ORIGINAL ARTICLE

Genotypic and Phenotypic Characteristics of Efflux Pumps in Acinetobacter spp. Isolated from Inpatients

Susan Dostvandi[1],
Ramin Abiri[2],
Parviz Mohajeri[2],
Amirhooshang Alvandi[2]

[1] MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Sanandaj, Iran
[2] Assistanr of Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received February 16, 2015 ; Accepted July 5 , 2015)

Abstract

Background and purpose: *Acinetobacter spp.* is a non-fermentative gram- negative bacterium involving in various nosocomial infections. During last decade increasing number of multidrug-resistant isolates of *Acinetobacter spp.* have been reported. This type of resistance is possibly related to efflux pumps. This research aimed at identifying the phonotypic and genotypic characteristics of efflux pump in resistance to antibiotics in *Acinetobacter spp.* isolated from hospitalized patients in Kermanshah, 2013.

Materials and methods: In this descriptive-analytical study, 100 *Acinetobacter spp* strains were isolated from different clinical samples including blood, wound, and liquid specimens of hospitalized patients in Imam Reza and Taleghani hospitals in Kermanshah. All isolates were identified by standard biochemical tests. The antimicrobial susceptibility patterns were determined by disk diffusion according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) guidelines in presence and absence of CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) as an efflux pump inhibitor. PCR was used to detect the *adeABC* efflux pump genes.

Results: The rate of resistant to imipenem was 58%, ampicillin 63%, ceftazidime 94%, erythromycin 55%, clarithromycin 36%, azithromycin 29%, gentamicin 83%, tobramycin 54%, and tetracycline 50%. Highest and lowest levels of resistance were observed for ceftazidime and azithromycin, respectively. Among the *Acinetobacter spp.* 68% were positive for *adeA* gene, 88% for *adeB* gene, and 86% for *adeC* gene.

Conclusion: Frequency of resistance using efflux pump inhibitor was found to be higher in *adeA, adeB,* and *adeC* positive *Acinetobacter spp.* isolates. The highest rate of resistance by efflux pump was observed in ceftazidime (13%) and tetracycline (12%).

Keywords: *Acinetobacter spp.*, efflux pump, disk diffusion

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(126): 1-10 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۶ تیر سال ۱۳۹۴ (۱۰-۱)

فنوتیپ و ژنوتیپ پمپ‌های ایفلاکس در ایزوله‌های گونه‌های *اسینتوباکتر* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های امام رضا و طالقانی کرمانشاه در سال ۱۳۹۲

سوزان دوستوندی[۱]
رامین عبیری[۲]
پرویز مهاجری[۲]
امیرهوشنگ الوندی[۲]

چکیده

سابقه و هدف: *سویه‌های اسینتوباکتر* با مقاومت چندگانه در دهه اخیر شایع شده است که ممکن است در نتیجه فعالیت پمپ‌های ایفلاکس باشد. مطالعه حاضر به منظور بررسی فنوتیپ و ژنوتیپ پمپ‌های ایفلاکس در ایزوله‌های گونه های *اسینتوباکتر* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های امام رضا و طالقانی کرمانشاه در سال ۱۳۹۲ انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه توصیفی-تحلیلی ۱۰۰ ایزوله گونه‌های *اسینتوباکتر* از نمونه‌های بالینی مختلف از بیمارستان‌های امام رضا و طالقانی کرمانشاه جمع‌آوری و توسط تست‌های بیوشیمیایی استاندارد تعیین هویت شدند. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی شامل ایزوله ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن در حضور و بدون حضور مهارکننده پمپ ایفلاکس در ایزوله‌ها مطابق با دستورالعمل استاندارد تعیین گردید. ژن‌های پمپ ایفلاکس ایزوله‌ها *adeABC* نیز با استفاده از روش PCR شناسایی شدند.

یافته‌ها: مقاومت ایزوله‌ها نسبت به ایمی‌پنم ۵۸ درصد، آمپی‌سیلین ۶۳ درصد، سفتازیدیم ۹۴ درصد، اریترومایسین ۵۵ درصد، کلاریترومایسین ۳۶ درصد، آزیترومایسین ۲۹ درصد، جنتامایسین ۸۳ درصد، توبرامایسین ۵۴ درصد و تتراسیکلین ۵۰ درصد بود. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به سفتازیدیم و آزیترومایسین بود. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش PCR، از بین ۱۰۰ ایزوله *گونه های اسینتوباکتر*، ۶۸ درصد دارای ژن *adeA*، ۸۸ درصد دارای ژن *adeB* و ۸۶ درصد حامل ژن *adeC* بودند.

استنتاج: فراوانی مقاومت به وسیله پمپ ایفلاکس در سویه‌های حمل کننده ژن‌های *adeA*، *adeB* و *adeC* بیش‌تر بود. بیش‌ترین میزان مقاومت در اثر پمپ‌های ایفلاکس در آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و تتراسایکلین، به میزان به ترتیب ۱۳ درصد و ۱۲ درصد دیده شد.

