

بررسی میزان شیوع ژنهای بتالاکتاماز blaIMP و blaVIM در سویه های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چندین دارو در مراکز درمانی استان اصفهان

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱۹

خلاصه

مقدمه

جداسازی ژن های blaIMP و blaVIM در سودوموناس آئروژینوزاهای مولد ESBL و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، اطلاعات مفیدی درباره اپیدمیولوژی و فاکتورهای خطر دخیل در این عفونت ها را فراهم می آورد. در این مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه های بالینی در ایزوله های جداسازی شده از عفونت های بیمارستانی در بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی استان اصفهان انجام گرفت.

روش کار

در مطالعه مقطعی-توصیفی حاضر ۵۱ سویه ی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های مختلف بالینی با استفاده از آزمونهای بیو شیمیایی در سال ۱۳۹۱ در مراکز درمانی استان اصفهان تعیین هویت شدند. الگوی مقاومت آنتی میکروبی به روش دیسک دیفیوژن (کربی- بائر) تعیین شد. این ایزوله ها با استفاده از روش های استاندارد آزمایشگاهی جداسازی شدند و به منظور ارزیابی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها، از روش انتشار دیسک استفاده گردید و از نظر ژنوتیپی ژن های بتالاکتاماز blaIMP و blaVIM در سویه های فوق با روش PCR بررسی شد. داده ها با نرم افزار اکسل تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

بیشترین مقاومت نمونه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین ۹۶/۰۸، کاربنی سیلین ۹۲/۱۶، ایمپ پنم ۸۰/، آمپی سیلین ۷۲/۵۵، و نیتروفورانتوئین ۷۸/۴۳/ملاحظه شد. از طرف دیگر در بین عفونت های مورد بررسی بالاترین میزان از عفونت ها مربوط به نمونه زخم در سودوموناس آئروژینوزا ۳۳/۳۳٪ بود. در بررسی ژنوتیپی با انجام آزمون تعداد ۳۲ سویه (۶۳٪) از ۵۱ نمونه مقاوم به دارو شامل ژن بتالاکتاماز blaIMP و هیچ کدام از سویه ها دارای ژن blaVIM نبودند.

نتیجه گیری

نتایج نشان می دهد که اغلب نمونه ها مقاوم به دارو هستند و در میان سویه های تولید کننده ESBL فراوانی ژن های بتالاکتاماز blaIMP بیشتر از ژن blaVIM یافت شد. لذا اندازه گیری سریع و بررسی دقیق مقاومت آنتی بیوتیکی امری ضروری می باشد زیرا فراوانی سویه های تولیدکننده ژن بتالاکتاماز در سویه های بیمارستانی رو به افزایش است.

کلمات کلیدی: بتالاکتاماز، سودوموناس آئروژینوزا، عفونت های بیمارستانی، مقاومت آنتی بیوتیکی، PCR

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

۱ لادن رحیم زاده ترابی*

۲ منیر دودی

۳ زینب گلشنی

۱،۲- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

* اصفهان-دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان،

دانشکده علوم زیستی - گروه میکروبیولوژی

تلفن: ۰۹۱۳۵۶۱۸۲۵۷

Email: negar.rahimz@gmail.com

مقدمه

مقاومت ضد میکروبی که اغلب به عنوان مقاومت دارویی شناخته می‌شود، هنگامی اتفاق می‌افتد که میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری، ویروس، قارچ و انگل به گونه‌ای تغییر کنند که ارائه داروهایی که قبلاً برای درمان عفونت‌های حاصل از آنها استفاده می‌شده، بی‌اثر شود. سودوموناس آئروژینوزا از باکتری‌های پاتوژن انسانی می‌باشند که عفونت‌های اکتسابی بیمارستانی را ایجاد کرده و حامل مقاومت چندگانه دارویی هستند (۱، ۲). سودوموناس آئروژینوزا باکتری بیماری‌زا و فرصت‌طلبی است که عاملی عمده در بروز مرگ و میر بیماران با ضعف سیستم ایمنی محسوب می‌شود. مقاومت ذاتی به مواد ضد میکروبی در این باکتری سبب وخیم‌تر شدن وضعیت درمان عفونت‌های ناشی از آن می‌گردد (۳). لیپوپلی ساکارید، پیلی و تازک قطبی در این پاتوژن فرصت طلب سبب چسبیدن باکتری به غشای سلولی شده و نقش مهمی را در بیماری‌زایی این باکتری ایفا می‌کند. بتالاکتام‌ها داروهای مناسبی جهت درمان سودوموناس آئروژینوزا محسوب می‌شود اما پس از مدتی برخی از باکتری‌ها با تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز به این آنتی بیوتیک مقاومت نشان می‌دهند (۴). عفونت‌های بیمارستانی یکی از معضلات مطرح پزشکی در کشورهای توسعه یافته و نیز در حال توسعه می‌باشد که موجب اشاعه بیماری‌های عفونی در جامعه می‌گردد (۵). در سال‌های اخیر توجه به عفونت‌های بیمارستانی از اهمیت زیادی برخوردار شده است، زیرا فقط در سال ۱۹۹۵ هشتاد و هشت هزار مورد مرگ در اثر عفونت‌های بیمارستانی در دنیا گزارش شده است (۶). سودوموناس آئروژینوزا از شایع‌ترین عوامل عفونت بیمارستانی به ویژه در زخم‌های سوختگی است. عفونت با این باکتری می‌تواند سپتی‌سمی، پنومونی، مننژیت و بیماری‌های کشنده دیگری را نیز به دنبال داشته باشد (۷). سودوموناس دارای مقاومتی ذاتی نسبت به طیف وسیعی از مواد ضد میکروبی و ضد عفونی‌کننده، مانند ترکیبات آمونیوم، هگزاکلروفن، صابون‌ها و محلول‌های ید دار می‌باشد (۹۸). سودوموناس آئروژینوزا از پاتوژن‌های فرصت طلب گرم منفی، غیر تخمیرکننده، اکسیداز مثبت و دارای شیوع بالا در عفونت‌های بیماران بستری با زخم‌های عفونی است. اغلب سویه‌های مقاوم به چندین آنتی بیوتیک، قادر به تولید طیف وسیعی از آنزیم‌های بتالاکتامازی هستند (۱۰). بروز مقاومت در باکتری‌های حامل این ژن‌ها از چند طریق ایجاد می‌گردد: ۱- پمپ

