

## Evaluation of prevalence of colistin and fosfomycin resistance genes in the clinical *Acinetobacter baumannii* isolates producing carbapenemase and ESBL

Maryam Nikbakht<sup>1</sup>, Mohammad Karim Rahimi<sup>1</sup>, Samin Taghizadeh Marand<sup>1</sup>, Seyyed Khalil Shokouhi Mostafavi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, TeMS.C, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background:** There are many reports of antibiotic resistance in ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) producing strains of *Acinetobacter baumannii* including cephalosporins from all over the world. This research aimed to determine the frequency of colistin-resistant genes (*mcr-2*, *mcr-1*) and fosfomycin-resistant genes (*fos A3*) in ESBL-producing and carbapenem-resistant *A. baumannii* strains.

**Materials and methods:** *Acinetobacter baumannii* isolates collected from selected hospitals in Tehran were confirmed by detecting the bla OXA-51-lik gene using PCR. Antibiograms were performed using the disk diffusion method, and the combined disk method was used to identify ESBL-producing isolates. The minimum inhibitory concentration (MIC) for colistin was obtained using the E-test. The presence of colistin (*mcr-1*, *mcr-2*) and fosfomycin (*fosA3*) resistance genes was evaluated using PCR.

**Results:** Of 219 clinical isolates of *A. baumannii*, 71 isolates with ESBL and carbapenem resistance were detected. The 100% of *A. baumannii* isolates were resistant to cephalosporins and piperacillin. The antibiotic resistance to ciprofloxacin, amikacin, gentamicin was evaluated at 87.3%, 71.8%, and 67.6%, respectively. The ESBL-producing and carbapenem-resistant isolates were 100% sensitive to colistin, fosfomycin and tigecycline. In these strains, *fosA3*, *mcr-1*, and *mcr-2* genes were not detected.

**Conclusion:** In the present study, common genes that cause resistance to the antibiotics fosfomycin and colistin were not observed among ESBL-producing and carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates. Therefore, prescribing these antibiotics is still effective and their excessive use should be avoided.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, *ESBL*, *Carbapenem resistant*.

**Cited as:** Nikbakht M, Rahimi MK, Taghizadeh Marand S, Shokouhi Mostafavi SK. Evaluation of prevalence of colistin and fosfomycin resistance genes in the clinical *Acinetobacter baumannii* isolates producing carbapenemase and ESBL. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2025; 35(3): 314-322.

**Correspondence to:** Seyyed Khalil Shokouhi Mostafavi

**Tel:** +98 2122006660

**E-mail:** shokouhi@iautmu.ac.ir

**ORCID ID:** 0000-0002-6227-3376

**Received:** 20 Oct 2024; **Accepted:** 1 Jan 2025

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی

دوره ۳۵، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۴، صفحات ۳۱۴ تا ۳۲۲

## بررسی فراوانی ژن‌های مقاومت به کولیستین و فسفومایسین در جدایه‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی تولیدکننده کارباپنماز و ESBL

مریم نیک بخت<sup>۱</sup>، محمدکریم رحیمی<sup>۱</sup>، ثمین تقی زاده مرند<sup>۱</sup>، سید خلیل شکوهی مصطفوی<sup>۱</sup><sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

### چکیده

سابقه و هدف: مواردی از مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های متعدد توسط جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) از جمله سفالوسپورین‌ها از سراسر دنیا گزارش می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی فراوانی ژن‌های مقاومت به کولیستین (*mcr-1* *mcr-2*) و فسفومایسین (*fosA3*) در بین جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی تولیدکننده ESBL و کارباپنماز انجام شد. روش بررسی: جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های منتخب تهران، با ردیابی ژن *bla OXA-51-lik* با تکنیک PCR مورد تأیید قرار گرفتند. آنتی بیوگرام با روش انتشار دیسک انجام شد و جهت شناسایی جدایه‌های مولد ESBL روش دیسک ترکیبی استفاده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برای کولیستین با استفاده از E-test بدست آمد. با استفاده از تکنیک PCR حضور ژن‌های مقاومت به کولیستین (*mcr-1* *mcr-2*) و فسفومایسین (*fosA3*) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: از ۲۱۹ جدایه بالینی اسینتوباکتر بومانی، ۷۱ جدایه تولیدکننده ESBL و مقاوم به کارباپنم شناسایی شدند. نتایج آنتی بیوگرام، نشان دهنده مقاومت ۱۰۰٪ باکتری نسبت به سفالوسپورین‌ها بود. جدایه‌های تولیدکننده ESBL و مقاوم به کارباپنم، به کولیستین، فسفومایسین و تیگاسیکلین حساس بودند. نتایج، بیانگر عدم حضور ژن‌های *mcr-1* *mcr-2* و *fosA3* در بین جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی تولیدکننده ESBL و کارباپنماز بود.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر، ژن‌های شایع مولد مقاومت به آنتی بیوتیک‌های فسفومایسین و کولیستین در بین جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی تولیدکننده ESBL و مقاوم به کارباپنم مشاهده نشد. لذا در حال حاضر تجویز این آنتی بیوتیک‌ها نتیجه بخش است و از مصرف بی رویه آنها نیز باید پرهیز شود.

واژگان کلیدی: اسینتوباکتر بومانی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، مقاومت به کارباپنم‌ها.

