مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۵٤/هفته دوم آبان ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۱۵

شناسایی پسودوموناس آئروژینوزاهای تولید کننده‌ی بتالاکتاماز و دارای مقاومت چندگانه‌ی آنتی‌بیوتیکی

دکتر حسین فاضلی[۱]، دکتر جمشید فقری[۲]، دکتر پیام کبیری[۳]، مهدی فتاحی بافقی[۴]، محمدرضا عربستانی[۵]

چکیده

مقدمه: با مصرف کلینیکی آنتی‌بیوتیک‌ها سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا بیمارستانی دارای مقاومت چندگانه در سراسر جهان به طور فزاینده‌ای افزایش یافته است. یکی از راه‌های مقاومت پسودوموناس آئروژینوزا نسبت به بتالاکتام‌ها تولید آنزیم بتالاکتاماز می‌باشد که معضلات بسیاری را در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری ایجاد کرده است. هدف از این مطالعه، بررسی ایزوله‌های تولید کننده‌ی بتالاکتاماز و دارای مقاومت چند گانه‌ی آنتی‌بیوتیکی (Multi-drug-resistant یا MDR) در پسودوموناس‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی در اصفهان بود.

روش‌ها: تعداد ۹۸ ایزوله از پسودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های مختلف بالینی جداسازی و با تست‌های بیوشیمیایی شناسایی گردید. همچنین بر روی این سویه‌ها تست ESBL (Extended-spectrum beta-lactamase) انجام گرفت. سپس حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های شناسایی شده به روش Kirby-Bauer تعیین گردید.

یافته‌ها: لگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه نشان داد که بیشترین مقاومت در نمونه‌های مربوط به سوختگی بود و از ۳۰ نمونه در سویه‌های جدا شده در سوختگی، همه‌ی ۳۰ سویه (۱۰۰ درصد) به بیش از سه آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند (MDR). بیشترین مقدار مقاومت به ترتیب مربوط به سفودوکسیم، کوآموکسی‌کلاو، سفکسیم، سفوتاکسیم و سفتیزوکسیم و بیشترین حساسیت مربوط به سیپروفلوکساسین و جنتامایسین بود. در این بررسی نمونه‌هایی که مقاومت کامل به سفتازیدیم و سفوتاکسیم داشتند ۶۳ سویه بود که بر روی آن‌ها تست ESBL انجام گرفت. از این تعداد ۲۳ سویه ESBL منفی تشخیص داده شدند و۴۰ سویه توسط کلاولانیک اسید مهار نشدند. تمام نمونه‌های سوختگی مقاوم به سفتازیدیم بودند و توسط کلاولانیک اسید مهار نشدند.

نتیجه‌گیری: باتوجه به بالا بودن شیوع پسودوموناس آئروژینوزاهای دارای MDR در نمونه‌های بالینی مورد مطالعه و افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و شیوع بالای ژن ESBL در این سویه‌ها، ضروری است اقداماتی در جهت کنترل و کاهش این پاتوژن‌های بیمارستانی صورت گیرد.

واژگان کلیدی: بتالاکتاماز، پسودوموناس آئروژینوزا، ESBL

مقدمه

قبل از کشف پسودوموناس آئروژینوزا پزشکان مشاهده‌ی چرک متمایل به رنگ سبز را نشانه‌ای برای وخیم بودن عفونت تلقی می‌کردند (۱). به تدریج خصوصیات این باکتری توسط محققین بررسی بیشتری شد و باکتری به نام های مختلفی اعلام شد تا بالاخره پسودوموناس آئروژینوزا نامیده شد (۵-۲). شایع ترین گونه از جنس پسودوموناس در عفونت‌های انسانی، پسودوموناس آئروژینوزا است که یک باسیل گرم منفی، بدون اسپور، متحرک می‌باشد. کلنی های سبز رنگ با بوی انگور از ویژگی‌های این گونه است. این باکتری بر روی پوست مرطوب و در روده‌ی افراد سالم و در

[۱] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] استادیار، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۴] کارشناس ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۵] دانشجوی دکتری، گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسین فاضلی
Email: h_fazeli@med.mui.ac.ir