افلوکس، ۲- تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی ۳- تغییر در غشای خارجیکرباپنمازهای گروه B (متالوبتالاکتامازها) شامل آنزیم‌های VIM (متالو بتالاکتاماز اینتگرونی ورونا) و IMP (موثر بر ایمنی پنم) هستند. نخستین عضو از آنزیم‌های این کلاس IMP-۱ بود که در سال ۱۹۹۱ در ژاپن گزارش شد. و پس از آن در نقاط مختلف جهان گزارش شدند یکی از عوامل اصلی پیدایش مقاومت توانایی باکتری در تولید آنزیم‌هایی است که داروها را غیر فعال می‌کنند. از جمله این آنزیم‌ها می‌توان بتالاکتاماز که توسط بسیاری از باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی تولید می‌شود را نام برد. متالو بتالاکتامازها آنزیم‌هایی هستند که برای فعالیت به کوفاکتوری مانند روی نیاز دارند و نه تنها کاربایم‌ها را بلکه می‌توانند همه آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام‌ها را هیدرولیز کنند (۱۱). معرفی کاربایم‌ها (همچون ایمنی پنم و مروپنم) به سیستم‌های بهداشتی و درمانی باعث یک پیشرفت بزرگ و مهم در درمان عفونت‌های شدید و جدی ناشی از باکتری‌های مقاوم به عوامل بتالاکتام‌گردید، البته سویه‌های مقاوم به کاربایم‌ها بطور مکرر در کشورهای مختلف مشاهده شده‌اند بر پایه مطالعات مولکولی آنزیم‌های هیدرولیزکننده کاربایم‌ها "متالو بتالاکتامازها" به طور موثری تمامی عوامل بتالاکتام‌بجز آزترونام را هیدرولیز می‌کنند. VIM، SPM، IMP از مهمترین متالوبتالاکتامازها از نظر کلینیکی هستند به وسیله ژن‌های bla-IMP، bla-VIM، bla-SPM کد می‌شوند. حداقل ۱۴ نوع vim و ۲۳ نوع imp متفاوت، تعیین هویت شده‌اند. از طرف دیگر متالو بتالاکتامازها به چند خانواده تقسیم می‌شوند که عبارتند از: VIM، SPM، IMP، GIM، SIM، AIM، DIM. در میان خانواده اتروباکتریاسه دو ژن bla IMP و bla VIM به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که این دو ژن به روش انتقال افقی و از طریق پلاسمید به سایر باکتری‌ها منتقل می‌شوند. ژنهای کدکننده متالو بتالاکتامازها بر روی اینتگرورها (integrons) قرار دارند که در این مناطق ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی به صورت دستجات ژنی تجمع می‌یابند. بسیاری از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا قادرند چندین نوع از بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف را تولید کنند، که آنها را قادر می‌سازد علیه آنتی بیوتیک‌های رایج مصرفی مقاوم باشند بتالاکتامازها توسط مهارکننده‌های بتالاکتام‌مانند - کلاولانیک اسید مهار می‌شوند (۱۲). هدف از این مطالعه، جداسازی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و شناسایی سویه‌های

توبرامایسین (TOB) کوآموکسی کلاو (AMC) آمپی سیلین (AM) سفاتاکسیم (CTX) آموکسی سیلین (AMX) جنتامایسین (GM) کوتری ماکسازول (SXT) ونکومایسین (V) سفیکسیم (CFM) کلوکساسیلین (CX) سفالکسین (CN) سیپروفلوکساسین (CP) سفتازیدیم (SF) نیتروفوراتوئین (NIF) آمیکاسین (AN) کرنی سیلین (CB) تازوسین (TA) پیراسیلین (PIP) تتراسایکلین (TE) پنی سیلین (P) کلیندامایسین (CC) ایمی پنم (IPM) (۱۵).

