Original Article

تایپینگ مولکولی سویه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* در شهر تهران با روش پالس فیلد ژل الکتروفورزیس

ندا فراهانی[۱]، رضا میرنژاد[۲]*، زینب احمدی[۲]، نور امیر مظفری[۳]، فرامرز مسجدیان[۴]

۱- گروه زیست شناسی، واحد علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران.
۳- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۴- گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۶/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۰۹/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: امروزه، *اسینتوباکتر بومانی* (*Acinetobacter baumannii*) به عنوان یک عامل مهم عفونت بیمارستانی در نظر گرفته می‌شود، چراکه اپیدمی‌های بیمارستانی ناشی از آن در نقاط مختلف گزارش شده است. از آنجایی که شناسایی مولکولی در حد سویه و گونه برای تعیین شیوع بیمارستانی از اهمیت بسیاری برخوردار است، این مطالعه با هدف تایپینگ مولکولی سویه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* در شهر تهران به روش پالس فیلد ژل الکتروفورزیس (PFGE) به عنوان مهم‌ترین روش تایپینگ گونه‌های باکتریایی انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در این بررسی، ۷۰ نمونه *اسینتوباکتر* از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های میلاد، بقیه ا... (عج) و رسول اکرم (ص) تهیه و در آزمایشگاه با استفاده از روش‌های کشت و بیوشیمیایی تا حد گونه شناسائی شدند. سپس بعد از تعیین الگوی مقاومت داروئی به روش دیسک دیفیوژن، با استفاده از آنزیم Apa1 ، ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* با روش PFGE مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت نتایج حاصل از PFGE مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بیمارستان‌های شهر تهران، شامل ۷ الگوی ژنتیکی مختلف هستند که ۲ تا از این الگوها، اسپورادیک می‌باشند. هم چنین الگوهای ژنوتیپی در هر بیمارستان با یکدیگر متفاوت بوده و از نظر مقاومت ژنتیکی به آنتی بیوتیک‌های رایج نیز با یکدیگر اختلاف داشتند.

نتیجه گیری: با استفاده از روش PFGE، هرچند تنوع در میان سویه های *اسینتوباکتر بومانی* در شهر تهران مشاهده شد، ولی هیچ سویه اپیدمیکی در میان آنها مشاهده نگردید.

کلمات کلیدی: PFGE، *اسینتوباکتر بومانی*، ژنوتایپینگ

مقدمه

اسینتوباکتر بومانی[۱] کوکوباسیل گرم منفی، اکسیداز منفی، غیر متحرک و هوازی اجباری می‌باشد که در طبیعت انتشار وسیعی داشته و می‌تواند از آب، خاک، پوست انسان، غذا و فاضلاب جدا شود. نیاز کم این باکتری به مواد غذایی و توانایی آن در استفاده از منابع مختلف کربن، موجب افزایش فراوانی آن در قسمت‌های مختلف بیمارستان‌ها و محیط اطراف شده است (۱،۲). این باکتری‌ها به عنوان یکی از پاتوژن‌های مشکل ساز در بخش مراقبت‌های ویژه در سرتاسر جهان به شمار می‌روند که به علت خاصیت کلینیکی قابل توجه آن به ویژه طی سال‌های اخیر و توانائی آن در کسب مقاومت دارویی، به عنوان یکی از میکروارگانیسم‌های تهدید کننده نسبت به درمان با داروهای ضد میکروبی در نظر گرفته می‌شود (۵-۳). این باکتری‌ها عامل عفونت‌های مختلف بیمارستانی نظیر باکتریمی، عفونت مجاری ادراری و مننژیت ثانویه می‌باشند، ولی نقش برجسته آن‌ها ایجاد پنومونی بیمارستانی به ویژه پنومونی ایجاد شده در دستگاه تنفسی فوقانی بیماران بستری شده در بخش‌های مراقبت ویژه می‌باشد(۵). سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به اکثر آنتی بیوتیک‌هایی که تاکنون گزارش شده‌اند، مقاومت نشان داده‌اند (۷،۶). عاملی که باعث تقویت این سیستم مقاومتی می‌شود، توانائی ذاتی غیر عادی *اسینتوباکتر بومانی* در بقای طولانی مدت در تمام محیط‌های بیمارستانی می‌باشد که همین امر، سبب گسترش بیمارستانی این باکتری شده است (۹،۸). به همین دلیل جهت کنترل گسترش *اسینتوباکتر* در بیمارستان‌ها، مشخص کردن مخزن ارگانیسم و طریقه انتقال آن امری ضروری به نظر می‌رسد (۱۰).