مایعات و سطوح مختلف به خصوص سطوح مرطوب حمام، دستشویی، تجهیزات تنفسی، دیالیز و حتی محلول‌های ضد عفونی وجود دارد. این باکتری به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت ذاتی دارد و می‌تواند در طول درمان به سویه‌های مقاوم‌تری تبدیل شود و عامل مهم عفونت‌هایی از جمله پنومونی، عفونت‌های بعد از عمل جراحی، عفونت‌های ادراری، عفونت گوش، عفونت‌های پوستی، عفونت‌های چشمی، باکتریمی و اندوکاردیت باشد (۶). باکتری مزبور یک بیماری‌زای فرصت‌طلب است که به ویژه عامل عفونت های کشنده در افراد مبتلا به ضعف ایمنی از جمله بیماران مبتلا به ایدز، نقص ژنتیکی فیبروز کیستیک، سرطان، بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه و بیماران دچار سوختگی به شمار می‌آید (۸-۷). این ارگانیسم توانایی بالایی در سازگاری با محیط دارد و می‌تواند از ۸۰ نوع ترکیب آلی برای رشد خود استفاده نماید. در طبیعت روی منابع مرطوب زندگی می‌کند و حتی در آب مقطر نیز زنده می‌ماند (۹).

پسودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از مهم ترین عوامل عفونی است که به سختی درمان می‌شود. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های این باکتری، مقاومت بالای آن به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌باشد. بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها از رشد این باکتری در شرایط invitro تا حدود زیادی جلوگیری می‌کنند، اما تنها تعدادی کمی از آن‌ها فعالیت مؤثری را به لحاظ غلظت‌های قابل دسترسی درمانی از خود نشان می‌دهند. با وجود همه‌ی پیشرفت‌های به دست آمده در زمینه‌ی تهیه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های ضد پسودوموناسی، هنوز دوز لازم برای از بین بردن این باکتری در عفونت های وخیم بسیار بیشتر از میزان معمولی آن می‌باشد (۱۰، ۱). با مصرف کلینیکی آنتی‌بیوتیک‌ها سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای بیمارستانی دارای مقاومت چندگانه در سراسر جهان به طور فزاینده ای افزایش یافته است (۱۱). نفوذپذیری کم پروتئین‌های غشای خارجی (Outer membrane proteins یا OMP)، تولید بتالاکتاماز Ampc کروموزومی و تغییر در سیستم‌های تراوشی (Efflux pumps) از عوامل اصلی مقاومت ذاتی این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها است.

یکی از راه‌های مقاومت پسودوموناس آئروژینوزا نسبت به بتالاکتام تولید آنزیم بتالاکتاماز می‌باشد که معضلات بسیاری را در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری ایجاد کرده است (۱۳-۱۲). یکی از این گروه‌ها بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs یا Extended-spectrum beta-lactamase) هستند که پس از تولید و مصرف انبوه سفالوسپورین های وسیع الطیف ظاهر شدند. این آنزیم‌ها (بتالاکتامازها) اولین بار در اوایل دهه‌ی ۱۹۸۰ از اروپا گزارش شدند (۱۴). ESBLs آنزیم‌هایی هستند که واسطه‌ی مقاومت به سفالوپورین هایی با طیف گسترده مانند سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفتریاکسون و همچنین مونوباکتام‌هایی مثل آزترونام می‌باشند. سویه‌های تولید کننده‌ی ESBLs، پس از استفاده‌ی بالینی از سفالوسپورین‌ها، شروع به افزایش کردند (۱۱). الگوهای مختلفی برای طبقه‌بندی بتالاکتامازها وجود دارد. یکی از این روش‌ها که به طور عمده ازآن استفاده می‌شود به وسیله‌ی Bush و همکاران ابداع شده است، که بر اساس نوع سوبستراها، ممانعت کنندگی و خصوصیات فیزیکی نظیر وزن مولکولی و نقطه‌ی ایزوالکتریک بتالاکتامازها به ۴ گروه تقسیم می‌شوند (۱۶-۱۵). طبقه بندی دیگر به نام Ambler می‌باشد. بتالاکتامازها طبق تقسیم‌بندی

www.mui.ac.ir

Ambler به چهار دسته‌ی A تا D تقسیم می‌شوند که نوع A، C، D سرین بتالاکتامازها هستند در حالی که نوع B متالوبتالاکتاماز است (۱۷). بتالاکتامازها از طریق هیدرولیز حلقه ی بتالاکتام منجر به ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتک‌های بتالاکتام می‌شوند (۱۸). وضعیت درمان بیماران با عفونت پسودوموناس آئروژینوزا به خصوص زمانی که این ارگانیسم به طور ذاتی مقاوم به چند رده‌ی آنتی‌بیوتیکی باشد و بتواند مقاومت به تمام داروهای ضد میکروبی را کسب کند مسأله‌ساز است. برای مثال توسعه‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ویژه مقاومت به آمینوگلیکوزیدهایی که با واسطه ی پلاسمید عمل می‌کنند به سرعت باعث انتقال ژن مقاومت به پسودوموناس‌های حساس و سایر باکتری‌های گرم منفی می‌گردد و ارگانیسم را نسبت به درمان مقاوم می‌کند (۱۹). از این رو هدف از این مطالعه بررسی ایزوله‌های تولید کننده‌ی بتالاکتاماز و دارای مقاومت چند گانه آنتی‌بیوتیکی (Multi-drug-resistant یا MDR) در پسودوموناس‌های جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی، عفونت زخم، عفونت ادراری، سپتی‌سمی و بر روی نمونه‌های مایع مفصل، مایع نخاع، پلور، برونش و مدفوع بود.

