical tests, again. The antibiotic susceptibility test was performed by disk diffusion method. Also using Hodge phenotypic test and according to Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines, carbapenemase enzyme producer isolates were isolated and identified. T-test and SPSS18 software were used for data analysis (p-value <0.05).

**Results:** Highest antibiotic resistance were related to ceftriaxone (100%) and cefotaxime (100%) and 26 Acinetobacters isolates were carbapenemase enzyme producer. Based on the statistical results, there was no significant correlation between sex (male and female) and antibiotic resistance (p-value >0.05).

**Conclusion:** This study revealed that Acinetobacter isolated from patients were antibiotic-resistant and carbapenemase producers. Accordingly, determination of appropriate programs for control and prevention of the Acinetobacter prevalence with antibiotic-resistant is required.

**Keywords:** Acinetobacter, antibiotic resistance, carbapenemase, Hodge test