در گذشته از ویژگی‌های فنوتیپی مانند بیوتیپ، سروتیپ، باکتریوفاژ یا باکتریوسین تیپ و پروفایل حساسیت به آنتی بیوتیک جهت تایپینگ میکروب‌ها استفاده می‌شد، ولی امروزه روش‌های تایپینگ مولکولی بسیار کارآمدتر از روش های قبلی می باشند. تکنیک‌های مولکولی که برای تایپینگ میکروب‌ها بکار می‌روند عبارتند از: PFGE[۲]، روش‌های متکی

* **نویسنده مسئول: دکتر رضا میرنژاد**، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران. تلفن : ۰۲۱-۸۸۰۳۹۸۸۳
Email: rmirnejad@yahoo.com

1- *Acinetobacter baumannii*
2- Pulsed-field Gel Electrophoresis

بر برش آنزیمی، آنالیز پلاسمیدها و روش‌های تیپ بندی براساس PCR (۱۱). در این بین، تکنیک PFGE به عنوان روش استاندارد طلائی برای تعیین بسیاری از گونه‌های باکتریایی به‌خصوص *اسینتوباکتر بومانی* محسوب می‌شود (۱۱،۹). اگرچه این روش بسیار پر زحمت است، ولی تجهیزات مورد نیاز آن در حال حاضر نه تنها در آزمایشگاه‌های مرجع یافت می‌شود بلکه در برخی از آزمایشگاه‌های پیشرفته بیمارستان‌ها هم قابل مشاهده است (۱۲). به طور معمول از آنزیم‌های محدوالاثر ApaI و یا SmaI برای برش DNA کروموزومی مورد استفاده قرار می‌گیرد. سپس قطعات کروموزومی ایجاد شده توسط الکتروفورز از یکدیگر جدا می‌شوند و نمودارهای انگشت نگاری شده به صورت چشمی و یا با استفاده از برنامه‌های کامپیوتری مورد مقایسه قرار می‌گیرند (۱۲). با توجه به اینکه این تکنیک در تهران در خصوص اسینتوباکترهای ایزوله شده از بیماران انجام نشده است، این مطالعه با هدف تعیین تیپ‌های مولکولی *اسینتوباکتر بومانی* ایزوله شده از بیماران در شهر تهران به روش PFGE طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

ایزوله‌های باکتریایی: در مجموع، ۵۰۰ نمونه خون، ترشحات تنفسی، ادرار، زخم پوست، تراشه، دهان بیماران بستری در بیمارستان های امام خمینی، بقیه ا...(عج) و میلاد تهران- ایران در طی سال‌های ۲۰۱۱-۲۰۱۰ جمع آوری شد. در این میان، ۵۰ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* از ۱۹ کشت خون، ۱۵ نمونه از تراشه، ۶ نمونه از سوآب های زخم، ۴ نمونه از ادرار و ۵ نمونه منشا نامعلوم داشتند. تمامی این ایزوله‌ها توسط روش‌های متداول بیوشیمیایی و میکروسکوپی شناسایی شدند (جدول شماره ۱). ایزوله‌ها در ۸۰- درجه سلسیوس در نوترینت براث که حاوی ۵۰٪ گلیسرول بود تا زمان انجام کارهای مولکولی نگهداری شدند.

پروفایل آنتی بیوتیکی: حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هینتون اگار با توجه به دستورالعمل‌های CLSI انجام شد (۱۳). به‌طور خلاصه، جهت انجام آزمایش از کلنی های باکتری، با لوله ۵/. مک فارلند سوسپانسیون تهیه شده و پس از آغشته کردن سواپ استریل با سوسپانسیون، به‌خوبی بر روی محیط مولر هینتون آگار پخش گردید. سپس دیسک‌های آنتی بیوتیک به فاصله استاندارد از یکدیگر قرار داده می‌شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله عدم رشد برای هر آنتی‌بیوتیک اندازه گیری گردید و نتایج برای هر آنتی بیوتیک مطابق با دستورالعمل مربوطه به‌عنوان حساس، حدواسط و مقاوم ثبت شد. لازم به ذکر است که از سویه استاندارد *اشریشیا کلی* ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و سویه استاندارد *اسینتوباکتر بومانی* ATCC 19606 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

آنتی بیوتیک‌های (Mast Diagnostics, Mast group Ltd., Me-seyside, UK) مورد بررسی شامل آمپی سیلین- سولباکتام (۱۰/۱۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، سفی پیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، نورفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، اوفلوکساسین (۱ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، پیپراسیلین- تازوباکتام (۱۰/۱۰۰ میکروگرم) و توبرامایسین (۱۰ میکروگرم) بودند. هم چنین MIC مروپنم، ایمی پنم، پیپراسیلین- تازوباکتام با روش میکرودایلوشین براث تعیین گردید. لازم به‌ذکر است طبق مطالعات انجام گرفته، ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی که به سه یا بیش از سه رده آنتی بیوتیکی شامل کینولون‌ها (سیپروفلوکساسین)، سفالوسپورین‌های وسیع الطیف (سفتازیدیم و سفی پیم)، ترکیب بتالاکتام/ مهارکننده بتالاکتاماز (آمپی سیلین/سولباکتام)، آمینوگلیکوزیدها (آمیکاسین و توبرامایسین)، و کارباپنم ها (ایمی پنم و مروپنم) مقاومت نشان دادند، به عنوان سویه‌های مقاوم به چند دارو[1] (MDR) تعریف گردیدند.

