پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، صفحات ۲۳۲ تا ۲۳۸

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی ژن‌های بتالاکتاماز (bla_{TEM} , bla_{CTX}) مقاوم به دارو و گلوتارالدئید در ایزوله‌های *Acinetobacter baumannii*

مجتبی ساده[۱]، حسین گودرزی*[۲]، گیتا اسلامی[۲]، فاطمه فلاح[۲]، معصومه حلاج زاده[۲]

[۱] دانشجوی دکترای باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، شعبه بین الملل
[۲] گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *با توجه به مصرف زیاد و بی رویه مواد ضد میکروبی و عوارض شناخته شده آن و کسب مقاومت‌های جدید به واسطه آنزیم های بتالاکتاماز و نیز محدود بودن اطلاعات در خصوص مکانیزم ژنی مقاومت به این مواد در کشور ، این تحقیق به منظورتعیین میزان مقاومت و یا حساسیت ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی (MDR) نسبت به گلوتارآلدئید درسال ۱۳۹۲در بخش‌های ویژه بیمارستان-های منتخب تهران انجام گرفت.*

روش بررسی: *تحقیق به روش تجربی در یک دوره ۱۰ ماهه انجام گرفت. تمامی نمونه‌ها از سطوح و تجهیزات پزشکی بخش‌های ویژه بیمارستان‌های فیاض بخش، طالقانی، امام خمینی، ولیعصر، لبافی نژاد جمع آوری و ایزوله‌های اسینتوباکتربومانی بر اساس‌های تست های متعدد بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. سویه‌های مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک‌ها با رعایت دستورالعمل CLSI(2012) شناسایی شدند. مقاومت سویه‌های MDR، نسبت به گلوتارآلدئید ۲٪ بررسی شد. برای تمامی سویه‌های MDR با استفاده از پرایمر های اختصاصی PCR گذاشته شد.*

یافته‌ها: *از ۵۸۸ نمونه جمع آوری شده، ۱۳۱ (۲۲/۳) گونه اسینتوباکتربومانی MDR با ترتیب فراوانی ژن‌های blaCTX (۱۹/۴٪) و blaTEM (۳/۲٪) مشاهده گردید. MIC50% و MIC90٪ آنتی بیوتیک‌های ایمی پنم و مروپنم برابر و به ترتیب ۳۲ µg/mL و ۶۴ µg/mL بود (p<۰/۰۹). الگوی باندی متفاوت درPCR سویه‌های MDR مشخص شد هیچگونه مقاومتی نسبت به گلوتارآلدئید ۲٪ مشاهده نشد.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد که علاوه بر تنوع و شیوع ژن‌های blaTEM و blaCTX مکانیسم‌های متعددی شامل پورین‌ها و سیستم‌های تراوشی (efflux pumps) درایجاد مقاومت‌های اسینتوباکتربومانی نسبت به مواد ضد میکروبی نقش دارند. تحقیقات در مورد بررسی دقیق الگوی مقاومت در این سویه ها و سایر میکروارگانیسم ها توصیه می گردد.*

واژگان کلیدی: *اسینتو باکتربومانی، ژن‌های بتالاکتاماز، دزانفکتانت‌ها، مقاومت دارویی.*

مقدمه

مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسایدها به عنوان مهم‌ترین عامل کد کننده درتکامل و کسب مقاومت جدید باکتری‌ها محسوب می‌شوند (۱). این عوامل اغلب با عناصر ژنتیکی متحرک مانند ترانسپوزن‌ها و انتگرون‌ها و پلاسمیدهای کنژوگاتیو قابل انتقال می باشند (۳،۲). در تحقیقات وسیع نشان داده شد که کسب و ظهور مقاومت‌های PDR، XDR و MDR در بین گونه‌های اسینتوباکتربومانی موجب نگرانی پزشکان می‌باشد و فرایند درمان عفونت را در بخش‌های ویژه بیمارستانی با مشکل روبرو نموده است (۴). در طی سه دهه

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه میکروبیولوژی حسین گودرزی
(**e-mail:** medicalopto@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۴/۱۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۵/۱۳

