

## Prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase among imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolated from selected hospitals in Karaj (2010)

A. Mohebi\*

S. Aghaei\*

M. Mohammadzadeh\*\*

M. Tavakoli\*\*\*

\*Assistant Professor of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj, Iran

\*\*Ph.D. in Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\*\*\*MSc. in Microbiology, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

### \*Abstract

**Background:** Imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. resulting from metallo- $\beta$ -lactamase (MBLs)-producing strains have been reported to be among important causes of nosocomial infections and of serious therapeutic problem worldwide.

**Objective:** To determine the prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase among imipenem-resistant *Acinetobacter* isolates based on phenotypic methods.

**Methods:** This was an descriptive study in which 140 clinical isolates of *Acinetobacter* spp. were initially tested for imipenem susceptibility and later for metallo- $\beta$ -lactamase production using combined disk diffusion, double disk synergy test, and Hodge test during 2010. Antibiotic susceptibility of positive metallo- $\beta$ -lactamase isolates were further evaluated by disk diffusion technique using CLSI methodology.

**Findings:** Of 140 isolates, 29 (20.7%) were imipenem-resistant *Acinetobacter*. Positive phenotypic test for metallo- $\beta$ -lactamase was 24 (17.1%).

**Conclusion:** The result of this study is indicative of growing number of nosocomial infections associated with multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. in this region leading to difficulties in antibiotic therapy.

**Keywords:** *Acinetobacter*, Antibiotic-Resistant, Imipenem, Metallo- $\beta$ -Lactamase, Nosocomial Infections

**Corresponding Address:** Mohammad Mohammadzadeh, Department of Microbiology, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Email:** q\_m1984@yahoo.com

**Tel:** +98-912-6767995

**Received:** 8 March 2011

**Accepted:** 20 Dec 2011

## شیوع متالوبتالاکتاماز در بین گونه‌های آسینتوباکتر جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های منتخب شهر کرج (۱۳۸۹)

مهناز توکلی\*\*\*

دکتر محمد محمدزاده\*\*

دکتر صمد آقایی\*

دکتر ابوالفضل محبی\*

\* استادیار گروه میکروشناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

\*\* دکترای میکروشناسی دانشگاه شهید بهشتی تهران

\*\*\* کارشناس ارشد میکروشناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

آدرس نویسنده مسؤل: تهران، دانشگاه شهید بهشتی، گروه میکروشناسی، تلفن ۰۹۱۲۶۷۶۷۹۹۵

Email: q\_m1984@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۹

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۱۷

### \* چکیده

**زمینه:** گونه‌های آسینتوباکتر مقاوم به ایمی‌پنم تولیدکننده متالوبتالاکتاماز به عنوان یکی از با اهمیت‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی گزارش شده‌اند و یک مشکل درمانی مهم در سراسر جهان هستند.

**هدف:** مطالعه به منظور تعیین شیوع متالوبتالاکتاماز در میان گونه‌های آسینتوباکتر مقاوم به ایمی‌پنم جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های منتخب شهر کرج انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی ۱۴۰ ایزوله آسینتوباکتر در ۶ ماهه اول سال ۱۳۸۹ از نمونه‌های بالینی که به آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های کرج ارسال شده بودند، انتخاب و از نظر مقاومت به ایمی‌پنم بررسی شدند. تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز با استفاده از روش‌های فنوتیپی انتشار دیسک ترکیبی، سینرژی دابل دیسک و آزمون Hodge مطالعه شد. سپس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های متالوبتالاکتاماز مثبت توسط روش انتشار دیسک با دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف طبق دستور کار مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) انجام شد.

**یافته‌ها:** از ۱۴۰ ایزوله آسینتوباکتر ۲۹ نمونه (۲۰/۷٪) به ایمی‌پنم مقاوم بودند که از بین آن‌ها ۲۴ نمونه (۱۷/۴۵٪) از نظر متالوبتالاکتاماز با روش‌های فنوتیپی مثبت بودند.

**نتیجه‌گیری:** یافته‌های مطالعه حاکی از رشد گسترده عفونت‌های بیمارستانی توسط آسینتوباکترهای مقاوم به چند دارو در این منطقه است که می‌تواند مشکل بزرگی در درمان آنتی‌بیوتیکی بیماران باشد.

**کلیدواژه‌ها:** آسینتوباکتر، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ایمی‌پنم، متالوبتالاکتاماز، عفونت بیمارستانی

### \* مقدمه:

و گسترده اکتسابی نسبت به کرباپنم‌ها مشکل بالینی حادی را به وجود آورده است. آسینتوباکترها باکتری‌های گرم منفی، هوازی و غیرمتحرکی هستند که اغلب بر روی پوست کلونیزه می‌شوند و یکی از عوامل تشکیل‌دهنده عفونت‌های بیمارستانی مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند.<sup>(۱و۲)</sup> در سال‌های اخیر مقاومت به کرباپنم‌ها در گونه‌های آسینتوباکتر به شدت رو به افزایش است.<sup>(۳و۴)</sup> یکی از مقاومت‌ها در این باکتری‌ها به وسیله کلاس III

پیدایش و کشف کرباپنم‌ها پیشرفت بزرگی در زمینه درمان آنتی‌بیوتیکی است. به دلیل فعالیت وسیع این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها و پایداری آن‌ها نسبت به بتالاکتامازها، امروزه از آن‌ها برای درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های گرم منفی مقاوم به سفالوسپورین یا پنی‌سیلین استفاده می‌شود. کرباپنم‌ها موفق‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی هستند که نسبتاً از دسترس مقاومت باکتریایی در امان مانده‌اند. اما مقاومت روزافزون

محیط مولر هینتون آگار کشت چمنی داده شد. پس از چند دقیقه یک دیسک ایمی پنم ۱۰ میکروگرم در مرکز محیط قرار داده شد. سپس از سودوموناس آئروژینوزا سویه ATCC ۲۷۵۸۳ به عنوان سویه متالوبتالاکتاماز مثبت، از کنار پلیت تا نزدیک دیسک ایمی پنم و در سه جهت دیگر با زاویه ۹۰ درجه ۳ نمونه مورد آزمایش به همان صورت کشت شعاعی داده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به وجود آمدن ساختار شبیه برگ شبدر نشان‌دهنده مثبت بودن تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده کرباپنم شامل متالوبتالاکتاماز و کرباپنماز است.<sup>(۶۵)</sup>

در روش دیسک دیفیوژن ترکیبی، غلظت نیم مک‌فارلند از نمونه‌های مقاوم به ایمی پنم تهیه و روی محیط مولر هینتون آگار کشت چمنی داده شد. پس از چند دقیقه دو عدد دیسک ایمی پنم ۱۰ میکروگرم با فاصله قرار داده شد. روی یکی از دیسک‌ها ۱۰ میکرولیتر EDTA ۰/۵ مولار ریخته و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس هاله عدم رشد دیسک ایمی پنم و دیسک ایمی پنم + EDTA با یکدیگر مقایسه شدند و نمونه‌هایی که هاله عدم رشد دیسک ایمی پنم + EDTA آن ۷ میلی‌متر بیش‌تر از دیسک ایمی پنم بود به عنوان متالوبتالاکتاماز مثبت در نظر گرفته شدند.<sup>(۸۶)</sup>

در آزمون دابل دیسک سینرژی، غلظت نیم مک‌فارلند از نمونه‌های مقاوم به ایمی پنم تهیه و روی محیط مولر هینتون آگار کشت چمنی داده شد. پس از چند دقیقه، یک دیسک ایمی پنم ۱۰ میکروگرم روی محیط و یک دیسک بلانک در فاصله ۱۰ تا ۲۵ میلی‌متری آن قرار داده شد. سپس ۵ میکرولیتر از EDTA ۰/۵ مولار روی دیسک بلانک ریخته و محیط به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، رشد باکتری در جهت مخالف دیسک ایمی پنم و عدم رشد آن در جهت دیسک حاوی EDTA به عنوان مقاومت به واسطه متالوبتالاکتاماز در نظر گرفته شد.<sup>(۱۰۹)</sup>

(تقسیم‌بندی Bush, 1998) یا کلاس II (تقسیم‌بندی Ambler) بتالاکتامازها انجام می‌شود که تحت عنوان متالوبتالاکتاماز (MBLs) شناخته می‌شوند. این آنزیم‌ها تقریباً توانایی هیدرولیز تمام آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به جز آزترونام را دارند. همچنین متالوبتالاکتامازها برای فعالیت خود به کاتیون‌های دو ظرفیتی فلز روی ( $Zn^{++}$ ) احتیاج دارند و در شرایط آزمایشگاهی در حضور عوامل شلاته‌کننده فلزی مثل اتیلن دی‌آمین تتراستیک اسید (EDTA) مهار می‌شوند.<sup>(۳)</sup> هدف از انجام این مطالعه تعیین شیوع متالوبتالاکتاماز در میان گونه‌های آسینتوباکتر مقاوم به ایمی پنم جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های منتخب شهر کرج بود.

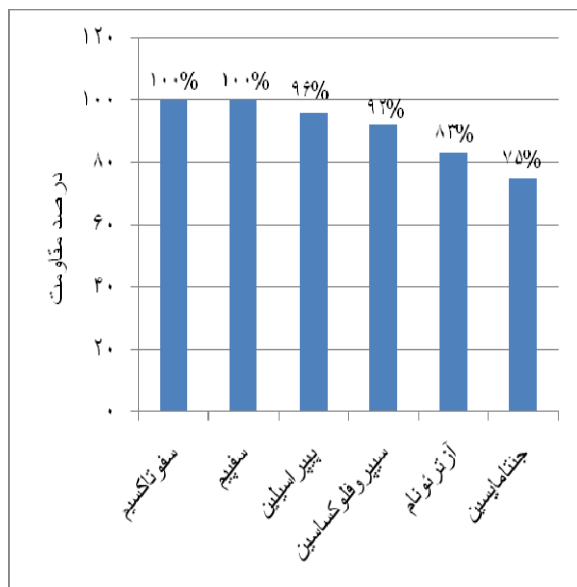
#### \* مواد و روش‌ها:

در این مطالعه توصیفی ۱۴۰ آسینتوباکتر ارسال شده به آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های منتخب کرج جمع‌آوری شدند. این نمونه‌های بالینی از بیمارانی که در مدت ۶ ماهه اول سال ۱۳۸۹ به این بیمارستان‌ها مراجعه کرده بودند، جدا شده بودند. باکتری‌های گونه آسینتوباکتر با توجه به رشد در محیط مک کانکی آگار و تخمیر لاکتوز منفی و با استفاده از آزمون‌های اکسیداز منفی، الگوی Alk/Alk در محیط TSI، عدم تحرک در محیط SIM و آزمون لام مرطوب، عدم تولید پیگمان و DNase منفی از نمونه‌های بالینی شامل خلط، زخم، خون و مایعات بدن جدا شدند. سپس غلظت نیم مک‌فارلند از نمونه‌های مورد نظر تهیه و روی محیط مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. در محیط دیسک ایمی پنم ۱۰ میکروگرم (محصول شرکت Mast انگلستان) قرار داده شد و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس قطر هاله عدم رشد با جدول استاندارد شرکت Mast مقایسه و باکتری‌های مقاوم جداسازی شدند.<sup>(۴)</sup>

برای آزمون Hodge test از سویه اشرشیاکولی ATCC ۲۵۹۲۲ که سویه حساس به ایمی پنم می‌باشد غلظت نیم مک‌فارلند تهیه و روی

۳۲ درصد بود.

### نمودار ۱- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های آسینتوباکتر متالوبتالاکتاماز مثبت



### \* بحث و نتیجه گیری:

مطالعه حاضر نشان داد ۱۷/۴ درصد آسینتوباکترهای جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان های شهر کرج در سال ۱۳۸۹ به واسطه متالوبتالاکتاماز نسبت به ایمی پنم مقاوم بودند که حاکی از گسترش شیوع این نوع مقاومت در این منطقه بود.

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۰ توسط لی و همکاران در کره انجام شد، ۹ درصد از نمونه های جدا شده آسینتوباکتر متالوبتالاکتاماز تولید می کردند.<sup>(۱۴)</sup> در مطالعه یونگ و همکاران نیز در همین کشور در سال ۲۰۰۶، حدود ۲۶/۵ درصد از نمونه های جدا شده آسینتوباکتر تولید کننده متالوبتالاکتاماز بودند.<sup>(۸)</sup>

در مطالعه پیمانی و همکاران در سال ۱۳۸۹ در تبریز، از بین ۱۰۰ نمونه جدا شده آسینتوباکتر بومانی، ۶۳ نمونه به کرباپنم مقاوم بودند که ۳۱ نمونه (۴۹ درصد) به واسطه متالوبتالاکتاماز مقاومت داشتند.<sup>(۱۵)</sup> همچنین در

برای انجام آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن، نیم مک فارلند از نمونه های مقاوم تهیه و روی محیط مولر هیتتون آگار کشت چمنی داده شد. پس از چند دقیقه دیسک های آنتی بیوتیکی (محصول شرکت Mast انگلستان) شامل سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، پیپراسیلین، آزترئونام، سفوتاکسیم و سفپیم روی محیط قرار داده شدند و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از این مدت هاله عدم رشد اطراف دیسک ها اندازه گیری شد و با جدول استاندارد شرکت Mast مقایسه شد.<sup>(۱۱-۱۳)</sup>

### \* یافته ها:

از بین ۱۶۳ نمونه آسینتوباکتر گرفته شده از آزمایشگاه های بیمارستان های کرج، ۱۴۰ سویه آسینتوباکتر مورد تأیید قرار گرفت که از میان ۱۴۰ نمونه آسینتوباکتر مورد آزمایش ۲۹ باکتری (۲۰/۷ درصد) به ایمی پنم مقاوم بود که تمامی ۲۹ نمونه طبق آزمون Hodge تولید کننده کرباپنماز بودند. در حالی که فقط ۲۴ نمونه (۱۷/۴ درصد) طبق روش های دیسک دیفیوژن ترکیبی و دابل دیسک سینرژی از نظر تولید متالوبتالاکتاماز مثبت شدند و ۵ نمونه (۳/۶ درصد) مقاومت به واسطه کرباپنمازی غیر از متالوبتالاکتاماز داشتند. در نتایج حاصل از آنتی بیوگرام ایزوله های متالوبتالاکتاماز مثبت، تمام ۲۴ ایزوله (۱۰۰ درصد) به سفوتاکسیم و سفپیم، ۲۳ نمونه به پیپراسیلین، ۲۲ نمونه به سیپروفلوکساسین، ۲۰ نمونه به آزترئونام و ۱۸ نمونه به جنتامایسین مقاوم بودند، همچنین ۱۰ نمونه به تمامی آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان دادند (نمودار شماره ۱).

در میان ۲۴ نمونه متالوبتالاکتاماز مثبت، ۵۶ درصد مربوط به مردان و ۴۴ درصد مربوط به زنان بود. توزیع نوع نمونه ها عبارت بود از: خلط ۵۶ درصد، ادرار ۱۲ درصد، زخم ۱۲ درصد، خون ۸ درصد، نمونه های جدا شده از کاتتر ۸ درصد، مایع مغزی نخاعی ۴ درصد. نمونه های مقاوم بخش مراقبت های ویژه ۶۸ درصد و سایر بخش ها

**\* مراجع:**

- Hoffmann MS, Eber MR, Laxminarayan R. Increasing resistance of acinetobacter species to imipenem in United States hospitals, 1999-2006. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010 Feb; 31 (2): 196-7
- Dugal S, Fernandes A. Carbapenem hydrolysing metallo- $\beta$ - lactamase: a review. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 2011; 3 (3): 9-16
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo - beta - lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005 Apr; 18 (2): 306-25
- Forbes BA, Sanm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott diagnostic microbiology*. 12th ed. United states: Academic Press of Elsevier; 2007. 364-8
- Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2006 Sep; 44 (9): 3139-44
- Qu TT, Zhang JL, Wang J, et al. Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo - beta - lactamase - producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. *J Clin Microbiol* 2009 Apr; 47 (4): 1136-42
- Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V. Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo - beta - lactamase production in clinical isolates. *Indian J Med Res* 2005 Jun; 121 (6): 780-3
- Yong D, Choi YS, Roh KH, et al. Increasing prevalence and diversity of metallo - beta - lactamases in *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., and *Enterobacteriaceae* from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 May; 50 (5): 1884-6