اجرای PFGE: برای انجام PFGE ایزوله‌های جدا شده از بیماران، که در ۸۰-درجه سلسیوس نگهداری شده بودند، ابتدا برای تهیه سوسپانسیون میکروبی روی محیط تریپتیکاز سوی آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند کشت داده شدند. در مرحله بعد ایزوله‌ها روی محیط کشت مولر هینتون اگار کشت ۲۴ ساعته داده شده و از این نمونه‌ها جهت آماده سازی DNA و تهیه پلاک مطابق با پروتکل استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه پلاک، در یک میکروتیوب، ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با ۲۰۰ میکرولیتر از آگارز Low melting مخلوط شده و جهت سفت شدن داخل یخچال قرار داده شدند. پس از انتقال این پلاک‌ها به داخل لوله آزمایش، بافر لیز ES (شامل پروتئینار K، سارکوزین و EDTA) به آن اضافه و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۵۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. در مرحله بعد، هر پلاک ۳ مرحله با آب مقطر و ۲ بار با بافر TE (محلول تریس و EDTA) شست و شو داده شد. در ادامه جهت هضم آنزیمی و برش DNA ژنومی از اندونوکلئاز Apa1 (Ro114L, Biolabs Inc.) مطابق با پروتکل استفاده گردید که به‌طور خلاصه عمل هضم آنزیمی در دو مرحله به شرح زیر انجام شد. در مرحله اول، پلاک‌ها ابتدا با ۹۰ سی سی آب مقطر و ۱۰ میکرولیتر بافر آنزیم مخلوط و به مدت یک ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند و مجددا پلاک‌ها به یک میکروتیوب دیگر انتقال و با ۹۰ سی سی آب مقطر، ۱۰ میکرولیتر بافر آنزیم و ۳ میکرولیتر آنزیم Apa1 مخلوط و به مدت یک شبانه روز در بن ماری ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند (۱۴). در ادامه، الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ در دستگاه CHEF DRII در بافر 0.5 X TBE با برنامه زمان سوئیچ اولیه ۵ ثانیه، زمان سوئیچ نهایی ۱۳ ثانیه و زمان اجرا ۲۰ ساعت در 6 V /cm2 انجام شد. در مرحله بعد، ژل در اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و پس از شستشو با آب مقطر در دستگاه Gel Doc (طراحی شده در مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)) مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۴). پروفایل باندهای DNA با کمک نرم افزار Gelclust با استفاده از الگوریتم Dice (ماتریس فاصله) آنالیز و براساس خوشه بندی UPGMA خوشه بندی[2] کلون‌ها انجام گردید.

نتایج

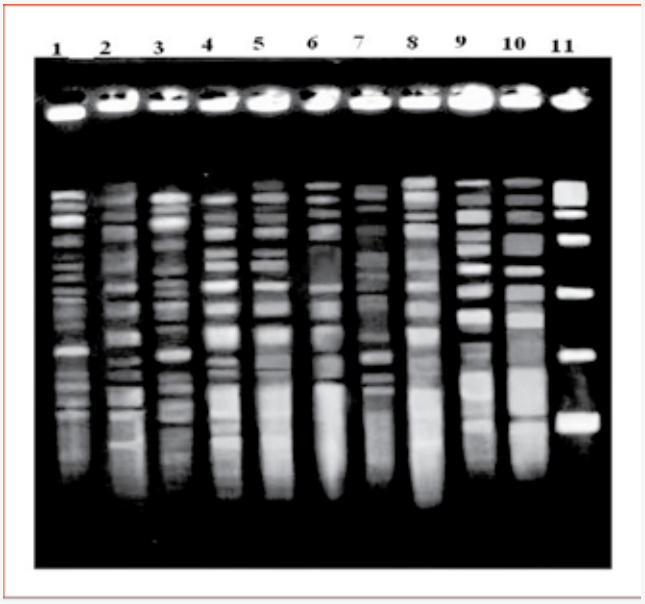
در این تحقیق، از ۷۰ نمونه اسینتوباکتر ایزوله شده از ۵۰۰ نمونه بیمار بستری، ۵۰ نمونه (۷۱/۴٪) به عنوان *اسینتوباکتر بومانی* تعیین هویت شدند و ۱۲ نمونه (۱۷/۱٪) اسینتوباکتر لوفی و ۸ نمونه (۱۱/۴٪) مربوط سایر گونه‌های اسینتوباکتر بود.