روش‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی-توصیفی بود. تعداد ۹۸ ایزوله از پسودوموناس آئروژینوزا از نمونه های مختلف بالینی شامل زخم‌های سوختگی، عفونت زخم، عفونت ادراری، سپتی‌سمی و نمونه‌های مایع مفصل، مایع نخاع، پلور، برونش، مدفوع از بیمارستان‌های شهر اصفهان شامل الزهرا (س)، شهید صدوقی، امام موسی کاظم، نور، آیت‌الله کاشانی و دکتر شریعتی جمع‌آوری شد. ابتدا ایزوله‌ها بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز مثبت، کاتالاز مثبت، تولید پیگمان در محیط پیوسین آگار، رشد در محیط ستریماید و مک کانکی آگار، رشد در ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، تست OF (Oxidative fermentative)، کشت در محیط‌های TSI (Triple sugar iron agar)، SIM (Sulfide Indol motility) و سیمون سیترات تشخیص داده شدند. روش انتشار در دیسک، از متداول‌ترین روش‌های تعیین حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک است که به طور معمول در اغلب آزمایشگاه‌ها انجام می‌شود. در تحقیق حاضر نیز حساسیت سویه‌های جدا شده با روش استاندارد Kirby bauer بررسی شد (۲۰). در این روش ابتدا پس از تهیه ی محیط مولر هینتون آگار سوسپانسیون میکروبی مطابق با غلظت نیم مک فارلند (که در هر میلی لیتر آن $۱۰^{۸} \times ۱/۵$ باکتری وجود دارد) تهیه و به طور کامل بر روی محیط مزبور پخش شد. در ادامه حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های شناسایی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین (AN)، جنتامایسین (GM)، سیپروفلوکسازین (CIP)، پیپراسیلین (PC)، سفتازیدیم (CAZ)، سفپیم (CPM)، سفوتاکسیم (CTN)، ایمپینم (IMP)، سفتیزوکسیم (ZON) (شرکت هایمدیا) تعیین گردید. برای تفسیر از جدول CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) استفاده شد. سویه‌ی *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853* جهت کنترل روش آنتی بیوگرام مورد استفاده قرار گرفت. سپس نمونه‌ها در محیط تریپتیکیس سوی براث (TSB) حاوی ۱۰ درصد گلیسرول در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمایشات حساسیت آنتی‌میکروبیال به منظور شناسایی سویه‌های ESBL مثبت به روش دیسک

www.mui.ac.ir

آگاردیفیوژن (DAD) بر اساس استانداردهای CLSI بر روی سویه های پسودوموناس آئروژینوزا انجام شد (۲۱). سویه‌هایی که مقاومت به سفتازیدیم و سفوتاکسیم داشتند برای بررسی های بعدی انتخاب شدند. روش Combine disk با قرار دادن دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰gμ)، سفو تاکسیم (۳۰ gμ) و سفودوکسیم (۳۰ gμ) در فاصله‌ی ۲۰ میلی‌متری (مرکز تا مرکز) از سفتازیدیم/ کلاولانیک اسید (۳۰-۱۰ gμ)، سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید (۳۰-۱۰ gμ) و سفودوکسیم /کلاولانیک اسید (۳۰gμ-۱۰) در محیط مولر هینتون آگار، برای شناسایی ESBLs در پسودوموناس آئروژینوزا مورد استفاده قرار گرفت (۱۸). از کلبسیلا پنومونیه ۷۰۰۶۰۳ (تهیه شده از انستیتو پاستور، ایران) به عنوان سویه ی شاهد مثبت و از پسودوموناس آئروژینوزا ۲۷۸۵۳ به عنوان شاهد منفی استفاده شد. چنانچه هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده توسط دیسک های کلاولانیک اسید، پنج یا بیشتر از پنج میلی متر از دیسک های بدون کلاولانیک اسید بزرگ‌تر باشد (۲۳-۲۲). می‌توان سویه ی مورد نظر را بر طبق CLSI به عنوان مولد ESBLs در نظر گرفت و همچنین آزمایش های تأییدی تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف با استفاده از مهارکننده ی آنزیم بتالاکتاماز (کلاولانیک اسید) و مقاومت در برابر سفامایسین (سفوکسیتین) به عنوان تولیدکننده‌ی بالقوه‌ی آنزیم بتالاکتاماز نوعAmpc در نظر گرفته شد (۲۱-۲۰).