واژه های کلیدی: گونه‌های *اسینتوباکتر*، پمپ ایفلاکس، انتشار در دیسک

مقدمه

گونه *اسینتوباکتر* یک باکتری کوکسی یا کوکوباسیل شکل است(۱). این ارگانیسم جزی از فلور نرمال اوروفارنکس افراد سالم است و می‌تواند به عنوان یک ارگانیسم فرصت طلب عفونت‌های متفاوتی ایجاد

مولف مسئول: امیرهوشنگ الوندی- کرمانشاه: بلوار شهید شیرودی، خیابان پرستار، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی E-mail: ah_alvandi@kums.ac.ir
۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران
۲. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۱۱/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۲/۲۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۴/۱۴

بیمارستانی کند(۲). این ارگانیسم در ایجاد بیماری عفونت‌های بیمارستانی مهمی مانند آندوکاردیت، پریتونیت، مننژیت، عفونت‌های دستگاه تنفس، سوختگی و سپتی سمی نقش دارد(۳). یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد این ارگانیسم مقاومت ذاتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز تمایل بالای آن در کسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی است. مقاوت به آنتی‌بیوتیک ها مشکلات فراوانی را در درمان عفونت به گونه‌های *اسینتوباکتر* ایجاد کرده است(۴). گونه‌های *اسینتوباکتر* می‌توانند دارای ویژگی مقاومت به چند دارو (Multidrug Resistance یا MDR) نیز باشند(۲،۱). عفونت‌های بیمارستانی این ارگانیسم می‌توانند از راه‌های مختلف از جمله وسایل بیماران، محیط و هوا در بخش‌ها منتشر شوند(۵). مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در این باکتری به دلیل مکانیسم‌های مختلفی از جمله غیرفعال‌سازی آنتی‌بیوتیک، تغییر هدف، تغییر در نفوذپذیری غشا و پمپ ایفلاکس به وجود آید. پمپ‌های ایفلاکس به عنوان یکی از راه‌های مقاومت ذاتی و اکتسابی در باکتری‌ها می‌توانند سبب مقاومت نسبت به دسته وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها شوند(۶). پمپ ایفلاکس برای اولین بار در سال ۱۹۷۸ توسط لوی در *اشرشیا کلی* شناسایی شد. اکنون بیش از ۵۰ پمپ ایفلاکس شناسایی شده است. خصوصیت مشترک همه پمپ‌های ایفلاکس، توانایی دفع انواع مواد ضد باکتریایی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها، بیوسایدها، رنگ‌ها، پاک‌کننده‌ها، اسیدهای چرب و حلال‌های آلی می‌باشد. افزون بر این باکتری‌ها متابولیت‌های طبیعی خود نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتریوسین‌ها، همولیزین‌ها و اندول را نیز با این مکانیسم به خارج سلول پمپ می‌نمایند(۸،۷). پمپ‌های ایفلاکس در باکتری‌ها از نظر فیلوژنی به پنج خانواده تقسیم می‌شوند که شامل Major Facilitatore superfamily (MFS)، Small Mulidrug Resistant (SMR)، Resistant Nodulation Division (RND)، Multidrug and toxic efflux (MATE) و ATP binding cassette (ABC) است. انرژی مورد نیاز عملکرد پمپ ABC به وسیله ATP تامین می‌شود، در حالی که بقیه پمپ‌ها از طریق نیروی محرکه پروتونی انرژی به دست می‌آورند(۹). پمپ‌های ایفلاکس از طریق بیوشیمیایی، میکروبیولوژی یا مولکولی شناسایی می‌شوند، ولی بهترین روش شناسایی آن‌ها از طریق توالی ژنومی می‌باشد(۱۰). از مهم‌ترین پمپ‌های ایفلاکس که در ایجاد مقاومت در گونه‌های *اسینتوباکتر* نقش دارند، پمپ ایفلاکس RND می‌باشد(۱۱). در خانواده RND پمپ‌های ایفلاکس سه جزیی، *adeABC*، *adeIJK* و *adeFGH* در گونه‌های *اسینتوباکتر* شناسایی شده است(۹). پمپ ایفلاکس خانواده RND دارای سه جزء اساسی می باشد که شامل یک پروتئین ناقل در غشاء داخل (AcrB)، یک پروتئین مستقر در فضای پری پلاسمیک (AcrA) و یک کانال پروتئینی در غشاء خارجی (TolC)، که به پروتئین غشاء خارجی هم معروف است، می‌باشد(۱۲). اعضای خانواده RND آنتی‌پورترهای پروتون-دارو هستند که با به کارگیری نیروی محرکه پروتونی غشاء، در ازای ورود یون‌های پروتون به درون سلول، ترکیبات دارویی را از سلول خارج می‌کنند. به همین دلیل به وسیله CCCP که گرادیان پروتونی را از بین می برد، مهار می‌شوند(۸). پمپ ایفلاکس *adeABC* از سه جز *adeA*، *adeB*، *adeC*، تشکیل شده است و توسط اپرون *adeRS* تنظیم می‌شود(۱۳،۱۱). *adeABC* در ایجاد مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها، کلرامفنیکل، اریترومایسین، تتراسایکلین، فلوروکینولون‌ها، ماکرولیدها، تی جی سیکلین و تری متوپریم نقش دارد(۹). هدف از انجام این مطالعه تعیین فنوتیپی پمپ‌های ایفلاکس و ژن‌های *adeABC* در ایزوله‌های گونه‌های *اسینتوباکتر* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های امام رضا و طالقانی کرمانشاه در سال ۱۳۹۲ و تعیین ارتباط آن با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بوده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی ۱۰۰ نمونه از گونه‌های *اسینتوباکتر* در فواصل زمانی فروردین تا مهر ۹۲ از ۱۰۰۰ نمونه بالینی مختلف زخم، مایعات بدن و خون از بخش‌های جراحی، اورژانس، داخلی و بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های امام رضا (ع) و طالقانی کرمانشاه جمع‌آوری گردید. نمونه‌های بالینی پس از انتقال به آزمایشگاه بر روی محیط بلاد آگار و مک‌کانکی آگار کشت داده شد. باکتری‌های کوکوس یا دیپلوکوکوس شکل گرم منفی، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی، مانند تست حرکت، کشت بر روی محیط OF حاوی قند گلوکز و رشد در دمای ۴۲-۴۴°C تعیین هویت قطعی انجام گردیدند. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در سویه‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (کربی-بائر) مطابق با معیارهای موسسه استاندارد های آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) تعیین گردید(۱۴). در این روش سوسپانسیون میکروبی برابر با استاندارد نیم مک فارلند در محیط مولر هینتون آگار و محیط مولر هینتون آگار حاوی مهارکننده پمپ ایفلاکس (CCCP) با غلظت ۱۰۰µM به صورت گسترده کشت گردید. برای بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل اریترومایسین (MAST Disk–15µg)، آزیترومایسین (MAST Disk–15µg)، کلاریترومایسین (MAST Disk–15µg)، توبرامایسین (MAST Disk-15µg)، جنتامایسین (MAST (Disk-10µg)، تتراسایکلین (Himedia -30µg)، آمپی‌سیلین (BioMerieux -10µg)، ایمی‌پنم (MAST Disk–10µg) و سفتازیدیم (MAST Disk–10µg) استفاده گردید. بعد از انکوباسیون ۱۸ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله بدون رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد و سویه‌ها بر اساس دستورالعمل CLSI در دسته‌های حساس، نیمه حساس و مقاوم تقسیم‌بندی گردید(۱۴). اختلاف بین تعداد سویه‌های مقاوم در حضور و بدون حضور CCCP بر اساس فرمول زیر به عنوان مقاومت در اثر پمپ‌های ایفلاکس در نظر گرفته شد:

