دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی ، آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه باکتری شناسی 2

رنگ آمیزی گرم و آشنایی با خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی باکتریهای جنس اسینتوباکتر

تهیه کننده:سهیلا عباسی

اسینتوباکتر

جنس اسینتوباکتر شامل باکتریهای گرم منفی، به شدت هوازی، غیر تخمیر کننده، غیر اسید دوست،غیر متحرک، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی با محتوای ۳۹٪ – ۴۷ G+C DNA است

اعضای جنس اسینتوباکتر در همه جا حضور دارند، چرا که این ارگانیسمها بعد از غنی سازی در محیط کشت از انواع نمونه های حاصل از خاک یا آبهای سطحی احیا میشوند

در حقیقت اکثر گونه های جنس اسینتوباکتر در محیط زیست دارای زیستگاه طبیعی هستند، اگرچه بیشتر گونه های اسینتوباکترها بخشی از فلور پوست انسان هستند

در یک مطالعه ی اپیدمیولوژی که برای بررسی کلونیزاسیون اسینتوباکتر روی پوست و موکوس انجام گرفت، مشخص شد که ۴۳% افرادی که در بیمارستان بستری نشده اند، با این ارگانیسم کلونیزه شده اند.

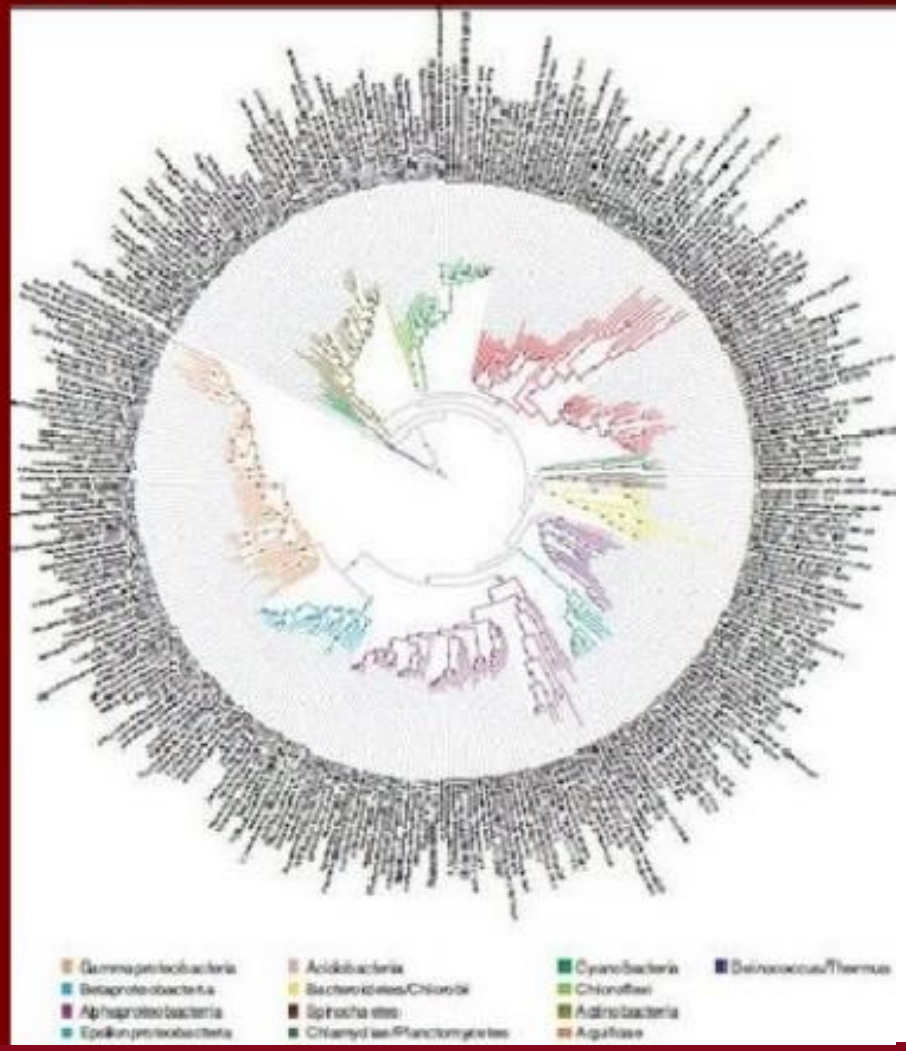
اسینتوباکترها

نام Acinetobacter (برگرفته از واژه‌ی یونانی akinetos به معنی غیرمتحرک)، توسط Brisou و Prevot در سال ۱۹۵۴ برای تمایز ارگانیسم‌های غیرمتحرک از انواع متحرک جنس Achromobacter به‌کار برده شد.