اخیر گونه‌های اسینتوباکتربومانی به دلیل تولید انواع آنزیم‌هایی که شامل bla_{TEM}، bla_{CTX} و آنزیم NDM – 1 (New – Delhe - metallo – B – Lactamase - 1) (۵) و آنزیم‌های OXA-48 (oxacilinase) و (OXA-181) و SHV, TEM type beta - Lactamase, CTX-M-15 و آنزیم‌های blaoxA-23,24,51,16 SRNA methylase, ESBL, qnr, TEM (bla_{TEM}-1,2,13), bla_{CTX} (oxA-10,2) و شش تیپ ژن NDM_5 ,NDM(1-2-3-4-5-6) و نوع جدیدی از NDM بنام NDM_5 می باشند و شناسایی پلاسمیدهای جدیدی به نام PNDm-1-DOK01 و ۱۹ ژن دیگر که بر روی همین پلاسمید قرار دارند (۶) و همچنین ژن‌های برداشت DNA خارجی از محیط شامل Pil_E , com_E , Pil_Q و تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح خشک و الاستیک از طریق تشکیل exopolysacarides , Pili و ژن‌های مقاوم به دزانفکتانت‌ها به نام‌های quc (A-E) (۷) و پروتئین‌های غشاء خارجی (OMPA) و سیستم کسب آهن با واسطه سیدروفرها و ظهور کلون‌های شایع که دارای ژن مقاوم به مواد ضد میکروبی می‌باشند، اهمیت ویژه‌ای را به خود اختصاص داده‌اند. آخرین مطالعات در کشورمان توسط گودرزی و همکاران در سال ۱۳۹۲ در دپارتمان میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفته است و از طرفی به دلیل محدود بودن اطلاعات در مورد مکانیسم و فراوانی این ژن‌ها و ایجاد زمینه تحقیقات در این مورد ، ما را بر آن داشت تا علاوه بر تحقیق پیرامون وجود ژن‌های bla_{CTX} bla_{TEM} در ایزوله‌های MDR اقدام به تعیین الگوی مقاومت و یا حساسیت ایزوله‌ها نسبت به گلوتارآلدئید ۲٪ بنمائیم.

مواد و روشها

مطالعه حاضربه روش تجربی درطی یک دوره ۱۰ ماهه درسال ۱۳۹۲ انجام گرفت. تمامی ۵۸۸ نمونه جمع‌آوری شده از سطوح و تجهیزات وسایل پزشکی بخش‌های ویژه بیمارستان‌های منتخب تهران که با استفاده از سواپ استاندارد(Swab from suspensinon1/5.10^8cfu/ml) نمونه برداری و توسط محیط ترانسپورت T.S.B (TryPticas Soy broth) شرکت MERCK به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی فرستاده شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. ایزوله‌های اسینتوباکتربومانی با استفاده از تست‌های افتراقی متعدد بیوشیمیایی به شرح جدول ۱ تعیین هویت شدند.

از دیسک‌های ایمی‌پنم µg ۱۰، مروپنم µg ۱۰، لینکومایسین µg ۲، سفتی زوکسیم µg ۳۰، اکساسیلین µg ۱، جنتامایسین µg ۱۰، سپروفلوکساسین µg ۵، سفتازیدیم µg ۳۰، سفوتاکسیم µg ۳۰، سفیکسیم µg ۵، آمپی‌سیلین µg ۱۰، تتراسیکلین µg ۳۰ و کلستین µg ۱۰ مربوط به شرکت Mast GrouP lod.uk انگلستان استفاده شد.

جدول ۱. تست‌های بیو شیمیایی اسینتو باکتر بومانی*

اکسیداز	-	مالئونات	+
کاتالاز	+	آرژنین دهیدرولاز	+
همولیز	-	اورنیتین دکربوکسیلاز	±
TSI	ALK/NC	SIM	-
مکانکی	+	رشد در ۴۴ درجه	+
OF	OXI	سیترات	+
بایل اسکولین	-	ژلاتین	-

*+ رشد، - عدم رشد، ± رشد متغیر

داده‌های حساسیت و یا مقاومت آنتی بیوتیکی‌ها با اندازه گیری قطر رشد و هاله عدم رشد با استفاده از روش Disk diffusion method وبر اساس دستورالعمل(CLSI 2012) انجام گردید (۸). MIC سویه‌های MDR نسبت به آنتی بیوتیک‌های ایمی‌پنم و مروپنم به روش میکرو دایلوشن انجام شد. ژن‌های مسئول بیان بتالاکتامازهای blaTEM و blaCTX درایزوله‌های مقاوم بر حسب حضور بر روی باندهای الکتروفورز شناسایی گردیدند.