یافته‌ها

در این بررسی تعداد ۹۸ سویه ی باکتری پسودوموناس آئروژینوزا از شش بیمارستان در شهر اصفهان جدا سازی و با تست‌های بیوشیمیایی شناسایی گردیدند (جدول ۱).

جدول ۱. تعداد نمونه‌های بالینی گرفته شده از بیماران و ارتباط آن‌ها با میزان ESBL در پسودوموناس آئروژینوزا

نوع نمونه	تعداد نمونه	عدم مهار با کلاولانیک
سوختگی	۳۰	۳۰ (۱۰۰)
ادرار	۲۶	۴ (۱۶)
سپتی‌سمی	۱۴	۱ (۷)
مجاری تنفسی	۲	۰
مایع مغزی نخاعی	۲	۰
ترشح مغز	۱	۱ (۱۰۰)
خلط	۱	۰
تراشه	۸	۱ (۱۲/۵)
زخم	۵	۱ (۲۰)
حفره‌ی شکم	۴	۲ (۵۰)
برونش	۲	۰
بافت	۱	۰
مفصل	۱	۰
دفوع	۱	۰
جمع کل	۹۸	۴۰

داده‌ها به صورت تعداد (درصد) گزارش شده است.

ESBL: Extended-spectrum beta-lactamase

www.mui.ac.ir

جدول ۲. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه‌های بالینی (۹۸ نمونه)

الگوی مقاومت نام آنتی‌بیوتیک	مقاوم (R)	نیمه حساس (I)	حساس (S)
سفودوکسیم	۹۸ (۱۰۰)	–	–
کوآموکسی کلاو	۹۸ (۱۰۰)	–	–
سفپیم	۹۳(۹۳)	۲ (۲)	۳ (۳)
سفوتاکسیم	۸۸ (۸۹)	۸ (۸)	۱ (۱)
امیکاسین	۵۹ (۵۹)	۶ (۶)	۳۳ (۳۳)
جنتامایسین	۳۸ (۳۸)	۳ (۳)	۵۷ (۵۷)
سیپروفلوکسازین	۳۳ (۳۳)	۶ (۶)	۵۹ (۵۹)
سفتازیدیم	۶۵ (۶۶)	۱۲ (۱۲)	۲۰ (۲۰)
پیپراسیلین	۶۳ (۶۳)	۳ (۳)	۳۲ (۳۲)
سفتیزوکسیم	۸۴ (۸۴)	۹ (۹)	۵ (۵)
ایمی‌پنم	۴۳(۴۳)	۶ (۶)	۴۹ (۴۹)
سفتریاکسون	۵۴ (۵۴)	۲۵ (۲۵)	۱۹ (۱۹)
سفکسیم	۹۷ (۹۸)	۰	۱ (۱)

داده‌ها به صورت تعداد (درصد) گزارش شده است.

R: Resistant; I: Intermediate; S: Sensitive

بیشترین نمونه یعنی ۳۰ درصد مربوط به زخم های سوختگی و کمترین نمونه مربوط به بافت، مفصل، ریه و ترشح مغز بود. تمام نمونه‌های سوختگی مقاوم به سفتازیدیم بودند و توسط کلاولانیک اسید مهار نشدند. از نظر الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه بیشترین مقاومت در نمونه‌های سوختگی دیده شد و از ۳۰ نمونه در سویه های جدا شده در سوختگی ۳۰ سویه (۱۰۰ درصد) به بیش از سه آنتی‌بیوتیک (سفپیم، سفتازیدیم، سفوتاکسیم) مقاوم بودند (Multi-drug resistant). تمام نمونه های جدا شده از سوختگی به ایمی‌پنم مقاوم بودند. این نمونه‌های مقاوم به ایمی‌پنم در بافت‌های دیگر به جز سوختگی نیز رو به افزایش بودند. نتایج به دست آمده در این بررسی نشان داد بیشترین مقدار مقاومت به آنتی بیوتیک های مورد استفاده مربوط به نمونه‌های سوختگی بود. بیشترین مقدار مقاومت به ترتیب مربوط به سفودوکسیم، آموکسی کلاو، سفکسیم، سفوتاکسیم و سفتیزوکسیم و بیشترین حساسیت مربوط به سیپرو فلوکسازین و جنتامایسین بود (جدول ۲).

