مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۳۰۷/هفته چهارم آذر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۵/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۸/۲۰

بررسی تأثیر باکتریوفاژ جدا شده از نمونه‌های آب بیمارستان بر سویه‌های مقاوم به درمان (MDR) سودوموناس آئروژینوزا

دکتر بهرام نصر اصفهانی[۱]، محسن روشنایی[۲]، دکتر حسین فاضلی[۱]، دکتر سید اصغر هوایی[۳]، دکتر شراره مقیم[۱]، دکتر حاجیه قاسمیان صفایی[۳]، ریحانه جعفری[۴]، حسن قجاوند[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مقاومت عفونت‌های باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها به علت مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها و مکانیسم‌های متعدد مقاومت به آن‌ها توسط باکتری‌ها رو به افزایش است. باکتری‌های مقاوم به چند دارو (MDR یا Multi-drug resistance) در بخش‌های مختلف بیمارستان از جمله بخش مراقبت‌های ویژه (ICU یا Intensive care unit)، باعث بروز عفونت‌های مهم بیمارستانی شده‌اند که درمان آن‌ها با آنتی‌بیوتیک‌ها را با مشکل مواجه ساخته است. استفاده از روش‌های جایگزین مانند استفاده از باکتریوفاژها، یکی از راه‌های حل این معضل است. باکتریوفاژها یکی از عوامل مهم ضد باکتریایی می‌باشند که به طور اختصاصی به باکتری‌های میزبان خود حمله می‌کنند و باعث انهدام آن‌ها می‌شوند. هدف از این مطالعه، جداسازی فاژهای اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا و بررسی تأثیر آن‌ها بر روی سویه‌های مقاوم به چند دارو سودوموناس آئروژینوزا بود.

روش‌ها: در یک مطالعه‌ی مقطعی در سال ۱۳۹۲، جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های کلینیکی بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه به روش بیوشیمیایی تعیین هویت شد. سپس، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها با استفاده از روش کربی بائر بر طبق دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) تعیین و به عنوان اندیکاتور میزبان جهت جستجوی فاژ از منابع آب استفاده گردید.

یافته‌ها: ۴۲ سویه‌ی سودوموناس آئروژینوزا از بخش مراقبت‌های ویژه به دست آمد. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که ۸۸ درصد ایزوله‌ها به آمیکاسین، ۹۰ درصد به سفی‌پیم، ۸۵ درصد به سفتازیدیم، ۹۰ درصد به جنتامایسین، ۷۵ درصد به ایمی‌پنم و مروپنم و همچنین ۹۵ درصد جدایه‌ها به سیپروفلوکسازین مقاوم بودند. در آزمایش‌های جداسازی فاژ، تنها از نمونه‌ی آب فاضلاب بیمارستان باکتریوفاژ لیتیک جداسازی شد و باکتریوفاژ جداسازی شده بر روی سودوموناس آئروژینوزاهای غیر مقاوم به چند دارو و ۳ سویه‌ی باکتری گرم منفی دیگر تأثیری نداشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوبیک‌های رایج استفاده از روش‌های درمانی جدید مانند فاژدرمانی افق جدیدی را در درمان عفونت‌های باکتری که به تمامی آنتی بیوتیک‌ها مقاومند باز می‌کند.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، باکتریوفاژ، فاژتراپی، مقاوم به چند دارو

ارجاع: نصر اصفهانی بهرام، روشنایی محسن، فاضلی حسین، هوایی سید اصغر، مقیم شراره، قاسمیان صفایی حاجیه، جعفری ریحانه، قجاوند حسن. **بررسی تأثیر باکتریوفاژ جدا شده از نمونه‌های آب بیمارستان بر سویه‌های مقاوم به درمان (MDR) سودوموناس آئروژینوزا.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۸): ۱۸۱۵-۱۸۰۵

۱- دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاوجان، اصفهان، ایران
۵- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شراره مقیم
Email: moghim@med.mui.ac.ir

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا، باسیل هوازی گرم منفی است که عامل بسیاری از عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی در بیماران بستری در بیمارستان است (۳-۱). این عفونت‌ها به نحو چشمگیری موجب افزایش شیوع بیماری و مرگ و میر در بیماران شده است (۵-۴). سودوموناس آئروژینوزا در ۱۶ درصد پنومونی بیمارستانی (۶)، ۱۲ درصد عفونت‌های مجاری ادراری (۷)، ۸ درصد عفونت زخم‌ها (۸) و ۱۰ درصد عفونت‌های خونی (۹) دخالت دارد. این باکتری همچنین در بیماران دارای نقص ایمنی مانند بیماران دریافت کننده ی داروهای سرکوب کننده‌ی ایمنی، بیماران سرطانی و پیوند مغز استخوان، عامل ۳۰ درصد از مرگ‌های ناشی از سپتی‌سمی و پنومونی است (۱۱-۱۰) و در پنومونی ناشی از دستگاه تهویه‌ی مکانیکی (ونتیلاتور)، موجب ۳۸ درصد مرگ می‌شود (۱۲). در بیماران سوانح سوختگی، عامل ۶۸ درصد مرگ های ناشی از عفونت زخم است (۱۳). استفاده‌ی گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مکانیسم های متعدد مقاومت دارویی توسط این باکتری، درمان سودوموناس آئروژینوزا را با مشکل مواجه ساخته است. به عنوان مثال، توانایی تولید و گرفتن پلاسمید حاوی ژنوم بتالاکتاماز از رده های دیگر باکتریایی، لایه‌ی خارجی نفوذ ناپذیر به واسطه‌ی نداشتن پروتئین‌های OprD، فعالیت کارآمد پمپ‌های برون‌ریز (Efflux systems)، تولید آنزیم‌های تخریب کننده‌ی آمینوگلیکوزیدها (مانند فسفریل ترانسفراز، استیل ترانسفراز و آدنیل ترانسفراز)، تغییر ساختار توپوایزومرازهای IV و II و بازسازی سفالوپورینز، از مکانیسم‌هایی هستند که سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو، برای ایجاد مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌کند (۱۴).

امروزه اصطلاح سودوموناس آئروژینوزا (Pseudomonas aeruginosa) مقاوم به چند دارو (MDR یا Multi-drug resistant) به سودوموناس آئروژینوزایی اطلاق می‌شود که حداقل به ۳ نوع آنتی‌بیوتیک شامل آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها و فلوروکینولون‌ها مقاوم باشد (۱۵). سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به چند دارو، یکی از معضلات مهم در درمان عفونت‌های بیمارستانی به خصوص در بخش‌های مراقبت‌های ویژه، نوزادان و غیره است. از این رو، استفاده از روش‌های جایگزین برای درمان ضروری به نظر می‌رسد. ویروس‌های باکتریایی (باکتریوفاژها) یکی از عوامل مهم ضد باکتریایی می‌باشند که به طور اختصاصی به باکتری‌های میزبان خود حمله می‌کنند و باعث انهدام آن‌ها می‌شوند، اما بر روی سلول‌های انسانی یا حیوانی تأثیری نمی‌گذارند. تخمین زده می‌شود فاژها گسترده‌ترین و متنوع‌ترین موجوداتی هستند که در کره‌ی زمین وجود دارند. فاژهای لیتیک درون باکتری تکثیر می یابد و تعداد زیادی فاژ تولید می شود که در نهایت موجب مرگ باکتری می‌شوند (۱۶).

ایده‌ی استفاده از فاژ در درمان عفونت‌های باکتریایی (Phage therapy) به سال ۱۹۲۰ در شوروی سابق بر می‌گردد. آن زمان درمان مؤثر دارویی با آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، عدم اطلاعات کافی در مورد بیولوژی فاژها و گران بودن هزینه‌ی فاژتراپی، موجب عدم استقبال از آن شد (۱۷).

امروزه، افزایش مقاومت باکتریایی و عدم کارایی

روش‌های پیشین، موجب مطرح شدن دوباره‌ی فاژتراپی به عنوان راه حلی برای حل این معضل شده است. استفاده از فاژها در درمان بیماری‌های عفونی، چندین مزیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارد که از آن جمله، می‌توان به این موارد اشاره کرد. فاژها دشمن طبیعی باکتری‌ها هستند، تا زمانی که میزبان وجود داشته باشد، تکثیر می‌یابند و با حذف باکتری میزبان از بین می‌رود. در حالی که آنتی‌بیوتیک‌ها به طور سنتتیک تهیه می‌شوند و در بدن متالولیزه می‌شوند. با توجه به این که میزبان باکتریوفاژها اختصاصی است، بر خلاف آنتی‌بیوتیک‌ها تأثیری بر نرمال فلور بدن و تعادل آن‌ها ندارند و به این ترتیب، امکان رشد پاتوژن‌های فرصت طلب را نمی‌دهند. همچنین فاژها تنها در حضور باکتری میزبان تکثیر می‌یابند و تکثیر آن‌ها کنترل شونده است؛ در حالی که غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها با گذشت زمان کاهش می‌یابد (۱۸). این مطالعه با هدف جداسازی و بررسی مقدماتی تأثیر باکتریوفاژ بر سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا MDR اجرا گردید. با مطالعات بیشتر بر روی فاژ جداسازی شده و افزایش تأثیر کارایی آن بر روی این باکتری، می‌توان به کاربرد آن در درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس‌ها توسط فاژها تحقق بخشید.

