پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال بیستم، شماره ۶، پی‌درپی ۱۰۸، صفحات ۳۵۰ تا ۳۵۸
بهمن و اسفند ۱۳۹۴

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۱۹

فراوانی ژن‌های KPC و MBL در بین سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی و سیستیک فیبروزیس

*مریم طرهانی[۱]، دکتر علی هاشمی[۲]، دکتر مژده حاکمی والا [*۳]، دکتر جمیله نوروزی[۴]، دکتر قمرتاج خانبابائی[۵]*

۱. کارشناس ارشد گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. استادیار گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. دانشیار گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴. استاد گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران شمال، تهران، ایران
۵. دانشیار بیمارستان مفید، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: هدف از این مطالعه، تعیین شیوع ژن‌های متالوبتالاکتاماز (MBL) و کلبسیلا پنومونیه کارباپنماز (KPC) در بین ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی و سیستیک فیبروزیس بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی بر روی ۷۰ و ۳۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از زخم بیماران مبتلا به سوختگی بیمارستان مطهری تهران و خلط بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس بیمارستان مفید تهران در سال ۲۰۱۳ انجام شد. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی با روش میکرودایلوشن مطابق پروتکل CLSI 2013 انجام گرفت. برای شناسایی تولید متالوبتالاکتامازها از روش CDDT (combined double disk synergy test) و کارباپنماز از روش MHT (Modified Hodge test) و برای تشخیص ژن‌های IMP، VIM و KPC از روش PCR و Sequencing استفاده گردید.

یافته‌ها: مقاومت سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی و سیستیک فیبروزیس بر اساس تست آنتی‌بیوگرام به شرح زیر به‌دست آمد: ایمی‌پنم (۸۵/۷۱٪) ۶۰ و (۳/۳٪)۱، مروپنم (۸۲/۸۵٪)۵۸ و (۳۶/۶٪)۱۱، سفتازیدیم (۷۷/۱۲٪)۵۴ و (۳۳/۳٪)۱۰، سفپیم (۷۸/۲۱٪)۵۵ و (۱۶/۶٪)۵، پیپراسیلین (۷۴/۱۵٪)۵۲ و (۱۰٪)۳، سیپروفلوکساسین (۷۹/۳۲٪)۵۶ و (۱۶/۶٪)۵، آزترئونام (۷۹/۳۲٪)۵۶ و (۲۶/۶٪)۸ و جنتامیسین (۸۱/۶۷٪)۵۷ و (۴۳/۳٪)۱۳. با روش CDDT، ۴۲/۵۱٪ و ۴۳/۳٪ سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی و سیستیک فیبروزیس، مولد متالوبتالاکتاماز و با روش MHT، هیچ کدام از سویه‌ها مولد KPC نبودند. شیوع ژن‌های KPC، VIM و IMP در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی به ترتیب ۱۰٪، ۰٪، ۰٪ و در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس، هیچ‌کدام از ژن‌ها مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: به دلیل افزایش سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* مولد متالوبتالاکتاماز در بیماران مبتلا به سوختگی و سیستیک فیبروزیس، شناسایی سویه‌های حاوی متالوبتالاکتاماز و کارباپنماز برای اجرای برنامه‌های کنترل عفونت، ضروری می‌باشد.

واژگان کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، سوختگی، سیستیک فیبروزیس، متالوبتالاکتاماز

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Tarhani M, Hashemi A, Hakemi Vala M, Nowroozi J, Khanbabaee G. Frequency of the KPC and MBL genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burn and cystic fibrosis patients. Pejouhandeh 2016;20(6):350-358.