1- Multiple drug resistance (MDR)
2- Clustering

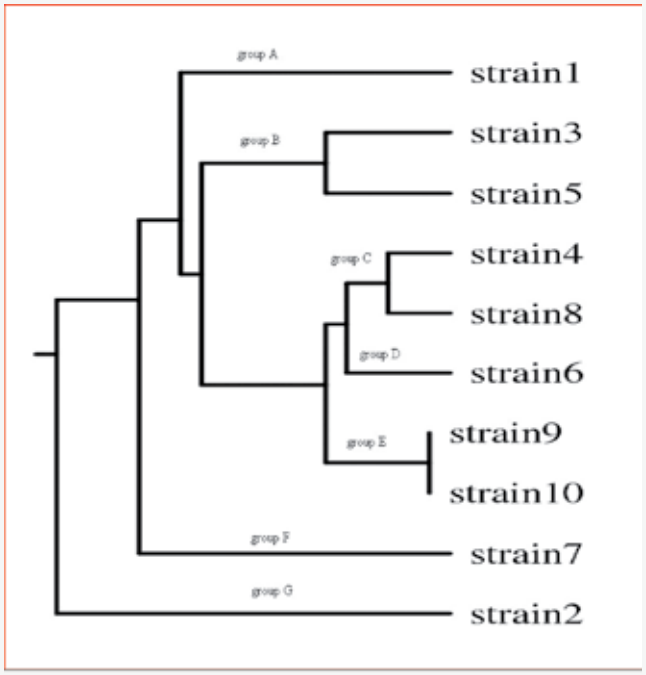
میزان مقاومت به مروپنم در بین ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* حدود ۴۴٪ و به ایمی پنم حدود ۷۸٪ بود (جدول ۱). این ایزوله‌های مقاوم به کرباپنم‌ها در تست میکرودایلوشن MIC بالای ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر نشان دادند. هم چنین این ایزوله‌ها مقاومت بالائی به پیپرسیلین- تازوباکتام نشان دادند.

در میان سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی*، ۸۲٪ مقاومت به چند دارو داشتند. همان‌طورکه در جدول ۲ نشان داده شده است، ۲۷ نمونه (۵۴٪) اسینتوباکتر بومانی نسبت به ۳ یا بیش از ۳ آنتی بیوتیک مقاوم هستند و ۱۶ نمونه (۳۲٪) به دو آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند. از میان آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی، سفی پیم و سفتازیدیم مقاوم‌ترین و پیپراسیلین-تازوباکتام، مروپنم و توبرامایسین حساس‌ترین آنتی بیوتیک‌ها بودند. هم چنین در این مطالعه مشخص گردید که هیچ سویه‌ای از اسینتوباکتر بومانی مقاوم به همه آنتی بیوتیک‌ها ایزوله نشده و آنتی بیوتیکی مانند مروپنم و توبرامایسین وجود دارند که بروی این باکتری موثر باشد.

با توجه به شکل ۱ و دندروگرام رسم شده (نمودار ۱)، نتایج PFGE نشان داد که ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر تهران دارای هفت الگوی ژنتیکی مختلف می‌باشند. به‌طورکلی، الگوی ژنتیکی F (strain7) و G (strain2) از نمونه‌های اسپورادیک بوده و قرابت ژنتیکی زیادی با بقیه گروه‌ها نداشتند. در بین ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بخش‌های بیمارستان میلاد، الگوی ژنتیکی A (strain1) و الگوی ژنتیکی B (strain3,5) مشاهده گردید. اغلب ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بخش‌های مختلف بیمارستان بقیه ا... (عج)، دارای الگوی ژنتیکی C (strain4,8) و D (strain6) بودند. در نهایت، الگوی ژنتیکی E (strain9,10) تنها در بین ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده



شکل ۱ـ الگوهای PFGE سویه‌های اسینتوباکتر بومانی ایزوله شده از بیماران با آنزیم ApaI. ردیف ۱: (strain 3)، ردیف ۲: (strain 4)، ردیف ۳: (strain 5)، ردیف ۴: (strain 1)، ردیف ۵: (strain 8)، ردیف ۶: (strain 6)، ردیف ۷: (strain 7)، ردیف ۸: (strain 2)، ردیف ۹: (strain 9)، ردیف ۱۰: (strain 10)، ردیف ۱۱ DNA فاژ لامبدا که با انزیم HindIII برش خورده و به عنوان Ladder می‌باشد.