جنس اسینتوباکتر شامل باسیل‌های پلئومورفیک، گرم منفی، به‌شدت هوازی، غیرتخمیرکننده، غیر اسیددوست، غیرمتحرک، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی با محتوای DNA G+C ۴۷ – ۳۹% است. بر اساس یافته‌های جدید تاکسونومی، اسینتوباکتر باید در خانواده‌ی جدید Moraxellaceae در راسته‌ی Gammaproteobacteria که شامل جنس‌های Moraxella، Psychrobacter، Acinetobacter و سایر ارگانیسم‌های وابسته است، طبقه‌بندی شود. این باکتری‌ها در هنگام رنگ‌آمیزی نمونه‌های میکروسکپی حاصل از مایعات بدن و از محیط کشت جامد اغلب مشابه نایسریا هستند.

Other species are occasional pathogens

- *A. **baumannii*** is the major species of **Acinetobacter**. Others occasional human pathogens include *A. calcoaceticus, A. lwoffi, A. junii, A. johnsonii* and *A. baylyi*.



از بین چندین روش موجود برای شناسایی گونه‌های اسینتوباکتر، هیبریداسیون DNA_DNA به‌عنوان روش مرجع استاندارد شناخته شده است. روش شناسایی فنوتیپی که در سال ۱۹۸۶ توسط Bouvet و Grimont پیشنهاد شد، بر اساس ۲۸ تست فنوتیپی است. این روش در سال ۱۹۸۷ بهبود یافت، به این روش جدید پارامترهایی مانند رشد در دمای ۳۷ °C، ۴۱ °C و ۴۴ °C، تولید اسید از گلوکز، هیدرولیز ژلاتین و استفاده از ۱۴ منبع کربن مختلف اضافه شد. اگرچه این روش قادر به تمایز بین ۱۱ تا ۱۲ بیوتیپ اسینتوباکتر که در ابتدا توصیف شدند، هست و همچنین ۹۵/۶% از ایزوله‌های اسینتوباکتر جداشده از نمونه‌های پوستی انسان را تا مرحله‌ی گونه‌ای به‌درستی شناسایی می‌کند، اما توانایی شناسایی گونه‌هایی که اخیراً شناسایی شده بودند را ندارد، همچنین این روش توانایی شناسایی گونه‌های بسیار نزدیک به یکدیگر، گونه‌های شایع کلینیکی، اسینتوباکتر بومانی و اسینتوباکتر بیوتیپ ۱۳TU را ندارد. درحالی‌که A.calcoaceticus و اسینتوباکتر بیوتیپ ۳ تنها به‌واسطه‌ی تفاوت رشد در دماهای مختلف قابل تمایز هستند، متأسفانه تست‌های فنوتیپی ساده که به‌طور معمول در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به کار می‌رود حتی برای شناسایی قطعی شایع‌ترین گونه‌های اسینتوباکتر غیرمناسب است.

هر ۲ روش هیبریداسیون DNA-DNA و Bouvet و Grimont بسیار پُر زحمت بوده و برای آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی مناسب نیستند. در حقیقت این روش‌ها در تعداد کمی از آزمایشگاه‌های مرجع دنیا در دسترس هستند. امروزه روش‌های مولکولی همانند تحلیل قطعات محدودشده‌ی ژن ۱۶S rRNA (ARDRA[۱])، انگشت‌نگاری DNA با قدرت تفکیک بالا با روش پلی‌مورفیسم طول قطعات تکثیرشده (AFLP[۲])، ریبوتایپینگ، انگشت‌نگاری فاصله‌گذارهای tRNA، آنالیز توالی‌های فاصله‌گذار بین‌ژنی ۱۶S-۲۳S rRNA و آنالیز توالی‌های ژن rpoB (زیرواحد β RNA pol) و فاصله‌گذارهای آن برای شناسایی اسینتوباکترها در دسترس است. آنالیزهای ARDRA و AFLP امروزه از جمله پذیرفته‌شده‌ترین روش‌های شناسایی گونه‌های اسینتوباکتر ه