روش‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی بود که در سال ۱۳۹۲ در گروه میکروب‌شناسی دانشکده ی پزشکی انجام شد. تعداد ۴۲ نمونه (شامل تمامی مایعات بدن، خلط، خون، زخم و ...) مشکوک به سودوموناس از بخش ICU (Intensive care unit) بیمارستان الزهرا (س) گرفته شد. آزمون‌های آماری به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۴ (version 14, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد و با استفاده از آزمون χ^2 و ضریب کاپا (Kappa coefficient) تجزیه و تحلیل گردید. مقادیر $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان شاخص معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد. بر روی ۴۲ نمونه‌ی دریافتی، آزمایش‌های فنوتیپی به منظور تشخیص سودوموناس آئروژینوزا صورت گرفت. سودوموناس یک باسیل گرم منفی نان فرمانتاتیو است و در محیط (Triple sugar iron agar) TSI به صورت $\frac{AlK}{AlK}$ در آمد و پس از آن، رشد در محیط ^{o}C ۴۲، آزمایش اکسیداز و بررسی ایجاد پیگمان سبز در محیط مولر- هینتون آگار (Mueller Hinton agar) انجام گرفت. پس از تأیید و تشخیص فنوتیپی سودوموناس آئروژینوزا، آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن صورت گرفت. ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا که به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکسازین، آمیکاسین، جنتامایسین، سفتازیدیم، ایمی‌پنم، مروپنم و سفیپیم مقاومت داشتند، به عنوان MDR در نظر گرفته شدند. جهت بررسی نتایج حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها، از جدول CLSI ۲۰۱۰ (Clinical and Laboratory Standards Institute) استفاده شد و دیسک‌های مورد آزمایش از شرکت ROSCO دانمارک تهیه شده بودند و بر روی تمامی دیسک‌ها با سوش‌های ATCC (American type culture collection) از قبل کنترل کیفی صورت گرفته بود. ۵ سویه باکتری MDR به عنوان اندیکاتور برای جداسازی فاژهای ویرولانت انتخاب شدند. جهت جداسازی باکتریوفاژ اختصاصی، ۵ نمونه از منابع آب محیطی بیمارستان الزهرا (س) شامل آب لوله‌کشی، آب بخش ICU، آب

شوینده‌ی وسایل مربوط به ICU، آب فاضلاب ICU و آب فاضلاب بیمارستان جمع آوری و جهت حضور فاژ از تکنیک غنی‌سازی فاژ استفاده گردید.

تکنیک غنی‌سازی فاژ

نمونه‌های آب در ابتدا در دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. ۵۰ ml مایع رویی از آب سانتریفوژ شده با ۵۰ ml محیط نوترینت براث (Nutrient broth) ۲x مخلوط شد. ۱ ml نیز کشت سوسپانسیون ۲۴ ساعته‌ی باکتری سودوموناس آئروژینوزا با غلظتی معادل ۰/۵ مک فارلند و چند قطره $MgSO_4$ اضافه گردید. این مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C شیکردار در دور ۱۶۰ rpm انکوبه گردید. بعد از ۲۴ ساعت، ارلن حاوی محیط، آب و باکتری از انکوباتور خارج شد و چند قطره کلروفرم به آن اضافه گردید و پس از ۱۵-۱۰ دقیقه، مخلوط در لوله‌های فالکون ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی در میکروتیوپ‌های ۱/۵ ml ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و در نهایت، تمامی نمونه‌های رویی میکروتیوپ ها در یک ارلن استریل ریخته و با فیلتر ۰/۴۵ محلول فیلتر گردید (۱۹).

جهت بررسی ایجاد پلاک از تکنیک دبل لایر آگار (Double-layer agar) استفاده گردید.

روش آگار دو لایه (Double-layer agar method)

در یک لوله ی آزمایش، ۰/۲ ml از مایع فیلتر شده به همراه ۰/۱ ml کشت ۲۴ ساعته‌ی سویه‌ی سودوموناس آئروژینوزا با ۲/۵ ml نوترینت آگار (۰/۷ درصد آگار) که در ۴۵ °C ذوب شده بود، مخلوط گردید و سپس در محیط جامد شده‌ی نوترینت آگار (۱/۵ درصد آگار) برده شد (۱۹).

بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ °C، پلاک های ایجاد شده در پلیت برداشته شد. جهت برداشت پلاک ها، از لوپ استریل استفاده شد و پلاک ها در یک ارلن استریل ریخته و ۵۰ ml نوترینت براث و ۰/۵ cc سوسپانسیون باکتری با رشد ۲۴ ساعته اضافه گردید و بار دیگر در انکوباتور شیکردار به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت، محلول حاوی فاژ و باکتری، ابتدا در دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی، با فیلتر ۰/۴۵ فیلتر شد. نمونه‌ی فیلتر شده، بار دیگر جهت مشاهده‌ی پلاک به روش دبل لایر آگار و روش Spot بررسی گردید. این کار چندین بار صورت گرفت تا میزان فاژ خالص زیادی تولید شود (۱۹).

آنالیز طیف میزبان (Host range)

طیف میزبان فاژ شناسایی شده در مقابل میکروارگانیسم‌های گرم منفی دیگر مانند اسینتوباکتربومانی، انتروباکتر کلوآکه و کلبسیلاپنومونیه بررسی صورت گرفت. جهت بررسی طیف میزبان فاژ آزمایش به صورت Spot انجام گردید.

روش Spot test

۰/۱ ml از سوسپانسیون باکتری با رشد ۲۴ ساعته با ۲/۵ ml نوترینت آگار ۰/۷ درصد مخلوط شد و این مخلوط بر روی پلیت‌هایی که حاوی نوترینت با ۱/۵ درصد آگار بود، ریخته شد. پلیت‌هایی با دو لایه ایجاد گردید و وقتی آگار لایه ی بالایی بسته شد، ۵ µl از محلول فاژ به صورت Spot به داخل پلیت هر باکتری ریخته شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ C° به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. هاله‌ی شفاف مشاهده شده، نشان دهنده‌ی حساسیت آن باکتری به فاژ بود (۲۰).