نمودار ۱ـ گروه بندی ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران با کمک نرم افزار Gelclust و با روش UPGMA براساس نتایج PFGE و شباهت باندها.

از بیمارستان رسول اکرم (ص) مشاهده گردید (جدول ۳). همان‌گونه که در جدول مشاهده می شود، گروه‌های حاوی الگوی ژنتیکی B، C و D بیشترین نقش را در شیوع عفونت در بخش ICU داشته‌اند و سایر گروه‌هایی که در شیوع عفونت در سایر بخش‌ها نقش داشته اند، به ترتیب گروه های A، E، F و G بودند.

با توجه به دندروگرام، بیشترین قرابت ژنتیکی در بین گروه های C و D مشاهده شده است که می توان گفت این دو گروه دارای منشا ژنتیکی یکسانی می‌باشند. هم چنین بین این دو گروه و گروه E قرابت ژنتیکی با درجه کمتری وجود دارد و این احتمال وجود دارد که منشا آن‌ها از یک کلون باشد.

مقایسه نتایج آنتی بیوگرام و PFGE نشان می‌دهد که تمامی گروه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بیمارستان‌های شهر تهران به سفی پیم و سفتازیدیم و بیش از ۹۸٪ از گروه‌ها به آزترونام مقاوم بودند. تمام گروه‌ها به غیر از گروه F نسبت به نورفلوکساسین مقاومت نشان داده و هیچ یک از گروه ها به غیر از گروه G نسبت به افلوکساسین حساسیت نداشتند. حساسیت به سیپروفلوکساسین فقط در گروه A مشاهده شده و بقیه گروه‌ها مقاوم بوده اند. مقاومت به توبرامایسین و مروپنم فقط در گروه‌های B و C مشاهده شده و تنها گروه‌های E و G به آمپی سیلین- سولباکتام مقاومت نشان دادند.

بحث

امروزه با استفاده از روش‌های مختلف تیپ بندی در بیمارستان‌ها، از شیوع بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی جلوگیری شده و از این نظر به اقتصاد و سلامت جوامع مختلف کمک شایانی شده است (۹،۱۱). *اسینتوباکتر بومانی*، یک پاتوژن فرصت طلب با قدرت بیماری زایی بالا

بوده و یکی از عوامل عفونت‌های بیمارستانی طی ۳۰ سال گذشته به شمار می‌رود. این باکتری در نقاط مختلف دنیا پراکنده بوده و سبب مشکلات زیادی در انسان می گردد (۵-۱). این مطالعه با هدف تعیین تیپ‌های مولکولی شایع ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بیماران در شهر تهران با روش مولکولی PFGE که ابزاری قدرتمند جهت تایپینگ مولکولی میکروب‌ها می باشد، انجام گردید.

در این تحقیق ۷۱/۵٪ از ایزوله‌ها *اسینتوباکتر بومانی* و ۲۸/۵٪ *اسینتوباکتر لوفی* و سایر *اسینتوباکتر*ها بودند که تقریبا مشابه مطالعه Constantiniu و همکاران در طی سال‌های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۴ بود که گزارش نمودند از ۲۴ ایزوله‌های کلینیکی جدا شده، ۷۱٪ *اسینتوباکتر بومانی* و ۲۹٪ *اسینتوباکتر لوفی* می‌باشد (۱۵).

یافته‌های این مطالعه همانند مطالعات Bayugo در سال ۲۰۰۲ و Joshi در سال ۲۰۰۳ نشان داد که مقاومت آنتی بیوتیکی به صورت جدی در حال افزایش است، تا جایی‌که ۸۲٪ از ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* مورد بررسی، فنوتیپ مقاومت به چند دارو (MDR) را دارا بودند. آنها در مطالعات خود میزان جداسازی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو را حدود ۴۵٪ تا ۷۵٪ گزارش کردند (۱۷،۱۶).