جدا سازی و استخراج DNA سویه‌های اسینتوباکتربومانی MDR به روش جوشانیدن انجام شد (۹) . DNA استخراج شده به همراه پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن‌های blaTEM و blaCTX در واکنش PCR مورد استفاده واقع گردید. برای انجام PCR در هر واکنش حجمی برابر ۲۵ میکرولیترکه شامل ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس PCR (شرکت فرمنتاز) با غلظت 10X و سه میکرولیتر از DNA الگو و یک میکرولیتر از پرایمرهای TEM (F&R), CTX (F&R) با غلظت ۱۰ پیکومول می‌باشد مورد نیاز است . توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر ژن های blaTEM و blaCTX درجدول ۲ قابل مشاهده می‌باشد. برنامه PCR جهت تکثیر ژن‌ها در ۳۵ سیکل به شرح جدول ۳ انجام گردید. جهت Setup نمودن تمامی واکنش‌های PCR گرادیان دمایی گذاشته شد و دمای Annelying برای هر دو ژن ۵۴ درجه سانتی گراد تعیین گردید. برا ی اطمینان

از صحت آزمایش و بررسی تکرار پذیری نتایج مراحل PCR برای هر سویه MDR دو بار انجام شد. جهت تعیین توالی ژن‌های TEM و CTX از سایت http:www.lahey.orgs استفاده شد (۱۰).

جدول۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR

پرایمر	توالی نوکلئوتید	نام ژن	طول قطعات
*Bla*CTX	5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3'	CTX-A	550bP
*bla*CTX	5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3'	CTX-B	550bP
*Bla*TEM	5´-GAGTATTCAACATTTCCGTGTC -3´	TEM-A	800bP
*bla*TEM	5´-TAATCAGTGAGGCACCTATCTC -3´	TEM-B	800bP

جدول ۳: شرایط تکثیر ژن های bla_{TEM} , bla_{CTX}

ردیف	مراحل	زمان CTX/ TEM	درجه حرارت اتصال (سانتی گراد) CTX/ TEM
۱	شوک حرارتی اولیه	۵ دقیقه	۹۴/۹۴
۲	واسرشت DNA	۱ دقیقه	۹۴/۹۴
۳	جفت شدن پرایمر	۱ دقیقه	۶۳/۴۵
۴	طویل شدن پرایمر	۱دقیقه	۷۲/۷۲
۵	طویل شدن نهایی	۵ دقیقه	۷۲/۷۲
۶	تعداد سیکل	۳۵	

پس ازاتمام مرحله آمپلیفیکاسیون محصول‌های PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد (invitrogen) Ultrapure^{Tm} Agarose با ولتاژ ۹۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز و جدا سازی شدند. تصاویر باندها پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) و با استفاده از دستگاه Gel Doc شرکت (طوبی نگین) مشاهده و ثبت گردیدند. مارکر به کار رفته در الکتروفورز شامل GeneRuler^{Tm} 100 bp DNA Ladder, ready/TO/Use) شرکت Fermentas بود. آنالیز آماری به کمک نرم افزار SPSS در رابطه بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فرآورده ژن‌های bla_{TEM} و bla_{CTX} با آزمون‌های آماری t-test بررسی گردید.