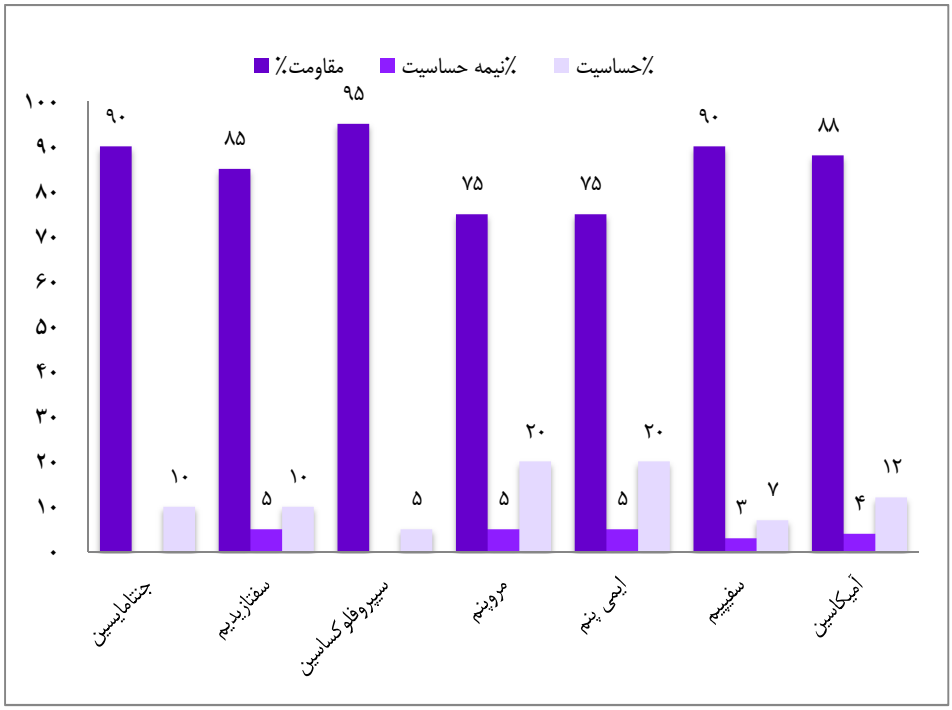
یافته‌ها

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که ۸۸ درصد ایزوله‌ها به آمیکاسین، ۹۰ درصد به سفی‌پیم، ۸۵ درصد به سفتازیدیم، ۹۰ درصد به جنتامایسین، ۷۵ درصد به ایمی‌پنم و مروپنم و همچنین ۹۵ درصد جدایه‌ها به سیپروفلوکسازین مقاوم بودند.

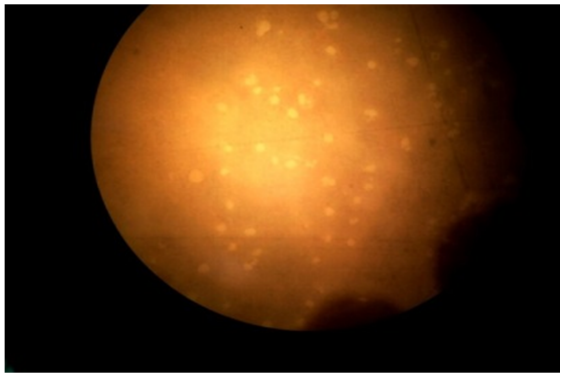
از ۵ نمونه‌ی آب بیمارستانی، تنها از نمونه‌ی مربوط به فاضلاب بیمارستان باکتریوفاژ جدا گردید. شکل ۲ پلاک تشکیل شده توسط فاژ به روش Double layer agar را نشان می‌دهد. در مرحله‌ی بعد، باکتریوفاژ بر روی پلیت سودوموناس غیر MDR،آسینتوباکتر بومانی، کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر کلوآکه مورد آزمایش قرار گرفت که در هیچ کدام از پلیت‌ها، پلاک تشکیل نشد و بی‌تأثیر بود.

بحث

در این مطالعه، میزان مقاومت سودوموناس آئروژینوزا استخراج شده از بخش مراقبت‌های ویژه‌ی بیمارستان الزهرا (س) در برابر ۷ آنتی بیوتیک مختلف بررسی شد. این بررسی از نظر تفاوت مقاومت های دارویی در نقاط مختلف دنیا و همچنین تفاوت مقاومت دارویی در یک نقطه در زمان های مختلف حایز اهمیت است. در مورد میزان مقاومت سودوموناس به کارباپنم‌ها، مطالعات زیادی انجام شده است. در مطالعه ی رگان و همکاران میزان مقاومت به ایمی پنم ۱۲/۳ درصد بود (۲۱). همچنین در مطالعه‌ی Gonlugur و همکاران در ترکیه، میزان مقاومت به ایمی‌پنم ۱۲/۶ درصد بود (۲۲). Niitsuma و همکاران میزان مقاومت به ایمی‌پنم و مروپنم را به ترتیب ۱۵/۷ و ۸/۸ درصد گزارش کردند (۲۳).