روش انتشار دیسک در آگار (انجام آزمون های میکروبیولوژی جهت تعیین هویت باکتری ها)

برای انجام این آزمایش، پس از شناسایی دقیق جنس و گونه ی باکتری سودوموناس آئروژینوزا، تعدادی کلنی از سویه های مورد آزمایش در محیط تریپتیکاز سوی براث (TSB) به حالت سوسپانسیون در آورده و سپس مورد قیاس با استاندارد ۰/۵ مک فارلند قرار داده شدند. در صورت اطمینان از یکسان بودن کدورت آن ها با استفاده از سوپ پنبه ای کاملاً استریل باکتری ها را در ۴ جهت مختلف بر روی محیط مولر هیتون آگار (MHA) کشت چمنی داده و سپس در شرایط استریل دیسک های آنتی بیوتیک های نامبرده شده را با رعایت فاصله دو دیسک از یکدیگر و فاصله ی دیسک از لبه پلیت بر روی محیط نامبرده قرار دادیم. پس از انکوباسیون^۲ به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شد (۱۵). برای تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و حساسیت ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی مطابق با دستورالعمل NCCLS و بر اساس قطر هاله عدم رشد اطراف دیسکها به صوت حساس، نیمه حساس و مقاوم بیان شد (۱۴). سپس سویه ها بر اساس نحوه واکنش در مقابل هر دارو در سه گروه حساس، بینابینی و مقاوم طبقه بندی شدند. برای از سویه های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا PTCC 17589 به عنوان سوش کنترل در این تحقیق استفاده شد. داده ها با استفاده از نرم افزار اکسل جمع آوری و تجزیه و تحلیل شده اند.

استخراج DNA

برای استخراج نمونه های سودوموناس از روش جوشاندن

واجد ژن کدکننده بتالاکتاماز blaVIM و blaIMP در نمونه های بالینی در شهر، اصفهان با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز است اهداف پژوهش حاضر منتج از رساله پژوهشی می باشد و با هدف جداسازی، تشخیص و تایید دقیق سویه ها و نیز تعیین و بررسی الگوی مقاومت دارویی سوش های سودوموناس آئروژینوزا موثر در عفونت زخم بیماران بستری در بیمارستان های اصفهان صورت پذیرفته است.

روش کار

در این مطالعه جمعا ۱۰۲ نمونه ی کلینیکی شامل ۵۱ نمونه سودوموناس آئروژینوزای از بیمارستان های الزهراء، شرعی، امام موسی کاظم، غرضی و چندین آزمایشگاه خصوصی در مناطق شمال، مرکزی و جنوب اصفهان طی ۴ ماه از اول فروردین ماه لغایت پایان تیر ماه ۱۳۹۱ جمع آوری شد و مورد مطالعه قرار گرفت. ایزوله های مورد بررسی از بیماران بستری در بخش های اورژانس داخلی، اورژانس جراحی، اطفال، گوارش، عفونی، زنان، پوست، ریه و داخلی جنرال، ارولوژی، بخش مراقبت های ویژه و بیماران سرپایی مراجعه کننده، جداسازی شدند و مورد بررسی قرار گرفتند (۱۳).

آزمایش حساسیت در برابر عوامل ضد میکروبی (آنتی بیوگرام)

تست های تشخیصی به کار برده شده عبارت بودند از: رنگ آمیزی گرم، OF، SIM، TSI، اکسیداز و ژلاتینازو تمامی نمونه ها پس از تشخیص و تایید نهایی در محیط تریپتیکس سوی براث (TSB) حاوی ۱۰٪ گلیسرول در ۲۰-درجه نگهداری شده تا در فرآیندهای بعدی مورد استفاده قرار گیرند. در ادامه، حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های شناسایی شده به روش انتشار دیسک در آگار (Kirby-Bauer) با استفاده از دیسک های تهیه شده از شرکت MAST انگلستان، در محیط مولر هیتون آگار مورد بررسی قرار گرفت. برای تفسیر نتایج از جدول CLSI استفاده شد (۱۴). باکتری های جدا شده با انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی با روش استاندارد شده ی انتشار دیسک در آگار^۱ مورد بررسی قرار گرفتند. جهت انجام این روش، دیسک های مصرفی آنتی بیوتیکی عبارت بودند از: اریترومایسین (E)

² Incubation

¹ Agar Disk Diffusion

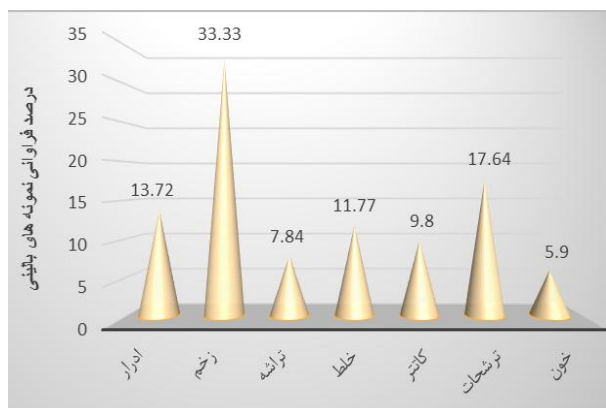
جدول ۱- فراوانی و درصد سودوموناس آئروژینوزا مورد مطالعه به تفکیک هر بیمارستان (الزهر، شریعتی، امام موسی کاظم، غرضی و متفرقه) در شهر اصفهان

| بیمارستان | | تعداد | درصد |
|----------------|--|-------|-------|
| الزهر | | ۲۴ | ۴۷/۰۵ |
| شریعتی | | ۶ | ۱۱/۷۶ |
| امام موسی کاظم | | ۱۵ | ۲۹/۴۱ |
| غرضی | | ۴ | ۷/۸۴ |
| متفرقه | | ۲ | ۳/۹۲ |

*منظور از متفرقه چندین آزمایشگاه خصوصی موجود در سطح شهر اصفهان می باشد.