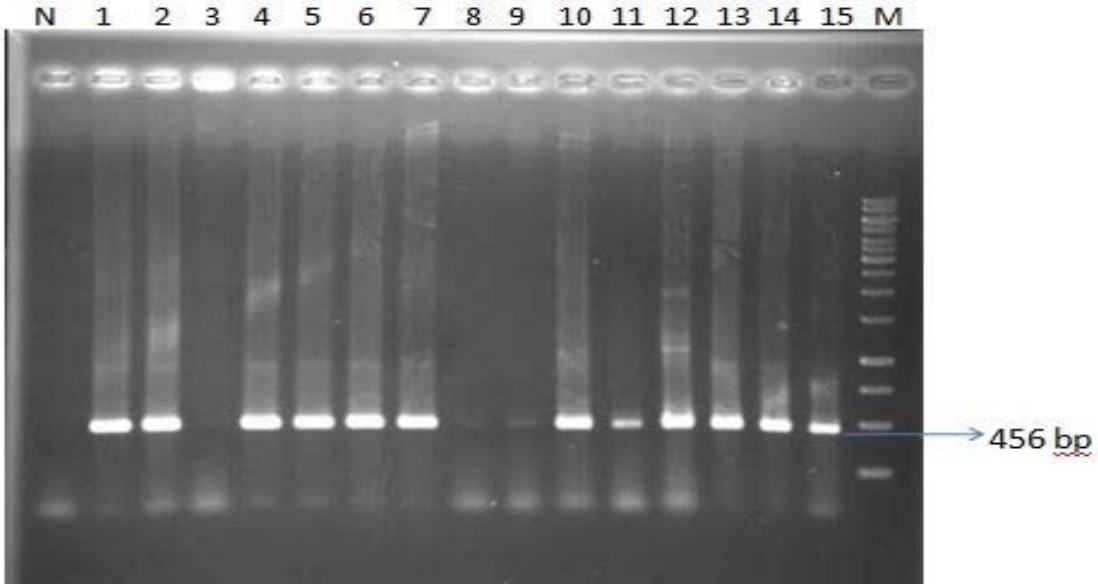
سوسپانسیون میکروبی معادل استاندارد نیم مک فارلند از ایزوله های مقاوم با استفاده از روش Direct colony suspension method (DCS) تهیه شد و سپس با حجمی معادل گلوتارآلدئید ۲٪ (از محلول کنسانتره گلوتارآلدئید neodisher septo 3000 بر اساس استاندارد EC به شماره ی ۶۴ ۸۱ ۲۰۰۴ استفاده شد) مجاور و پس از اتمام زمان مجاورت در زمان های ۵ و ۱۰ و ۱۵ دقیقه بر روی محیط بلاد آگار در دمای ۳۷ درجه و به مدت ۱۸-۱۶ ساعت گرمخانه گذاری شد. رشد یا عدم رشد ایزوله‌های مقاوم پس از گذشت ۱۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از محلول سدیم سولفات (SBS) اقدام به خنثی‌سازی گلوتارآلدئید با غلظت ۲٪ و دستیابی به pH=۱۲ گردید و سوسپانسیون خنثی شده را که دارای غلظت بسیار کم گلوتارآلدئید ۲٪ می‌باشد با اضافه کردن اسیدهای غیرآلی و محلول های خنثی کننده به pH تا حد خنثی رسانیده شد. پس از اضافه کردن PBS و شستشوی سوسپانسیون ، نمونه ها در محیط بلاد آگار در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۸-۱۶ ساعت انکوبه شدند و مجددا رشد یا عدم رشد ایزوله ها مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله حجم مشخصی از سوسپانسیون میکروبی برابر غلظت ۰/۵ مک فارلند در سطوح به ابعاد ۲۵ cm^2 پخش گردید و بلافاصله در همان حجم گلوتارآلدئید ۲٪ اضافه نمودیم و پس از گذشت زمان‌های ۵ و۱۰و۱۵ دقیقه با سواپ استریل نمونه‌برداری و بر روی محیط کشت بلادآگار پاساژ داده شد و به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه و رشد یا عدم رشد ایزوله‌ها دوباره مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

از میان ۵۸۸ مورد نمونه ارسالی به آزمایشگاه، ۱۳۱ (۲۲/۳٪) مورد اسینتوباکتربومانی MDR شناسایی شدند. فراوانی (درصد) سویه‌های MDR در بخش‌های ویژه بیمارستانی به میزان حداقل ۲۱٪ و حداکثر ۲۴٪ بود که بیشترین درصد فراوانی سویه‌های MDR مربوط به بخش ICUII بیمارستان فیاض بخش (۲۳/۸٪) و کمترین فراوانی سویه‌ها مربوط به بخش های ICU و NICU بیمارستان طالقانی (۲۳/۳٪) بود (جدول ۴).

جدول ۴. ترتیب توزیع فراوانی ایزوله‌های اسینتوباکتربومانی در بخش‌های ویژه مراکز درمانی منتخب تهران

بخش	بیمارستان	تعداد نمونه	تعداد ایزوله‌ها	درصد ایزوله‌ها
ICU II	فیاض بخش	۳۳	۶	۲۳/۸
CCU	ولیعصر	۳۴	۶	۲۳/۱
RCU	لبافی نژاد	۴۰	۷	۲۲/۹
NICU	فیاض بخش	۲۳	۴	۲۲/۷
NICU	ولیعصر	۹۴	۱۶	۲۲/۲
ICU	لبافی نژاد	۴۲	۷	۲۱/۸
ICU I	فیاض بخش	۱۱۵	۱۹	۲۱/۸
ICU	مجتمع بیمارستانی امام خمینی	۱۲۸	۲۱	۲۱/۴
NICU	طالقانی	۴۳	۷	۲۱/۳
ICU	طالقانی	۴۳	۷	۲۱/۳
جمع	-----	۵۸۸	۱۰۰	------



شکل ۱. نتایج الکتروفورز ژن blaCTX سویه‌های اسینتوباکتربامانی جداشده از سطوح وتجهیزات مراکز درمانی منتخب تهران N : تعداد DNA الگو، M: سایز مارکر 1 kb ladder

میزان مقاومت به ایمی‌پنم و مروپنم و لینکومایسین ۱۰۰٪ ومقاومت نسبت به اکسی‌سلین ۹۰٪، جنتامایسین ۸۵/۹۷ ٪ و سیپروفلوکساسین ۷۰/۲٪ بود (جدول ۵).