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی، همواره در همه‌ی کشورها یکی از مشکلات عمده‌ی بیمارستان‌ها محسوب می‌شوند. در بیماران مبتلا به سوختگی، عفونت، به خصوص با *سودوموناس آئروژینوزا* نقش بسیار مهمی در به خطر انداختن سلامتی این افراد دارد. به علاوه، آلودگی با این باکتری‌ها در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس نیز از اهمیت خاصی برخوردار است، زیرا در افزایش روند پیشرفت بیماری و میزان مرگ و میر در

[*] **نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر مژده حاکمی والا؛** ولنجک، بلوار دانشجو، خیابان کودکیار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران؛ **پست الکترونیک:** m.hakemi@sbmu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

این بیماران مؤثر است (۱).

سودوموناس آئروژینوزا پاتوژن فرصت طلبی است که به صورت ژنتیکی به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم بوده و همچنین می‌تواند در طی درمان با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها موتانت‌های مقاوم دیگری نیز تولید کند. این باکتری باعث ایجاد انواع عفونت‌ها از قبیل عفونت‌های پوستی محدود تا بیماری‌های تهدیدکننده‌ی حیات در بیماران مبتلا به سوختگی شدید، بیماران مبتلا به لوسمی، AIDS، سیستیک فیبروزیس و سرطان می‌گردد (۲). بیمارانی که دچار نقص سیستم ایمنی شده‌اند، به ویژه دریافت کنندگان پیوند، بیماران مبتلا به سوختگی و بیماران سرطانی، در معرض ریسک بالای کسب عفونت‌های *سودوموناس آئروژینوزا* هستند. یکی از مکانیسم‌های اصلی مقاومت این باکتری‌ها علیه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، تولید متالوبتالاکتامازها (MBLS) است. بر اساس مطالعات مولکولی، آنزیم‌های هیدرولیزکننده‌ی بتالاکتام‌ها (بتالاکتامازها) در چهار گروه A، B، C و D طبقه‌بندی شده‌اند که متالوبتالاکتامازها متعلق به گروه B بوده و برای فعالیت آنزیمی خود، نیاز به یک یا دو یون Zn در اکتیو سایت خود به عنوان کوفاکتور دارند (۳). تولید متالوبتالاکتامازها در سرتاسر جهان در چند سال گذشته در بسیاری از ایزوله‌های کلینیکی، به تناوب و به صورت روزافزون شناسایی شده‌اند و سویه‌هایی که این آنزیم‌ها را تولید می‌کنند مسؤول طولانی شدن دوره‌ی عفونت با این سویه‌ها در بیمارستان‌ها بوده‌اند. کارباپنم‌ها به ویژه ایمی‌پنم، یکی از مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها علیه *سودوموناس آئروژینوزا* است. *سودوموناس آئروژینوزا* با کاهش جذب آنتی‌بیوتیک به علت فقدان یک پورین غشای خارجی، تحت عنوان oprD، یا دفع فعال دارو از طریق پمپ‌های efflux و تولید متالوبتالاکتامازها در برابر کارباپنم‌ها مقاوم می‌شوند (۴). VIM، SPM و IMP مهم‌ترین متالوبتالاکتاماز از نظر کلینیکی هستند که به‌وسیله‌ی ژن‌های bla-IMP، bla-VIM، bla-SPM کد می‌شوند. حداقل ۱۴ نوع VIM و ۲۳ نوع IMP متفاوت، تعیین هویت شده‌اند. از طرف دیگر، متالوبتالاکتامازها به چند خانواده تقسیم می‌شوند که عبارتند از: VIM، SPM، IMP، GIM، SIM، DIM و AIM (۵،۴). در بعضی از مطالعات، میزان مرگ و میر ناشی از *سودوموناس آئروژینوزای* تولیدکننده‌ی MBL را بیش از سویه‌های فاقد آن گزارش نموده‌اند (۹-۶).