دارو را به خود اختصاص داده است و سودوموناس آئروژینوزا بالاترین درصد فراوانی را در این بیمارستان داشته اند. این نتایج قابل توجه است زیرا بیمارستان فوق تخصصی الزهرا یکی از بزرگ ترین بیمارستان های شهر اصفهان می باشد، که در مقایسه با سایر بیمارستان ها و مراکز درمانی حجم بیشتری از بیماران سرپایی و بستری را به خود اختصاص داده است.

مطابق با نمودار (۱)، نمونه های بالینی تهیه شده از بیماران شامل ترشحات حفره شکم، ترشحات واژن، ترشحات برونش، مایع مغزی نخاعی، زخم، ادرار، خون، مدفوع، خلط، کاتتر و ترشحات گلو، گوش و چشم بود که مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج فوق به این صورت بود که سودوموناس آئروژینوزا ۳۳/۳۳٪ از نمونه های زخم و بیشترین درصد نمونه ها را در هر باکتری به طور میانگین به خود اختصاص داده بودند.



نمودار ۱- درصد فراوانی نمونه های بالینی جداسازی شده از بیماران در بیمارستان ها و چندین آزمایشگاه خصوصی در شهر اصفهان

استفاده گردید. به این صورت که مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل را در داخل میکروتیوب ریخته و از کلنی های تازه کشت ۳ تا ۴ کلنی بر داشته و در داخل آن حل کرده و سپس خوب ورتکس نموده و به مدت ۱۰ دقیقه در داخل آب جوش قرار گرفت. سوسپانسیون فوق در در داخل سانتریفوژ گذاشته شد و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی جدا شده و به یک میکروتیوب جدید منتقل گردید. مایع رویی حاوی DNA برای انجام PCR بود. روش PCR برای شناسایی ژن های blaVIM و blaIMP در سویه های سودوموناس آئروژینوزا ایزوله شده با استفاده از دما و پرایمرهای اختصاصی این ژن ها انجام گرفت.

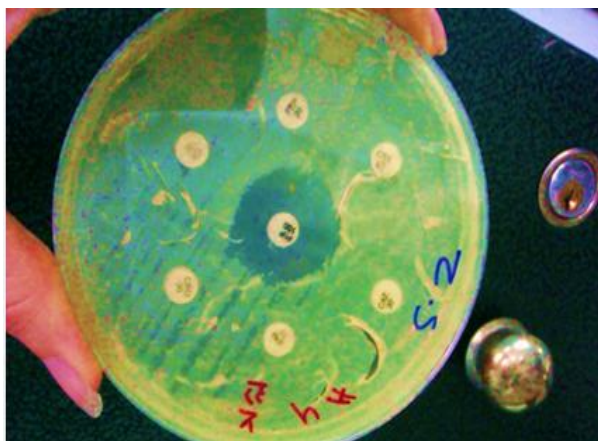
از سودوموناس آئروژینوزا PTCC 17589 و Acinetobacter baumannii KPC+ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محتویات هر میکروتیوب شامل ۱۲ μl از DNA استخراج شده و ۱۱ μl از هر پرایمر به کیت PCR MASTER با حجم نهایی ۱۲۵ μl بود. جهت تایید جداسازی DNA نمونه در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید با دستگاه GELDOC (bio rad-usa) مشاهده شد. برای تعیین میزان کمی DNA از دستگاه uv اسپکتروفتومتر استفاده شد. آزمون PCR برای شناسایی ژن بتالاکتامازی با اندازه انجام شد.

پرایمرهای مورد استفاده برای انجام PCR عبارت بودند از: VIM-R (5'-GCATGGTCGCATATCGCAAC-3')، F (5'-AATGCGCAGCACCAGCATAG-3')، IMP-F (5'-GAAGCCGTTTATATTCATAC-3') و IMP-R (5'-GTACGTTTCAACGGTGATGC-3').

نتایج

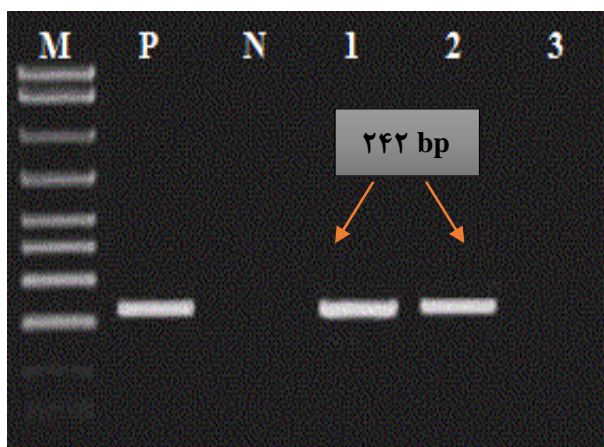
در این مطالعه توصیفی - مقطعی، در یک بازه زمانی ۴ ماهه، تعداد ۵۱ سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم سوختگی بیماران بستری در بیمارستان های شهر اصفهان مورد شناسایی دقیق و تایید قرار گرفت. مطابق با جدول (۱) درصد باکتری های ایزوله شده به ترتیب در بیمارستان های الزهرا، امام موسی کاظم، شریعتی، غرضی و چندین آزمایشگاه خصوصی یا متفرقه بیشترین درصد فراوانی را داشته و می توان این گونه نتیجه گیری کرد که بیمارستان الزهرا نسبت به سایر مراکز درمانی درصد بالایی از نمونه های بالینی و نمونه های مقاوم به

سیپروفلوکسازین بود. از طرف دیگر در بین عفونت های مورد بررسی در بیمارستان های فوق الذکر بالاترین میزان از عفونت ها مربوط به نمونه زخم در سودوموناس آئروژینوزا ۳۳/۳۳ درصد، بیشترین درصد نمونه ها را در باکتری به طور میانگین به خود اختصاص داده بودند و بالاترین درصد فراوانی باکتری های MDR از بیمارستان فوق تخصصی الزهرا واقع در جنوب اصفهان به دست آمد.