شکل ۱. توزیع فراوانی الگوی مقاومت دارویی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا



شکل ۲. تصویر پلاک [فاژ اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا MDR (Multi-drug resistance)] با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰

همچنین مطالعات مشابهی در نقاط مختلف ایران انجام شده است. مهاجری نشان داد که میزان مقاومت سودوموناس در برابر ایمی‌پنم در کرمانشاه ۱۰ درصد می‌باشد (۲۴). عظیمی و همکاران در تنکابن میزان مقاومت به ایمی‌پنم را ۱۶ درصد ذکر کردند (۲۵) که این عدد در مطالعه‌ای در تهران ۶ درصد بود (۲۶). در همه‌ی این مطالعات، میزان مقاومت به کاربا‌پنم‌ها کمتر از ۱۶ درصد بود. این در حالی است که میزان مقاومت به ایمی پنم و مروپنم طبق نتایج مطالعه‌ی حاضر ۷۵ درصد می باشد که در مقایسه با سایر مطالعات مشابه، بسیار بالا است. البته مطالعات اندکی نیز نتیجه‌ی این مطالعه را تأیید می‌کند. رنجبر و همکاران نشان دادند که میزان مقاومت به ایمی‌پنم در تهران ۹۷/۵ درصد بوده است (۲۷).

از طرف دیگر، در مطالعه‌ی مشابهی که ۴ سال پیش در بیمارستان الزهرا (س) اصفهان انجام شد، میزان مقاومت به ایمی پنم ۴۲ درصد ذکر گردید (۲۸) که این مطلب نشان دهنده‌ی افزایش میزان مقاومت سودوموناس به این آنتی‌بیوتیک در این بیمارستان در سال‌های اخیر است. در مطالعه‌ی حاضر، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین ۹۵ درصد بود. این در حالی است که در مطالعه‌ی مشابهی که ۴ سال پیش در این بیمارستان انجام گرفت، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۴۲/۸۵ درصد ذکر شد که این امر، نشان دهنده ی افزایش مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در شهر اصفهان می‌باشد (۲۸). در مطالعه‌ای در تهران، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۲۳ درصد ذکر شد (۲۷). در حالی که در مطالعه ی دیگری در این شهر، این مقدار ۱۹//۷ درصد بود (۲۶) و همچنین این مقدار، در مطالعه ی نهایی و همکاران (۲۹) در تبریز ۲۲ درصد بود که در تأیید نتایج این مطالعه نیست و میزان مقاومت نسبت به این دارو در اصفهان بسیار بیشتر از سایر مطالعات موجود در ایران است.

همچنین این عدد در مطالعه‌ی Gonlugur و همکاران در ترکیه، ۱۶/۱ درصد می‌باشد که نشان دهنده‌ی پایین‌تر بودن میزان مقاومت در برابر سیپروفلوکساسین در این کشور است. میزان مقاومت آنتی بیوتیک جنتامایسین در این مطالعه، ۹۰ درصد بود که این میزان، نسبت به مطالعات مشابه در کشورهای دیگر و همچنین در ایران بیشتر بود. در مطالعه‌ی رنجبر و همکاران این عدد ۶۷/۵ درصد (۲۷) و در مطالعه‌ی شاهچراغی و همکاران در تهران، ۳۱ درصد ذکر شده است (۲۶). همچنین در مطالعات مشابهی در تبریز و کرمانشاه، این عدد به ترتیب ۵۱ و ۵۲ درصد گزارش شد (۲۹، ۱۹) که نشان دهنده‌ی بالا بودن میزان مقاومت نسبت به جنتامایسین در بیمارستان الزهرا (س)، نسبت به دیگر نقاط ایران می باشد. تنها مطالعه ای که در ایران در تأیید نتایج این مطالعه وجود دارد، در تنکابن انجام شد که مقاومت

۱۰۰ درصدی نسبت به جنتامایسین را نشان داد (۲۵). در مطالعات مشابهی در ترکیه (۲۲) و بنگلادش (۳۰)، میزان مقاومت به جنتامایسین به ترتیب ۵۷/۵ و ۷۵/۸ درصد گزارش شد.

در رابطه با سفتازیدیم، مطالعات متعددی در ایران و سایر نقاط دنیا انجام شده و نتایج متفاوتی به دست آمده است. برای نمونه این میزان مقاومت در مطالعه‌ای در ژاپن ۴/۶ درصد (۲۳)، در بنگلادش ۸۵/۸ (۲۴) درصد و در ترکیه ۵۰/۸ (۲۲)درصد ذکر شده است. در مطالعات مشابه در ایران، این عدد در تهران در سال ۲۰۰۹، ۳۱ درصد و در سال ۲۰۱۱، ۵۷/۵ درصد بوده است که نشان دهنده‌ی افزایش این مقاومت در این شهر می‌باشد (۲۶-۲۵). همچنین میزان مقاومت نسبت به سفتازیدیم در تبریز و کرمانشاه ۶۹ و ۵۰ درصد گزارش شد (۲۴، ۲۳). این در حالی است که میزان مقاومت ۸۵ درصدی به دست آمده در این مطالعه، نسبت به این دارو از سایر مطالعات بیشتر است. در مقایسه با مطالعه‌ای که ۴ سال پیش در بیمارستان الزهرا (س) اصفهان انجام شد، میزان مقاومت در برابر سفتازیدیم در این مطالعه بیش از ۳۶ درصد افزایش داشته است (۲۸).