در این بررسی نمونه هایی که مقاومت کامل به سفتازیدیم و سفوتاکسیم داشتند ۶۳ سویه (۶۴ درصد) بودند که بر روی آن‌ها تست ESBL انجام گرفت. از این تعداد ۲۳ سویه ESBL منفی تشخیص داده شدند و ۴۰ سویه توسط کلاولانیک اسید مهار نشدند. تمام نمونه‌های سوختگی توسط کلاولانیک اسید مهار نشدند و ۹ عدد (۲۷ درصد) از نمونه‌های بالینی (از ۳۳ نمونه‌ی مقاوم به سفتازیدیم و سفوتاکسیم) این پدیده را نشان دادند. مقاومت به سفودوکسیم و آموکسی‌کلاو نیز در این مطالعه ۱۰۰ درصد بود. آزمایش‌های تأییدی تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف با استفاده از مهارکننده‌ی آنزیم

www.mui.ac.ir

بتالاکتاماز (کلاولانیک اسید) و مقاومت در برابر سفامایسین (سفوکسیتین) به عنوان تولید کننده‌ی بالقوه‌ی آنزیم بتالاکتاماز نوع Ampc در نظر گرفته شد. در این بررسی ۴۰ سویه مقاوم بودند که برای تأیید ژنتیکی آن‌ها نیاز به بررسی‌های مولکولی می‌باشد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌هایی که از نظر فنوتیپی مشکوک به Ampc بودند در جدول ۳ ذکر شده است که بیش از ۷۰ درصد آن‌ها به تمام آنتی بیوتیک های مورد مطالعه در این بررسی مقاوم بودند.

بحث

پدیده ی مقاومت دارویی بلافاصله پس از چند سال مصرف انبوه آنتی‌بیوتیک‌ها در جوامع انسانی شناخته شده است و به صورت‌های مختلف تکی و یا چند دارویی دیده می‌شود. سویه‌های ESBL نوع خاصی از مقاومت های دارویی هستند که اولین بار در سال ۱۹۸۳ گزارش گردیده‌اند (۱۴). به دنبال آن از کشورهای مختلف در این مورد گزارشاتی دریافت شده است. در مطالعه‌ی میرصالحیان و همکاران در بیماران سوختگی ۸۷/۰۵ درصد سویه‌ها به بیش از سه آنتی‌بیوتیک مقاوم گزارش شد (۲۴) و در مطالعه ای دیگر در کره این مقاومت ۵۰ درصد گزارش شد . در مطالعه‌ی حاضر تمام نمونه های جدا شده از بیماران سوختگی به بیش از سه آنتی بیوتیک مقاوم بودند. همچنین در مطالعه ی توسط میرصالحیان و همکاران مقاومت به سفودوکسیم ۱۰۰ درصد گزارش شد (۲۴).

جدول ۳. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای Ampc مثبت در نمونه‌های بالینی (۴۰ نمونه)

نام آنتی‌بیوتیک	الگوی مقاومت مقاوم (R)	نیمه‌حساس (I)	حساس (S)
سفودوکسیم	۴۰ (۱۰۰)	۰	۰
کوآموکسی کلاو	۴۰ (۱۰۰)	۰	۰
سفپیم	۴۰ (۱۰۰)	۰	۰
سفوتاکسیم	۴۰ (۱۰۰)	۰	۰
امیکاسین	۲۸ (۷۰)	۲ (۵)	۱۰ (۲۵)
جنتامایسین	۲۸ (۷۰)	۱ (۲/۵)	۱۱ (۲۷/۵)
سیپروفلوکسازین	۲۶ (۶۵)	۵ (۱۲/۵)	۹ (۲۲/۵)
سفتازیدیم	۴۰ (۱۰۰)	۰	۰
پیپراسیلین	۳۱ (۷۷)	۴ (۱۰)	۵ (۱۲/۵)
سفتیزوکسیم	۳۸ (۹۵)	۱ (۲/۵)	۱ (۲/۵)
ایمی‌پنم	۳۳ (۸۲)	۱ (۲/۵)	۶ (۱۵)
سفتریاکسون	۳۸ (۹۵)	۱ (۲/۵)	۱ (۲/۵)
سفکسیم	۴۰ (۱۰۰)		۰

داده‌ها به صورت تعداد (درصد) گزارش شده است.