در مطالعه حاضر، همانند مطالعه فیض آبادی وهمکارانش و برخلاف مطالعه Hujer و همکاران که میزان مقاومت به مروپنم و ایمی پنم حدود ۲۰٪ اعلام کردند، میزان مقاومت به مروپنم و به ایمی پنم بالای ۴۰٪ بود (۱۹،۱۸). هم چنین نتایج این مطالعه برخلاف مطالعه

آنتی بیوتیک	مقاوم (تعداد(درصد	حدواسط (تعداد(درصد	حساس (تعداد(درصد
سفی پیم	۵۰ (۱۰۰)	۰	۰
سفتازیدیم	۵۰ (۱۰۰)	۰	۰
آزترونام	۴۹ (۹۸)	۰	۱ (۲)
نورفلوکساسین	۴۸ (۹۶)	۰	۲ (۴)
اوفلوکساسین	۴۶ (۹۲)	۰	۴ (۸)
سیپروفلوکساسین	۴۶ (۹۲)	۰	۴ (۸)
آمیکاسین	۴۵ (۹۰)	۰	۵ (۱۰)
ایمی پنم	۳۹ (۷۸)	۱ (۲)	۱۰ (۲۰)
جنتامیسین	۳۲ (۶۴)	۳ (۶)	۱۵ (۳۰)
آمپی سیلین-سولباکتام	۳۱ (٪۶۲)	۳ (۶)	۱۶(۳۲)
پیپراسیلین-تازوباکتام	۲۴ (٪۴۸)	۱ (۲)	۲۵(۵۰)
مروپنم	۲۲ (٪۴۴)	۱ (۲)	۲۷(۵۴)
توبرامایسین	۱۴ (٪۲۸)	۱ (۴)	۳۴(۲۸)

جدول ۱ ـ تفکیک ایزوله‌ها بر حسب مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در سه بیمارستان شهر تهران

Valencia و همکارانش می باشد که در اسپانیا انجام شد (۲۰) و در آن، مقاومت به ایمی پنم در حدود ۴۳٪ بیان شد. در هرحال مطالعات مختلف از جمله مطالعه Zarrilli نشان می‌دهد که مقاومت به کرباپنم ها در سراسر دنیا در حال افزایش می‌باشد (۲۱).

در این مطالعه، نتایج PFGE نشان داد که ۷ الگوی ژنتیکی مختلف مسئول عفونت‌های بیمارستانی شهر تهران می‌باشند که از A تا G نام گذاری شدند. این یافته‌ها با نتایج تحقیقاتی که Raka و همکارانش در کوزوو انجام دادند، کاملا مطابقت داشت(۲۲). این مطالعه نشان داد که ۴۰٪ از این باکتر ی‌ها از بخش ICU جدا شده و بقیه از بخش‌های مختلف بیمارستانی جمع آوری گشته اند. از بین این ۷ الگوی ژنتیکی، ۲ الگو F و G از نمونه های اسپورادیک بوده و قرابت ژنتیکی زیادی با سایر گروه‌ها نداشتند که این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعات Villalon و همکارانش در اسپانیا هم خوانی دارد (۲۳).

از بین سایر گروه‌ها، الگوی ژنتیکی B، C و D بیشترین نقش را در شیوع عفونت در بخش ICU داشته اند و بقیه گروهایی که در شیوع عفونت در سایر بخش‌ها دارای نقش بودند به ترتیب گروه‌های A، E، F و G بودند،که این یافته‌ها با نتایج تحقیقاتی که Durante-Mangoni و همکارانش در ایتالیا انجام داده اند، از نظر شناسایی گروه‌های موثر در انتشار عفونت انطباق دارد (۲۴).

در این مطالعه، تمامی گروه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بیمارستان‌های شهر تهران به سفی پیم و سفتازیدیم مقاومت نشان داده‌اند که با مطالعات Ben و همکارانش که در همین زمینه در تایوان انجام شده انطباق دارد (۲۵). هم چنین مشابه مطالعه Sengstock و همکارانش در ایالات متحده آمریکا بیش از ۹۸٪ از گروه‌ها به ازترونام مقاوم بوده‌اند (۲۶).

برخلاف مطالعه Perez و همکارانش، نتایج این مطالعه نشان داد که تمام گروه‌ها به غیر از گروه F نسبت به نورفلوکساسین و تمام گروه‌ها به غیر از گروه G نسبت به افلوکساسین مقاومت نشان می‌دهند (۲۷).

همانند مطالعه Ben و همکارانش در تایوان، این بررسی نشان داد که حساسیت به سیپروفلوکساسین فقط در گروه A مشاهده شده و بقیه گروه‌ها نیز مقاوم هستند (۲۵).

برخلاف مطالعه Zarrillii و همکارانش در ایتالیا، نتایج این بررسی نشان داد که مقاومت به توبرامایسین فقط در گروه‌های B و C دیده شده و بقیه گروه‌ها نسبت به آن حساسیت نشان داده‌اند و این آنتی بیوتیک به عنوان یکی از موثرترین آنتی بیوتیک‌ها در برابر *اسینتوباکتر بومانی* به شمار می‌رود. لازم به‌ذکر است که علت این اختلاف ناشی از نوع مطالعه، منطقه جغرافیائی مورد مطالعه، نوع آنتی بیوتیک و روش اجرا می‌باشد (۲۱).