در این مطالعه، تعداد نمونه ها با توجه به مشکلات موجود محدود بود و توصیه می‌شود مطالعات مشابه با حجم نمونه‌ی بالاتری انجام شود. در این مطالعه، با توجه به محدودیت امکانات، نوع باکتریوفاژ مورد استفاده مشخص نشد. مشخص بودن نوع باکتریوفاژ در مطالعات مشابه، مفید خواهد بود. همچنین در این مطالعه مقاومت سودوموناس نسبت به ۷ آنتی بیوتیک سنجیده شد که توصیه می شود در مطالعات آتی، سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرند. درمان با استفاده از باکتریوفاژها در برابر باکتری های مقاوم به درمان می‌تواند بسیار مؤثر باشد. در این مطالعه، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که یک ایزوله‌ی جدید باکتریوفاژ می‌تواند به طور فعال سودوموناس آئروژینوزا در حال رشد را لیز کند. فاژها به طور طبیعی و به مدت طولانی ساکن سلول میزبان اختصاصی خود در آب دریا و آب فاضلاب هستند (۳۱). فاضلاب اغلب حاوی تعداد زیادی میکروب به دلیل آلودگی از مدفوع و منابع آب بیمارستان می‌باشد. فاژ موقعی می‌تواند یک میزبان را عفونی کند که بتواند بعد از واکنش با گیرنده‌ی باکتریایی وارد آن شود (۳۲). اکثر فاژهای یافت شده، اختصاصیت زیادی برای گیرنده‌های موجود در میزبانشان داشته‌اند. فاژها نشان داده‌اند که هیچ واکنشی با گیرنده‌های دارای ساختار متفاوت، نمی‌دهند. اختصاصیت فاژها اساس فاژ تایپینگ را تشکیل می‌دهد که در تشخیص سویه‌های باکتریایی به کار می‌رود.

نتیجه‌ی مطالعه‌ی حاضر نشان داد که فاژ سودوموناس آئروژینوزا دارای اختصاصیت بالا بوده و فقط یک سویه از ۵ سویه‌ی سودوموناس آئروزینوزای MDR را لیز نموده و بر سایر باکتری‌های مورد مطالعه نیز اثری نداشته است. در این مطالعه، استفاده از فاژ در برابر سودوموناس در محیط آزمایشگاه صورت گرفت. هر چند استفاده در نمونه های حیوانی و انسانی نتایج قابل قبولی داشته است (۳۳).

با توجه به مطالعات گذشته، از قبل از طریق محیط چه به صورت تماسی و چه از طریق دستگاه گوارش، فاژها با انسان تماس داشته‌اند که این امر خود می تواند بیانگر حداقل عوارض استفاده از فاژها

باشد (۳۵). همچنین مطلب دیگری که می‌تواند بیانگر ایمن بودن استفاده‌ی کلینیکی از فاژها باشد، آلوده شدن واکسن ها در سال ۱۹۷۰ با فاژها است که در نتیجه ی آن، هیچ مشکل یا بیماری خاصی برای افراد آلوده شده پیش نیامد (۳۶-۳۵). مطالعه‌ی Betts و همکاران بر روی استفاده از فاژها در درمان سودوموناس نتایج این مطالعه را تأیید می کند. در این مطالعه، استفاده از فاژ باعث از بین بردن کامل سودوموناس مقاوم به درمان شد (۳۷). علاوه بر سودوموناس، مطالعات زیادی بر روی باکتری‌های دیگر نیز صورت گرفت که فاژ درمانی را به عنوان یک روش مؤثر در درمان گونه های باکتریایی مقاوم تأیید می‌کند. برای مثال، در مطالعات مختلف، استفاده از فاژ در برابر سالمونلا گالیناروم (۳۸)، مایکوباکتریوم اولسرانس (۳۹) و حتی استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین (MRSA یا Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) (۴۰) بررسی و تأثیرگذاری باکتریوفاژ در از بین بردن باکتری مقاوم مورد تأیید قرار گرفته است (۴۰-۳۸).