R: Resistant; I: Intermediate; S: Sensitive

www.mui.ac.ir

که در این مطالعه نیز ۱۰۰ درصد بود. مطالعه‌ای که عزیز ژاپنی در ایران بر روی پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران سوختگی انجام داد، درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، ایمی‌پنم، سفتازیدیم و سفپیم به ترتیب ۲۷/۱، ۶۷/۱، ۱۴/۳، ۱۵/۷، ۲/۹ بود (۱۹). در حالی‌که در مطالعه‌ی میرصالحیان و همکاران در بیماران سوختگی به ترتیب ۸۳، ۶۳، ۸۵ و ۸۸ درصد بود (۲۴) و در مطالعه‌ی حاضر به ترتیب ۸۰، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد بود که نشان‌دهنده‌ی افزایش آن می‌باشد. در مطالعه‌ی شاهچراغی و همکاران بر روی سویه‌های جدا شده از زخم مقاومت نسبت به سفتازیدیم، سیپروفلوکسازین و ایمی پنم در سویه های جدا شده از نمونه های زخم به ترتیب ۲۴، ۱۹ و ۵ درصد بوده است (۲۵). این افزایش میزان مقاومت نشان می‌دهد که نیاز است پیگیری‌های مکرری از الگوی مقاومت پسودوموناس آئروژینوزا به عمل آید تا بتوان پروتکل درمانی مناسب‌تری را برای بیماران تهیه نمود. در یک بررسی بر روی نمونه های بالینی در شهر کرمانشاه میزان مقاومت به جنتامایسین، سفتازیدیم، آمیکاسین، سیپروفلوکسازین و ایمی پنم به ترتیب ۵۲، ۵۰، ۳۸، ۳۸ و ۱۰ درصد گزارش گردید (۲۶). این مقاومت در مطالعه‌ی حاضر به ترتیب ۴۰، ۴۳، ۵۹، ۳۳ و ۴۲ درصد بود. در پسودوموناس آئروژینوزاهای جدا شده از سوختگی در شهر سنندج میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفتیزوکسیم ۱۰۰ درصد بود (۲۷). میزان شناسایی ژن‌های ESBL در سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا در تایلند ۲۸ درصد (۱۵) و ۲۰/۶ درصد (۲۸)، در کره ۲۵/۴ درصد (۲۹)، در بولیوی ۲۳/۴ درصد (۳۰)، در چین ۴۵/۳۳ درصد (۲۲) و در ایران در مطالعه‌ی میرصالحیان و همکاران ۴۰ درصد گزارش شده است (۲۴). در یک مطالعه آنتی بیوگرام به روش انتشار در دیسک مشخص شد که کوآموکسی کلاو بی‌اثرترین داروی ضد پسودوموناس آئروژینوزا می‌باشد (۲۹) که در مطالعه ی فعلی نیز این چنین بود. در بررسی انجام شده توسط حسین‌زادگان و همکاران از باکتری های پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های مختلف بالینی مقاومت به سفتازیدیم ۶/۸ درصد گزارش شده است (۳۱) در بررسی دیگری مقاومت به سفتازیدیم ۶۵ درصد گزارش شد (۳۲). در این بررسی نمونه هایی که مقاومت کامل به سفتازیدیم و سفوتاکسیم داشتند ۶۳ سویه بود که بر روی آن‌ها تست ESBL انجام گرفت که از این تعداد ۲۳ سویه ESBL منفی تشخیص داده شدند و ۴۰ سویه توسط کلاولانیک اسید مهار نشدند. این مسأله ممکن است به دلیل ژن GES-2 باشد که ESBL در تشخیص آن‌ها مؤثر نیست و همچنین ممکن است به دلیل وجود ژن‌های Ampc از کلاس C، Ambler و یا به علت OXA، به خصوص OXA18 از کلاس Dو یا وجود متالوبتالاکتاماز از کلاس B و حتی از ژن‌هایی از کلاس A مانند TEM-4، TEM42 و SHV-2a باشد (۳۴-۳۳). در مطالعه ی Weldhagen و همکاران بیش از ۵۰ درصد نمونه‌های مقاوم به سفتازیدیم این ژن در آن‌ها دیده شد (۲۱). بتالاکتامازهای نوع Ampc سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مانند سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم و مونوباکتام‌هایی مانند ازترونام و سفامایسین‌ها را هیدرولیز می کنند ولی توسط مهارکننده های معمولی مانند کلاولانات مهار نمی‌شوند (۲۳)، در این مطالعه نیز به این شکل بود.

www.mui.ac.ir

نتیجه‌گیری

بر اساس این مطالعه و مطالعات مختلف نتایج مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، متفاوت است و لازم است در هر بیمارستان پروتکل درمانی بر اساس شرایط ارگانیسم های آن بیمارستان صورت گیرد. بهترین راه برای جلوگیری از شیوع این مقاومت در بین بیماران دیگر که به این باکتری آلوده هستند افزایش سطح بهداشت و وسایل مورد استفاده در بخش‌های مراقبت ویژه، محدود کردن جابجایی بیمارانی که با سویه‌های MDR آلوده هستند و همچنین افزایش سریع بهبودی در بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه، است.