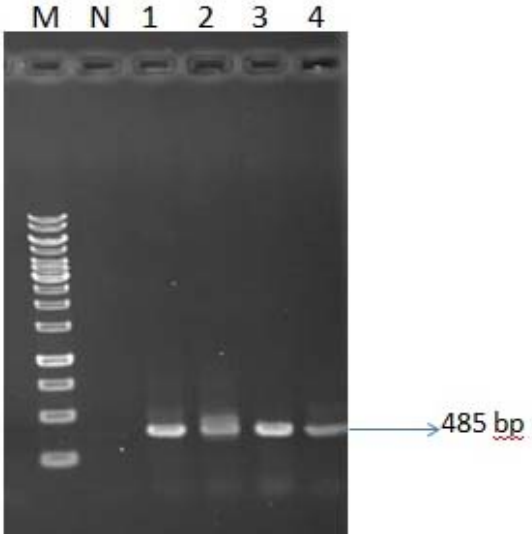
جدول ۵. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به ایزوله های اسینتوباکتربومانی جدا شده از سطوح و تجهیزات پزشکی منتخب تهران

آنتی بیوتیک	درصد مقاومت(٪)
ایمی‌پنم۱۰ میکرو گرم	۱۰۰
مرو پنم ۱۰ میکرو گرم	۱۰۰
لینکومایسین۲ میکرو گرم	۱۰۰
سفتازیدیم۳۰ میکرو گرم	۹۹
سپروفلوکساسین۵ میکرو گرم	۹۸
اکساسیلین۱ میکرو گرم	۹۰
سفتی زوکسیم۳۰ میکرو گرم	۹۰
جنتامایسین۱۰ میکرو گرم	۸۵/۹۷
تتراسیکلین۳۰ میکرو گرم	۷۰/۲
آمپی‌سیلین۱۰ میکرو گرم	۷۰/۲
سفوتاکسیم۳۰ میکرو گرم	۶۹/۴/
سفیکسیم۵ میکرو گرم	۶۹/۴

نتایج MIC نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم و مروپنم (۱۱) به میزان MIC ≥64 µg /ml بود. با احتساب ضریب انحراف معیار رقت MIC برای هر دو آنتی بیوتیک برابر MIC50٪= ۳۲ (µg/mL) و MIC90٪=۶۴ (µg/mL) بود (p<۰/۰۹). جدول ۶ نتایج تکثیر ژن blaCTX و blaTEM را نشان می‌دهد.

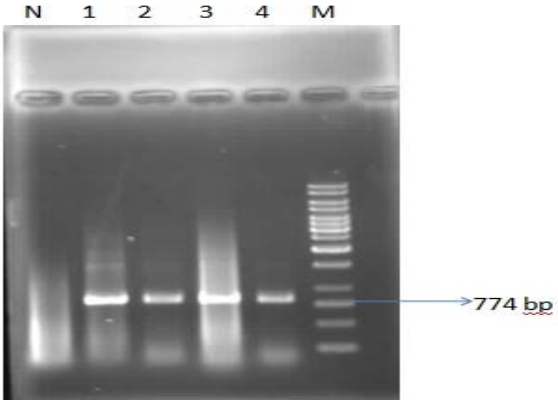
جدول ۶- نتایج MIC

آنتی بیوتیک	اسینتوباکتربومانی		
	MIC50 (µg/mL)	MIC90 (µg/mL)	MIC range (µg/mL)
ایمی پنم	۳۲	۶۴	۴-۱۲۸
مروپنم	۳۲	۶۴	۴-۱۲۸



شکل ۲. نتایج الکتروفورز ژن blaCTX ، M: سایز مارکر 1 kb ladder، N : تعداد DNA الگو

تکثیر قطعات مربوط به ژن‌های blaTEM و blaCTX باروش PCR تائید گردید. شکل ۱ و ۲ نتایج محصول PCR را بعد از انجام الکتروفورز نشان می‌دهد. در این شکل وجود باندهای ۴۵۶ و ۴۸۵ جفت بازی نشان دهنده ژن‌های blaCTX جهت شناسایی سویه‌های MDR اسینتوباکتربومانی می‌باشد. در شکل ۳ وجود باندهای ۷۷۴ جفت بازی نشان دهنده ژن blaTEM در سویه‌های MDR اسینتوباکتربومانی می‌باشد.



شکل ۳. نتایج الکتروفورز ژن blaTEM N : تعداد DNA الگو، M: سایز مارکر 1 kb ladder

با توجه به اثر بخشی محلول دزانفکتانت گلوتارآلدئید ۲٪ بر روی رقت و تراکم تقریبی باکتری اسینتوباکتربومانی و رعایت زمان‌های مجاورت به مدت ۱۰ و ۱۵ دقیقه هیچ گونه رشدی از سویه‌های MDR مشاهده نگردید و درمجاورت کمتر از زمان پیشنهادی (۵ دقیقه) تمام سویه‌های مقاوم رشد نمودند.