توصیه می‌شود با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه، این درمان در بیماران مبتلا به عفونت‌های مقاوم به درمان، به عنوان یک گزینه‌ی درمانی مد نظر قرار گیرد. همچنین در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در مورد سودوموناس آئروژینوزا و دیگر پاتوژن‌های مقاوم، با توجه به نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی در مورد انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب تصمیم‌گیری شود تا نه تنها عفونت به خوبی درمان شود بلکه تا حدی از مقاومت بیشتر پاتوژن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها جلوگیری شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای محسن روشنایی به شماره‌ی طرح پژوهشی ۳۹۰۶۴۲ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

References

1. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis 2005; 41(6): 848-54.
2. Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. Clin Infect Dis 2000; 30(3): 454-60.
3. Streit JM, Jones RN, Sader HS, Fritsche TR. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001). Int J Antimicrob Agents 2004; 24(2): 111-8.
4. Crouch BS, Wunderink RG, Jones CB, Leeper KV, Jr. Ventilator-associated pneumonia due to Pseudomonas aeruginosa. Chest 1996; 109(4): 1019-29.
5. Osmon S, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. Hospital mortality for patients with bacteremia due to Staphylococcus aureus or Pseudomonas aeruginosa. Chest 2004; 125(2): 607-16.
6. Wiblin RT. Nosocomial pneumonia. In: Wenzel RP, editors. Prevention and control of nosocomial infections.3rd ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 1997. p. 807-19.
7. Pollack M. Pseudomonas aeruginosa. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 1995. p. 1980-2003.
8. Kluytmans J. Surgical infections including burns. In: Wenzel RP, editor. Prevention and control of nosocomial infections. 3rd ed.

Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 1997. p. 841-65.
9. Gordon SM, Serkey JM, Keys TF, Ryan T, Fatica CA, Schmitt SK, et al. Secular trends in nosocomial bloodstream infections in a 55-bed cardiothoracic intensive care unit. Ann Thorac Surg 1998; 65(1): 95-100.
10. Fergie JE, Shema SJ, Lott L, Crawford R, Patrick CC. Pseudomonas aeruginosa bacteremia in immunocompromised children: analysis of factors associated with a poor outcome. Clin Infect Dis 1994; 18(3): 390-4.
11. Bergen GA, Shelhamer JH. Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem. Infect Dis Clin North Am 1996; 10(2): 297-325.
12. Crouch BS, Wunderink RG, Jones CB, Leeper KV, Jr. Ventilator-associated pneumonia due to Pseudomonas aeruginosa. Chest 1996; 109(4): 1019-29.
13. Richard P, Le FR, Chamoux C, Pannier M, Espaze E, Richet H. Pseudomonas aeruginosa outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains. J Infect Dis 1994; 170(2): 377-83.
14. Gorgani N, Ahlbrand S, Patterson A, Pourmand N. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. Int J Antimicrob Agents 2009; 34(5): 414-8.
15. Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa. J Med Microbiol 2006; 55(Pt 12): 1619-29.
16. Livermore DM. The need for new antibiotics. Clin Microbiol Infect 2004; 10(Suppl 4): 1-9.
17. Ackermann HW, DuBow MS. Viruses of Prokaryotes: General properties of bacteriophages. Boca Raton, FL:CRC Press; 1987.
18. Kunisaki H, Tanji Y. Intercrossing of phage genomes in a phage cocktail and stable coexistence with Escherichia coli O157:H7 in anaerobic continuous culture. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 85(5): 1533-40.
19. Clokie MRJ, Kropinski A. Bacteriophages: Methods and protocols, Vol 1: Isolation, characterization, and interactions. New York, NY: Humana Press; 2009. p. 15-23, 69-113.
20. Jin J, Li ZJ, Wang SW, Wang SM, Huang DH, Li YH, et al. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects Acinetobacter baumannii clinical isolates. BMC Microbiol 2012; 12: 156.
21. Regal RE, DePestel DD, VandenBussche HL. The effect of an antimicrobial restriction program on Pseudomonas aeruginosa resistance to beta-lactams in a large teaching hospital. Pharmacotherapy 2003; 23(5): 618-24.
22. Gonlugur U, Bakici MZ, Ozdemir L, Akkurt I, Icagasioglu S, Gultekin F. Retrospective analysis of antibiotic susceptibility patterns of respiratory isolates of Pseudomonas aeruginosa in a Turkish University Hospital. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2003; 2: 5.
23. Niitsuma K, Saitoh M, Kojimabara M, Kashiwabara N, Aoki T, Tomizawa M, et al. Antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa isolated in Fukushima Prefecture. Jpn J Antibiot 2001; 54(2): 79-87.
24. Mohajeri P. Antibiotic susceptibility and resistance patterns of pseudomonas aeruginosa strains isolated from different clinical specimens in patients referred to the teaching hospitals in Kermanshah(2001-2). J Kermanshah Univ Med Sci 2004; 7(4): 11-20. [In Persian].
25. Azimi, Z, Ghane, M, Heshmatipour, Z. The antibiotic resistance of pseudomonas spp. isolated from different wards of Shahid Rajai Hospital in Tonekabon, 2010-2011. Medica Laboratory Journal. 2013; 7(2): 23-9. [In Persian].
26. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Prevalence of ESBLs genes among multidrug-resistant isolates of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients in Tehran. Microb Drug Resist 2009; 15(1): 37-9.
27. Ranjbar R, Owlia P, Saderi H, Mansouri S, Jonaidi-Jafari N, Izadi M, et al. Characterization of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burned patients hospitalized in a major burn center in Tehran, Iran. Acta Med Iran 2011; 49(10): 675-9.
28. Kianpour F, Havaei SA, Hosseini MM. Evaluation of Pseudomonas aeroginosa isolated from cutaneous infections and determination of drug resistance pattern in patients of Alzahra hospital in Esfahan. J Isfahan Med Sch 2010; 28(110): 503.
29. Nahaei MR, Bohloli-Khiavi R, Asgarzadeh M, Hasani A, Sadeghi J, Akbari Dibavar M. Antibiotic resistance and plasmid profile of Pseudomonas aeruginosa strain isolated from hospitalized patients. J Ardabil Univ Med Sci 2007; 7(1): 90-8. [In Persian].
30. Rahman M, Shamsuzzaman AK, Sirajee A, Miah AG, Hossain MA. Pattern of bacteria and their antimicrobial susceptibility isolated from inanimate objects and hospital personnel. Mymensingh Med J 2003; 12(2): 104-7.