نتیجه گیری

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که الگوهای ژنتیکی مختلفی از ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بیمارستان‌های شهر تهران وجود دارند و الگوهای مسئول در شیوع عفونت در یک بیمارستان با هم قرابت ژنتیکی داشته و ممکن است دارای منشا ژنتیکی مشترکی باشند. البته شباهت بین الگوهای موجود در بیمارستان‌های مختلف نیز دیده شده که می‌تواند نتیجه جابجایی بیماران در بیمارستان‌ها باشد. هم چنین نتایج این مطالعه نشان داد که بیشتر این الگوها به

اکثر آنتی بیوتیک‌های رایج مقاومند و الگوهای مقاومت دارویی در هر بیمارستان با دیگری متفاوت بوده، لذا طراحی برنامه‌های حفاظتی نظیر کنترل عفونت‌های ایجاد شده در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها به خصوص بخش مراقبت‌های ویژه به‌طور جداگانه بسیار اهمیت دارد. هم چنین بهتر است در هر بیمارستان، با استفاده از روش‌های مولکولی، این باکتری‌ها شناسائی و ویژگی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها تعیین و متناسب با آن، آنتی بیوتیک‌های مناسب تجویز گردند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در مرکز تحقیقاتی بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... اجرا شد، لذا نویسندگان مقاله از همکاری‌های کارکنان آن مرکز کمال تشکر را دارند.

	تعداد نمونه‌های مقاوم به یک یا چند آنتی بیوتیک					جمع ایزوله‌های اسینتوباکتر
تعداد آنتی بیوتیک	۱	۲	۳	۴	>۴	۵۰
اسینتوباکتر بومانی	۷	۱۶	۱۳	۵	۹	

جدول ۲ ـ تعداد فراوانی ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چندگانه دارو مورد بررسی در این مطالعه

گروه A (strain1)	۱۰ و ۱۱ و ۱۲	جداشده از بخش اطفال بیمارستان میلاد
گروه B (strain3,5)	(strain3) ۱۴،۱۳ (strain5) ۹،۸،۷،۶،۵،۴،۳،۲،۱	جداشده از بخش اطفال بیمارستان میلاد جداشده از ICU بیمارستان میلاد
گروه C (strain4,8)	۲۹،۲۸،۲۷،۲۶،۱۷،۱۸،۱۶،۱۵ (strain4) (strain9) ۳۲،۳۱،۳۰،۱۹،۱۸	جداشده از ICU و بخش داخلی بیمارستان بقیه ا... (عج)
گروه D (strain6)	۲۵،۲۴،۲۳،۲۲،۲۱،۲۰	جداشده از ICU بیمارستان بقیه ا... (عج)
گروه E (strain9,10)	۴۸،۴۷،۴۱،۴۰،۳۹،۳۸،۳۷،۳۶،۳۵ (strain9) ۸ (strain9) ۴۶،۴۵،۴۴،۴۳،۴۲	جداشده از بخش‌های اطفال و زنان بیمارستان رسول اکرم (ص)
گروه F (strain7)	۳۴،۳۳	جداشده از بخش داخلی بیمارستان بقیه ا... (عج)
گروه G (strain2)	۵۰،۴۹	جداشده از بخش اطفال بیمارستان رسول اکرم (ص)

جدول ۳ ـ تطابق شماره بیماران و الگوهای ژنتیکی حاصل از دندروگرام

References

1. Peleg AP, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: Emergence of a Successful Pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008; 21(3):538-582.
2. Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. Multidrug-resistant Acinetobacter spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. Yonsei Med J. 2011; 52(6):879-891.
3. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of Acinetobacter baumannii in health care facilities. Clin Infect Dis. 2006; 42(5): 692–699.
4. Towner KJ. Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. J Hosp Infect. 2009;73(4):355-363.
Siširak M, Hukić M. Acinetobacter baumannii as a cause of sepsis. Med Glas Ljek komore Zenicko-doboj kantona. 2012; 9(2):311-316.
5. Wisplinghoff H, Schmitt R, Wöhrmann A, Stefanik D, Seifert H. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of Acinetobacter baumannii. J Hosp Infect. 2007;66(2): 174–181.
6. 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): 3579-3583.
7. Wroblewska MM, Towner KJ, Marchel H, Luczak M. Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of