بحث

مقاومت چند دارویی در اسینتوباکتر بومانی، علت اصلی شکست درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از آن به شمار می‌آید و به دلیل مقاومت ذاتی و پذیرش عناصرژنتیکی حامل ژن‌های مقاومت و همچنین کسب ژن‌های مقاومت آنزیمی و غیرآنزیمی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها و بیوسایدها و با ایجاد مکانیسم‌های PDR، XDR و MDR موجب نگرانی درمان بیماری‌های عفونی در سراسر جهان شده است. از طرفی چون مقاومت‌های دیگر شامل پورین‌ها و سیستم‌های (effluxpumps) (۱۲) و بیان کاهش یافته پروتئین‌های غشاء خارجی و موتاسیون در توپوایزومرازها و افزایش بیان پمپ‌های تراوشی فعال از نوع RND(resistance – nodulation celldivision) و نوع Multidrug and Toxic compound Extrusion (MATE) (۱۳) در گونه‌های Acientobacter bumanii از اهم مکانیسم‌های مقاومتی می‌باشند دارای اهمیت ویژه ای هستند. به طوری که گزارشات قبلی تحقیق ازسراسر جهان حاکی از وجود ۳۰٪ تا ۸۳/۹٪ اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو می‌باشد (۱۴) و برخی از گزارشات تا ۵۹٪ نیز ذکر شده است که مویدمطالب فوق می‌باشد (۱۵).

از طرفی Ferreira و همکاران درسال ۲۰۱۱ دریافتند که ۶۸٪ ایزوله‌ها در برزیل مقاوم به چند دارو (۱۶) و ۷۹٪ به کارباپنم‌ها مقاوم می‌باشند. در یونان در سال ۲۰۱۲ میزان MDR ۸۳/۹٪ گزارش شده است (۱۷). پیمانی و همکاران در ۲۰۱۲ در تبریز دریافتند که ۸۰٪ ایزوله‌ها مقاوم به چند دارو می‌باشند (۱۸). در مطالعه گودرزی و همکاران در سال ۱۳۹۲ در شهر تهران، ۸۳٪ ایزوله‌های اسینتوباکتربومانی مقاوم به دارو و ۴۴/۸٪ به صورت XDR بودند (۱۹) . در مطالعه حاضر ۸۷/۳٪ از ایزوله‌ها مقاوم به چند دارو بودند که با یافته‌های فوق مطابقت دارد. در مطالعه گودرزی ، مقاومت به کارباپنم‌ها ۹۲٪ بود که در این مطالعه ۱۰۰٪ گزارش گردید که نسبت به مطالعات محققین دیگر مقاومت بالاتری نسبت به کارباپنم-ها گزارش می‌گردد . همچنین در مطالعه وحدانی و همکاران اسینتوباکتربومانی نسبت به مروپنم ۹۹٪ و سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین ۹۸٪ و سفیپم ۹۰٪ مقاومت مشاهده شد که با نتایج این مطالعه اختلاف قابل ملاحظه‌ای وجود ندارد (۲۰). در مطالعه حاضر همانند مطالعه فیض آبادی (۲۱) در ایران و بر خلاف مطالعه Hujer و همکاران در سال ۲۰۰۶ که در آمریکا انجام داده بودند، میزان مقاومت به مروپنم و ایمی پنم بالای ۹۰٪ بود (۲۲). از طرفی نتایج این مطالعه نشان داد که توزیع فراوانی گونه‌های مقاوم اسینتوباکتربومانی دربخش‌های ویژه مناطق مختلف دنیا متفاوت می‌باشد. به طوری که Merick و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ترکیه به میزان ۲۶/۸٪ (۲۳) و در هند ۴۳٪ (۲۴) و شریفی و همکاران در بیمارستان‌های قزوین به ترتیب شهید رجایی ۵/۹۳٪ و قدس ۴/۰۴٪ و کوثر ۱/۰۸ ٪ و بوعلی ۳/۳٪ از گونه‌های مقاوم در بخش‌های ویژه از تجهیزات و وسایل پزشکی جدا نمودند (۲۵). در این مطالعه به میزان ۲۲/۲۸٪ جدا گردید که با مطالعات دیگران همخوانی دارد و دلیل بالا بودن این درصد در کشورمان مربوط به استفاده‌ی بی رویه و خودسرانه از مواد ضدمیکروبی در بخش‌های ویژه می‌باشد. به طوری که طی پژوهشی در سال ۲۰۰۷ در هندوستان ۲۸٪ نمونه‌های