شکل ۱- نتایج تأثیر دیسک های آنتی بیوتیکی بر روی رشد باکتری MDR

از بین ۵۱ نمونه سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو تعداد ۳۲ سویه (۶۳٪) از ۵۱ سویه مقاوم به دارو تولید کننده ژن بتالاکتاماز blaIMP و در هیچ یک از باندها حضور ژن blaVIM مشاهده نشد.



شکل ۲- یافته های PCR برای ژن blaIMP؛ M مارکر، P: کنترل مثبت، N: کنترل منفی، ۱ و ۲ سویه های حامل ژن blaIMP در ۲۴۲ bp

نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی در سودوموناس آئروژینوزا

تمامی سویه های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از عفونت های مختلف بیماران نسبت به آنتی بیوتیک های توبرامایسین، آمپی سیلین، جنتامایسین، ایمی پنم، سفنازیدیم، نیتروفورانتوئین، آمیکاسین، سفاتاکسیم، کاربنی سیلین، سیپروفلوکسازین، پیراسیلین، سفالکسین، تازوسین مورد بررسی قرار گرفتند. بیشترین مقاومت نمونه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکسازین ۹۶/۰۸، کاربنی سیلین ۹۲/۱۶٪، ایمی پنم ۸۰٪، آمپی سیلین ۷۲/۵۵٪ و نیتروفورانتوئین ۷۸/۴۳٪ ملاحظه و در سایر آنتی بیوتیک ها کم تر از ۷۰٪ مشاهده شد. کم ترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک پیراسیلین ۴۹/۳۵٪ بود. (جدول ۲). سویه ی استاندارد سودوموناس آئروژینوزا برخلاف سویه های بالینی آن به تمامی آنتی بیوتیک های مورد مطالعه حساس بود.

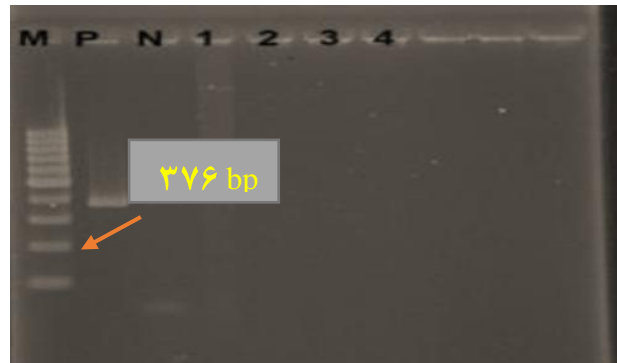
جدول ۲- نتایج تست های حساسیت و مقاومت دارویی سویه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا

| نوع آنتی بیوتیک | حساس | مقاوم | نیمه حساس |
|-----------------------------|-------|-------|-----------|
| توبرامایسین (TOB) | ۳۳/۳۳ | ۶۱ | ۵/۶۷ |
| آمپی سیلین (AM) | ۲۷/۴۵ | ۷۲/۵۵ | - |
| جنتامایسین (GM) | ۴۳/۱۴ | ۵۰ | ۶/۸۶ |
| ایمی پنم (IPM) ^۱ | ۱۱/۷۶ | ۸۰ | ۸/۲۴ |
| سیپروفلوکسازین (CP) | ۳/۹۲ | ۹۶/۰۸ | - |
| سفنازیدیم (SF) | ۴۱/۱۸ | ۵۸/۸۲ | - |
| نیتروفورانتوئین (NIF) | ۲۱/۵۷ | ۷۸/۴۳ | - |
| آمیکاسین (AN) | ۳۰ | ۶۲/۷۵ | ۷/۲۵ |
| سفاتاکسیم (CTX) | ۳۹/۲۲ | ۶۰/۷۸ | - |
| کاربنی سیلین (CB) | ۷/۸۴ | ۹۲/۱۶ | - |
| تازوسین (TA) | ۴۷/۰۶ | ۵۱ | ۱/۹۴ |
| پیراسیلین (PIP) | ۴۱ | ۴۹/۳۵ | ۹/۶۵ |
| سفالکسین (CN) | ۳۷/۲۵ | ۶۰ | ۲/۷۵ |

یافته های حاصل از این پژوهش پس از سه بار تکرار برای هر کدام از نمونه های باکتریایی نشان داد که بالاترین میزان در برابر آنتی بیوتیک ها مربوط به باکتری عفونت زای سودوموناس آئروژینوزا (۹۶/۰۸) و بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک

^۱ Imipenem

صادقی و همکاران در سال ۲۰۱۲ مطالعه ای بر حساسیت آنتی بیوتیکی ۱۰۰ سویه سودوموناس آئروژینوزای بالینی انجام دادند، که نتایج به دست آمده بدین صورت بود. میزان مقاومت به ایمی پنم ۳۵٪، مروپنم ۳۵٪، جنتامایسین ۱۴٪، آمیکاسین ۹٪، سیپروفلوکساسین ۲۳٪، سفنازیدیم ۱۵٪ بود (۲۴). در سال ۲۰۰۴ لوزارو در ایتالیا با انجام آزمایشات PCR روی ۵۰۶ سویه سودوموناس آئروژینوزا نشان داد که ۴ سویه ۷٪ تولید کننده متالو بتالاکتاماز حامل ژن VIM می باشند (۲۵). در سال ۲۰۰۷ خسروی و میهنی در اهواز با انجام آزمایش MBL و PCR روی ۱۰۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا نشان دادند که ۸ سویه از ۴۱ سویه مقاوم به ایمی پنم تولید کننده ی متالو بتالاکتاماز و هر ۸ سویه حامل ژن VIM می باشند (۲۶). در مطالعه ای که توسط نهایی و همکاران در شهر تبریز در سال ۲۰۰۶ انجام شده، میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های سفنازیدیم، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین و ایمی پنم به ترتیب ۶۹٪، ۵۱٪، ۲۲٪، ۱۵٪ و ۲٪ گزارش شده است (۲۷). در این زمینه هم چنین مطالعات زیادی در ایران نیز انجام شده استی در مطالعه مشابه دیگری که توسط رنجبر و همکاران در سال ۲۰۱۱ در بیمارستان بقیه الله تهران انجام شده، میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های مورد بررسی شامل سفنازیدیم ۵/۵۷٪، آمیکاسین ۹۰٪، سیپروفلوکساسین ۶۵٪، جنتامایسین ۶۷/۵٪ و ایمپنیم ۹۷/۵٪ بوده است (۲۸). به عنوان مثال در مطالعاتی که توسط نیتسوما و همکاران در سال ۲۰۰۱ در ژاپن انجام پذیرفته، مقاومت سویه های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از خلط بیماران تنفسی به آنتی بیوتیک سفنازیدیم ۴/۶٪ و نسبت به آنتی بیوتیک ایمی پنم ۱۵/۷٪ و ۸/۸٪ گزارش شده است (۲۹). آموتا و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده به آنتی بیوتیک های جنتامایسین (۱۰۰٪)، افلوکساسین (۱۰۰٪)، کلیندامایسین (۹۰٪)، اریترومایسین (۹۰٪) و نیتروفورانئوئین (۸۰٪) حساس بودند. در حالیکه مقاومت بالایی در برابر آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۱۰۰-۹۰٪)، ریفامپین (۹۰٪) و سولفامتوکسازول (۹۰٪) مشاهده شد (۳۰). یا در مطالعه دیگری که توسط ذوالفقاری و همکاران در سال ۲۰۱۱ و در شهر قم بر روی نمونه های سوختگی انجام شده است باکتری سودوموناس آئروژینوزا به عنوان شایعترین عامل عفونت بیمارستانی معرفی شده است



شکل ۳- یافته های PCR برای ژن blaVIM؛ M مارکر، P: کنترل مثبت برای ژن blaVIM در ۳۷۶ bp، N: کنترل منفی و نمونه های منفی برای ژن blaVIM در ۳۷۶ bp (۳،۴،۱،۲)

بحث

در مطالعه ای که در کانادا انجام شد ۳۵٪ از ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای مولد mbl بودند و از این تعداد ۹۶٪ ژن VIM و ۴٪ ژن IMP مشاهده شد (۱۶). به عنوان مثال، در مطالعه ای که در شهر تهران انجام شده است، شایع ترین ارگانسیم یافت شده از زخم بیماران سوختگی سودوموناس آئروژینوزا بوده است (۱۷). شناخت وضعیت مقاومت سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک های رایج در بیمارستانها، به منظور تعیین خط مشی درمانی در برخورد اولیه و کنترل مقاومت این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های درمانی ضروری است (۱۹،۱۸). در مطالعه ای توسط یزدی و همکاران نتایج مشابهی با نتایج مطالعه حاضر در مورد آنتی بیوگرام سویه های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران سوختگی در زمانی متفاوت بدست آمد که تعداد ژن VIM در تحقیق بر سایر ژنها غالب بود (۲۰). مطالعه شاهچراغی در سال ۱۳۸۶ روی سویه های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران غیر سوختگی بیمارستان امام خمینی و مرکز طبی کودکان نشان داد که ۳٪ از سویه ها مولد blaVIM بودند. اختلاف نتایج می تواند مربوط به روند رو به افزایش مقاومت نسبت به سفالوسپورین های نسل سوم و لذا مصرف بیشتر کارباپنم ها در سالهای اخیر باشد (۲۲،۲۱). در مطالعه جمالی و همکاران در سال ۱۳۸۷، ۱۸۶ بیمار سوختگی بررسی شدند که ۷۲٪ مرد و ۲۸٪ زن بودند. در این مطالعه بیشترین مقاومت به سفتی زوکسیم و سفوتاکسیم با مقاومت ۱۰۰٪ و کمترین مقاومت به ایمی پنم با ۸٪/۶۱٪ مشاهده گردید (۲۳).

زمانی حدود ۱۱ سال) و جغرافیایی (کرمان نسبت به اصفهان) و حتی روش انجام آزمایشات باشد (۳۲).

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در زمینه تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری‌های جدا شده از بیماران نشان می‌دهد که به سختی می‌توان آنتی بیوتیکی را بدون دغدغه مقاومت به کاربرد. بررسی انجام شده حاکی از آن است که اگرچه بعضی از آنتی بیوتیک‌ها هنوز تاثیر نسبتاً خوبی بر سودوموناس آئروژینوزا دارند؛ ولی برخی دیگر عملاً از دایره کاربرد خارج شده و یا به زودی خارج خواهند شد. هرچند عمده ترین علت مقاومت دارویی را به وجود ژن‌های قابل انتقال نسبت داده اند؛ اما نباید از نظر دور داشت که فشار انتخابی ناشی از استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها به گزینش باکتری‌های با مقاومت چند دارویی می‌انجامد. در پژوهش ما طبق نتایج به دست آمده بیشترین میزان مقاومت در باکتری سودوموناس آئروژینوزا مربوط به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین (۹۶/۰۸٪) و کمترین میزان مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک پیراسیلین (۵۰/۹۸٪) بود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و پرسنل محترم آزمایشگاه‌های خصوصی و بیمارستانهای مورد مطالعه قدردانی می‌گردد.

(۳۱). ظهور مقاومت روز افزون به عوامل ضد میکروبی در این باکتری به عنوان تهدیدی برای بهداشت عمومی، باعث بروز نگرانی‌هایی از قبیل کاهش انتخاب‌های درمانی، افزایش هزینه‌ها و مرگ و میر شده است. در مطالعه حاضر تعداد ۵۱ سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم بیماران مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نتایج الگوی مقاومت سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای به دست آمده از این بیماران، نشان دهنده میزان مقاومت بالای سویه‌ها در مقابل آنتی بیوتیک‌های درمانی می‌باشد. در مورد مقاومت دارویی این باکتری، تا کنون مطالعات زیادی انجام گرفته است. در این تحقیق بیشترین مقاومت نمونه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین ۹۶/۰۸، کاربنی سیلین ۹۲/۱۶٪، ایمپنم ۸۰٪، آمپی سیلین ۷۲/۵۵٪ و نیتروفورانتوئین ۷۸/۴۳٪ ملاحظه و در سایر آنتی بیوتیک‌ها کم تر از ۷۰٪ مشاهده شد. کمترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک پیراسیلین ۴۹/۳۵٪ بود. از طرف دیگر در بین عفونت‌های مورد بررسی بالاترین میزان از عفونت‌ها مربوط به نمونه زخم در سودوموناس آئروژینوزا ۳۳/۳۳٪ بود و بالاترین درصد فراوانی باکتری‌های MDR از بیمارستان فوق تخصصی الزهرا واقع در جنوب اصفهان به دست آمد. تعداد ۳۸ سویه (۲۰٪) تولید کننده ژن بتالاکتاماز بودند در مطالعه شکیبایی و همکاران که روی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیمارستان شفای کرمان انجام شده بود هیچ سویه‌ای مولد mbl نبود که چنین تفاوت‌هایی می‌تواند ناشی از تفاوت زمانی (اختلاف

References

1. Albuquerque WF, Macrae A, Sousa OV. Multiple drug resistant staphylococcus aureus strains isolated center hospital. Braz J Microbiol 2007; 38:131-134.
2. Amutha R, Padmakrishnan I, Murugan T, Renuga Devi MP. Studies On Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* from pediatric population with special reference to extended spectrum beta lactamase. Indian J Sci Technol 2009; 11-13.
3. Driscoll JA, Brody SI, Kollef Mh. The Epidemiology, pathogenesis and treatment of *pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs 2007; 67:351-368.
4. Wilson R, Ruth Bd, Dowling Rb. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. Thorax 1998; 53:213-219.
5. Arvanitidou M, Katikaridou E, Douboyas J, Tsakris A. Prognostic factors for nosocomial bacteraemia outcome: a prospective study in a Greek teaching hospital. J Hosp Infect. 2005; 61:219-224.
6. Wenzel RP. The economics of nosocomial infections. J Hosp Infect 1995; 31:79-87.
7. Eriksen HM, Iversen BG, Aavitsland P. Prevalence of nosocomial infections in hospitals in Norway, 2002 and 2003. J Hosp Infect 2005; 60:40-45.
8. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Prevalence of ESBLs Gene among Multidrug- Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients in Tehran. Microb Drug Resist 2009; 15:37 -39.
9. Tsukayama DT, Van Loon HJ, Cartwright C, Chmielewski B, Fluit AC, van der Werken C, et al. The Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* During Antibiotic A rotation in a Medical Intensive Care Unit: The Radar-trial. Int J Antimicrob Agents 2004; 24:339-345.
10. Mirsalehian A, Feyzabadi M, Akbari Nakhjavani F, Jabal Ameli F. Prevalence of extended spectrum beta lactamases among strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Tehran Univ Med J 2008; 66:333-337. [Full Text in Persian].

11. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa and acinetobacter baumannii: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 1:71-93.
12. Tan J, Pitout JD, Guttman DS. New and sensitive assay for determining Pseudomonas aeruginosa metallo-beta-lactamase resistance to imipenem. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1870-1872.
13. Patel J, Cockerill III F, Alder J, Bradford P, Eliopoulos G, Hardy D, et al. M100-S24: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fourth informational supplement. *Clin Lab Standards Institute (CLSI)*. 2014.
14. Cormican M, Whyte T, Hanahoe B. Antimicrobial Susceptibility Testing in Ireland: Introduction to in the Methods of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Available From: http://www.ucg.ie/bac/Antimicrobial_Susceptibility_Testing.Html. Accessed December 10, 2005.
15. Wikler MA, Cockerill FR, Criag WA, Dudley MA, Eliopoulos MA, Hecht DW, et al. Performance Standards for Antimicrobial Sensitivity Testing: Seventeenth Informational Supplement. *CLSI* 2007; 26:1-177.
16. Pitout JD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45:294-298.
17. Rastegar Lari A, Alaghehbandan R, Nikui R. Epidemiological study of 3341 burn patients during three years in Tehran, Iran. *Burns* 2000; 26:49-53.
18. Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, et al. Global trends in resistance to anti tuberculosis drugs. *J N Engl Med* 2001; 344:1294-1303.
19. Yu WL, Chuang YC, Walter-Rasmussen J. Extended-spectrum Beta-lactamases in Taiwan: Epidemiology, Detection, Treatment and Infection Control. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39:264-277.
20. Yazdi HR, Nejad GB, Peerayeh SN, Mostafaei M. Prevalence and detection of metallo-beta-lactamase (MBL)-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from clinical isolates in Iran. *Ann Microbiol* 2007; 57:293-295.
21. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FZ. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis* 2005; 18:41-45.
22. Shahcheraghi F, Nikbin V. Metallo-Lactamase and resistance rate of *P. aeruginosa* isolates to ceftazidim and imipenem. *Iran J Inf Trop Dis* 2007; 36:19-22.
23. Jamali SH, Bahar MA, Hoshmand M. Prevalence of VIM & IMP metallo-beta-lactamase in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Knowledge Microb* 2009; 19-25. (In Persian).
24. Sadeghi A, Rahimi B, Shojapour M. Molecular detection of metallo-beta-lactamase genes blaVIM-1, blaVIM-2, blaIMP-1, blaIMP-2 and blaSPM-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in Markazi province by Duplex-PCR. *Afr J Microbiol Res* 2012; 6:2965-2969. (In Persian).
25. Luzzaro F, Endimiani A, Docquier J-D, Mugnaioli C, Bonsignori M, Amicosante G, et al. Prevalence and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48:131-135.
26. Mihani F, Khosravi A. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo beta lactamases from infections in burned patients and identification of blaIMP and blaVIM genes by PCR. *Iran J Med Microbiol* 2007; 1:23-31.
27. Nahaei MR, Bohloli-Khiavi R, Sadeghi J, Asgarzadeh M, Hasan A, Akbari Dibavar M. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from hospitalized patients. *J Ardabil Univ Med Sci* 2007; 7:90-98. [Full Text in Persian].
28. 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. *Acta Med Iran* 2011; 49:675-679.
29. 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; 54:79-87.
30. Amutha R, Padmakrishnan I, Murugan T, Renuga Devi MP. Studies on multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from pediatric population with special reference to extended spectrum beta lactamase. *Indian J Sci Technol* 11-13.
31. Zolfaghari M, Motlagh M, Aghaiee S, Heidarpoor A. Bacterial elements affecting infections after burn in nequiee-hedaiati Burn hospital, Ghom. *J Ghom Univ Med Sci*. 2011; 5:3:23-29. [Full Text in Persian]
32. Shakibaie MR, Shahcheraghi F, Hashemi A, Adeli NS. Detection of TEM, SHV and PER Type Extended-Spectrum beta-Lactamase Genes among Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burnt Patients at Shafa-Hospital, Kerman, Iran. *Iran J Basic Med Sci* 2008; 11:104-111.

Original Article

The frequency of blaIMP and blaVIM carbapenemase genes in clinical Isolates of pseudomonas aeruginosa in Isfahan medical centers

Received 26 May 2016 - Accepted: 9 Jul 2016

¹ Ladan Rahimzadeh Torabi*

² Monireh Doudi

³ Zeynab Golshani

1,2- Ms of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

3- Department of biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

* Isfahan, Falavarjan Branch Islamic Azad University, Department of biology
Tel: 09135618257
Email: Negar.rahimz@gmail.com

Abstract

Introduction: This study aimed to investigate the discovery of antibiotic resistance in isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and antibiotic susceptibility patterns and also, identify the gene encoding beta-lactamase in the isolated strains, isolated from nosocomial infections in patients admitted to the hospitals of Isfahan province.

Methods: In this cross-sectional study, 51 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were collected from patients in various hospitals and clinical laboratories in North, South and Central Isfahan. Then, antibiotic susceptibility of isolates was determined, using standard methods and disk diffusion method. The carbapenemase genes of blaVIM and blaIMP were detected by PCR test.

Results: Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were most resistant to ciprofloxacin (96/08 %), carbenicillin (92/16%), imipenem (80 %), ampicillin (72/55%) and nitrofurantoin (78/43%), respectively. On the other hand, among the highest rates of infection by *Pseudomonas aeruginosa* were wounds, by the rate of %33/33. Of 51 cases with drug resistance, 32 strains (63%) had beta-lactamase-producing blaIMP gene, while none of the gene were blaVIM.

Conclusion: The results of this study showed that resistance to antibiotics among strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients, were prevalent. Therefore, fast and precise evaluation of antibiotic resistance is necessary, because the strains producing beta-lactamase, among hospital strains are on the rise.

Key words: Antibiotic resistance, Carbapenemase genes, *Pseudomonas aeruginosa*, PCR

Acknowledgement: There is no conflict of interest.