



ISMJ 2014;17(5): 815-823

دوماهنامه طب جنوب

پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال هفدهم، شماره ۵، صفحه ۸۲۳ - ۸۱۵ (آذر و دی ۱۳۹۳)

تشخیص مولکولی ژن‌های پمپ تراوشی AdeABC در سویه‌های بالینی آسینتوباکتر بومانی و ارزیابی نقش آن در ایجاد مقاومت نسبت به ایمپینم

علیرضا ژاپونی‌نژاد^{۱، ۲}، معصومه صوفیان^۳، احسان ا. غزنوی‌راد^{۲ و ۴*}

^۱ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۲ گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۳ گروه بیماری‌های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۴ مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

(دریافت مقاله: ۹۱/۱۲/۱۷ - پذیرش مقاله: ۹۲/۲/۵)

چکیده

زمینه: یکی از مشکلات ایجاد شده توسط آسینتوباکتر بومانی بروز مقاومت چند دارویی می‌باشد. پمپ‌های تراوشی ایجاد کننده مقاومت چند دارویی نقش اساسی را در ایجاد مقاومت در این باکتری ایفا می‌کنند. هدف از انجام این مطالعه بررسی فراوانی ژن‌های کد کننده پمپ تراوشی AdeABC در ایزوله‌های بالینی آسینتوباکتر بومانی و ارزیابی نقش آن در ایجاد مقاومت نسبت به ایمپینم بوده است.

مواد و روش‌ها: ۵۶ ایزوله آسینتوباکتر بومانی از نمونه‌های بالینی مختلف بیمارستان ولی‌عصر اراک جمع‌آوری شد و توسط آزمایش‌های بیوشیمیایی استاندارد تعیین هویت شدند. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت بازدارنده ایمپینم در حضور و عدم حضور مهار کننده پمپ تراوشی CCCP در ایزوله‌ها با استفاده از نوارهای E-test مطابق با دستورالعمل‌های CLSI تعیین گردید. ژن‌های پمپ تراوشی AdeABC با استفاده از روش PCR در ایزوله‌ها شناسایی شدند.

یافته‌ها: تمامی ۵۶ ایزوله آسینتوباکتر بومانی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفوکسیتین، سفپیم، پیراسیلین/تازوباکتام، ازترنوم و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند، همچنین تمامی ایزوله‌ها با توجه به نتایج MIC نسبت به ایمپینم مقاوم بودند. حداقل غلظت بازدارنده ایمپینم در حضور مهار کننده پمپ تراوشی در ایزوله‌ها کاهشی نداشت. ژن‌های adeA و adeB در ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها و ژن adeC در ۹۶/۵ درصد ایزوله‌ها یافت شدند.

نتیجه‌گیری: پمپ تراوشی AdeABC در ایجاد مقاومت نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نقش دارد و در ایجاد مقاومت نسبت به ایمپینم در ایزوله‌های مورد بررسی نقشی ندارد و مکانیسم‌های دیگر همچون آنزیم‌های کارباپنمازی در ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک نقش مهم‌تری را دارند.

واژگان کلیدی: آسینتوباکتر بومانی، پمپ تراوشی AdeABC، مقاومت به ایمپینم

* اراک، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه میکروبی‌شناسی

Email : e.ghaznavirad@arakmu.ac.ir

مقدمه

آسیتوباکتر بومانی، کوکوباسیل گرم منفی است که از بسیاری از منابع انسانی و محیطی جدا می‌گردد. این باکتری پاتوژن مهم و فرصت‌طلبی است که مسئول عفونت‌های بیمارستانی گوناگونی می‌باشد (۱).

طی دهه گذشته شیوع عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری در حال افزایش می‌باشد. این موضوع به‌ویژه در بیماران بستری شده در بخش‌های مراقبت ویژه، سوختگی و جراحی اهمیت بیشتری دارد (۱-۴).

یکی از مشکلات ایجاد شده توسط آسیتوباکتر بومانی بروز مقاومت چند دارویی (Multi drug resistance) می‌باشد که مشکلات زیادی را در درمان عفونت‌های بیمارستانی ایجاد شده توسط این باکتری چه از لحاظ هزینه‌های درمانی و چه از نظر بهبودی بیماران ایجاد می‌کند (۵، ۲۵ و ۲۶).

به‌طور کلی چندین فاکتور در ایجاد مقاومت در این باکتری دخیل هستند از جمله پمپ‌های تراوشی ایجاد کننده مقاومت (Multi drug efflux pump)، پروتئین‌های غشا خارجی، تولید گروه‌های متنوعی از بتالاکتامازها و تولید آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (۲ و ۶). پمپ‌های تراوشی ایجاد کننده مقاومت نقش اساسی را در ایجاد مقاومت در این باکتری نسبت به طیف وسیعی از داروها و مواد ضد عفونی کننده ایفا می‌کنند (۷ و ۸). این باکتری‌ها با افزایش در بیان این پمپ‌ها به واسطه جهش باعث ایجاد مقاومت نسبت به طیف وسیعی از داروها می‌گردند (۲).

پمپ‌های تراوشی در باکتری‌ها به پنج دسته تقسیم می‌شوند (۹ و ۱۰) که شامل خانواده ATP binding cassette (ABC)، خانواده

small multidrug resistance (SMR)، خانواده resistance nodulation-cell division (RND)، خانواده multidrug and toxic compound extrusion (MATE) و خانواده major facilitator superfamily (MFS) می‌باشند. دسته اول انرژی خود را از ATP به دست می‌آورد. در حالی که مابقی پمپ‌ها با نیروی محرکه پروتونی (Proton motive force) انرژی به دست می‌آورند (۲ و ۳).

از مهم‌ترین پمپ‌های تراوشی که در ایجاد مقاومت در آسیتوباکتر بومانی نقش دارند، پمپ تراوشی RND می‌باشد (۴) که تاکنون سه نوع پمپ تراوشی سه جزئی از این دسته به نام‌های AdeABC، AdeIJK و AdeFGH در آسیتوباکتر بومانی شناسایی شده است (۲).

پمپ تراوشی سه جزئی AdeABC از پروتئین غشای خارجی کد شونده توسط ژن adeC، پروتئین فیوژن غشا کد شونده توسط ژن adeA و پروتئین غشای داخلی کد شونده توسط ژن adeB تشکیل شده است (۲ و ۱۱).

اپرون adeABC در حدود ۸۰ درصد (۵۳ تا ۹۷ درصد) از سویه‌های اسیتوباکتر بومانی وجود دارد (۲ و ۳). بیان بالای این پمپ (overexpression) باعث ایجاد مقاومت چند دارویی (MDR) در سویه‌ها می‌گردد. بیان این پمپ تحت تأثیر سیستم تنظیمی دو جزئی به نام AdeR-AdeS می‌باشد که این سیستم به وسیله اپرون adeRS که در بالا دست اپرون adeABC قرار دارد کد می‌گردد (۲ و ۳).

AdeABC در ایجاد مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها، تتراسایکلین، فلوروکینولون‌ها، تایگسیکلین، ماکرولیدها، کلرامفنیکل

و تری-متوپریم نقش دارد (۲، ۷ و ۱۲). نقش این پمپ در ایجاد مقاومت نسبت به کاربایمها مورد بحث می‌باشد به گونه‌ای که در بعضی از مطالعه‌ها عنوان شده که این پمپ نقشی در ایجاد مقاومت نسبت به کاربایم ندارد (۱۳ و ۱۴) و در برخی دیگر از مطالعه‌ها نتایج به‌دست آمده نشان دهنده این بوده که این پمپ در ایجاد مقاومت نسبت به کاربایمها نقش دارد (۱۵ و ۱۶).

با توجه به اینکه در ایران تاکنون مطالعه‌ای بر روی نقش پمپ تراوشی adeABC در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های آسیتوباکتر بومانی صورت نپذیرفته است، در این بررسی ایزوله‌های آسیتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان ولی عصر اراک از نظر وجود ژن‌های این پمپ تراوشی و نقش آن در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که به‌صورت توصیفی-مقطعی صورت پذیرفت، ۵۶ ایزوله آسیتوباکتر بومانی از نمونه‌های مختلف بالینی خون، مایع مغزی نخاعی، ادرار، ترشحات دستگاه تنفسی و زخم در مدت زمان بین شهریور ۱۳۹۰ تا فروردین ماه ۱۳۹۱ از بیماران بستری شده در بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستان ولیعصر اراک جمع‌آوری گردید. این مطالعه در جلسه کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک با شماره ۹۰-۱۱۳-۵ تصویب شده است.

با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی استاندارد از جمله اکسیداز، TSI، رشد در مک کانکی، OF، اوره، سیتрат، رشد در ۴۳ درجه سانتی‌گراد، SIM، ژلاتین، لایزین دکربوکسیلاز، هیدرولیز آرژنین و Dnase گونه‌های آسیتوباکتر بومانی تعیین شدند.

سویه استاندارد آسیتوباکتر بومانی ۱۹۶۰۶ ATCC به‌عنوان کنترل مثبت در تشخیص ایزوله‌ها استفاده گردید.

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (کربی-بائر) بنا بر معیارهای مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI-۲۰۱۱) تعیین گردید (۱۷). دیسک‌ها محصول شرکت MAST (انگلستان) و به شرح زیر بودند: سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفوکستین، سفپیم، پیپراسیلین/ تازوباکتام، ازترونام، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامایسین، تتراسایکلین و کلبستین. همچنین سویه استاندارد پسودوموناس آئروژینوزا ATCC۲۷۸۵۳ به‌عنوان کنترل آنتی‌بیوگرام استفاده گردید.

حداقل غلظت بازدارنده ایمپنم با استفاده از نوارهای E-test (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) بنا بر دستورالعمل CLSI در حضور و عدم حضور مهار کننده پمپ تراوشی کربونیل سیانید m-کلروفنیل هیدرازون (CCCP) با غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ میکرومولار (μM) جهت بررسی نقش پمپ تراوشی adeABC در ایجاد مقاومت نسبت به ایمپنم در ایزوله‌ها تعیین گردید (۱۷).

استخراج DNA و انجام PCR

استخراج DNA ایزوله‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA محصول کره جنوبی (Bio flux bioer) بنا بر دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت.

آزمون PCR برای شناسایی ژن‌های پمپ تراوشی adeABC که شامل adeA، adeB و adeC بودند در ایزوله‌ها صورت پذیرفت. مشخصات پرایمرهای

مورد استفاده و شرایط واکنش در جدول ۱ شرح داده شده است.

واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام پذیرفت بدین ترتیب که ۱٫۵ میکرولیتر از پرایمر رفت، ۱/۵

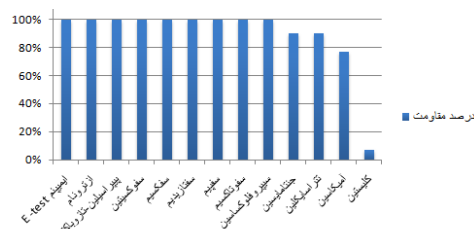
میکرولیتر از پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر از DNA به عنوان الگو، ۲۵ میکرولیتر از Master mix 2XTaq (vivantis) و ۲۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استفاده گردید.

جدول (۱) مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و شرایط واکنش PCR

منبع	سایز محصول pcr	شرایط واکنش	توالی پرایمرها	ژن های پمپ تراوشی
۱۱	۵۱۳ bp	۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی گراد ۱، دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد	F: ATCTTCCTGCACGTGTACAT R: GCGGTCATACTCACTAACC	adeA
۱۱	۵۴۱ bp	۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی گراد ۱، دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد	F: TTAACGATAGCGTTGTAACC R: TGAGCAGACAATGGAATAGT	adeB
۱۱	۲۵۷ bp	۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی گراد ۱، دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد	F: TACGGACTGCTACGCTTAAT R: AACAGGATGACCTGCTAACA	adeC

یافته ها

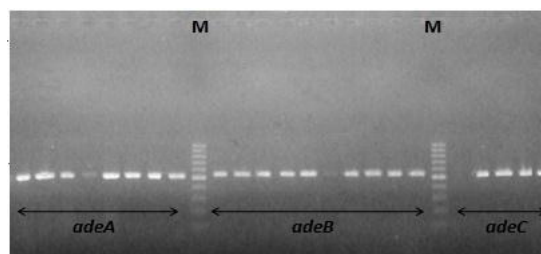
میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های آسیتوباکتر بومانی در این مطالعه بدین ترتیب بود که تمامی ۵۶ ایزوله (۱۰۰ درصد) آسیتوباکتر بومانی نسبت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم، سفنازیدیم، سفوکسیتین، سفپیم، پی پراسیلین / تازوباکتام، از ترونام و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند، در حالی که میزان مقاومت نسبت به سایر آنتی بیوتیک ها به شرح ذیل بود: تتراسایکلین و جنتامایسین در ۵۰ ایزوله (۹۰ درصد)، آمیکاسین در ۴۳ ایزوله (۷۷ درصد) و کلیستین در ۴ ایزوله (۷ درصد) (نمودار ۱).



نمودار (۱) میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های آسیتوباکتر بومانی به دست آمده از بیمارستان ولیعصر اراک

الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد و ولتاژ ۹۰ به مدت ۱ ساعت صورت پذیرفت. سپس ژل با استفاده از نور ماوراء بنفش مورد ارزیابی قرار گرفت، اندازه باندهای به دست آمده در مقایسه با مارکر ۱۰۰bp (Fermentas) مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱).

تعیین توالی DNA جهت ژن های adeA، adeB و adeC در یکی از ایزوله ها صورت پذیرفت و این سویه به عنوان کنترل مثبت ژن های نام برده در آزمون PCR استفاده گردید.



شکل (۱) الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن های پمپ تراوشی adeABC. مارکر ۱۰۰ bp

در بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستان‌ها می‌باشد. سویه‌های مقاوم به کاربایم از این باکتری به مشکل بسیار بزرگی در دنیا تبدیل شده‌اند. این سویه‌ها به‌عنوان معضل جهانی مطرح می‌باشند زیرا درمان این سویه‌ها بسیار مشکل بوده است (۱۸). تنها آنتی‌بیوتیک‌هایی که در بیشتر ارزیابی‌ها در برابر این ایزوله‌ها مؤثر بوده‌اند از دسته پلی‌میکسین‌ها هستند که این آنتی‌بیوتیک‌ها نیز به‌دلیل عوارض جانبی بالا دارای محدودیت می‌باشند (۱۹).

در بررسی کنونی نیز مؤثرترین آنتی‌بیوتیک در برابر ایزوله‌های آسینتوباکتر بومانی، کلیستین بود که تنها ۴ ایزوله (۷ درصد) به این آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند.

نتایج به‌دست آمده از بررسی پیش رو نیز نشان دهنده‌ی این بود که درصد بسیار بالایی از سویه‌های جدا شده در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه دارای مقاومت می‌باشند، به گونه‌ای که تمامی ایزوله‌ها در این مطالعه به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفنازیدیم، سفوکسیتین، سفیم، پپراسیلین / تازوباکتام، ازترونام، سیپروفلوکساسین و ایمپنم مقاوم بودند.

در این مطالعه میزان مقاومت نسبت به ایمپنم ۱۰۰ درصد گزارش گردید که این میزان بسیار بالاتر از مطالعات قبلی صورت پذیرفته بر روی این باکتری در نقاط دیگر ایران می‌باشد. در مطالعه صورت پذیرفته توسط خسروشاهی و شریفی در سال ۸۴-۸۵ بر روی ایزوله‌های بالینی آسینتوباکتر بومانی در شهر قزوین میزان مقاومت نسبت به ایمپنم ۲۶/۶ درصد گزارش شد. در مطالعه صورت پذیرفته توسط هاشمی‌زاده و همکاران در سال ۸۶-۸۷ در شهر شیراز میزان مقاومت نسبت به ایمپنم ۱۶/۳ درصد گزارش گردید (۲۰).

در مطالعه‌ای که توسط شاه‌چراغی و همکاران در سال ۸۷ بر روی ایزوله‌های آسینتوباکتر بومانی جدا شده از

نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) ایزوله‌های آسینتوباکتر بومانی نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم در عدم حضور مهار کننده پمپ تراوشی CCCP نشان داد که تمامی ۵۶ ایزوله (۱۰۰ درصد) نسبت به ایمپنم مقاوم بودند، بدین ترتیب که میزان MIC ایمپنم در ۵۳ ایزوله بیشتر از ۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر، در دو سویه ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و در یک سویه ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر شد.

نتایج حاصل از PCR جهت تعیین میزان فراوانی ژن‌های کد کننده پمپ تراوشی adeABC در ایزوله‌های آسینتوباکتر بومانی در این بررسی در جدول ۲ نشان داده شده است

همچنین میزان MIC ایمپنم در حضور مهار کننده پمپ تراوشی CCCP با غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ میکرومولار (μM) در ایزوله‌هایی از آسینتوباکتر بومانی که دارای ژن‌های کد کننده پمپ تراوشی adeABC بودند به‌صورت قبل باقی ماند و تغییری نداشت.

جدول ۲) فراوانی ژن‌های کد کننده پمپ تراوشی

adeABC در ایزوله‌های آسینتوباکتر بومانی در این مطالعه

نام ژن	تعداد ایزوله‌های دارای ژن	درصد ایزوله‌ها
adeA	۵۶	٪۱۰۰
adeB	۵۶	٪۱۰۰
adeC	۵۴	٪۹۶/۵

بحث

در این مطالعه فراوانی ژن‌های کد کننده پمپ تراوشی adeABC و نقش این پمپ تراوشی در ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم مورد بررسی قرار گرفت، با توجه به اینکه در ایران تاکنون در این مورد مطالعه‌ای صورت نپذیرفته است.

آسینتوباکتر بومانی در دهه اخیر عامل بسیار مهمی جهت به‌وجود آوردن عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه

نمونه‌های گوناگون بالینی بیمارستان‌های منتخب در شهر تهران صورت پذیرفته است، میزان مقاومت نسبت به ایمپینم ۶۸/۴ درصد گزارش گردید. میزان مقاومت نسبت به ایمپینم در مطالعه صورت پذیرفته توسط پیمانی و همکاران در شهر تبریز در سال‌های ۸۸-۸۷، ۶۰ درصد گزارش گردید (۲۱).

بررسی مطالعات صورت پذیرفته نشان دهنده این موضوع است که با گذشت زمان میزان مقاومت نسبت به ایمپینم در ایران رو به افزایش است. به طوری که این میزان از ۱۶/۳ درصد در سال ۸۷-۸۶ به میزان ۱۰۰ درصد در مطالعه حاضر (سال ۹۰-۹۱) رسیده است، که نشان دهنده این است که کارباینها جهت درمان آسیتوباکتر بومانی مناسب نمی‌باشند.

در مطالعه کنونی تمامی ۵۶ ایزوله دارای ژن کد کننده adeB، adeA بودند و فراوانی ژن کد کننده adeC در ایزوله‌ها ۹۶/۵ درصد بود. میزان فراوانی این ژن‌ها در مطالعات قبلی صورت پذیرفته بین ۵۳ تا ۹۷ درصد بوده است (۲-۴).

فراوانی بالای ژن‌های این پمپ در ایزوله‌های برگرفته از بیمارستان ولیعصر در مطالعه پیش رو نشان دهنده این مطلب است که یکی از مکانسیم‌های دخیل در ایجاد مقاومت بالای این ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین و بتالاکتام‌ها پمپ تراوشی adeABC می‌باشد.

پمپ تراوشی adeABC از نیروی محرکه پروتونی جهت تراوش مواد ضد میکروبی به محیط خارج از غشای سیتوپلاسمی استفاده می‌کند (۲ و ۴).

در این مطالعه از CCCP که جز ترکیبات مهار کننده پمپ تراوشی می‌باشد جهت بررسی نقش این پمپ در ایجاد مقاومت نسبت به ایمپینم استفاده گردید.

حداقل غلظت بازدارنده ایمپینم (MIC) در حضور این مهار کننده کاهش نداشت. یافته‌های این بررسی در دیگر پژوهش‌ها بود که نشان دهنده این موضوع بودند که پمپ تراوشی adeABC در ایجاد مقاومت نسبت به کارباینم نقشی ندارد (۱۳، ۱۴ و ۲۲).

این موضوع نشان دهنده این است که دیگر مکانسیم‌های دخیل در ایجاد مقاومت نسبت به کارباینم‌ها از جمله آنزیم‌های کارباینم‌زایی گروه D (مانند OXA23-OXA24-OXA51-OXA58، IMP-VIM-SIM-GIM- (مانند NDM)، آنزیم AmpC به همراه کاهش در بیان پروتئین‌های غشای خارجی نقش مهم‌تری را در ایجاد مقاومت نسبت به کارباینم‌ها در ایزوله‌های مورد بررسی ایفا می‌کنند (۶، ۲۳ و ۲۴). بررسی این آنزیم‌ها در ایزوله‌های اسیتوباکتر بومانی به دست آمده از این مطالعه نیاز به انجام مطالعات دیگری دارد.

با توجه به جداسازی ایزوله‌های اسیتوباکتر بومانی از بیماران بستری شده در بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستان ولیعصر و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا در آنها، لازم است که بررسی‌های بیشتری در زمینه یافتن منشاء و منبع آلودگی در محیط و تجهیزات قرار گرفته شده در این بخش‌ها صورت پذیرد (۲۷). همچنین از محدودیت‌های این طرح نیز لزوم به کارگیری یک روش تایپینگ مانند روش میدان الکتروفورزی در میدان الکتریکی ضربان دار یا pulse field gel electrophoresis اشاره نمود تا بتواند ارتباط این ایزوله‌ها را با هم مشخص نماید.

سپاس و قدردانی

این پژوهش حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی آقای علیرضا ژاپونی‌نژاد می‌باشد. بدین‌وسیله از

انجام این طرح یاری نمودند تشکر به عمل می آید.

معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک بابت تأمین هزینه های مالی و کلیه کسانی که مجریان را در

References:

1. Lin Y-C, Sheng W-H, Chen Y-C, et al. Differences in carbapenem resistance genes among *Acinetobacter baumannii* Acinetobacter genospecies 3 and *Acinetobacter* genospecies 13TU in Taiwan. *International journal of antimicrobial agents* 2010;35:439-43.
2. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011;55:947-53.
3. Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, et al. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010;54:4389-93.
4. Coyne S, Guigon G, Courvalin P, et al. Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010;54:333-40.
5. Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, et al. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008;52:557-62.
6. Huang L, Sun L, Xu G, et al. Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2008;62:326.
7. Schneiders T, Findlay J, Amyes SG. Efflux Pumps in *Acinetobacter baumannii*. *Acinetobacter Biology and Pathogenesis* 2008:105-27.
8. Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA. Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy (J Antimicrob Chemother)* 2010;65:228-32.
9. Zechini B, Versace I. Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria. *Recent patents on anti-infective drug discovery* 2009;4:37-50.
10. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology (J Bacteriol)* 1996;178:5853.
11. Lin L, Ling B-D, Li X-Z. 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. *International journal of antimicrobial agents* 2009;33:27-32.
12. Pannek S, Higgins PG, Steinke P, et al. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- β -naphthylamide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy (J Antimicrob Chemother)* 2006;57:970-4.
13. Bou G, Cerveró G, Domínguez M, et al. Characterization of a Nosocomial Outbreak Caused by a Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Strain with a Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme: High-Level Carbapenem Resistance in *A. baumannii* Is Not Due Solely to the Presence of β -Lactamases. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:3299-305.
14. Quale J, Bratu S, Landman D, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clinical Infectious Diseases* 2003;37:214-20.
15. Hu WS, Yao S-M, Fung C-P, et al. An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007;51:3844-52.
16. Lee Y, Yum JH, Kim C-K, et al. Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the blaOXA-66 gene. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 2010;40:43-8.
17. Clinical and L.S. Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing,

- twenty first informational supplement M100-S21. 2011, CLSI Wayne, PA.
18. Ruiz M, Marti S, Fernandez Cuenca F, et al. Prevalence of ISAba1 in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *FEMS microbiology letters* 2007;274:63-6.
 19. Li J, Rayner CR, Nation RL, et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2006;50:2946-50.
 20. Hashemizadeh Z, Bazargani A, Emami A, et al. *Acinetobacter* antibiotic resistance and frequency of ESBL-producing strains in ICU patients of Namazi Hospital (2008-2009). *The Journal of Qazvin University of Medical Sciences (J Qazvin Univ Med Sci)* 2010;14:47-53.
 21. Peymani A, Nahaei M-R, Farajnia S, et al. High Prevalence of Metallo-b-Lactamase-Producing *Acinetobacter baumannii* in a Teaching Hospital in Tabriz, Iran. *Jpn J Infect Dis* 2011;64:69-71.
 22. Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, et al. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy (J Antimicrob Chemother)* 2006;57:557-61.
 23. Qi C, Malczynski M, Parker M, et al. Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains collected from 2004 to 2007. *Journal of Clinical Microbiology (J Clin Microbiol)* 2008;46:1106-9.
 24. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International journal of antimicrobial agents (Int J Antimicrob Agents)* 2010;35:219-26.
 25. Vahdat K, Rezaee R, Gharibi O. Bacteriology of hospital-acquired infection and antibiotic resistance in a hospital university of Bushehr Port Fatemeh Zahra (s) in 2002-2003. *ISMJ*. 2005; 7(2) :135-140.
 26. Zeki abbasi M, Bahtooie M, Vahdat K, Tavakolli M, Dalaki F. Antibiotic susceptibility of microorganisms of urinary tract infection in adult outpatients in Bushehr port. *ISMJ*. 2008; 10 (2) :153-158.
 27. Japoni-Nejad A, Sofian M, van Belkum A, Ghaznavi-Rad E. Nosocomial Outbreak of Extensively Pan Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Tertiary Hospital in Central Part of Iran. *Jundishapur journal of Microbiology* 2013;69(8): e9892

Original Article

Molecular detection of AdeABC efflux pump genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and their contribution in imipenem resistance

AR. JaponiNejad ^{1,2}, M. Sofian ³, E. Ghaznavi-Rad ^{2,4*}

¹ Student research committee, Arak University of Medical Sciences, Arak- IRAN

² Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University Of Medical Sciences, Arak, IRAN

³ Department of Infectious Disease, Arak University of Medical Sciences, Arak- IRAN

⁴ Molecular research center, Faculty of medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak- IRAN

(Received 7 Mar, 2013 Accepted 25 Apr, 2013)

Abstract

Background: Multi-drug resistance due to *Acinetobacter baumannii* strains has become a significant challenge. Efflux pump plays a vital role in the development of resistance in this bacteria. The aim of this study was to evaluate the frequency of the AdeABC efflux pump genes and its role in resistance to imipenem in clinical isolates of *A.baumannii*.

Materials and methods: A total of 56 isolates of *A.baumannii* were collected from different clinical specimens of Valiasr hospital in the Arak –Iran and all isolates were identified by standard biochemical tests. The Antimicrobial susceptibility patterns were determined by disk diffusion method and minimum inhibitory concentrations of imipenemin via E-test strips with and without CCCP efflux pump inhibitor were determined according to CLSI guidelines. The PCR test was used to detect the AdeABC efflux pump genes in isolates.

Results: All *A.bummannii* isolates were resistant to cefotaxim, ceftazidim, cefepim, ceftazidime, azteronam, piperacillin-tazobactam and ciprofloxacin, as well as all isolates were resistant to imipenem according to the results of the E-test method. Imipenem MIC with efflux pump inhibitor not reduced in all isolates and showed no differences in imipenem activity. The *adeA*, *adeB* and *adeC* genes were found in 100%, 100% and 96.5% of isolates, respectively.

Conclusion: AdeABC efflux system contributes to resistance to other antibiotics and resistance to imipenem has not been involved with this efflux system in *A.baumannii* isolates in current study and other mechanism such as carbapenemase enzymes play vital role to imipenem resistance in *A.baumannii* isolates.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, AdeABC efflux pump, resistance to imipenem

Address for correspondence: Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences
Email: e.ghaznavirad@arakmu.ac.ir

Website: <http://bpums.ac.ir>
Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>