$$A = B - C$$

در این فرمول:

A= تعداد سویه‌های مقاوم در اثر پمپ‌های ایفلاکس،

B= تعداد سویه‌های مقاوم در عدم حضور CCCP و

C= تعداد سویه‌های مقاوم در حضور CCCP بود.

استخراج DNA به روش جوشاندن انجام پذیرفت و حضور ژن‌های *adeA*، *adeB* و *adeC* در ایزوله‌ها با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی تعیین شد. جدول شماره ۱ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد(۱۵). واکنش PCRدر حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر و مواد زیر انجام پذیرفت: 1X بافر PCR، نیم میکرومولار از هر پرایمر رفت و برگشت، یک واحد Taq DNApol، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی مولار dNTPs و ۱ میکرولیتر از DNA الگو. برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۲°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای ۹۲°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۶°C به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه بود. محصولات PCR، بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و باندها با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۱۵ دقیقه قابل مشاهده گردید. باندهای مورد نظر به وسیله دستگاه ژل داکیومنتیشن عکسبرداری گردید. بر اساس

جدول شماره ۱: پرایمر های مورد استفاده، توالی پرایمرها، درجه حرارت اتصال

پرایمر	توالی پرایمر ها (´۳-´۵)	محصول PCR جفت باز	دمای اتصال	منبع
adeAF *adeAR*	ATCTTCCTGCACGTGTACAT GGCGTTCATACTCACTAACC	۵۱۳	۵۶	۱۵
adeBF *adeBR*	TTAACGATAGCGTTGTAACC TGAGCAGACAATGGAATAGT	۵۴۱		
adeCF *adeCR*	AGCCTGCAATTACATCTCAT TGGCACTTCACTATCAATAC	۵۶۰		

مطالعه انجام شده توسط Lin و همکاران(۱۶)، در مجموع ۱۰۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. داده های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ و آزمون کای دو مورد ارزیابی قرارگرفتند.

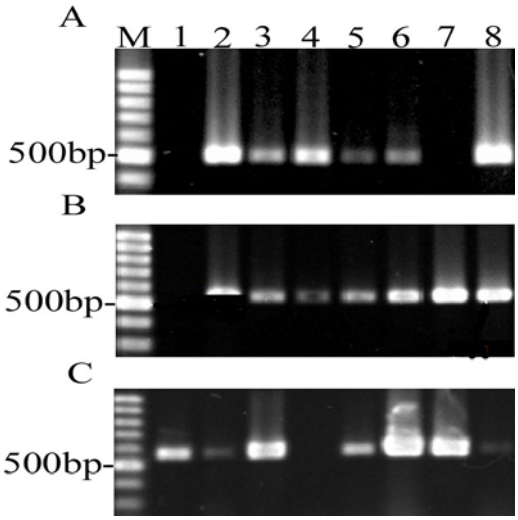
یافته ها

در تحقیق حاضر از مجموع ۱۰۰۰ نمونه بالینی، ۱۰۰ ایزوله گونه های *اسینتوباکتر* جداسازی شد (۱۰ درصد)، که این ایزوله‌ها از ۴۵ بیمار مونث و ۵۵ بیمار مذکر جدا گردید. بیماران در رده سنی کم‌تر از ۲۰ سال ۲۸ نفر، ۴۰-۲۰ سال ۳۶ نفر، در رده سنی ۶۰-۴۰ سال ۲۲ نفر و در رده ۹۰-۶۰ سال ۱۴ نفر قرار داشتند. جدول شماره ۲ فراوانی ایزوله‌ها به تفکیک نمونه و بخش آورده شده است. مقاومت ایزوله‌ها نسبت به ایمی‌پنم ۵۸ درصد، آمپی‌سیلین ۶۳ درصد، سفتازیدیم ۹۴ درصد، اریترومایسین ۵۵ درصد، کلاریترومایسین ۳۶ درصد، آزیترومایسین ۲۹ درصد، جنتامایسین ۸۳ درصد و تتراسیکلین ۵۰ درصد بود. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به سفتازیدیم و آزیترومایسین بود. محصول PCR حاصل از ژن‌های *adeA*، *adeB* و *adeC* به ترتیب ۵۱۳، ۵۴۱ و ۵۶۰ جفت باز بود (تصویر شماره ۱). از بین ۱۰۰ ایزوله گونه‌های *اسینتوباکتر*، ۶۸ درصد دارای ژن *adeA*، ۸۸ درصد دارای ژن *adeB* و ۸۶ درصد دارای ژن *adeC* بودند.

در این مطالعه اختلاف بین تعداد سویه های مقاوم در حضور و بدون حضور CCCP به عنوان مقاومت در اثر پمپ‌های ایفلاکس در نظر گرفته شد.

جدول شماره ۲: فراوانی نسبی ایزوله ها گونه های *اسینتوباکتر* جدا شده از بیماران به تفکیک نمونه و بخش

نمونه	بخش				
	جراحی	اورژانس	مراقبت های ویژه	داخلی	مجموع
مایعات بدن	۱۳ درصد	۸ درصد	۸ درصد	۲۲ درصد	۵۱ درصد
زخم	۵ درصد	۹ درصد	۱۲ درصد	۱۶ درصد	۴۲ درصد
خون	۱ درصد	۱ درصد	۲ درصد	۳ درصد	۷ درصد
مجموع	۱۹ درصد	۱۸ درصد	۲۲ درصد	۴۱ درصد	۱۰۰ درصد



تصویر شماره ۱: الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR ژن های *adeA* با ۵۱۳ جفت باز، *adeB* با ۵۴۱ جفت باز و *adeC* با ۵۶۰ جفت باز، در گونه های *اسینتوباکتر*. A و B: چاهکM: مارکر وزن مولکولی با سایز ۱۰۰ جفت باز، چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: کنترل مثبت، چاهک های ۸-۳: نمونه های ۱ الی ۶. C: چاهکM: مارکر وزن مولکولی با سایز ۱۰۰ جفت باز، چاهک شماره ۱: کنترل مثبت، چاهک های ۸-۲: نمونه های ۱ الی ۷

در سویه‌هایی که ژن *adeA* آن‌ها مثبت بوده است، بیش‌ترین میزان مقاومت به وسیله پمپ‌های ایفلاکس در تتراسایکلین دیده شد (۱۲ درصد). این میزان برای جنتامایسین صفر بود. اما در سویه‌هایی که ژن *adeA* آن‌ها منفی بود، بیش‌ترین میزان مقاومت به وسیله پمپ‌های ایفلاکس در ایمی‌پنم، به میزان ۵ درصد دیده شد. در حالی که در سویه‌هایی که ژن *adeB* آن‌ها مثبت بوده است، بیش‌ترین مقاومت به وسیله پمپ‌های ایفلاکس به میزان ۱۱ درصد در ایمی پنم دیده شد. این میزان برای جنتامایسین صفر بود. اما در سویه‌هایی که ژن *adeB* آن‌ها منفی بوده است، بیش‌ترین میزان مقاومت به وسیله پمپ‌های ایفلاکس به میزان ۲ درصد برای توبرامایسین، ایمی‌پنم و تتراسایکلین دیده شد و برای سایر آنتی‌بیوتیک‌ها صفر بود.