یک مطالعه که توسط انور و همکاران در سال ۲۰۱۰ در بنگلادش انجام شد، ۴۴/۸ درصد از نمونه‌های جدا شده آسینتوباکتر بومانی مقاوم به ایمی‌پنم از نظر آزمون‌های فنوتیپی تولیدکننده متالوبتالاکتاماز بودند.<sup>(۱۶)</sup> در سال ۲۰۱۱ نیز کومار و همکاران در هندوستان گزارش نمودند که ۲۱ درصد از آسینتوباکترهای مقاوم به ایمی‌پنم و مروپنم جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه حامل متالوبتالاکتامازها بودند و ۹۵ درصد نمونه‌های متالوبتالاکتاماز مثبت، مقاومت چند دارویی داشتند.<sup>(۱۷)</sup>

در تحقیق حاضر اکثر نمونه‌ها از بخش مراقبت‌های ویژه و اکثر آن‌ها از نمونه خلط و ترشحات تنفسی بودند که می‌تواند به علت استفاده بی‌رویه ایمی‌پنم برای درمان بیماران بستری در این بخش‌ها باشد. همچنین اکثر این نمونه‌ها در آزمون آنتی‌بیوگرام نسبت به بقیه خانواده‌های آنتی‌بیوتیکی همچون فلوروکینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدها، سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم، پنی‌سیلین‌های ضد سودوموناسی و حتی آزرثرونام نیز مقاوم بودند که بیان‌گر وجود مکانیسم‌های دیگر مقاومت در این نمونه‌هاست. به طوری که می‌توان آن‌ها را به عنوان آسینتوباکترهای دارای مقاومت چنددارویی در نظر گرفت.

با توجه به این که ایمی‌پنم یکی از عمده آنتی‌بیوتیک‌هایی است که پزشکان برای درمان عفونت‌هایی که به درمان سخت پاسخ می‌دهند تجویز می‌کنند، گسترش مقاومت به این آنتی‌بیوتیک می‌تواند بسیار نگران‌کننده باشد. بنابراین انجام آزمون‌های ساده فنوتیپی برای شناسایی سویه‌های تولیدکننده این آنزیم‌ها می‌تواند پزشکان را در تجویز رژیم صحیح آنتی‌بیوتیکی یاری کند.

**\* سپاس‌گزاری:**

از شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج جهت تأمین بودجه این طرح تحقیقاتی و همکاری کارکنان آزمایشگاه بیمارستان‌های البرز، کسری، قائم و شهید مدنی کرج تقدیر می‌شود.

9. Saderi H, Karimi Z, Owlia P, et al. Phenotypic detection of metallo - beta - lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burned patients. *Iranian Journal of Pathology* 2008; 3 (1): 20-4
10. Shahcheraghi F, Sadat Nikbin V, Feizabadi MM. Identification and genetic characterization of metallo- beta- lactamase- producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* in Tehran, Iran. *New Microbiological* 2010; 33: 243-8
11. Karthika RU, Srinivasa RR, Suchismita S. Phenotypic and genotypic assays for detecting the prevalence of metallo-  $\beta$ - lactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a South Indian tertiary care hospital. *Journal of Medical Microbiology* 2009; 58: 430-5
12. Walsh TR, Bolmström A, Qwörnström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002 Aug; 40 (8): 2755-9
13. Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, et al. IMP - 4, a novel metallo- beta- lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Mar; 45 (3): 710-4
14. Lee K, Chong Y, Shin HB, et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo - beta - lactamase - producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001 Feb; 7 (2): 88-91
15. Peymani A, Nahaei MR, Farajnia S, 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
16. Anwar S, Amin R. Phenotype detection of metallo - beta - lactamase among the imipenem resistant *psudomonas* and *asintobacter* in the tertiary care hospitals of Dhaka city. *BMC proc* 2011; 5 (1): 92
17. Kumar AV, Pillai VS, Dinesh KR. The phenotypic detection of carbapenemase in meropenem resistant *Acinetobacter Calcoaceticus - Baumannii* complex in a tertiary care hospital in south India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2011; 5 (2): 223-6