### مقدمه

امروزه به طور کلی می‌توان اظهار کرد که وجود سویه‌های باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک از مهم‌ترین عوامل بوجود آمدن عفونت‌های مشکل‌ساز در علم پزشکی است. از شایع‌ترین عفونت‌های بیمارستانی می‌توان به پاتوژن‌های گروه ESKAPE

اشاره کرد، که شامل باکتری‌های *Klebsiella pneumoniae*، *Enterobacter spp*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Acinetobacter baumannii* می‌شود. این گروه منجر به بیش از ۹۸ درصد از عفونت‌های بیمارستانی می‌شوند (۱، ۲). یکی از عوامل مهم عفونت بیمارستانی اسینتوباکترها هستند. این باکتری‌ها در دسته باکتری‌های گرم منفی هستند که به دلیل عواملی همچون مقاوم شدن به طیف گسترده‌ای از آنتی بیوتیک‌ها قدرت بقای طولانی، وجود این باکتری‌ها در محیط نگرانی‌های فراوانی ایجاد کرده است (۳، ۴). بقای این

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، دانشکده علوم و فناوری پشرفته، گروه میکروبیولوژی، سید خلیل شکوهی مصطفوی (email: shokouhi@iautmu.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0002-6227-3376

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۷/۲۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۱۲

تولیدکننده کاربامپناز و ESBL به منظور تجویز منطقی و معقولانه آنتی بیوتیک‌های مناسب در بخش‌های مختلف بیمارستان جهت کاهش مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها و هزینه‌های درمانی که بسیار حائز اهمیت است، می‌باشد.

## مواد و روشها

### نمونه گیری و تعیین هویت باکتری‌ها

در این تحقیق ۲۱۹ جدایه *اسینتوباکتر بومانی* از نمونه‌های بالینی (خون، زخم و خلط) از بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران (فرهیختگان، بوعلی و امیرالمومنین) در طی سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۰ جمع آوری شد. به منظور حصول اطمینان از صحت انتخاب، کشت میکروبی در محیط‌های مک کانکی آگار، بلاد آگار و بررسی لام میکروسکوپی با رنگ آمیزی گرم، انجام تست‌های مختلف بیوشیمیایی مانند مصرف قندها در محیط‌های (Oxidative-Fermentative) OF و (Triple Sugar Iron Agar) TSI، تست‌های اندول، حرکت، متیل رد (MR)، ووگس پروسکوئر (VP) و سیمون سترات آگار صورت گرفت (۱۱). از ژن *OXA51* به عنوان مارکر ژنتیکی جهت تایید قطعی جدایه‌ها به عنوان *اسینتوباکتر بومانی* در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شد (۹). جهت اطمینان از صحت آزمایشات تاییدی از سویه کنترل مثبت *اسینتوباکتر بومانی* ATCC17978 خریداری شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران استفاده شد. پس از تایید شناسایی، جدایه‌ها در محیط TSB و گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

کد اخلاق پژوهشی اخذ شده برای پروژه حاضر IR.IAU.PS.REC.1399.212 بود.

### تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی

جهت بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی از روش دیسک آگار دیفیوژن (Kirby-Bauer) و بر اساس دستورالعمل‌های (CLSI 2023) Clinical and Laboratory Standard Institute استفاده شد (۱۲). دیسک‌های آنتی بیوتیک مورد استفاده، شامل آمیکاسین (۳۰ gμ)، سفیپیم (۳۰ gμ)، سفوتاکسیم (۳۰ gμ)، سففتازیدیم (۳۰ gμ)، سفتریاکسون (۳۰ gμ)، سفیکسیم (۵ gμ)، سیپروفلوکساسون (۵ gμ)، جنتامیسین (۱۰ gμ)، پپراسیلین (۱۰۰ gμ)، تتراسیکلین (۳۰ gμ)، تیکارسلین

باکتری‌ها در محیط بیمارستان از یک طرف، توانایی بیماری‌زایی و فاکتورهای ویروالانس متنوع از سوی دیگر و مقاومت آنتی بیوتیکی بالا منجر می‌شود تا این باکتری‌ها به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی شناخته شوند که درمان آن‌ها سخت است و می‌تواند زندگی بیماران را در معرض خطر قرار بدهد (۵، ۶).

این باکتری به مانند دیگر باکتری‌های گرم منفی توانایی به دست آوردن مکانیسم‌های جدید مقاومت را از طریق پلاسمیدها، اینتگرون‌ها و ترانسپوزون‌ها دارد. در حال حاضر، توسعه ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیک از راه ساختارهای اینتگرون با تولید مقاومت‌های آنتی بیوتیکی چندگانه، به یک معضل مهم، در درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری‌ها، تبدیل شده است. به همین دلیل می‌توان گفت ظهور گونه‌های مقاوم این باکتری‌ها به انواع داروها به مهم‌ترین مشکل پیش روی سیستم درمانی و بهداشتی در بیمارستان‌ها تبدیل شده است (۳، ۷).

کاربامپنم‌ها داروی انتخابی برای درمان *اسینتوباکتر بومانی* دارای مقاومت دارویی چندگانه (MDR) بودند که نخستین بار در ایالات متحده در سال ۱۹۹۱، گزارش مقاومت *اسینتوباکتر بومانی* به آنتی بیوتیک کاربامپنم، نگرانی همگان را برانگیخت. امروزه ایزوله‌های مولد آنزیم‌های مختلف مثل متالوبتالاکتاماز و کاربامپناز گزارش شده‌اند (۸).

*bla OXA-51 like* یک ژن ذاتی در ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* است که حضور این ژن به تنهایی در مقاومت باکتری‌ها نسبت به کاربامپنم‌ها نقشی ندارد. زمانی که این ژن در امتداد توالی الحاقی ISAbal و یا توالی‌های الحاقی مشابه دیگر بیان گردد، توانایی ایجاد مقاومت نسبت به کاربامپنم‌ها را پیدا می‌کند (۹). اولین بار ژن *bla OXA-23 like* در جدایه‌های بالینی جداسازی شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های کشور اسکاتلند شناسایی شد و پس از آن در دیگر کشورهای دنیا به مانند ایران نیز شناسایی شد (۸). در بیمارستان‌های ایالات متحده آمریکا فراوانی *اسینتوباکتر بومانی* که به کاربامپنم‌ها مقاوم هستند بین ۳۳ تا ۵۸ درصد است و در اکثر نقاط دنیا به خصوص ایران نیز درصد بالایی را شامل می‌شود که سیاست‌های درمانی بسیار کمی مثل استفاده از کولیسیتین تنها راه باقی مانده است (۱۰).

هدف از مطالعه حاضر، تعیین میزان مقاومت به کولیسیتین و فسفومایسین در جدایه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی*

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

منبع	Tm (°C)	طول توالی (bp)	توالی پرایمر (3'—5')	نام ژن
(۱۶)	۵۹	۳۵۳	F: TAATGCTTGATCGGCCTTG R: TGGATTGCACTTCATCTTGG	<i>bla</i> <i>OXA-51-IIIk</i>
(۱۷)	۵۰	۲۷۱	F: CCTGGCATTTTTATCAGCAGT R: CGGTTATCTTTCCATACCTCAG	<i>fosA3</i>
(۱۸)	۵۸	۴۰۰	F: CGGTCAGTCCGTTTGTTTC R: TGCTTAATCAGTGAGGCACC	<i>mcr-1</i>
(۱۸)	۵۷	۱۶۲۶	F: TGGTACAGCCCTTTATT R: GCTTGAGATTGGGTTATGA	<i>mcr-2</i>

استاندارد/شریشیالکی ATCC 25922 کشت خطی داده شد و دیسک های آغشته به باکتری را بر روی محیط کشت قرار داده شد و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون انجام شد. افزایش قطر هاله عدم رشد به اندازه  $\geq 18$ mm نشان دهنده تولید کارباپنماز است (۱۵).

#### استخراج DNA باکتریایی و شناسایی مولکولی ژن های

##### *mcr-1* و *fosA3* با تکنیک PCR

پس از کشت ۲۴ ساعته جدایه های خالص/اسینتوباکتر بومانی، DNA تمام ایزوله ها با استفاده از کیت استخراج DNA (Bioneer DNA Polymerase Co.Korea) استخراج شدند. از تکنیک مولکولی Polymerase Chain Reaction (PCR) برای شناسایی حضور ژن های *mcr-1* و *mcr-2* استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن های مذکور در جدول ۱ نشان داده شده است. جهت تکثیر ژن های مورد مطالعه مخلوط PCR در حجم نهایی ۲۵µg تهیه شد (۱۶).

##### تحلیل داده ها

در این مطالعه تمام آزمایش ها به صورت سه بار تکرار انجام شد و از آزمون chi-square جهت مقایسه متغیرها در دو گروه، در نرم افزار SPSS ورژن ۲۷ استفاده شد و *p*-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

##### یافته ها

تعداد ۲۱۹ جدایه بالینی بر اساس فرمول آماری طی سال های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۰ جمع آوری و با استفاده از تست های بیوشیمیایی استاندارد و وجود ژن *OXA51* به عنوان مارکر ژنتیکی/اسینتوباکتر بومانی با کمک تکنیک PCR تأیید هویت شدند. میزان فراوانی جدایه های/اسینتوباکتر بومانی جمع آوری شده در نمونه های مختلف بررسی شد (نمودار ۱).

(۷۵µg)، مروینم (۱۰gµ)، ایمی پنم (۱۰gµ)، فسفومایسین (۲۰۰gµ)، تیگه سایکلین (۱۵gµ) (شرکت پادتن طب، ایران) بودند و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شد و نتایج برای هر آنتی بیوتیک مطابق با دستورالعمل های CLSI به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش شدند. همچنین برای تعیین MIC، از نوارهای E-Test آنتی بیوتیک کولیستین استفاده شد. سپس قطر هاله عدم رشد با عدد روی نوار مطابقت داده شد و براساس دستورالعمل های CLSI میزان مقاومت تمامی جدایه ها نسبت به کولیستین تعیین شد (۱۳).

##### بررسی فنوتیپی تولید آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف

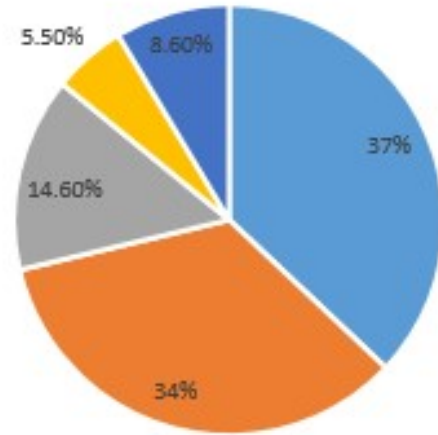
##### (ESBLs) به روش Combined Disk Test و کارباپنماز

روش دیسک ترکیبی با استفاده از دیسک سفنازیدیم (۳۰gµ) به تنهایی و دیسک ترکیبی سفنازیدیم (۳۰g) - کلاوولانیک اسید (۱۰gµ) برای شناسایی ESBLها بر روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار با مطابقت با کدورت سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بررسی شد. افزایش قطر هاله عدم رشد بیشتر یا مساوی ۵ میلی متر در اطراف دیسک ترکیبی سفنازیدیم-کلاوونیک اسید در مقایسه با دیسک سفنازیدیم تنها نشان دهنده تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف است (۱۴). جهت شناسایی جدایه های تولید کننده آنزیم کارباپنماز، ابتدا ۲ میکرولیتر محیط مولر هینتون برات (MHB) را درون میکروتیوپ استریل ریخته و به آن ۱ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری به مقدار نیم مک فارلند اضافه کرده و توسط سمپلر به خوبی مخلوط نموده، سپس دیسک مروینم (MER 10µg) را به درون هر یک از میکروتیوپ های حاوی محیط برات و باکتری اضافه کرده و به مدت ۴ ساعت درون انکوباسیون انجام شد. همزمان، سوسپانسیون میکروبی (معادل نیم مک فارلند) از سویه باکتریایی

نتایج حاصل از تکثیر نمونه‌های کنترل مثبت اهدایی از طرف آقای دکتر عبدالمجید قاسمیان را نشان می‌دهد.

**جدول ۲.** الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* به روش انتشار دیسک در آگار

Resistant n (%)	Intermediate n (%)	Susceptible n (%)	Antibiotic
(۷۱/۸)۵۱	(۰)۰	(۲۸/۲)۲۰	Amikacin (30µg)
(۶۷/۶)۴۸	(۰)۰	(۲۲/۴)۲۳	Gentamicin (10µg)
(۸۷/۳)۶۲	(۰)۰	(۱۲/۷)۹	Ciprofloxacin (5µg)
(۱۰۰)۷۱	(۰)۰	(۰)۰	Ceftazidime (30µg)
(۱۰۰)۷۱	(۰)۰	(۰)۰	Cefepime (30µg)
(۱۰۰)۷۱	(۰)۰	(۰)۰	Cefotaxime (30µg)
(۱۰۰)۷۱	(۰)۰	(۰)۰	Ceftriaxone (30µg)
(۱۰۰)۷۱	(۰)۰	(۰)۰	Cefixime (5 µg)
(۰)۰	(۰)۰	(۱۰۰)۷۱	Fosfomycin (200 µg)
(۰)۰	(۰)۰	(۱۰۰)۷۱	(15 µg) Tigecycline
(۱۰۰)۷۱	(۰)۰	(۰)۰	Piperacillin (100µg)
(۱۰۰)۷۱	(۰)۰	(۰)۰	Ticaracillin (75µg)
(۸۵/۱)۷۱	(۸)۱۳	(۶/۹)۱۱	Tetracycline (30µg)
(۹۷/۲)۶۹	(۰)۰	(۲/۸)۲	Meropenem (10µg)
(۱۰۰)۱	(۰)۰	(۰)۰	Imipenem (10µg)



■ ونتریاکتور ■ خون ■ زخم ■ انداز ■ قرشه

**نمودار ۱.** درصد فراوانی جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جمع آوری شده در نمونه‌های بالینی مختلف

بر اساس نتایج حاصل از آنتی بیوگرام، بیشترین مقاومت جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* به دست آمده، نسبت به سفتریاکسون (۱۰۰٪)، سفوتاکسیم (۱۰۰٪)، سفپیم (۱۰۰٪)، سفیکسیم (۱۰۰٪)، پپراسلین (۱۰۰٪) و سفتازیدیم (۱۰۰٪) مشاهده شد. مقاومت به آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، آمیکاسین و جنتامایسین به ترتیب ۸۷/۳٪، ۷۱/۸٪ و ۶۷/۶٪ ارزیابی شد (جدول ۲). براساس روش فنوتیپی با استفاده از دیسک ترکیبی (شکل ۱) و جدایه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های ایمی پنم، مروپنم تعداد ۷۱ جدایه *اسینتوباکتر بومانی* تولید کننده ESBL و مقاوم به کارباپنم جداسازی شدند. تمام جدایه‌های تولید کننده ESBL و مقاوم به کارباپنم، نسبت به کولیسیتین، فسفومایسین و تیگسایکلین حساس بودند.

نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) کولیسیتین با روش E-Test نشان داد که تمام جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* تولید کننده ESBL و مقاوم به کارباپنم به این آنتی بیوتیک حساس بودند. همچنین MIC50 و MIC90 برای این آنتی بیوتیک در جدایه‌های این مطالعه به ترتیب ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد (شکل ۲).

نتایج حاصل از آزمون PCR نشان دادند که از میان ۷۱ جدایه *اسینتوباکتر بومانی* تولید کننده ESBL و مقاوم به کارباپنم مورد آزمایش، هیچکدام از جدایه‌ها حاوی ژن های *mcr-1* و *mcr-2* و *fosA3* نبودند. شکل ۳، تصویر

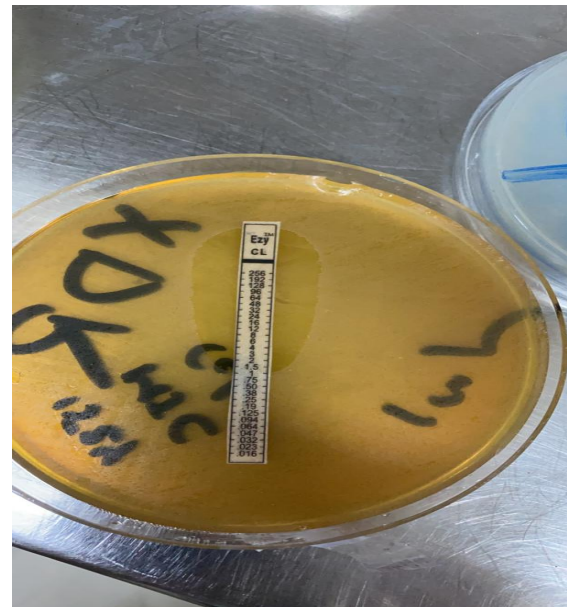


**شکل ۱.** شناسایی فنوتیپی جدایه های تولیدکننده ESBL روش دیسک ترکیبی

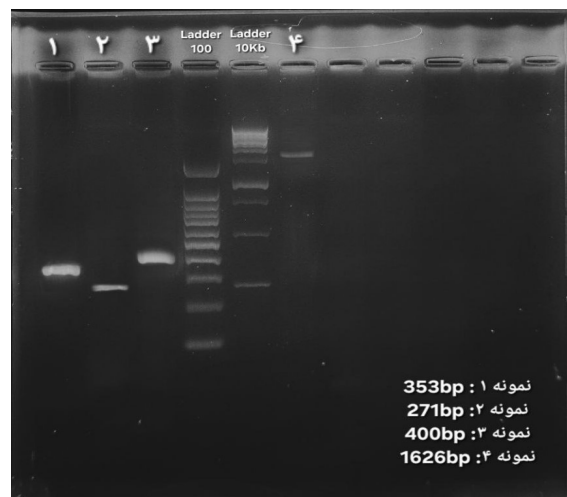
است. در بین پاتوژن‌های یاد شده، گونه‌های/سینتوباکتر نقش اساسی را در عفونت و کلونیزه شدن در بیماران بستری در بیمارستان‌ها دارند (۲۰). این ارگانسیم‌ها در عفونت‌های متعدد، مثل پنومونی وابسته به اندوکاردیت، عفونت‌های پوستی، دستگاه ادراری، مننژیت، بافت نرم، و افرادی که از پروتژها استفاده می‌کنند نقش مهمی دارند (۲۱). مهم‌ترین گونه/سینتوباکتر،/سینتوباکتر بومانی است. میزان مرگ و میر نشأت گرفته از این باکتری حدود ۵ درصد در بخش‌های عمومی و ۵۴ درصد در بخش‌های مراقبت ویژه گزارش شده است (۲۲). در ایران نیز به دلیل عدم اطلاع کافی از وضعیت مقاومت میکروبی و استفاده از مراجع خارجی که ممکن است بدون تناسب با وضع مقاومت میکروبی در داخل کشور باشد نیز مقاومت دارویی در حال گسترش است (۲۳).

به دلیل اینکه روش‌های تشخیص فنوتیپیک توانایی تمایز دادن گونه‌های مختلف/سینتوباکتر و تشخیص دادن گونه/سینتوباکتر بومانی را ندارند، در این مطالعه از تکنیک PCR برای شناختن ژن *bla<sub>OXA-51-like</sub>* که مختص این گونه است، استفاده شد. تمامی سویه‌ها دارای ژن *bla<sub>OXA-51-like</sub>* بودند. پژوهش‌های مختلفی وجود این ژن را در شناخت گونه/سینتوباکتر بومانی تایید کرده‌اند (۲۴).

این پاتوژن به علت زیاد شدن شیوع و گسترش جهانی جدایه‌های بالینی همراه با مقاومت چند دارویی و پیدایش سریع مقاومت، به "هشدار قرمز" تبدیل شده است (۲۵). سویه‌های/سینتوباکتر بومانی دارای آنزیم‌های ESBL مقاومت آشکار ( $MIC > 16 \text{ mg/ml}$ ) به تمامی سفالوسپورین‌های وسیع الطیف و آزترونام نشان می‌دهند. ESBL‌ها به واسطه اینکه توسط پلاسمیدهای خیلی بزرگی کد می‌شوند، اغلب ژن‌های مقاومت به سایر عوامل ضد میکروبی را نظیر آمینوگلیکوزیدها، تری متوپریم، سولفانامیدها، تتراسیکلین و کلرامفنیکل را نیز می‌توانند به همراه خود منتشر کنند (۲۶). در مطالعه حاضر، بیشترین مقدار فراوانی/سینتوباکتر بومانی مرتبط به نمونه‌های خون تراشه (۳۷ درصد) و حداقل فراوانی مرتبط به نمونه‌های خون (۵/۵٪) بود. بر اساس نتایج حاصل از آنتی بیوگرام، بیشترین مقاومت جدایه‌های/سینتوباکتر بومانی به دست آمده نسبت به سفالوسپورین‌ها و پپراسیلین مشاهده شد و همچنین ۱۲۴ سویه/سینتوباکتر بومانی (۵۶/۶٪) بر مبنای تست فنوتیپی ترکیبی دارای آنزیم ESBL بودند. در مطالعه زرا بادی پور و همکارانش در سال ۲۰۲۱ در ایران شیوع مشابهی از جدایه‌های بالینی/سینتوباکتر بومانی دارای آنزیم‌های ESBL گزارش شده است (۲۷).



شکل ۲. MIC رشد جهت آنتی بیوتیک کولیستین با روش E-Test



شکل ۳. نمونه‌های کنترل مثبت حاوی ژن‌های مورد نظر. چاهک شماره یک، کنترل مثبت ژن *OXA-51* چاهک شماره ۲، کنترل مثبت ژن *fosA3* چاهک شماره ۳، کنترل مثبت ژن *mcr-1* چاهک شماره ۴، کنترل مثبت ژن *mcr-2*

## بحث

انتقال میکروارگانسیم‌های مقاوم به انواع آنتی بیوتیک‌ها در بیمارستان‌ها در طول ۲۰ سال اخیر بسیار قابل توجه است و به دلیل منتقل شدن ژن مقاومت در میان باکتری‌های گرم منفی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حال افزایش است (۱۹). مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در باکتری‌های گرم منفی خانواده انتروباکتریال، سودوموناس آئروژینوزا، و/سینتوباکتر شایع‌تر

در مطالعه ما، ۷۱ سویه (۵۷/۲٪) از بین جدایه‌های تولید کننده آنزیم ESBL دارای مقاومت به کاربامپنها بودند که این جدایه‌ها وارد مطالعه شدند. طبق گزارش مرادی و همکارانش در سال ۲۰۱۵، بررسی مطالعات بر روی ۳۰۴۹ جدایه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* در دوره زمانی ۲۰۰۱ تا ۲۰۱۴ در ایران بیانگر این واقعیت است که در این دوره زمانی به مرور میزان مقاومت به کاربامپنها افزایش پیدا کرده است. مقاومت به کاربامپنها در نقطه شروع مطالعه حدود ۶۵٪ بود و در پایان مطالعه این میزان مقاومت به میزان ۷۶/۴٪ رسید و این نشان دهنده افزایش مقاومت به کاربامپنها در *اسینتوباکتر بومانی* در ایران است (۲۸). در مطالعه یزدان ستاد و همکارانش در سال ۲۰۱۹ میزان شیوع بسیار بالای مقاومت به کاربامپنها در *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی شده از زخم‌های سوختگی گزارش شده است. در این مطالعه، ۹۶/۹٪ (۶۳ جدایه از ۶۵ جدایه) *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی شده از زخم‌های سوختگی مقاومت به کاربامپنها را نشان دادند (۲۹).

خوشبختانه حساسیت بالا در مقابل لیپوپپتیدها (کولیستین) در بین جدایه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چندین دارو (MDR) مشاهده می‌شود. در مطالعه ما نیز پس از انجام E-Test به منظور بررسی حداقل غلظت مهارتی آنتی بیوتیک کولیستین، مشخص شد که تمام جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به کاربامپنها به این آنتی بیوتیک حساس بودند. اگرچه اخیراً چند مورد *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به کولیستین در ایران گزارش شده‌اند. در مطالعه یزدان ستاد و همکارانش در سال ۲۰۱۹ گزارش داده شد که ۱۲/۷٪ (۸ جدایه از ۶۵ جدایه) *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به کاربامپنها به کولیستین نیز مقاومت نشان دادند (۲۹). در سال‌های قبل‌تر نیز بهادر و همکارانش در سال ۲۰۱۳ برای اولین بار میزان شیوع بالای ۱۴/۲٪ *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به آنتی بیوتیک کولیستین را گزارش کرده بودند (۳۰).

میزان مقاومت به آمینوگلیکوزیدها نیز بسیار نگران کننده بود، که برای آمیکاسین ۷۱/۸٪ و برای جنتامیسین ۶۷/۶٪ مشاهده شد. مقاومت کامل به تمام آنتی بیوتیک‌های خانواده بتالاکتامها (۱۰۰٪) در این مطالعه نیز مشاهده شد. مقاومت به سیپروفلوکساسین به عنوان داروی شاخص گروه فلوروکینولون‌ها نیز در اکثر جدایه‌ها مشاهده شد. به طور خلاصه، این داده‌ها نشان دهنده مقاومت بالا به همه آنتی بیوتیک‌ها به جز کولیستین و فسفومایسین است.

در مطالعه حاضر میزان شیوع ژن‌های *mcr-1* و *mcr-2* مطابق انتظار صفر بود. در مطالعه‌ای توسط آقاپور و همکارانش

گزارش شد تمام جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو از نظر وجود ژن‌های *mcr-1* و *mcr-2* منفی بودند (۳۱). تاکنون حضور ژن‌های *mcr-1* و *mcr-2* در بین جدایه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو گزارش نشده است. هرچند در گذشته حضور ژن‌های *mcr-1* و *mcr-2* در بین جدایه‌های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* در ایران گزارش شده است (۳۲). بنابراین این نگرانی وجود دارد که امکان انتقال افقی این ژن‌ها از جدایه‌های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* و یا سایر اعضای انتروباکتریالس به جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* سبب پیدایش و گسترش جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به کولیستین به واسطه این ژن‌ها شود.

در مطالعه‌ای که محمد کریم طی سال‌های ۲۰۱۴ تا ۲۰۱۸ بر روی ۲۰۵ جدایه *اسینتوباکتر بومانی* در کشور عراق انجام داد، ۹۵ درصد جدایه‌ها به کاربامپنها مقاوم بودند و ۷ درصد جدایه‌ها دارای ژن *fosA3* و ۱۱ درصد نیز دارای ژن *mcr-1* بودند. هیچ کدام از جدایه‌ها دارای ژن *mcr-2* نبودند و در مقایسه با مطالعه حاضر، مقاومت بالاتری مشاهده شد و بیانگر ارتباط بین مناطق جغرافیایی مختلف و میزان شیوع این ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی است (۳۳).

در مطالعه دیگری در کشور عراق که توسط عبدالطیف و همکارانش که طی سال‌های ۲۰۱۹ الی ۲۰۲۱ بر روی ۲۰۰ جدایه بالینی *اسینتوباکتر بومانی* صورت پذیرفت، میزان شیوع ژن‌های *mcr-1* و *mcr-2* به ترتیب ۲٪ و ۱/۵٪ و صفر درصد گزارش شد که به نتایج مطالعه حاضر نزدیک است (۳۴).

در مطالعه حاضر همچنین شیوع ژن *fosA3* در بین جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* تولید کننده آنزیم ESBL دارای مقاومت به کاربامپنها صفر بود و جدایه‌ها حساسیت خوبی را در برابر فسفومایسین نشان دادند. در ایران، بررسی میزان شیوع ژن *fosA3* تنها در بین جدایه‌های انتروباکتریالس انجام گرفته است. در مطالعه‌ای که فناوندی و همکارانش در ایران در سال ۲۰۱۷ انجام دادند، ۳۵۵ نمونه انتروباکتریالس جمع آوری کردند که این نمونه‌ها شامل ادرار، خون، زخم و منابع دیگر در طی مدت زمان حدود یک سال بودند. ژن‌هایی که جهت مقاومت به فسفومایسین مطالعه کردند، شامل ژن‌های پلاسمیدی و کروموزومی بودند که ژن‌های پلاسمیدی شامل *fosA*، *fosB*، *fosA3* و *fosC2* با روش مولکولی بررسی شدند. در این مطالعه، تعداد ۱۵۵ نمونه تولید کننده بتالاکتاماز بودند که ۹۲/۸٪ به فسفومایسین حساس بودند. به عنوان نتیجه در این مطالعه بیان شد که هیچ یک از انتروباکتریالس‌های تولید

شیوع ژن‌های *mcr-1*، *mcr-2* و *fosA3* در میان جدایه‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی در قسمت‌های مختلف بیمارستانی صفر بوده است، اگرچه در پژوهش‌های آتی می‌توان توسط نمونه‌گیری از نمونه‌های موجود در محیط به حضور احتمالی این ژن‌های قابل انتقال پی برد و در صورت منابع مشترک و شناسایی کردن آن‌ها از پخش و مقاومت احتمالی آن‌ها جلوگیری کرد.

### قدردانی و تشکر

این تحقیق با حمایت مادی و معنوی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران انجام شده است که بدین طریق از همگی عزیزان قدردانی می‌شود. از آقای دکتر عبدالمجید قاسمیان نیز به جهت اهدای نمونه‌های کنترل مثبت حاوی ژن‌های مورد مطالعه، کمال تشکر را داریم.

کننده بتالاتاماز شاخص مقاومت یا موتاسیونی در برابر فسفومايسين ندارند و حساسیت خوبی را در برابر فسفومايسين نشان دادند (۳۵).

مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران بر روی جدایه‌های بالینی /سینتوباکتر بومانی انجام گرفت و نتایج بیانگر عدم وجود ژن-های شایع عامل مقاومت به آنتی بیوتیک‌های کولیسیتین و فسفومايسين به عنوان آنتی بیوتیک‌های مهم خطوط آخر درمان هستند.

از یافته‌های این پژوهش نتیجه‌گیری می‌شود، هیچ یک از ژن-های مقاومت به آنتی بیوتیک‌های فسفومايسين و کولیسیتین در بین جدایه‌های /سینتوباکتر بومانی تولید کننده ESBL و مقاوم به کاربایم مشاهده نشد. تجویز منطقی آنتی بیوتیک-های فسفومايسين و کولیسیتین در بخش‌های مختلف بیمارستان به منظور کاهش مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها و هزینه‌های درمانی بسیار حائز اهمیت است. همچنین مقدار

### REFERENCES

1. De Oliveira DM, Forde BM, Kidd TJ, Harris PN, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. Clin Microbiol Rev 2020;33:e00181-19.
2. Rosa TF, Coelho SS, Foletto VS, Bottega A, Serafin MB, Machado CdS, et al. Alternatives for the treatment of infections caused by ESKAPE pathogens. J Clin Pharmacy Ther 2020;45: 863-73.
3. Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. Acinetobacter baumannii antibiotic resistance mechanisms. Pathogens 2021;10:373.
4. Whiteway C, Breine A, Philippe C, Van der Henst C. Acinetobacter baumannii. Trends Microbiol 2022;30:199-200.
5. Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. Insights into Acinetobacter baumannii: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. Antibiotics 2020;9:119.
6. Zaidan N, Hornak JP, Reynoso D. Extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii nosocomial pneumonia successfully treated with a novel antibiotic combination. Antimicrob Agents Chemother 2021;65: e0092421.
7. Jeon JH, Jang K-M, Lee JH, Kang L-W, Lee SH. Transmission of antibiotic resistance genes through mobile genetic elements in Acinetobacter baumannii and gene-transfer prevention. Sci Total Environ 2023;857:159497.
8. Nguyen M, Joshi S. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii, and their importance in hospital-acquired infections: a scientific review. J Appl Microbiol 2021;131:2715-38.
9. Takebayashi Y, Findlay J, Heesom KJ, Warburton PJ, Avison MB, Evans BA. Variability in carbapenemase activity of intrinsic OxaAb (OXA-51-like)  $\beta$ -lactamase enzymes in Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother 2021;76:587-95.
10. Falcone M, Tiseo G, Leonildi A, Della Sala L, Vecchione A, Barnini S, et al. Cefiderocol-compared to colistin-based regimens for the treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother 2022;66:e02142-21.
11. Levi I, Rubinstein E. Acinetobacter infections—overview of clinical features. Acinetobacter 2020:101-15.
12. Rai S, Dash D, Agarwal N. Introducing the new face of CLSI M100 in 2023: An explanatory review. Indian J Med Microbiol 2023;46:100432.
13. Kolesnik-Goldmann N, Seth-Smith HM, Haldimann K, Imkamp F, Roloff T, Zbinden R, et al. Comparison of Disk Diffusion, E-Test, and Broth Microdilution Methods for Testing In Vitro Activity of Cefiderocol in Acinetobacter baumannii. Antibiotics 2023;12:1212.
14. Kumari M, Bhattarai NR, Rai K, Pandit TK, Khanal B. Multidrug-Resistant Acinetobacter: Detection of ESBL, MBL, blaNDM-1 Genotype, and Biofilm Formation at a Tertiary Care Hospital in Eastern Nepal. Int J Microbiol 2022;2022:8168000.

15. Patidar N, Vyas N, Sharma S, Sharma B. Phenotypic detection of carbapenemase production in carbapenem-resistant enterobacteriaceae by modified hodge test and modified strip Carba NP test. *J Lab Physicians* 2021;13:14-21.
16. El-Kazzaz W, Metwally L, Yahia R, Al-Harbi N, El-Taher A, Hetta HF. Antibiogram, prevalence of OXA carbapenemase encoding genes, and RAPD-genotyping of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* incriminated in hidden community-acquired infections. *Antibiotics* 2020;9:603.
17. Najafikhah A, Hakemi-Vala M, Samavat S, Nasiri MJ. Molecular Analysis of Fosfomycin Resistance Among *Escherichia coli* Isolates From Urinary Tract Infections in Kidney Transplant Patients During 2019-2020. *Arch Clin Infect Dis* 2023;18:e132120.
18. Ilbeigi K, Askari Badouei M, Vaezi H, Zaheri H, Aghasharif S, Kafshdouzan K. Molecular survey of *mcr1* and *mcr2* plasmid mediated colistin resistance genes in *Escherichia coli* isolates of animal origin in Iran. *BMC Res Notes* 2021;14:1-5.
19. Willems RP, van Dijk K, Vehreschild MJ, Biehl LM, Ket JC, Rimmelzwaal S, Vandenbroucke-Grauls CM. Incidence of infection with multidrug-resistant Gram-negative bacteria and vancomycin-resistant enterococci in carriers: a systematic review and meta-regression analysis. *Lancet Infect Dis* 2023;23:719-31.
20. Hansen GT. Continuous evolution: perspective on the epidemiology of carbapenemase resistance among Enterobacterales and other Gram-negative bacteria. *Infect Dis Ther* 2021;10:75-92.
21. Gedefie A, Demsis W, Ashagrie M, Kassa Y, Tesfaye M, Tilahun M, et al. *Acinetobacter baumannii* biofilm formation and its role in disease pathogenesis: a review. *Infect Drug Resist* 2021;3711-9.
22. Appaneal HJ, Lopes VV, LaPlante KL, Caffrey AR. Treatment, clinical outcomes, and predictors of mortality among a national cohort of admitted patients with *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2022;66(3):e01975-21.
23. Farajzadeh Sheikh A, Savari M, Abbasi Montazeri E, Khoshnood S. Genotyping and molecular characterization of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates from a single hospital in Southwestern Iran. *Pathog Glob Health* 2020;114:251-61.
24. Noshadi S, Khodavandi A. Expression analysis of drug-resistant gene (*blaOXA-51*) in carbapenemases producing *Acinetobacter baumannii* treated with imipenem/sulbactam combination. *Braz J Pharm Sci* 2021;57:e19048.
25. Girija AS. *Acinetobacter baumannii* as an oro-dental pathogen: a red alert!! *J Appl Oral Sci* 2024;32:e20230382.
26. Abd El-Baky RM, Farhan SM, Ibrahim RA, Mahran KM, Hetta HF. Antimicrobial resistance pattern and molecular epidemiology of ESBL and MBL producing *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitals in Minia, Egypt. *Alexandria J Med* 2020;56:4-13.
27. Zarabadi-Pour M, Peymani A, Habibollah-Pourzeshki N, Sarookhani MR, Karami AA, Javadi A. Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases among *Acinetobacter Baumannii* Isolated from Hospitals of Qazvin, Iran. *Ethiop J Health Sci* 2021;31:229-36.
28. Moradi J, Hashemi FB, Bahador A. Antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* in Iran: a systemic review of the published literature. *Osong Public Health Res Perspect* 2015;6:79-86.
29. Yazdansetad S, Najari E, Ghaemi EA, Javid N, Hashemi A, Ardebili A. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates carrying *blaOXA* genes with upstream *ISAbal1*: First report of a novel OXA subclass from Iran. *J Glob Antimicrob Resist* 2019;18:95-99.
30. Emergence of Rifampicin, Tigecycline, and Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Iran; Spreading of MDR Strains of Novel International Clone Variants. *Microb Drug Resist* 2013;19:397-406.
31. Aghapour Z, Hasani A, Aghazadeh M, Rezaee MA, Ganbarov K, Poulak T, et al. Genes involved in colistin resistance of gram-negative isolates in the northwest of Iran. *Gene Reports* 2019;14:81-6.
32. Moosavian M, Emam N. The first report of emerging mobilized colistin-resistance (*mcr*) genes and ERIC-PCR typing in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in southwest Iran. *Infect Drug Resist* 2019;12:1001.
33. Kareem SM. Emergence of *mcr*-and *fosA3*-mediated colistin and fosfomycin resistance among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Iraq. *Meta Gene* 2020;25:100708.
34. Abdulateef SA, Al-Salmani MS, Owaf HAA. *Acinetobacter baumannii* producing ESBLs and carbapenemases in the Intensive Care Units developing fosfomycin and colistin resistance. *Journal of Applied and Natural Science* 2023;15:1263-67.
35. Ghanavati R, Ohadi E, Kazemian H, Yazdani F, Toriki A, Kalani BS, et al. Evaluation of Fosfomycin Activity Against Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) Producing Enterobacteriaceae Isolated from Three Centers of Tehran, Iran. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2018;13:180-86.