Acinetobacter baumannii in a tertiary-care hospital in Poland. Clin Microbiol Infectm. 2007; 13(5): 490–496.
8. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen O. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of Acinetobacter baumannii. Drug Resist Updat. 2012;15(4):237-247.
9. Mo GX, She DY, Guan XZ, Cui JC, Wang R, Chen LA. Antimicrobial resistance and genotyping of Acinetobacter baumannii in ICU. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. 2010 ;33(9):656-659.
10. 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.
11. Nasonova ES. Pulsed field gel electrophoresis: theory, instruments and applications. Tsitologiia. 2008;50(11):927-935.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (2010) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M100-S20. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
Durmaz R, Otlu B, Koksal F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of Acinetobacter baumannii, Escherichia coli and Klebsiella spp. Jpn J Infect Dis. 2009 ;62(5):372-377.
13. Constantiniu S, Romaniuc A, Iancu, SL, Filamon R, Tarasi I. Cultural and biochemical characteristics of Acinetobacter spp. Strains isolated from hospital units. The Journal of preventive medicine. 2004;12:35-42.
14. Bayuga S, Zeana C, Sahni J, Della-Latta P, el-Sadr W, Larson E. Prevalence and antimicrobial patterns of Acinetobacter baumannii on hands and nares of hospital personnel and patients: the iceberg phenomena again. Heart Lung. 2002; 31(5): 382-390.
15. 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.
16. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant Acinetobacter spp. Isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. Antimicrobl Agents Chemother. 2006; 50(12): 4114–4123
17. Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, Rasoolinejad M, Sadeghifard N, Aligholi M, et al. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of blaOXA genes among Acinetobacter spp. Isolated from patients at Tehran hospitals. Jpn J Infect Dis. 2008; 61(4):274-278.
18. Valencia R, Arroyo LA, Conde M, Aldana JM, Torres MJ, Fernández-Cuenca F, et al. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant Acinetobacter baumannii in a tertiary care university hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009; 30(3):257-263.
19. Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. J Infect Dev Ctries. 2009; 3(5):335-341
20. Raka L, Kalenć S, Bosnjak Z, Budimir A, Katić S, Sijak D, et al. Molecular epidemiology of Acinetobacter baumannii in central intensive care unit in Kosova Teaching Hospital. Braz J Infect Dis. 2009; 13(6):408-413.
21. Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual M J, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA. A Clonal Diversity of Nosocomial Epidemic Acinetobacter baumannii Strains Isolated in Spain. J Clin Microbiol. 2011; 49(3): 875–882
22. Durante-Mangoni E, Zarrilli R. Global spread of drug-resistant Acinetobacter baumannii: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. Future Microbiol. 2011 ;6(4):407-22.
23. Ben RJ, Yang MC, Hsueh JC, Shiang JC, Chien ST. Molecular characterisation of multiple drug-resistant Acinetobacter baumannii isolates in southern Taiwan. Int J Antimicrob Agents. 2011 ;38(5):403-408.
24. Sengstock DM, Thyagarajan R, Apalara J, Mira A, Chopra T, Kaye KS. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: an emerging pathogen among older adults in community hospitals and nursing homes. Clin Infect Dis. 2010; 50(12):1611-1616.
25. Perez F, Endimiani A, Ray AJ, Decker BK, Wallace CJ, Hujer KM, et al. Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii and Klebsiella pneumoniae across a hospital system: impact of post-acute care facilities on dissemination. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(8):1807-1818.

Original Article

Molecular Typing of *Acinetobacter Baumannii* Clinical Strains in Tehran by Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Farahani N[1], Mirnejad R[2*], Ahmadi Z[2], Amirmozafari N[3], Masjedian F[4]

1- Department of Biology Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4- Department of Medical Bacteriology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 08 Sep 2012 Accepted: 16 Dec 2012

Abstract

Background & Objectives: Currently, *Acinetobacter baumannii* is an important nosocomial pathogen insofar as its hospital outbreaks have been described from various geographical areas. Since the discrimination of strains within a species is important for delineating nosocomial outbreaks, this study was conducted with the aim of genotyping the A. baumannii clinical strains in Tehran via the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) method, which is the most accurate method used for the typing of bacterial species.

Material & method: This study was performed on 70 isolates of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients from Baqiyatallah, Rasoole Akram, and Milad hospitals in Tehran. Cultural and biochemical methods were used for the identification of the isolates in species level, and then susceptibility tests were carried out on 50 isolates of *A. baumannii* using the disk diffusion method. The PFGE method was performed on the isolates by Apa I restriction enzyme. Finally, the results of the PFGE were analyzed.

Result: *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospitals in Tehran showed seven different genetic patterns, two of which were sporadic. Also, genotypic profiles were different in each hospital, and different patterns of genetic resistance to common antibiotics were observed.

Conclusion: Although diversity was observed among the strains of *A. baumannii* by the PFGE method in Tehran, no epidemic strains were found among them.

Keywords: Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), *Acinetobacter baumannii*, Genotyping

*** Corresponding author: Mirnejad Reza,** Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel - Fax: +98 21 88039883
E-mail: rmirnejad@ yahoo.com