در این مطالعه، با جدا نمودن *سودوموناس آئروژینوزای* مولد متالوبتالاکتاماز از نمونه‌های بالینی به‌دست آمده از بیماران مبتلا به سوختگی در بیمارستان شهید مطهری و بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس در بیمارستان مفید به روش‌های فنوتیپی و مولکولی، فراوانی ژن‌های IMP، VIM و KPC را بررسی نمودیم.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از ۲۵ فروردین تا تیر ۱۳۹۳ از بخش سوختگی بیمارستان شهید مطهری تهران و از مهر ماه ۱۳۹۲ تا مهر ماه ۱۳۹۳ نمونه‌های خلط از بیماران مبتلا به سیتیک فیبروزیس از بیمارستان کودکان مفید جمع‌آوری شد. برای نمونه‌برداری، در ابتدا محل زخم بیماران با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد، سپس نمونه‌گیری به کمک سواب استریل انجام و در ادامه، سواب‌ها داخل محیط انتقالی استوارت قرارگرفته و سریعاً به آزمایشگاه گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انتقال یافتند. نمونه‌های خلط بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس نیز در ظروف استریل جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه بیمارستان کودکان مفید انتقال و روی محیط مکانکی اگار کشت داده شدند. بلافاصله، محیط‌های کشت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و بعد از این مدت کلنی‌های رشد یافته جهت انجام تست‌های تشخیصی و افتراقی از نظر وجود باکتری‌های غیر تخمیری، مورد آزمایش و ارزیابی قرار گرفتند (۲).

برای سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، از روش استاندارد دیسک دیفیوژن Kirby-Bauer و طبق دستور CLSI 2013 صورت گرفت. دیسک‌های استفاده شده از شرکت Mast انگلستان خریداری شدند و شامل سفتازیدیم ۳۰µg، سفپیم ۳۰µg، آزترئونام ۱۰µg، ایمی‌پنم ۱۰µg، مروپنم ۱۰µg، جنتامیسین ۱۰µg، سیپروفلوکساسین ۳۰µg، پیپراسیلین ۱۰۰µg بودند. در ضمن، برای کنترل آزمایش‌ها از *سودوموناس* ATCC27853 به‌عنوان کنترل استفاده گردید. برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) از روش میکرودایلوشن و بر اساس پروتکل CLSI 2013 استفاده شد (۲). بر اساس پروتکل CLSI 2013 جهت جداسازی سویه‌های تولیدکننده‌ی ESBL، از دیسک مروپنم و آنتی‌بیوتیک مروپنم به اضافه EDTA استفاده شد (۲). برای انجام این آزمایش، ابتدا حجمی از محلول تهیه شد که حاوی ۷۵۰ میکروگرم EDTA بود، به دیسک‌های مروپنم اضافه شد و سپس در انکوباتور خشک گردید. سپس از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده توسط سواب استریل در سطح محیط مولر

Archive of SID

www.SID.ir

هینتون اگار به روش متراکم (سفره‌ای) کشت داده شد و پس از ۱۵ دقیقه و حصول اطمینان از خشک شدن محیط کشت، دیسک‌های مروپنم و مروپنم به اضافه EDTA به‌کمک پنس استریل روی محیط کشت طوری قرار داده شد که دیسک‌ها از هم، فاصله‌ی ۳۰ میلی‌متری داشتند. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت نگهداری شدند. زمانی که رشد باکتری‌ها به طور واضحی روی پلیت‌ها نمایان شدند، خواندن نتایج تست انجام شد (۲).

تست MHT (Modified Hodge test)، برای بررسی وجود کارباپنماز طبق دستور کار CLSI 2013 انجام شد. بدین صورت که سوسپانسیون باکتری با رقت نیم مک فارلند از باکتری E. coli ATCC 25922 تهیه شد. تهیه‌ی رقت ۱/۱۰ با سرم فیزیولوژی از سوسپانسیون مرحله‌ی قبل با رقت نیم مک فارلند تهیه شد. سپس کشت چمنی با سواب استریل از سوسپانسیون با رقت ۱/۱۰ E. coli ATCC 25922 روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد. در ادامه، پلیت در دمای اتاق به مدت ۳ الی ۵ دقیقه نگهداری شد تا جذب محیط گردد. یک دیسک مروپنم ