

## Antibiotic Susceptibility and Molecular Typing by REP-PCR among *Acinetobacter baumannii* Isolates

Rezaee D<sup>1</sup>; Zarrini G\*<sup>1</sup>; Ahangarzadeh Rezaee M<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>2</sup>Tabriz Research Center of Infectious and Tropical Diseases, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

\* Corresponding Author. Tel: +984113392707 Fax: +984113356027 E-mail: zarrini@tabrizu.ac.ir

Received: 11 Sep 2013 Accepted: 15 Jan 2014

### ABSTRACT

**Background & Objectives:** *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic Gram-negative pathogen with increasing relevance in a variety of hospital-acquired infections especially among intensive care unit patients. *A. baumannii* is mostly a cause of septicemia, pneumonia and urinary tract infection following hospitalization of patients. In this study antibiotic susceptibility pattern of *A.baumannii* isolates and molecular typing among isolates resistant by REP-PCR were determined.

**Methods:** During study, the *A. baumannii*, were isolated from hospitals in Tehran. The isolates were identified using standard biochemical tests and antibiotic susceptibility was determined by the disk diffusion method. Extraction of DNA and molecular typing of isolates performed using CTAB method and REP-PCR, respectively.

**Results:** In this study 75 *A. baumannii* isolates separated from patients with an average age of  $51 \pm 18.45$  years. The highest resistance rate was against azteronam (97%), ceftazidim (93%), cefepime (93%), piperacillin-tazobactam (93%), ciprofloxacin (93%) and ticarcillin (93%) while the lowest resistance rate was against tigecycline (n= 51, 68%), followed by tobramycin (n=24, 32%), ampicillin-sulbactam (n=21, 28%), amikacin (n=16, 21%), and carbapenems (n=11, 15%). The REP-PCR in resistant of *A. baumannii* isolates showed that the genotypes of A, B and C are the predominant genotypes in the resistant antibiotics.

**Conclusion:** This study showed a high percentage of resistance to antimicrobial agents among genotypes A, B, and C of the *A. baumannii* isolates; therefore strategies to control the spread of *A. baumannii* isolates must be designed and evaluated.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*; Antibiotic Resistance; molecular Typing; REP-PCR

## حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تیپ‌بندی مولکولی بوسیله‌ی REP-PCR در جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی

دلسوز رضایی<sup>۱</sup>؛ غلامرضا زرینی<sup>۱\*</sup>؛ محمد آهنگرزاده رضایی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران <sup>۲</sup> مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

\*نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۱۱۳۳۹۲۷۰۷ فاکس: ۰۴۱۱۳۳۵۶۰۲۷ پست الکترونیک: zarrini@tabrizu.ac.ir

### چکیده

**زمینه و هدف:** آسینتوباکتر بومانی<sup>۱</sup> پاتوژنی گرم منفی است که ارتباط نزدیکی با انواعی از عفونت‌های بیمارستانی ایجاد شده بویژه در بیمارستان بخش مراقبت‌های ویژه دارد. این باکتری عمدتاً عامل سپتی‌سمی، نومونی و عفونت ادراری بیمارستان بستری شده در بیمارستان می‌باشد. در این مطالعه حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی و الگوی تیپ‌بندی مولکولی بوسیله‌ی PCR توالی‌های تکراری پالیندرومیک خارج ژنی (REP-PCR) در میان جدایه‌های مقاوم تعیین گردید.

**روش کار:** در طول این مطالعه جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیمارستان‌های تهران مورد مطالعه قرار گرفت. جدایه‌ها با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی استاندارد شناسایی و حساسیت گونه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، با روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید. استخراج DNA با روش CTAB و تیپ‌بندی مولکولی جدایه‌ها با روش REP-PCR انجام گرفت.

**یافته‌ها:** در این مطالعه از ۷۵ آسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیمارستان با میانگین سنی  $51 \pm 18/45$  سال بیشترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آزترونام (۹۷٪)، سفتازیدیم (۹۳٪)، سفپیم (۹۳٪)، تیکارسیلین (۹۳٪)، سیپروفلوکساسین (۹۳٪) و پیپراسیلین-تاروباکتام (۹۳٪) بوده در حالی که کمترین مقاومت به ترتیب در برابر آنتی‌بیوتیک‌های تاجیسایکلین (۶۸٪)، توبرامایسین (۳۲٪)، آمپی‌سیلین-سولباکتام (۲۸٪)، آمیکاسین (۲۱٪) و کارباپنم‌ها (۱۵٪) بود. REP-PCR نشان داد شایعترین ژنوتیپ‌ها میان آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم، A، B و C بودند.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان دهنده‌ی مقاومت بالا به عوامل ضد میکروبی بخصوص در ژنوتیپ‌های A، B و C جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی می‌باشد. بنابراین استراتژی‌هایی برای کنترل گسترش سویه‌های مقاوم باید طراحی و ارزیابی شود.

**کلمات کلیدی:** آسینتوباکتر بومانی؛ مقاومت آنتی‌بیوتیک؛ تیپ‌بندی مولکولی؛ REP-PCR

دریافت: ۹۲/۶/۲۰ پذیرش: ۹۲/۱۰/۲۵

### مقدمه

آسینتوباکتر بومانی باکتری گرم منفی بصورت کوکسی یا کوکوباسیل می‌باشد که قدرت تخمیر ندارد [۱، ۲]. این باکتری نیازمندی‌های غذایی کمی برای رشد داشته و می‌تواند در شرایط نامساعد، سطوح خشک و همچنین محیط آبی بمدت طولانی زنده بمانند [۳]. آسینتوباکتر بومانی به ندرت عامل عفونت‌های سخت در افراد با سطح ایمنی طبیعی می‌باشد، همچنین کمتر بعنوان فلور طبیعی بدن شخص سالم شناخته شده است. اما عفونت این باکتری

بویژه در بیمارانی که در بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستان‌ها بستری هستند، بسیار خطرناک می‌باشد [۴]. این باکتری باعث طیف وسیعی از عفونت‌ها بویژه عفونت‌های دستگاه ادراری، مننژیت، باکتری، عفونت زخم، عفونت پوست و بافت نرم و عفونت‌های دستگاه تنفس می‌شود [۱، ۲، ۵]. آسینتوباکتر بومانی به عوامل ضد میکروبی بسیار مقاوم است که این مقاومت می‌تواند ذاتی و یا از طریق بدست آوردن عوامل ژنتیکی مقاومت باشد. به طوری که این باکتری توانایی مقاومت

PCR-Fingerprinting روشی مبتنی بر REP-PCR است. در این تکنیک از پرایمرهای consensus برای توالی‌های REP موجود در کروموزوم بسیاری از باکتری‌ها، استفاده می‌شود. در *آسینتوباکتر بومانی* نواحی REP، توالی‌های حفاظت شده و شامل ۳۵ نوکلئوتید با تکرارهای معکوس‌اند که می‌توانند کپی-های تکی یا چندتایی در ژنوم باکتری داشته باشند [۱۰-۱۲].

### روش کار

#### جامعه مورد مطالعه و نمونه‌ها:

در این مطالعه که از نوع توصیفی-تحلیلی است جدایه‌های *آسینتوباکتر* در فواصل زمانی اردیبهشت سال ۹۱ تا مهر همان سال از نمونه‌های بالینی (شامل، سوختگی، خون، ادرار، زخم، خلط و نای) بیماران بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های تهران جدا گردید. مطالعه‌ی انجام گرفته در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه تبریز و آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام گرفت.

**روش‌های آزمایشگاهی:** از نمونه‌های بالینی جدا شده از بیماران لام رنگ آمیزی گرم تهیه شده و روی محیط‌های کشت بلاد آگار و مک‌کانگی آگار کشت داده شد. سپس برای تعیین هویت، کوکوباسیل‌های گرم منفی و لاکتوز منفی رشد یافته روی محیط کشت مک‌کانگی آگار که دارای تست اکسیداز منفی باشند، به محیط‌های افتراقی از جمله سیمون سیترات، کلیکلر و TSI تلقیح شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد، کلنی‌های مشکوک به *آسینتوباکتر بومانی* با کمک تست-های OF و رشد در دمای ۴۴ درجه از سایر گونه‌ها متمایز می‌شدند.