جداشده از تجهیزات پزشکی دارای ژن‌های bla_{CTX} و bla_{TEM} بودند (۲۶) . در مطالعه Hujer، ۴۰٪ از نمونه‌ها حاوی ژن bla_{CTX} و ۱۲/۸٪ حاوی ژن bla_{TEM} بودند (۲۷) . در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۹ توسط Jin Hui و همکاران در چین انجام شد، میزان درصد نمونه‌های TEM ۲۶/۲٪ گزارش گردید(۲۸) . در مطالعه شاه چراغی و همکاران در سال ۱۳۸۸ میزان CTX و TEM به ترتیب ۱۲/۸٪ و ۱/۲٪ بود (۲۹). در حالی که در مطالعه حاضر CTX مثبت ۱۹/۴٪ و TEM مثبت ۳/۲٪ می باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که علاوه بر تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز و وجود سیستم‌های efflux pump و پورین‌ها، سایر مکانیسم‌های مقاومتی نسبت به دزانفکتانت‌ها دخیل می‌باشند. از طرفی پمپ‌های افلاکس چندداروی (Multidrug Efflux pumps) به خاطر تنوع وسیع سوبسترایی، اثرات ناشی از افزایش بیان آنها و وفور پمپ‌های افلاکس که باعث دفع و تراوش طیف گسترده ای از مواد شامل آنتی بیوتیک ها، ترکیبات آنتی سپتیک، رنگ‌ها و دترجنت‌ها و دزانفکتانت‌ها می‌گردند، نقش مهمی در پدیدار شدن سویه های مقاوم به چند دارو را دارند. یافتن داروهای جدید علیه این اهداف نوین درمانی اهمیت ویژه‌ای دارد. از طرفی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که گلوتارآلدئید ۲٪ به عنوان یک دزانفکتانت غالب و استریل کننده خصوصا برای گندزدایی سطوح و تجهیزات پزشکی بخش‌های ویژه با فعالیت ضدمیکروبی بالا با مکانیسم‌های متعدد مانند پیوستگی با آمین‌های غیر پروتئینه در سطح سلول باکتری، آلکیله کردن گروه‌های سولفیدریل، هیدروکسیل، کربوکسیل و آمین در میکروارگانیسم‌ها و کراس لینک شدن با گروه‌های آلفا آمینو، اسید آمینه لیزین و دیگر اسیدهای آمینه و جلوگیری از عمل انتقال و فعالیت دهیدروژناز و آنزیم‌های پری پلاسمیک به عنوان یک دزانفکتانت موثر مطرح می‌باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که وجود ژن‌های bla_{CTX} و bla_{TEM} با شیوع و تنوع مختلفی که از ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی جدا شده‌اند بسیار قابل توجه می‌باشند و از طرفی الگوهای مسئول در شیوع عفونت در مراکز درمانی با هم قرابت و منشاء مشترک ژنتیکی دارند که می‌توانند نقش مهمی در طغیان‌های متعددی از اسینتوباکتر بومانی در مراکز درمانی با تایپ‌های متعددی داشته باشند. لذا شناسایی این ژن‌ها در این گونه مطالعات از اهمیت بالایی برخوردار است. استناد به نتایج این مطالعه و با تدابیر طراحی برنامه‌های حفاظتی نظیر کنترل عفونت‌های ایجاد شده ومدیریت صحیح مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسایدها و رعایت استانداردهای بهداشتی به منظور جلوگیری از گسترش مقاومت به دیگر بیماران بستری و وسایل و تجهیزات پزشکی و در نهایت شناسایی سریع و ردیابی سویه‌های مولد آنزیم‌های مقاومت نسبت به مواد ضدمیکروبی بتوان به بررسی دقیق الگوی مقاومت فنوتیپی و ژنوتیپی این گونه و سایر میکروارگانیسم ها در نقاط مختلف جهان منجمله ایران پرداخت و این امر مطالعات گسترده محققین را می‌طلبد.

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه همکاران آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشکده پزشکی و مسئولین محترم بخش‌های ویژه بیمارستان‌های امام خمینی، ولی عصر، لبافی‌نژاد، فیاض بخش و طالقانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Lacey RW. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and streptococci. British Medcine Bulletin 1984; 40: 77-83.
2. Issa NC. Staphylococcal toxic shock syndrome. J Postgrad Med 2001; 110: 55-62.
3. Sabath LD, Laverddiere M, Wheeler N, Blazevic D, Wilkinson B. A new type of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. Lancet 1977;443-47.
4. Tseng SH, Lee CM, Lin TY, Chang SC, Chang FY. Emergence and spread of multi-drug resistant organisms: think globally and act locally. J Microbial Immunol Infect 2011;44:157-65.
5. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis 2011;17:1791-98.
6. Chen Y, Cui Y, Pu F, Jiang G, Zhao X, Yuan Y, Zhao W, et al. Draft genome sequence of an Acinetobacter genomic species. 3 strain harboring a bla(NDM-1) gene. J Bacteriol 2012;194:204-205.
7. Johnston LH, Dyke GH. Ethidium bromide resistance, a new marker on the staphylococcal penicillinase plasmid. J Bacteriol 1969; 100: 1413-14.
8. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in gram-negative bacteria pathogens. Int J Med Microbiol 2010;300:371-79.

9. Pitout JDD, Thomson K, Hanson N, Ehrhardt A, Moland E, Sander C. β-lactamase responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. Antimicrob Agents Chemother1998; 42:1350-1654.

10. Song JS, Lee JH, Jeong BC, Lee WK, Lee SH. Removal of contaminating TEM-la B-lactamase gene from commercial Taq DNA polymerase. J Microbiol 2006;44:126-28.

11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2nd approved standard M7-T2, tentative standard. M7-T2.NCCLS,Villanova; 1990.

12. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 2006;43: 2:49-56.

13. Piddock JV, Johnson MM. Accumulation of 10 Fluoroquinolones by wild-type of efflux mutant *Streptococcus pneumonia*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 813-20.

14. Kwmpf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in Acinetobacter baumanii in Europe: clinical impact and therapeutic options. Int J Antimicrob Agents 2012; 39:105-14.

15. Prata-Rocha ML, Gontijo-Filho PP, Melo GB. Factors influencing survival in patients with multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infection. Braz J Infect Dis 2012;16:237-41.

16. Ferreira AE, Marchetti DP, Cunha GR, Oliveira LM, Fuentefria DB, Dall Bello AG, et al. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of Acinetobacter sp. From hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2011;44:725-30.

17. Maraki S, Mavros MN, Kofteridis DP, Samonis G, Falagas ME. Epidemiology and antimicrobial sensitivities of 536 multi-drug-resistant gram-negative bacilli isolated from patients treated on surgical wards. Surg Infect (Larchmt) 2012;13:326-31.

18. Peymani A, Farajnia S, Nahaei MR, Sohrabi N, Abbasi L, Ansarin K, et al. Prevelance of class 1 integron among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, North West of Iran. Pol J Microbal 2012;61:57-60.

19. Goudarzi H, Douragh M , Dabiri H, ghalavand Z. study gene expression and function of efflux pumps in multidrug-resistant isolates Journal of Medicine Shaheed Beheshti University of Medical Sciences 2013: 37(2):107-112.

20. Vahdani M, Azimi L, Asghari B, Bazmi F, RastegarLari A. Phenotypic screening of extendedspectrum ß-lactamase and metallo-ß-lactamase in multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa from infected burns. Ann Burns Fire Disasters 2012;25(2):78- 81.

21. Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, Rasoolinejad M, Sadeghifard N, Aligholi M, et al. Antimicrobal Susceptibility patterns and distribution of blaOXA genes among Acinetobater spp. Isolated from patients at Tehran hospitals. Jpn J Infect Dis 2008;61:274-278.

22. Hujer K , Hujer A , Hulten E, Bajaksouzian S , Adams J, Donskey C, et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug- resistant Acinetobacter sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed army medical center. Antimicrob Agents Chemother 2006, 50, No. 12, p. 4114–4123.

23. Meric M, Willke A, Tokerk CC. Intensive care unit – acquired infection: incidence, risk factors and associated mortality in a Turkish university hospital. JPN J Infect Dis 2005; 58:297-302.

24. Proshonth K, Badrinoth S. Epidemiological investigation of nosocomial Acinetobacter infections using orbitrarity primed PCR and pulse field gel electrophoresis. Indian J Med Res 2005; 122:408-18.

25. Khosrishahi N, Sharifi M. Isolation of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) strains from patients and equipments of Intensive care units (ICUs) at Qazvin between 2005 and 2006. Iranian J Med Microbiology 2007; 1: 33-38.

26.Sinha MH, Srinivasa RM. Antibiotic resistance profile ND extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in Acinetobacter species. Indian J Med Res 2007; 126: 63-67

27. Hujer K , Hujer A , Hulten E, Bajaksouzian S , Adams J, Donskey C, et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug- resistant Acinetobacter sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 4114-23.

28. Hui J, Xiao-min XU, Zu-huang MI, Yi M, Pei L. Drug-resistant gene based genotyping for *Acinetobacter baumannii* in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial settings. Chinese Medl J 2009;122:301-306.

29. Shahcheraghi F, Abbasalipour M, Feizabadi MM, Ebrahimipour GH, 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;3:68-74.