همانطورکه در بالا اشاره شد اسینتوباکتر بومانی (A.baumannii) شایع‌ترین گونه جداشده است. گونه‌های دیگر نظیر اسینتوباکتر لوفی (A.lwoffii)، اسینتوباکتر جانسونی (A.johnsonii)، اسینتوباکتر همولیتیکوس (A.heamolyticus) و سایر گونه‌ها بندرت جدا می‌شوند. قبلاً اسینتوباکترها با نام‌های مختلفی نظیر میما پلی‌مورفا (Mima polymorpha) و هرلا واژینیکولا (Herellea vaginicolla) که بیانگر خصوصیات ارگانیسم‌ها بود، نامیده می‌شدند. اسینتوباکتر بومانی که برخلاف سایر گونه‌های شایع در دمای ۴۴ درجه سانتیگراد نیز رشد می‌کند از خون، خلط، پوست، مایع جنب و ادرار (معمولاً در عفونت‌های همراه با تجهیزات پزشکی) جدا می‌شود. اسینتوباکتر جانسونی پاتوژن بیمارستانی با بیماری‌زایی محدود بوده و در کشت خون بیماران دارای کاتترهای پلاستیکی داخل وریدی دیده می‌شود. اسینتوباکترهایی که از پنومونی‌های بیمارستانی جدا می‌شوند، اغلب از مرطوب‌کننده‌ها یا خنک‌کننده‌ها منشأ گرفته‌اند. این باکتری‌ها در بین باسیل‌های غیرتخمیرکننده بعد از سودوموناس بیشترین وفور را در نمونه‌های کلینیکی دارند.

امروزه اسینتوباکتر بومانی به‌عنوان یکی از مشکل‌سازترین پاتوژن‌های انسانی در مراکز پزشکی دنیا شناخته می‌شود. به دلیل به‌دست آوردن شاخص‌های مقاومت به‌خصوص در ۱۵ سال اخیر، اسینتوباکتر بومانی تبدیل به یکی از ارگانیسم‌های تهدیدکننده‌ی آنتی‌بیوتیک‌های عصر حاضر شده است. سویه‌های اسینتوباکتر بومانی به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های شناخته‌شده مقاوم هستند که این موضوع تلاش‌های گسترده در سطح جهانی را برای کنترل این ارگانیسم می‌طلبد.

چرا اسینتوباکتر بومانی پاتوژن بیمارستانی مقاوم است؟

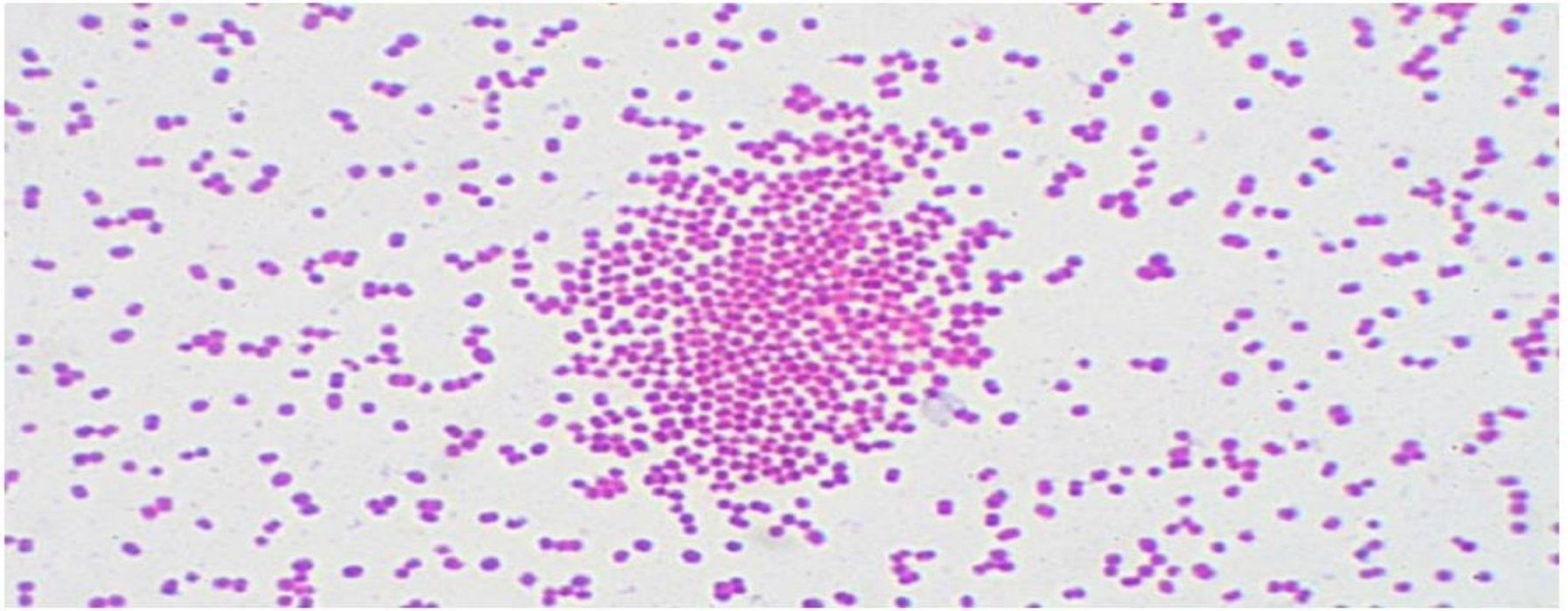
۳ فاکتور اصلی احتمالاً در بقای اسینتوباکتر بومانی در شرایط بیمارستانی نقش دارند. این عوامل عبارتند از مقاومت به اکثر داروهای ضد میکروبی، مقاومت به خشکی و مقاومت به مواد شیمیایی ضد عفونی‌کننده.

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و فشار مضاعف ناشی از آن‌ها ممکن است باعث ایجاد سویه‌هایی خاص با خاصیت انتخابی شود. مطالعات مختلف نشان داده است که میزان مقاومت در سویه‌های اپیدمیک اسینتوباکتر بومانی به میزان قابل‌توجهی بیشتر از سویه‌های عامل مولد تک‌گیر است. مقاومت به فلوروکینولون‌ها در ارتباط با رفتارهای اپیدمیک است. Villers و همکارانش دریافتند که درمان‌های قبلی با فلوروکینولون‌ها به‌عنوان یک فاکتور خطر مستقل برای عفونت با اسینتوباکتر بومانی اپیدمیک است و به‌نظر می‌رسد که فشار انتخابی ناشی از استفاده‌ی مداوم فلوروکینولون‌ها در حداقل ۵ سال، مسئول مقاومت و گسترش اپیدمیک کلون‌های اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو است. افزایش مقاومت سویه‌های اسینتوباکتر بومانی به کارباپنم‌ها در ارتباط با همه‌گیری‌های بیمارستانی است. پیشنهاد شده است که هر ایزوله‌ی کلینیکی اسینتوباکتر بومانی با مقاومت به چندین آنتی‌بیوتیک می‌تواند سویه‌ای با توانایی ایجاد همه‌گیری‌های بیمارستانی ایجاد کند.

تشخیص آزمایشگاهی

از نمونه‌های خون، مایع پلور، ادرار، ضایعات پوستی می‌توان این باکتری‌ها را جدا کرد.

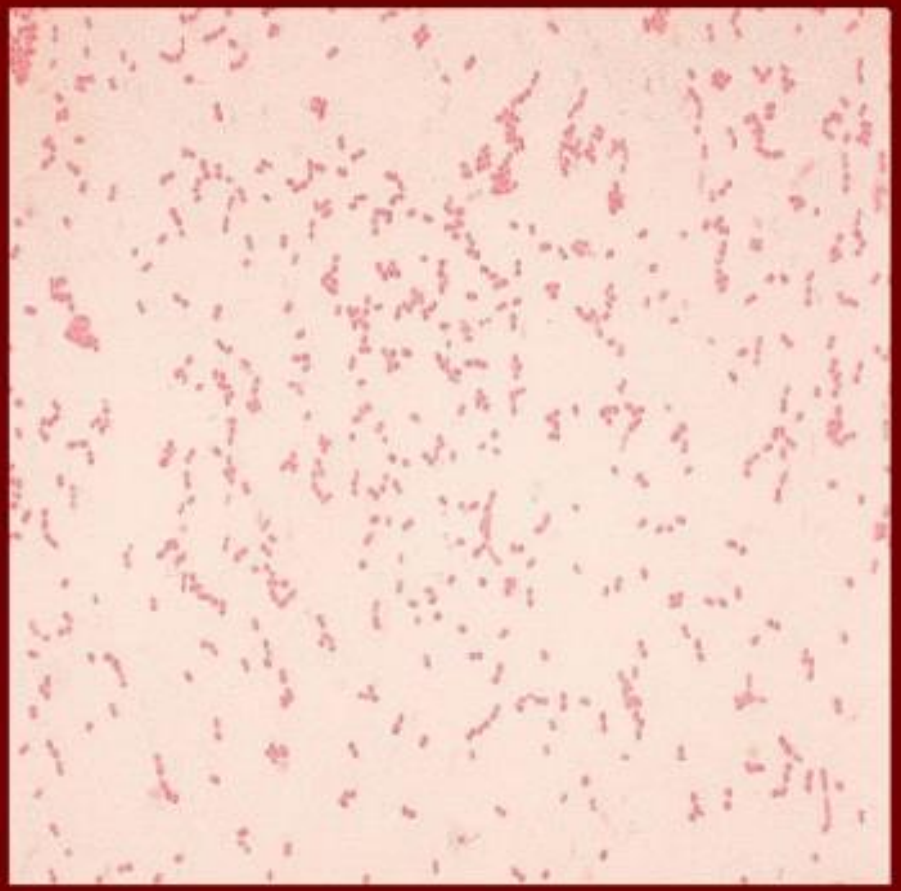
رنگ‌آمیزی گرم: کوکوباسیل یا باسیل‌های کوتاه که در روی محیط‌های جامد و نمونه‌های کلینیکی اغلب به شکل دیپلوکوک هستند و با نایسریاها اشتباه می‌شوند (شکل ۱). این باکتری‌ها گرم منفی هستند که گاهی اوقات گرم مثبت مشاهده می‌شوند (گرم متغیر).



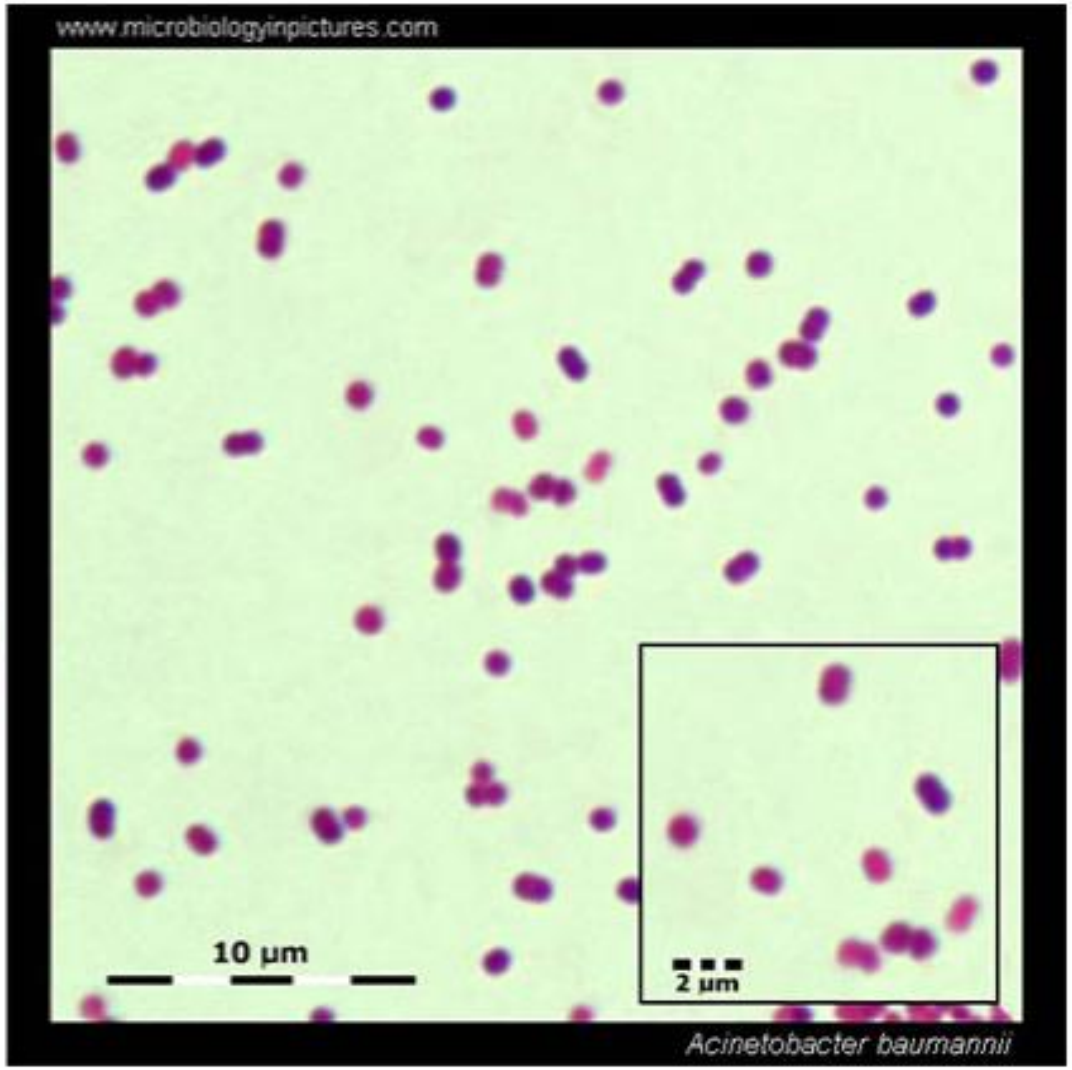
شکل (۱): رنگ‌آمیزی گرم گونه‌های اسینتوباکتر

Acinetobacter baumannii
Morphology

- *Acinetobacter baumannii* is a pleomorphic aerobic gram-negative bacillus, commonly isolated from the hospital environment and hospitalized patients.



Acinetobacter baumannii



Morphology is distinctive

- Rod shaped during rapid growth and coccobacillary in the stationary phase.
- Encapsulated (generally).
- Nonmotile (although they may exhibit twitching motility).
- **Gram-negative organisms**. Retention of crystal violet may result in incorrect identification as gram-positive cocci.

کشت اسینتوباکتر

بر روی بیشتر محیطهای معمولی رشد میکند.روی بلاد آگار کلنی های محدب، خاکستری تا سفید به قطر ۲-۳میلیمتر با همولیز متغیر ایجاد میکند.

کلنی آن در روی مکانکی شبیه سایر لاکتوز منفی ها است.در عمق TSI نمی تواند رشد نماید و الگوی TSI آن مانند سودوموناس ALK/ALK است.

در جدول زیر مشخصات مهم اسینتوباکتر بومانی و لوفی نشان داده شده است.عدم تخمیر گلوکز وجه افتراق آن با انتروباکتریاسه و تست اکسیداز وجه تمایز آن با نایسریا است،اسینتوباکتر برخلاف نایسریاها اکسیداز منفی است

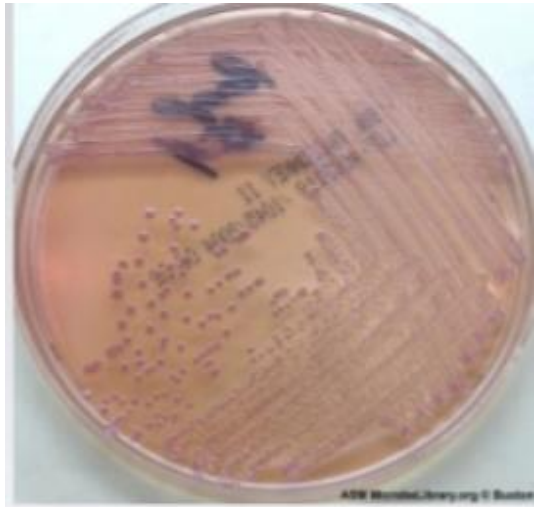
کلید تشخیصی اسینتوباکتر:در TSIواکنش ،ALK/ALK رنگ آمیزی گرم با مشخصات ذکرشده،اکسیداز منفی، مقاومت به پنیسیلین،H۲S منفی، بدون حرکت، کاتالاز مثبت، حساس به پلی میکسین B

کشت: بر روی بیشتر محیط‌های معمولی رشد می‌کند. روی بلادآگار کلنی‌های محدب، خاکستری تا سفید به قطر ۳-۲ میلی‌متر با همولیز متغیر ایجاد می‌کند. کلنی آن در روی مکانکی شبیه سایر لاکتوز منفی‌ها است. در عمق TSI نمی‌تواند رشد نماید و الگوی TSI آن مانند سودوموناس ALK/ALK است. در جدول زیر مشخصات مهم اسینتوباکتر بومانی و لوفی نشان داده شده است.

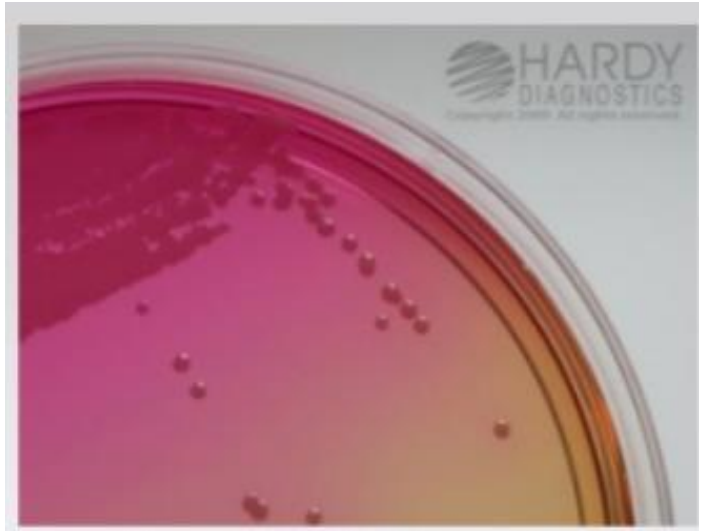
عدم تخمیر گلوکز وجه افتراق آن با انتروباکتریاسه و تست اکسیداز وجه تمایز آن با نایسریا است (اسینتوباکتر برخلاف نایسریاها اکسیداز منفی است).

کلنی های اسینتوباکتر (لاکتوز منفی) بر روی محیط مک کانکی آگار

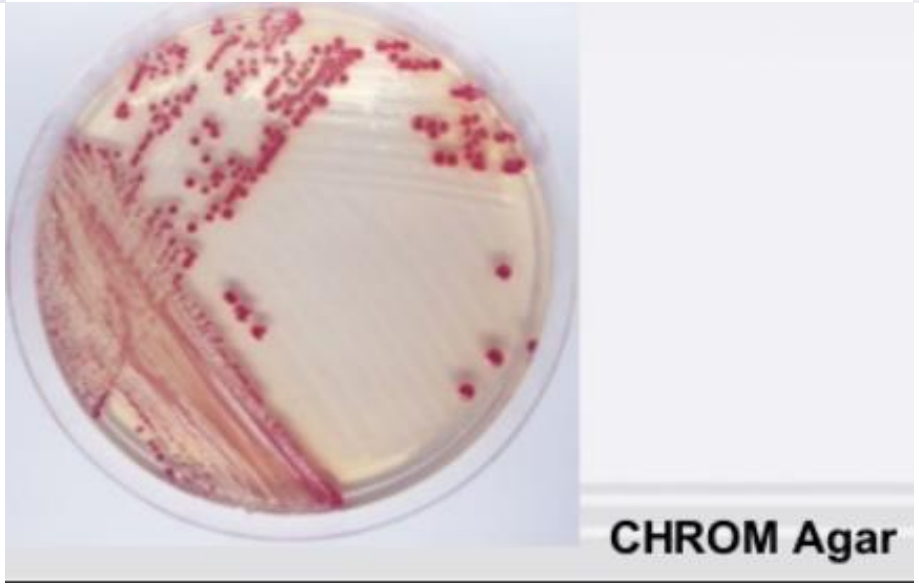
کلنی های اسینتوباکتر بر روی ژلوز خوندار



MacConky Agar



Leeds Acinetobacter Agar



CHROM Agar

شناسایی گونه های مختلف باکتری اسینتوبکتر

اسینتوباکترها تا مرحله ی جنس به واسطه ی خصوصیاتی مانند کوکوباسیلهای گرم منفی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، غیر تخمیر کننده و غیر متحرک شناسایی میشوند.

اسینتوباکترها باسیلهای کوتاه و پهن هستند که رنگ خود را به آسانی از دست نمی دهند و به همین دلیل ممکن است با کوکسیهای گرم مثبت اشتباه گرفته شوند.

اسینتوباکترهای با منشأ انسانی به خوبی در محیط های جامد که به طور معمول در آزمایشگاههای میکروبیولوژی استفاده میشوند، مانند بلاد آگار گوسفندی یا تریپتیکاز سوی آگار در دمای ۳۷° رشد میکنند.

این ارگانیسمها کلنی های صاف، گاهی موکوئیدی و خاکستری تشکیل می دهند.

کلید تشخیصی اسینتوباکتر: در TSI واکنش ALK/ALK، رنگ‌آمیزی گرم با مشخصات ذکرشده، اکسیداز منفی، مقاومت به پنی‌سیلین، H_2S منفی، بدون حرکت، کاتالاز مثبت، حساس به پلی‌میکسین B

جدول (۱): مشخصات کلیدی اسینتوباکترها

TEST	ACINETOBACTER BAUMANNII	ACINETOBACTER LWOFFII
Oxidase	-	-
Motility	-	-
Growth on Maconkey agar	+	+
Growth at 42°C	+	-
OF glucose	+	-
NO_3 reduced	-	-
Gelatin	V	V
Urea	V	V
Pigmentation	-	-

Biochemical Reactions

- **Oxidase negative** (opposite to *Neisseria spp.* or *Moraxella spp.*)
- Haemolytic
- **Indole negative.**
- **Catalase positive.**

Transmission of: Acinetobacter

- Transmission: Acinetobacter can be spread from person to person (infected or colonized patients), contact with contaminated surfaces of exposure to the environment.

درمان

سویه‌های اسینتوباکتر اغلب نسبت به عوامل ضدمیکروبی مقاوم بوده و درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌ها مشکل است. برای انتخاب بهترین درمان ضدمیکروبی، انجام تست تعیین حساسیت ضروری است. این باکتری‌ها به سولفونامیدها، سفالوسپورین‌های قدیمی، اریترومایسین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل مقاوم بوده و در اکثر موارد سویه‌های اسینتوباکتر نسبت به جنتامایسین، آمیکاسین، توبرامایسین و پنی‌سیلین‌ها یا سفالوسپورین‌های جدید و آمینوگلیکوزیدها پاسخ می‌دهند.

تعریف اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چندین دارو

اکثر مطالعات انجام‌گرفته درصد ایزوله‌های حساس (یا مقاوم) به طیف آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهند. اگرچه برخی از مطالعات نیز مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهند. بهترین تعریف برای اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو، مقاومت همزمان به بیش از ۲ آنتی‌بیوتیک از ۵ دسته کلاس آنتی‌بیوتیکی است (ایمی‌پنم یا مروپنم)، آمپی‌سیلین–سولباکتام، فلوروکینولون‌ها و سیپروفلوکساسین یا لووفلوکساسین و آمینو گلیکوزیدها (جنتامیسین، توبرامایسین یا آمیکاسین). لازم به ذکر است که تست‌های حساسیت‌سنجی بتالاکتام‌ها و بازدارنده‌های آن یعنی بتالاکتامازها بسیار پرزحمت هستند و آزمایشگاه‌ها ممکن است از پیپراسیلین–تازوباکتام یا تیکارسیلین–کلاولانات در اسینتوباکتر بومانی استفاده کنند. علاوه‌براین مقاومت به همه‌ی داروها به معنای مقاومت به تمام مواد ضد میکروبی است که برای درمان اسینتوباکتر بومانی مورد استفاده قرار می‌گیرند که شامل بتالاکتام‌ها (شامل کارباپنم‌ها و سولباکتام MIC بیش از ۴ mg/mL)، فلوروکینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها است. اگرچه با افزایش استفاده‌ی پلی‌میکسین‌ها و tigecycline، این تعریف احتمالاً، این عوامل ضد میکروبی را نیز دربر می‌گیرد.

با تشکر از توجه شما