31. Rolston KV, Bodey GP. Pseudomonas aeruginosa infection in cancer patients. Cancer Invest 1992; 10(1): 43-59.
32. Richards FF. The genetics of bacteria and their viruses. Yale J Biol Med 1969; 42(2): 120-1.
33. Mihaljev-Martinov J, Nikolic I. Migraine--diagnostic problems. Med Pregl 1986; 39(7-8): 351-4.
34. Kutter E, Sulakvelidze A. Bacteriophages: Biology and applications: Molecular biology and applications. Boca Raton, FL: CRC Press; 2005.
35. Merril CR, Friedman TB, Attallah AF, Geier MR, Krell K, Yarkin R. Isolation of bacteriophages from commercial sera. In Vitro 1972; 8(2): 91-3.
36. Merril CR. Phage in human vaccines. Science 1975; 188(4183): 8.
37. Betts A, Vasse M, Kaltz O, Hochberg ME. Back to the future: evolving bacteriophages to increase their effectiveness against the pathogen Pseudomonas aeruginosa PAO1. Evol Appl 2013; 6(7): 1054-63.
38. Hong SS, Jeong J, Lee J, Kim S, Min W, Myung H. Therapeutic effects of bacteriophages against Salmonella gallinarum infection in chickens. J Microbiol Biotechnol 2013; 23(10): 1478-83.
39. Trigo G, Martins TG, Fraga AG, Longatto-Filho A, Castro AG, Azeredo J, et al. Phage therapy is effective against infection by Mycobacterium ulcerans in a murine footpad model. PLoS Negl Trop Dis 2013; 7(4): e2183.
40. Gilmer DB, Schmitz JE, Euler CW, Fischetti VA. Novel bacteriophage lysin with broad lytic activity protects against mixed infection by Streptococcus pyogenes and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(6): 2743-50.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 29.07.2014
Vol. 32, No. 307, 4th Week, December 2014
Accepted: 11.11.2014

The Effect of Isolated Bacteriophage on Multi-Drug Resistant (MDR) Pseudomonas Aeruginosa

Bahram Nasr-Esfahani PhD[1], Mohsen Roshnaei[2], Hossein Fazeli PhD[1], Asghar Havaei PhD[3], Sharareh Moghim PhD[1], Hajieh Ghasemian-Safaei PhD[3], Reyhaneh Jafari[4], Hasan Ghajavand[5]

Original Article

Abstract

Background: Bacterial drug resistance, due to overuse of antibiotics and several mechanisms of resistance by bacteria, is increasing. Multi-drug resistant bacteria (MDR) in different parts of the hospital including the intensive care unit (ICU), cause nosocomial infections and resistance to antibiotics made them difficult to treat. Alternative methods of treatment are one way to solve this problem. Bacteriophages are antibacterial agents that specifically attack their host. In this study, Pseudomonas specific lytic phages isolated from the clinical environment and its effect on multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa was investigated.

Methods: In a cross sectional study in 2013, isolates of Pseudomonas aeruginosa from clinical specimens of patients admitted to the intensive care unit were identified via biochemical methods. Then, antibiotic resistance patterns were determined via standard disk diffusion method according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) and were used as indicator hosts to screen phages from water samples.

Findings: 42 strains of Pseudomonas aeruginosa wre isolated from the intensive care units. The antibiotic resistant patterns of bacterial isolates were as follows: 88% to amikacin, 90% to cefepime, 85% to ceftazidime, 90% to gentamicin, 75% to imipenem and meropenem and 95% to ciprofloxacin. Lytic bacteriophage was isolated only from hospital wastewater. The isolated bacteriophage had no effect on non- multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa and other Gram-negative bacteria.

Conclusion: Bacterial resistance to antibiotics is increasing. New alternative methods, such as phage therapy, would open new insights in treatment of multidrug resistant bacterial infections.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, Bacteriophage, Phage therapy, Multi-drug resistant

Citation: Nasr-Esfahani B, Roshnaei M, Fazeli H, Havaei A, Moghim Sh, Ghasemian-Safaei H, et al. **The Effect of Isolated Bacteriophage on Multi-Drug Resistant (MDR) Pseudomonas Aeruginosa.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(307): 1805-15

1- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- MSc Student, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran
5- MSc Student, Department of Microbiology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Sharareh Moghim PhD, Email: moghim@med.mui.ac.ir