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به طور نامناسب مثل آمینوگلیکوزیدها در شروع ژن‌های مقاوم به مولکول‌های آنتی‌بیوتیک‌های غیر وابسته مثل سفالوسپورین‌های با طیف گسترده و یا حتی کاربا‌پنم ها را کد می‌کند که این موضوع در بتالاکتاماز دیده می‌شود (۳۲). به طور کلی درصد مقاومت پسودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌های رایج به خصوص بیماران دارای سوختگی و همچنین شیوع بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف روز به روز در حال افزایش می‌باشد و باید طرحی تازه برای مبارزه با آن و درمان مناسب‌تر استفاده شود.

References

1. Doggett R. Microbiology of pseudomonas aeruginosa. In: Aduan RP, editor. Pseudomonas aeruginosa: clinical manifestations of infection and current therapy. New York: Academic Press; 1979. p. 120.
2. Bergey DH, Buchanan RE, Gibbons NE, American Society for Microbiology. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Philadelphia: Williams & Wilkins Co; 1974. p. 141-219.
3. Campa M, Bendinelli M, Friedman H. Pseudomonas aeruginosa as an opportunistic pathogen. New York: Plenum Press; 1993. p. 12-5.
4. Topley WWC, Ajello L, Collier L, Wilson GS, Balows A, Hay RJ. Topley & Wilson's microbiology and microbial infections: Medical mycology. 9th ed. New York: Arnold; 1998.
5. DeBell RM. Production of exotoxin A by Pseudomonas aeruginosa in a chemically defined medium. Infect Immun 1979; 24(1): 132-8. p. 245-1138.
6. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005.
7. Estahbanati HK, Kashani PP, Ghanaatpisheh F. Frequency of Pseudomonas aeruginosa serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. Burns 2002; 28(4): 340-8.
8. Shahcheraghi F, Feizabadi MM, Yamin V, Abiri R, Abedian Z. Serovar determination, drug resistance patterns and plasmid profiles of Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients at two hospitals of Tehran (IRAN). Burns 2003; 29(6): 547-51.
9. Maleknezhad P, Aligholi M, Moosavi S. Study of pseudomonas aeroginosa resistance to penicillines, cephalosporins and aminoglycosides. Tehran Univ Med J 1998; 56(4): 23-8.
10. Aduan RP. Pseudomonas aeruginosa: clinical manifestations of infection and current therapy. New York: Academic Press; 1979. p. 3.
11. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. J Antimicrob Chemother 2001; 48(6): 839-52.
12. Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant Pseudomonas aeruginosa. Clin Microbiol Infect 2011; 11(Suppl 4): 17-32.
13. Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii infections in the healthcare setting. Curr Opin Infect Dis 2005; 18(4): 306-13.
14. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M , Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. Infection 1983; 11(6): 315-7.
15. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(6): 1211-33.
16. Thomson KS, Prevan AM, Sanders CC. Novel

www.mui.ac.ir

plasmid-mediated beta-lactamases in enterobacteriaceae: emerging problems for new beta-lactam antibiotics. Curr Clin Top Infect Dis 1996; 16: 151-63.