در سویه‌هایی که ژن *adeC* آن‌ها مثبت بود، بیش‌ترین مقاومت به وسیله پمپ‌های ایفلاکس به میزان ۱۲ درصد در تتراسایکلین، دیده شد. این میزان برای

جنتامایسین صفر بود. اما در سویه‌هایی که ژن *adeC* آن‌ها منفی بود، بیش‌ترین مقاومت به وسیله پمپ‌های ایفلاکس به میزان ۴ درصد در ایمی‌پنم وجود داشت. درحالی‌که برای اریترومایسین، آزیترومایسین، توبرامایسین، سفتازیدیم، جنتامایسین و تتراسایکلین این میزان صفر بود. جدول شماره ۳ ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در حضور و بدون حضور CCCP به صورت کامل نشان داده شده است.

جدول شماره ۳: ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های گونه‌های *اسینتو باکتر* در حضور و بدون حضور مهار کننده پمپ ایفلاکس (CCCP)

آنتی بیوتیک	CCCP/بدون CCCP	حساس	نیمه حساس	مقاوم
اریترومایسین	CCCP	۱	۵۱	۴۸
	–	۱	۴۴	۵۵
آزیترومایسن	CCCP	۵۷	۱۵	۲۸
	–	۵۷	۱۴	۲۹
کلاریترومایسین	CCCP	۶۲	۸	۳۰
	–	۵۶	۸	۳۶
توبرامایسن	CCCP	۴۷	۴	۴۹
	–	۴۳	۳	۵۴
ایمی پنم	CCCP	۴۳	۱۲	۴۵
	–	۳۰	۱۲	۵۸
آمپی سیلین	CCCP	۲۸	۱۶	۵۶
	–	۲۴	۱۳	۶۳
جنتامایسن	CCCP	۱۴	۳	۸۳
	–	۱۵	۲	۸۳
تتراسایکلین	CCCP	۴۶	۱۶	۳۸
	–	۳۶	۱۴	۵۰
سفتازیدیم	CCCP	۹	۱	۹۰
	–	۵	۱	۹۴

بحث

گونه‌های *اسینتوباکتر* به خصوص گونه *اسینتوباکتر بومانی* به علت مقاومت ذاتی و اکتسابی و نیز توانایی بالا در کسب ژن‌های مقاومت از عوامل رایج عفونت‌های بیمارستانی‌اند(۱۷). داروهای انتخابی برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها، پنی‌سیلین‌های وسیع‌الطیف و کرباپنم‌ها هستند، اما امروزه مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها را در حال گسترش است(۱۸). ایفلاکس آنتی‌بیوتیکی یکی از گسترده‌ترین مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین میکروارگانیسم‌ها است. پمپ‌های ایفلاکس در باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی از جمله در گونه‌های بیماری‌زای مهم و هم‌چنین در بیماری‌زاهای فرصت طلب مثل گونه‌های *اسینتوباکتر* وجود دارد. با توجه به دخالت این پمپ‌ها در ایجاد مقاومت، شناخت و آگاهی از شیوع آن‌ها می‌تواند در درمان عفونت‌های باکتریایی برای پزشکان و محققان از اهمیت ویژه ای برخوردار باشد(۱۹،۲۰). این پمپ‌ها، آنتی‌بیوتیک‌هایی که مصرف بالینی دارند را از باکتری خارج می‌کنند و خروج آن‌ها از سلول باکتری کاهش چشمگیری در اثر درمانی آن‌ها می گردد(۲۱،۲۲).

در این مطالعه فراوانی ژن‌های کدکننده پمپ ایفلاکس *adeABC* و ارتباط این پمپ‌های ایفلاکس در ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها در سویه های گونه‌های *اسینتوباکتر* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از CCCP که جز ترکیبات مهار کننده پمپ ایفلاکس می‌باشد، جهت بررسی نقش این پمپ در ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده گردید. اعضای خانواده RND آنتی‌پورترهای پروتون-دارو هستند که با به کارگیری نیروی محرکه پروتونی غشاء، در ازای ورود یون های پروتون به درون سلول ترکیبات دارویی را از سلول خارج می‌کند(۲۳). ترکیب CCCP با مهار سیتوکروم اکسیداز، زنجیره انتقال الکترون را در جایگاه ۳ مهار کرده، فسفریلاسیون را از اکسیداسیون جدا کند و گرادیان الکتروشیمیایی یون‌های پروتون در غشاء تخریب می‌شود. بنابراین ترکیب مذکور می‌تواند همه پمپ‌های ایفلاکس از جمله پمپ‌های ایفلاکس گونه‌های *اسینتوباکتر* را که از نیروی محرکه پروتونی برای خروج مواد ضد میکروبی از سلول استفاده می‌کنند را مهار کرده و سطح مقاومت دارویی را در باکتری کاهش دهد(۲۴).

ایمی پنم از اعضای دسته ای از داروهای بتالاکتام به نام کارباپنم‌ها است که به آنزیم‌های بتالاکتاماز مقاوم می‌باشد. از سال‌های گذشته تا به امروز در شیراز، تهران، تبریز مقاومت به ترتیب ۱۳ درصد، ۵۰ درصد، ۶۸/۴

درصد و ۶۸ درصد گزارش شد(۲۷-۲۵). در این مطالعه میزان مقاومت نسبت به ایمی‌پنم ۵۶ درصد گزارش گردید. میزان مقاومت به وسیله پمپ‌های ایفلاکس در ایمی پنم ۱۳ درصد بود که به نظر می‌رسد بعد از آنزیم های بتالاکتاماز، نقش مهمی در ایجاد مقاومت به بتالاکتام ها ایفا می کنند. این مطالعه از معدود مطالعاتی است که به بررسی نقش ایفلاکس پمپ‌ها در مقاومت به بتالاکتام‌ها پرداخته است. مطالعات نشان داده اند که پمپ‌های ایفلاکس در مقاومت به کلوگزاسیلین در *کلبسیلا نومونیه* و مقاومت به ایمی‌پنم در *انتروباکتر ایروژنز* و گونه *اسینتوباکتر* بومانئی دخالت دارد(۳۰-۲۸). آمینوگلیکوزیدها از داروهای اصلی در درمان عفونت گونه‌های *اسینتوباکتر* به شمار می‌آیند. اما در سال‌های اخیر مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها نیز در این باکتری افزایش یافته است(۳۱). دو مکانیسم اصلی ایجاد مقاومت در مقابل آمینوگلیکوزیدها، موتاسیون در ریبوزوم و یا تغییر آنزیمی ریبوزم می‌باشد، که به وسیله آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزید (Aminoglycoside Modifying Enzymes or AMEs) (۲۸). در مطالعات انجام شده در شهرهای مختلف ایران، مقاومت نسبت به جنتامایسین طیفی از ۳۷ درصد تا ۹۵ درصد گزارش شده است(۱۵،۲۷،۳۷-۳۳). مقاومت نسبت به توبرامایسین نیز در طیفی از ۸/۷ درصد تا ۶۸/۳ درصد گزارش شده است(۳۳،۳۵،۳۷،۳۸). در مطالعه حاضر میزان مقاومت جنتامایسن و توبرامایسین به ترتیب ۸۳ درصد و ۵۴ درصد بود که مشابه این مطالعات می‌باشد. نقش پمپ‌های ایفلاکس در مقاومت به جنتامایسین و توبرامایسین به ترتیب ۱ درصد و ۵ درصد بود.

تتراسیکلین‌ها گروهی از آنتی‌بیوتیک های باکتریوساید می‌باشند که در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی فعال هستند. میزان مقاومت نسبت به تتراسیکلین در شهرهای مختلف ایران از ۵۱ درصد تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است(۱۵،۳۵،۳۷). در مطالعه ما میزان مقاومت به تتراسیکلین ۵۰ درصد بوده است. در این مطالعه یکی از بیش‌ترین میزان مقاومت به وسیله پمپ‌های ایفلاکس در تتراسایکلین دیده شد (۱۲ درصد)، که نشان می‌دهد پمپ‌های ایفلاکس نقش مهمی در مقاومت به تتراسایکلین دارند.

سفتازیدیم از سفالوسپورین‌های نسل سوم است که علیه باکتری‌های گرم منفی مؤثر بوده و در درمان عفونت‌های ناشی از آن مانند عفونت‌های مجاری صفراوی، مننژیت، پنومونی، سپتی سمی و ... به کار می‌رود. مقاومت به سفتازیدیم در گزارش‌های مختلف ۷۹/۷ درصد و ۹۳ درصد بوده است(۳۲،۳۳). در مطالعه حاضر مقاومت به سفتازیدیم ۹۴ درصد بود. مکانیسم اصلی مقاومت به این آنتی بیوتیک، تولید آنزیم بتالاکتاماز با طیف وسیع است(۳۴). میزان مقاومت به وسیله پمپ‌های ایفلاکس در این آنتی‌بیوتیک حدود ۴ درصد بود که نشان دهنده میزان کمی از فعالیت پمپ‌های ایفلاکس در مقاومت به این آنتی‌بیوتیک می‌باشد. اثر پمپ‌های ایفلاکس در مقاومت به سفتازیدیم در سودوموناس ایروژینوزا و گونه *اسینتوباکتر* بومانئی نشان داده شده است(۹،۳۸). آمپی‌سیلین یکی از داروهای خانواده پنی سیلین ها و از دسته بتالاکتام ها است. مقاومت به آمپی سیلین در تبریز و تهران به ترتیب ۹۴ درصد و ۱۰۰ درصد گزارش شده است(۲۶،۳۳). در مطالعه حاضر مقاومت به آمپی‌سیلین ۶۳ درصد بود. مکانیسم اصلی مقاومت به این آنتی‌بیوتیک به صورت تغییر در گیرنده هدف و نیز تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است(۲۶). میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک به وسیله پمپ‌های ایفلاکس حدود ۷ درصد بود.

ماکرولیدها گروهی ازآنتی‌بیوتیک‌های حاوی یک حلقه بزرگ ماکروسیکلیک لاکتونی (حلقه ماکرولید) هستند. از مهم‌ترین داروهای این خانواده می‌توان از اریترومایسین، آزیترومایسین و کلاریترومایسین نام برد(۳۹). مقاومت به اریترومایسین در تهران ۱۰۰ درصد گزارش شده است. در این مطالعه مقاومت به

اریترومایسین ۵۵ درصد، کلاریترومایسین ۳۶ درصد و آزیترومایسین ۲۹ درصد بود. مکانیسم اصلی مقاومت در این دسته تغییر در گیرنده هدف است(۳۶). میزان مقاومت به وسیله پمپ‌ها در گونه‌های *اسینتوباکتر* در اریترومایسین، آزیترومایسین و کلاریترومایسین به ترتیب ۷ درصد، ۱ درصد و ۶ درصد بود. هر چند فروانی فنوتیپ مقاومت در اثر پمپ‌های ایفلاکس در سویه‌های حامل ژن‌های *adeA*، *adeB* و *adeC* بیش‌تر بود، اما بین فنوتیپ مقاومت در اثر پمپ های ایفلاکس و حضور این ژن‌ها از نظر آماری ارتباط معنی‌داری وجود نداشت (p>۰/۰۵). دلیل این امر نیز وجود سایر ژن‌های پمپ‌های ایفلاکس و نیز تفاوت در میزان بیان این ژن‌ها در سویه‌های مختلف گونه‌های *اسینتوباکتر* است(۹،۴۰).

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از پرسنل آزمایشگاه‌های بیمارستان امام رضا و طالقانی کرمانشاه که در جمع‌آوری و کشت اولیه نمونه‌ها ما را یاری نمودند و هم‌چنین از زحمات بی‌دریغ پرسنل آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی، خانم اداباقر و آقایان صفریان و فروغی کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Choi JY, Park YS, Kim CO, Park YS, Yoon HJ, Shin SY, et al. Mortality risk factors of *Acinetobacter baumannii* bacteraemia. J Intern Med 2005; 35(10): 599-603.
2. Brooks G, Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 26th ed. New York, USA: McGraw-Hill Companies; 2013.
3. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9(2): 148-165.
4. Wybo I, Blommaert L, De Beer T, Soetens O, De Regt J, Lacor P, et al. Outbreak of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in a Belgian university hospital after transfer of patients from Greece. J Hosp Infect 2007; 67(4): 374-380.
5. Akalin H, Ozakin C, Gedikoglu S. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Turkey. Infect Control Hosp Epidemiol 2006; 27(4): 404-408.
6. van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pump. Biochem Pharmacol 2000; 60(4): 457-470.
7. Köhler T, Pechère JC, Plésiat P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. Cell Mol Life Sci 1999; 56(9-10): 771-778.
8. Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA. Novel role of Acinetobacter baumannii RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides. J Antimicrob Chemother 2010; 65(2): 228-232.
9. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in Acinetobacter spp. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(3): 947-953.
10. Paulsen IT, Chen J, Nelson KE, Saier MH Jr.Comparative genomics of microbial drug efflux systems. J Mol Microbiol Biotechnol 2001; 3(2): 145-150.
11. Coyne S, Guigon G, Courvalin P, Périchon B. Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in Acinetobacter baumannii with a microarray.

Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(1): 333-340.

12. Koronakis V, Eswaran J, Hughes C. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. Annu Rev Biochem 2004; 73: 467-489.
13. Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Périchon B.Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(10): 4389-4393.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement M100-S22. Wayne, PA, USA: CLSI; 2012.
15. Farajnia S, Azhari F, Alikhani MY, Hosseini MK, Peymani A, Sohrabi N. Prevalence of PER and VEB Type Extended Spectrum Betalactamases among Multidrug Resistant Acinetobacter baumannii Isolates in North-West of Iran. Iran J Basic Med Sci 2013; 16(6): 751-755.
16. Lin L, Ling BD, Li XZ. Distribution of the multidrug efflux pump genes, adeABC, adeDE and adeIJK, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii-Acinetobacter calcoaceticus complex. Int J Antimicrob Agents 2009; 33(1): 27-32.
17. Szabo D, Szentandrassy J, Juhasz Z, Katona K, Nagy K, Rokusz L. Importand PER-1 producing *Psedomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacte baumannii* and VIM-2- producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hungary. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2008; 7: 12.
18. Katragkou A, Roilides E. Successful treatment of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii central nervous system infections with colistin. J Clin Microbiol 2005; 43(9): 4916-4917.
19. Najar Peerayeh SH, Esmaeili D. Antibiotic Efflux Pumps. Ann Military Health Sci Res 2004; 2(1): 301-306.
20. Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J.Prevalence of IS (Aba1) in epidemiologically unrelated Acinetobacter baumannii clinical isolates. FEMS Microbiol Lett 2007; 274(1): 63-66.
21. Livermore DL. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2002; (34):634-640.
22. Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol Mol Biol Rev 2000; 64(4): 672-693.
23. Guglierame P, Pasca MR, De Rossi E, Buroni S, Arrigo P, Manina G, et al. Efflux pump genes of the resistance-nodulation-division family in Burkholderia cenocepacia genome. BMC Microbiol 2006; 6: 66.
24. Piddock LJ, Johnson MM. Accumulation of 10 fluoroquinolones by wild-type or efflux mutant Streptococcus pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(3): 813-820.
25. Hashemizadeh Z, Bazargani A, Emami A, Rahimi MJ. Acinetobacter antibiotic resistance and frequency of ESBL-producing strains in ICU patients of Namazi Hospital (2008-2009). JQUMS 2010; 14(2): 47-53 (Persian).
26. Mohammadimehr M, Feizabadi MM, Bahadori A. Antibiotic resistance pattern of Gram negative Bacilli Caused nosocomial infections in ICUs in khanevadeh and golestan hospital in Tehran- 2007. Annals of Military and Health Sciences Research 2011; 8(4): 283-290 (Persian).

27. Peymani A, Nahaei MR, Farajnia S, Hasani A, Mirsalehian A, Sohrabi N, et al. High prevalence of metallo-beta-lactamase-producing acinetobacter baumannii in a teaching hospital in Tabriz, Iran. Jpn J Infect Dis 2011; 64(1): 69-71.
28. Pages JM, Lavigne JP, Leflon-Guibout V, Marcon E, Bert F, Noussair L, et al. Efflux pump, the masked side of beta-lactam resistance in Klebsiella pneumoniae clinical isolates. PLoS One 2009; 4(3): e4817.
29. Bornet C, Chollet R, Malléa M, Chevalier J, Davin-Regli A, Pagès JM, et al. Imipenem and expression of multidrug efflux pump in Enterobacter aerogenes. Biochem Biophys Res Commun 2003 Feb 21; 301(4): 985-990.
30. Hou PF, Chen XY, Yan GF, Wang YP, Ying CM. Study of the correlation of imipenem resistance with efflux pumps AdeABC, AdeIJK, AdeDE and AbeM in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. Chemotherapy 2012; 58(2): 152-158.
31. Nemec A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside resistance genes and their association With class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. J Med Microbiol 2004; 53(12): 1233-1240.
32. Miller GH, Sabatelli FJ, Naples L, Hare RS, Shaw KJ. The most frequently occurring aminoglycoside resistance mechanisms--combined results of surveys in eight regions of the world. The Aminoglycoside Resistance Study Groups. J Chemother 1995; 7(Suppl 2): 17-30.
33. Aliakbarzade K, Farajnia S, Karimi Nik A, Zarei F, Tanomand A. Prevalence of Aminoglycoside Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii* Isolates. Jundishapur J Microbiol 2014; 7(10): e11924.
34. Hosseini JN, Babazadeh H, Khalkhali HR. An assessment of the sensitivity of *Acinetobacter* spp. burn isolates to ciprofloxacin and some other antibiotics used for treatment. J Jahrom Uni Med Sci. 2009; 7(2): 48-58 (Persian).
35. Rasti A, Erfani Y, Yazdanbod H. Prevalence and antibiotic susceptibility of isolated acinetobacters from blood culture in Shariati hospital. J Payavard Salamat. 2010; 3(3,4): 75-70 (Persian).
36. Saadatiyan Farivar A, Nowroozi J, Emami M. The Prevalence of Acinetobacter in Sergical ICU in Rasoul Akram Hospital in 2004-2005. J Uni Rafsanjan Uni Med Sci 2005; 4(4): 342-347.
37. Mirnejad R, Vafaei S. Antibiotic resistance patterns and the prevalence of ESBLs among strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical specimens. J Gene Microb Immun 2013; (2013): 1-8.
38. Du SJ, Kuo HC, Cheng CH, Fei ACY, Wei HW, Chang SK, et al. Molecular mechanisms of ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine and human infections. Veterinarni Medicina 2010; 55 (4):172-182.
39. Moniri R, Kheltabadi Farahani R, Shajari Gh, Nazem Shirazi MH, Ghasemi A.Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance in acinetobacter spp. with emergence of multidrug-resistant strains. Iranian Journal of Public Health 2010; 39(2): 63-68.
40. Yoon E J, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. RND-type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii: Major role for AdeABC overexpression and aders mutations. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2013; 57(7): 2989-2995.