**تعیین حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها:** حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با روش انتشار از دیسک (روش Kirby-Bauer) طبق توصیه دستورالعمل مؤسسه‌ی استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) نسبت به

قابل توجهی در برابر کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی را داراست که منجر به مقاومت چند دارویی در آن شده است. امروزه *آسینتوباکتر بومانی* به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها شامل آمینوگلیکوزیدها، کارباپنم‌ها، سفالوسپورین‌ها و بتالاکتام‌ها مقاومت نشان می‌دهد [۴، ۶، ۷]. به منظور شناسایی منبع عفونت، گسترش و شیوع جدایه‌ها در جمعیت‌های میکروبی و کنترل عامل عفونی، آن‌ها را تیپ بندی می‌کنند. وجود ژنوتیپ‌های مختلف در میان جدایه‌های باکتری در یک مکان نشان دهنده‌ی انتقال آن باکتری از مکان‌های دیگر بوده که این موضوع در اهمیت و شیوع پاتوژن و درمان صحیح برای جلوگیری از گسترش عامل پاتوژن بسیار مهم می‌باشد. روش‌های زیادی برای تیپ‌بندی مولکولی وجود دارد از روش-های ژنوتیپی که در تیپ‌بندی *آسینتوباکتر بومانی* استفاده می‌شود می‌توان پالس فیلد ژل الکتروفوریزس<sup>۱</sup>، ریبوتایپینگ<sup>۲</sup>، DNA پلی‌مورف تکثیر یافته تصادفی<sup>۳</sup>، پلی‌مورفیسم طول قطعات تکثیر شده<sup>۴</sup> و PCR توالی‌های تکراری پالیندرومیک خارج ژنی (REP-PCR)<sup>۵</sup> را نام برد. بر اساس گزارشی که توسط Liu و همکارانش منتشر گردید، نشان داده شد که اگرچه تعیین ژنوتیپ *آسینتوباکتر بومانی* با PFGE، به عنوان روش استاندارد و طلایی در نظر گرفته شده ولی زمان بر، پیچیده و هزینه‌بر است با این حال REP-PCR یک روش ساده، سریع و ارزانتر است که برای مطالعه‌ی شیوع کلون‌های مختلف *A. baumannii* استفاده می‌شود. تحقیقی در کشور اسپانیا نیز نشان داد که REP-PCR برای مطالعه‌ی شیوع کلون‌های مختلف *A. baumannii* بسیار مناسب است [۸، ۹].

<sup>1</sup>Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

<sup>2</sup>Ribotyping

<sup>3</sup>Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

<sup>4</sup>Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

<sup>5</sup>Repetitive Extragenic Palindromic PCR

درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت انکوبه کرده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰ رسوب دادیم. با اتانول ۷۰٪ (۳۰۰ μL)، DNA را شستشو و با دور ۷۰۰۰ یا ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و بعد الکل را دور ریخته و به هر نمونه ۵۰ μL از بافر TE اضافه و در ۳۷ درجه سانتیگراد برای ۲۰ دقیقه قرار دادیم [۱۴].

### تایپینگ جدایه‌ها با روش REP-PCR:

استخراج DNA جدایه‌های *آسینتوباکتر بومانی* با روش CTAB انجام گرفت [۱۴]. واکنش REP-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت که شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10X، ۲۰۰ میکرومولار از هر کدام از dATP، dGTP، dCTA، dTTA، ۰/۵ میکرولیتر  $MgCl_2$  (۳ میلی مولار)، ۲۵ پیکومول از هر کدام از  $REP_1$  و  $REP_2$ ، ۲ واحد آنزیمی (۰/۵ میکرولیتر) از آنزیم Taq DNA Polymerase، ۳ میکرولیتر از DNA استخراج شده از جدایه‌های *آسینتوباکتر بومانی* و ۱۶/۱ میکرولیتر آب مقطر انجام شد. برنامه دستگاه ترموسایکر برای واکنش REP-PCR شامل دناتوراسیون اولیه (initial denaturation) در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و سیکل اصلی ۳۵ بار تکرار شامل دناتوراسیون (denaturation) در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها (annealing) به مدت ۱ دقیقه در ۵۷ درجه سانتیگراد، تکثیر (extension) به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و تکثیر نهایی (final extension) یک سیکل به مدت ۱۶ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد بود. در روش REP-PCR، جفت پرایمر 3-GCGCCGICATCAGGC-5'  $REP_1$  و 3-ACGTCTTATCAGGCCTAC-5'  $REP_2$ ، برای تکثیر عناصر REP در کروموزوم‌های ژنوم باکتری‌ها استفاده شد [۹]. حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی *آسینتوباکتر بومانی* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه با توجه به اعداد به دست آمده و مقایسه آن با دستورالعمل مؤسسه‌ی استانداردهای

آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین-سولباکتام (۱۰/۱۰ μg/ml)، پپراسیلین-تازوباکتام (۱۰/۱۰ μg/ml)، آزترونام (۳۰ μg/ml)، تیکارسیلین (۳۰ μg/ml)، سفتازیدیم (۳۰ μg/ml)، سلفپیم (۳۰ μg/ml)، تایجی‌سایکلین (۳۰ μg/ml)، توبراماسین (۱۰ μg/ml)، آمیکاسین (۳۰ μg/ml)، ایمی‌پنم (۱۰ μg/ml) و م‌روپنم (۱۰ μg/ml) (MAST, Merseyside, UK) تعیین گردید. از کلنی‌های باکتری، با لوله‌ی نیم مک‌فارلند، سوسپانسیون تهیه شد و پس از آغشته کردن سوآپ استریل با سوسپانسیون بخوبی بر روی محیط مولر هینیتون آگار پخش گردید سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به فاصله‌ی استاندارد از همدیگر قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد قطر هاله‌ی رشد پس از ۳ بار تکرار برای هر آنتی‌بیوتیک اندازه‌گیری گردید [۱۳]. دیسک‌ها از شرکت Liofilichem ایتالیا تهیه شده بود. از سویه‌ی استاندارد *آسینتوباکتر بومانی* ATCC 19606 به عنوان شاهد استفاده شد.

**استخراج DNA:** استخراج DNA جدایه‌های *آسینتوباکتر بومانی* با روش CTAB<sup>۱</sup> انجام گرفت. ابتدا: یک لوپ پر از باکتری را در ۳۰۰ μL آب مقطر ریخته و ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰ ppm قرار داده، ۲۷۰ μL از بافر TE<sup>۲</sup> و ۳۰ μL از ۱۰٪ SDS<sup>۳</sup> و ۸ μL از پروتئیناز K را اضافه و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. به هر نمونه ۱۰۰ μL از ۱۰۰ mM NaCl (۵mM) و ۸۰ μL از ۱۰٪ CTAB اضافه و بعد مخلوط و در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد برای ۱۰ دقیقه انکوبه، به هر نمونه ۷۰۰ μL کلروفرم اضافه و در سانتریفیوژ با دور ۱۱۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه قرار داده شد. فاز مایع رویی را جدا و ۴۰۰ μL ایزوپروپانول اضافه و در ۲۰-

<sup>1</sup> Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB)

<sup>2</sup> Tris-EDTA buffer

<sup>3</sup> Sodium dodecyl sulfate (SDS)

محیط OF را داشته که در دو دمای ۳۷ و ۴۴ درجه سانتیگراد به خوبی رشد کردند. بیشترین جدایه‌ها از بخش سوختگی (۳/۵۷٪) بودند. تعداد ۵۴ (۷۲٪) مورد از جدایه‌ها، از مردان و ۲۱ (۲۸٪) مورد از زنان با محدوده سنی ۱۴ تا ۸۶ سال با میانگین سنی  $51 \pm 18/45$  سال جدا شدند که در جدول ۱ توزیع فراوانی جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی بر حسب نوع نمونه‌ی بالینی آورده شده است.

جدول ۱. توزیع فراوانی جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی بر حسب نوع

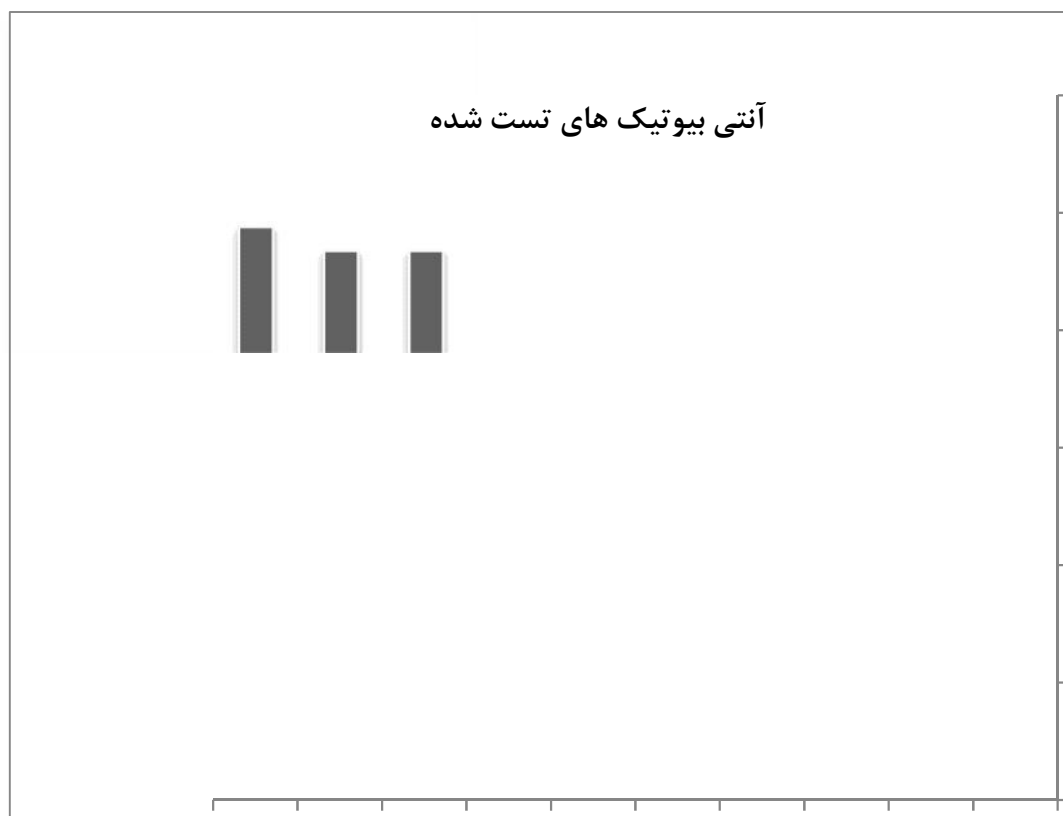
نمونه‌ی بالینی		نوع نمونه
تعداد	درصد	تراشه
۱۸	۲۴	ادرار
۸	۱۱	خون
۱	۱	خلط
۴	۵	سوختگی
۴۳	۵۷/۳	زخم
۱	۱	

در این مطالعه جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی مقاومت بالایی را به آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده نشان دادند. نمودار ۲ حساسیت آنتی‌میکروبی جدایه

آزمایشگاهی و بالینی (CLSI)، تعیین گردید. ارزیابی و تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم افزار SPSS version 16 انجام گردید. آنالیز آماری داده‌ها با محاسبه‌ی توزیع فراوانی داده‌ها، میانگین توزیع نرمال و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون Chi Square انجام گردید.

### یافته‌ها

در طول ۶ ماه (اردیبهشت تا مهر ماه سال ۱۳۹۱) از بیماران بخش مراقبت‌های ویژه و از نمونه‌های مختلف بیمارستان‌های تهران ۷۵ جدایه‌ی آسینتوباکتر بومانی جمع‌آوری شد. در این تحقیق ۷۵ جدایه‌ای که بعنوان آسینتوباکتر بومانی مشخص گردیدند، الگوی بیوشیمیایی یکسانی داشتند. خصوصیات بیوشیمیایی آنها شامل کوکوباسیل‌های گرم منفی، واکنش آلکالین / آلکالین در محیط TSI، اکسیداز منفی، غیر متحرک، کاتالاز مثبت، سیترات مثبت و تولید اسید از گلوکز در



نمودار ۱. توزیع فراوانی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی

های *آسینتوباکتر بومانی* را با دیسک‌های آنتی‌بیوتیک نشان می‌دهد.

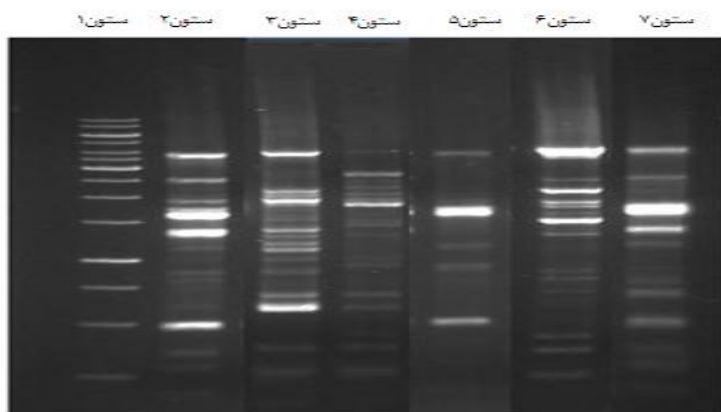
### REP-PCR

دسته‌بندی و تیپ‌بندی مولکولی بوسیله‌ی REP-PCR نشان داد که جدایه‌های مقاوم به ۶ کلاستر مشخص اصلی (A (12=n), B (19=n), C (18=n), D (9=n), E (6=n) و F (7=n) تعلق دارند. شکل ۱ الگوهای REP-PCR موجود در ایزوله‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. شایعترین ژنوتیپ‌های مشاهده شده به آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم مطالعه شده، ژنوتیپ‌های A, B و C بودند. توزیع و فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه میان کلون مختلف جدا شده در جدول ۲ آورده شده است. بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تست شده و قرارگیری

آنها در کلون‌های موجود ارتباط معناداری وجود ندارد.

### بحث

الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های پاتوژن بیمارستانی ممکن است از یک کشور به کشور دیگر و یا در مناطق مختلف یک کشور متفاوت باشد. مطالعات قبلی نشان می‌دهند که درمان خط مقدم برای عفونت‌های ناشی از *آسینتوباکتر بومانی* شامل آمیکاسین، کارباپنم‌ها، سفتازیدیم و کوئینولون-هاست [۱۵، ۱۶]. این مطالعه نشان داد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی *آسینتوباکتر بومانی* در سوبه‌های جدا شده از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های تهران بالا می‌باشد. نتایج بررسی



شکل ۱. الگوی REP-PCR در میان ایزوله‌های *A. baumannii*. ستون ۱: سایز مارکر 1 kbp؛ ستون ۲: ژنوتیپ A؛ ستون ۳: ژنوتیپ B؛ ستون ۴: ژنوتیپ C؛ ستون ۵: ژنوتیپ D؛ ستون ۶: ژنوتیپ E؛ ستون ۷: ژنوتیپ F.

جدول ۲. مقایسه‌ی حساسیت آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه میان کلون‌های موجود در جدایه‌های *آسینتوباکتر بومانی*

REP-type (تعداد)	سفتازیدیم (تعداد)	سفیم (تعداد)	پیپراسیلین-تازوباکتام (تعداد)	تیکارسیلین (تعداد)	آزترونام (تعداد)	آمی‌سیلین (تعداد)	سولباکتام (تعداد)	آمیکاسین (تعداد)	فلیچساکلین (تعداد)	توبرامیسین (تعداد)	ایمی‌پنم (تعداد)	مرونیوم (تعداد)
A (12=n)	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۰	۳	۸	۱۰	۱۰	
B (19=n)	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۶	۷	۱۵	۱۶	۱۶	
C (18=n)	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۹	۱۵	۹	۱۷	۱۸	۱۸	
D (9=n)	۹	۹	۹	۹	۹	۹	۶	۰	۳	۶	۶	
E (6=n)	۶	۶	۶	۶	۶	۶	۴	۰	۲	۴	۴	
F (7=n)	۷	۷	۷	۷	۷	۷	۳	۰	۱	۴	۴	

نتایج حاصل نشان می‌دهد بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تست شده و قرارگیری آن‌ها در کلون‌های موجود ارتباط معناداری وجود ندارد.

استراتژی‌های درمان در هر منطقه‌ی جغرافیایی باشد. همان‌طور که در الگوهای REP-PCR نشان داده شد (جدول ۳) شایعترین ژنوتیپ‌های مشاهده شده در آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم، ژنوتیپ‌های A, B و C بودند که نشان می‌دهد آن‌ها از منبع مشترکی منشأ گرفته‌اند. در مطالعه‌ای که در کرمانشاه انجام گرفت تقریباً مشابه با نتایج مطالعه حاضر بیشترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم، سفپیم و سفپودکسیم میان ژنوتیپ‌های A و B قرار داشتند [۲۰].

در نتایج مطالعه حاضر، بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تست شده و قرارگیری آنها در کلون‌های موجود ارتباط معناداری وجود نداشت. هدف از تیپ‌بندی مولکولی با REP-PCR وجود مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در کلون‌های مختلف بوده است که وجود ۶ نوع کلون مختلف در میان جدایه‌های مقاوم احتمالاً ناشی از انتشار کلونی و ایجاد تیپ‌های مختلف مقاوم در میان سویه‌های *آسینتوباکتر بومانی* بوده است. با توجه به مشاهده‌ی مقاومت بالا در میان سویه‌های *آسینتوباکتر بومانی* تجزیه و تحلیل REP-PCR برای تشخیص سویه‌های رایج در بخش‌های مختلف، پیشگیری از گسترش بیشتر از آن‌ها به محیط بیمارستان‌ها و مکان‌های دیگر و درمان مناسب این پاتوژن بیمارستانی بسیار ارزشمند می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

با مقایسه‌ی نتایج حاصل از این تحقیق و مطالعات مشابه می‌توان به شیوع بالای عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *آسینتوباکتر بومانی* که مقاومت بالایی داشته پی برد. با توجه به الگوهای ژنوتیپی مختلف در میان جدایه‌های *آسینتوباکتر بومانی* که دارای ۶ ژنوتیپ بودند، به نظر می‌رسد که انتشار کلونی و گسترش سویه‌های مقاوم وجود دارد.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها در مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آزترونام (۹۷٪)، سفنازیدیم (۹۳٪)، سفپیم (۹۳٪)، تیکارسیلین (۹۳٪)، سپیروفلوکساسین (۹۳٪) و پپراسیلین-تازوباکتام (۹۳٪) بوده در حالی که بیشترین حساسیت به ترتیب در برابر آنتی‌بیوتیک‌های تایجیسی‌اکلین (۶۸٪)، توبرامایسین (۳۲٪)، آمپی‌سیلین-سولباکتام (۲۸٪)، آمیکاسین (۲۱٪) و کاربانپم‌ها (۱۵٪) مشاهده گردید. در یک بررسی در کاشان از ۶۰ سویه‌ی *آسینتوباکتر بومانی* به ترتیب بیشترین مقاومت به آمیکاسین (۴۸٪)، توبرامایسین (۴۱٪)، سفنازیدیم (۳۶٪)، پپراسیلین-تازوباکتام (۳۱٪)، ایمی‌پنم (۱۵٪) و آمپی‌سیلین-سولباکتام (۱۲٪) نشان دادند [۱۷]. در مطالعه‌ای در اصفهان الگوی ضد میکروبی سویه‌های *آسینتوباکتر بومانی* نشان داد که ۵۲٪ سویه‌ها به کاربانپم‌ها، ۶۶٪ به سفنازیدیم، ۶۴٪ به آمیکاسین و ۵۴٪ به پپراسیلین-تازوباکتام مقاوم بودند. در مطالعه‌ای که Hujer و همکارانش روی ۷۵ سویه‌ی *آسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بیماران نظامی و غیر نظامی جنگ عراق و افغانستان انجام دادند حداقل ۸۰٪ از جدایه‌ها نسبت به سفالوسپورین‌های با طیف وسیع، ۴۹٪ به آمپی‌سیلین-سولباکتام، ۲۰٪ به ایمی‌پنم و ۸۱٪ حداقل به یکی از آمینو گلیکوزیدها مقاوم بودند [۱۸]. در مطالعه‌ای که توسط Wang و همکاران در سال ۲۰۰۳ بر روی اپیدمی‌های ناشی از *آسینتوباکتر بومانی* مقاوم به دارو در بخش ICU انجام گرفت مشخص گردید که تمام سویه‌ها به آزترونام، آمیکاسین، آمپی‌سیلین-سولباکتام، سفنازیدیم، سفپیم، سپیروفلوکساسین، ایمی‌پنم، مروپنم، پپراسیلین-تازوباکتام و تیکارسیلین-کلولانیک اسید مقاوم بودند [۱۹]. تفاوت در یافته‌ها ممکن است ناشی از تنوع در نمونه‌های بالینی مورد بررسی، زمان انجام مطالعه و