17. Howard C, van DA, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV beta-lactamases in nosocomial infection-associated Klebsiella pneumoniae in Brisbane, Australia. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(3): 659-64.
18. Soltan Dallal MM, Molla Aghamirzaei H, Fallah Mehrabadi J, Rastegar Lari A, Sabbaghi A, Eshraghian MR, et al. Molecular detection of TEM and AmpC (Dha, mox) broad spectrum ?-lactamase in clinical isolates of Escherichia coli. Tehran Univ Med J 2010; 68(6): 315-20.
19. Japoni A, Farshad S, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients in the South of Iran. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine 2006; 35(11): 13-8.
20. Mansori S, Chitsaz M, Hajihoseini R, Mirzaei M, Ghaini MH. Determining the resistance of clinical isolates producing Ampc btalactamases broad spectrum based on phenotypic and genotypic characteristics. Daneshvar 2009; 16(80): 61-70.
21. Weldhagen GF, Prinsloo A. Molecular detection of GES-2 extended spectrum Beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in Pretoria, South Africa. Int J Antimicrob Agents 2004; 24(1): 35-8.
22. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(9): 2990-5.
23. Nikan M, Chitsaz M, Motvayei M. Prevalence of broad-spectrum beta-lactamase ampc gene in clinical isolates of klebsiella pneumoniae. IJMM 2008; 2(2): 1-8.
24. Mirsalehian A, Feizabadi MM, Akbari Nakhjavani F, Jabal ameli F, Goli HR. Prevalence of extended spectrum beta lactamases among strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Tehran Univ Med J 2008; 66(5): 333-7.
25. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Shooraj F. PCR detection of PER &VEB &SHV and TEM lactamases in multidrug resistant P. aeruginoasa isolated from wound infections in two hospitals of Tehran. IJMM 2008; 1(4): 21-7.
26. Mohajeri P. Determine the sensitivity and antibiotic resistance of *P. aeruginosa* strains isolated from various clinical specimens in patients referred to medical centers in Kermanshah. Behbood 2003; 7(4): 11-20.
27. (۳۰) Afrasiabian Sh, Heidari M. Burn wound infection and antibiotic resistance patterns in patients hospitalized in a hospital burn unit Tohid. Iranian Journal of Infectious Diseases 2008; 13(42): 61-5.
28. Chayakulkeeree M, Junsriwong P, Keerasuntonpong A, Tribuddharat C, Thamlikitkul V. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase producing gram-negative bacilli at Siriraj Hospital, Thailand, 2003. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2005; 36(6): 1503-9.
29. Lee S, Park YJ ,Kim M, Lee HK, Han K, Kang CS, et al. Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamases among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in Korea. J Antimicrob Chemother 2005; 56(1): 122-7.
30. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. J Antimicrob Chemother 2006; 57(5): 975-8.
31. Hoseinzadegan H, Azadpour M, Mohammadi F. Screening of extended spectrum beta lactamase producing gram negative bacilli isolated from clinical cases. Medical Laboratory Journal 2007; 1(2).
32. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in Pseudomonas aeruginosa: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(8): 2385-92.
33. Poirel L, Weldhagen GF, De CC, Nordmann P. A nosocomial outbreak of Pseudomonas aeruginosa isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. J Antimicrob Chemother 2002; 49(3): 561-5.
34. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Shooraj F, Shafiei M. Investigation of blaIMP-1, blaVIM-1 and blaSPM-1 MBL genes among clinical strains of pseudomonas aeruginosa isolated from Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran. Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2009; 14(2): 67-72.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 154, 2nd week, November 2011 Received: 28.5.2011 Accepted: 6.9.2011

Identification of Beta-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* with Multiple Antibiotic Resistances

Hossein Fazzeli MD[1], Jamshid Faghri MD[2], Payam Kabiri MD[3], Mehdi Fatahibafghi MSc[4], Mohammad Reza Arabestani MSc[5]

Abstract

Background: The clinical use of antibiotics in treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections causes resistant to multiple drugs increasingly. *P. aeruginosa* could produce beta lactamase enzyme to beta lactam antibiotics that causes many problems. The purpose of this study is analysis of the isolated of Pseudomonas from clinical specimens and this was done for the first time in Isfahan.

Methods: A total of 98 isolates of *P. aeruginosa* from various clinical samples collected, then identified by biochemical tests. The antibiotic sensitivity of strains was performed by Kirby-Bauer method.

Findings: The pattern of resistance to antibiotics showed that the greatest strength was in the burn specimen and 30 samples of the strains isolated from burns. In the 30 strains (%100) were resistances to more than three antibiotic (multi-drug resistant). Maximum resistance to Cefodoxime, amoxiclave, Cefexime, Cefotaxime and ceftizoxime respectively and the most sensitive to Ciprofloxsazine and gentamicin. In this study 63 strains showed the full resistance to ceftazidime and Cefotaxime s and ESBL test was done that revealed 23 strains of ESBL were negative and 40 strains did not inhibit by Clavulanic acid. All of the burn samples resistant to ceftazidime and did not inhibit by Clavulanic acid.

Conclusion: In regarding to the high prevalence of *P. aeruginosa* with Multiple Drug Resistant, increased resistance to antibiotics and the high incidence of ESBL in the strains in clinical samples, it is essential, extended control measures to reduce this pathogens.

Keywords: Beta- lactamase, *Pseudomonas aeruginosa*, ESBL.

[1] Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[2] Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Biostatitics and Epidemiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[4] Department of Microbiology, School of Medicine Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5 PhD Student, Department of Medical Microbiology, School of Medicine And Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Hossein Fazzeli MD, Email: h_fazeli@med.mui.ac.ir