## References

- 1- Bergogne-Berezin E, Towner K. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev. 1996 Apr; 9(2): 148.
- 2- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008 Apr; 21(3): 538-582.
- 3- Baumann P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. J Bacteriol. 1968 July; 96(1): 39-42.
- 4- Boroumand M, Akhyani H, Sheikhvatan M, Yazdi SH, Saboorian R, Hashemi S, et al. Evaluation of antimicrobial resistance of *acinetobacter baumannii* to imipenem, ciprofloxacin and ceftazidime using E test. Iranian J Public Health. 2009 Apr; 38(2): 130-133.
- 5- Mak JK, Kim MJ, Pham J, Tapsall J, White PA. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2009 Nov; 63(1): 47-54.
- 6- Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. Antimicrob Agents Chemother. 1993 Apr; 37(4): 750-753.
- 7- Shi ZY, Liu PYF, Lau YJ, Lin YH, Hu BS, Shir JM. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Diagn Microbiol Infect Dis. 1996 Feb; 24(2): 81-85.
- 8- Liu P Y , Wu WL. Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. Diagn Microbiol Infect Dis. 1997 Sep; 29(1): 19-28.
- 9- Bou G, Cervero G, Dominguez M, Quereda C, Martínez-Beltrán J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem-and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 2000 Sep; 6(12): 635-643.
- 10- Koeleman JG, Stoof J, Biesmans DJ, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *acinetobacter* genomic species and typing of *acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 1998 Sep; 36(9): 2522-2529.
- 11- Koeleman JG, Stoof J, Van Der Bijl MW, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Identification of epidemic strains of *acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. J Clin Microbiol. 2001 Jan; 39(1): 8-13.
- 12- Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann M, Garaizar J, et al. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. J Clin Microbiol. 1996 Jun; 34(6): 1519-1525.
- 13- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement (M100-S19). Wayne, PA: CLSI; 2011.
- 14- Green MR, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012: 87-90.
- 15- Prashanth K, Badrinath S. In vitro susceptibility pattern of *Acinetobacter* species to commonly used cephalosporins, quinolones, and aminoglycosides. Indian J Med Microbiol. 2004 Jun; 22(2): 97.
- 16- Van Looveren M, Goossens H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. Clin Microbiol Infect. 2004 Aug; 10(8): 684-704.



- 17- Farahani Kheltabadi R, Moniri R, Shajari GR, Shirazi N, Hossein M, Musavi SGA, et al. Antimicrobial susceptibility patterns and the distribution of resistance genes among *Acinetobacter* species isolated from patients in shahid Beheshti hospital, Kashan. KAUMS J (FEYZ). 2009 Jan; 12(4): 61-67. (Full text in Peersian)
- 18- Shaw K, Rather P, Hare R, Miller G. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol Rev. 1993 Mar; 57(1): 138.
- 19- Wang S, Sheng W, Chang Y, Wang L, Lin H, Chen M, et al. Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care unit. J Hosp Infect. 2003 Feb; 53(2): 97-102.
- 20- Mohajeri P, Farahani A, Feizabadi MM, Davoodabadi A, Noroozi B. The prevalence of ESBL isolates of *acinetobacter baumannii* using pulsed-field gel electrophoresis. Zahedan J Res Med Sci. 2013 Sep; 15(7): 29-33.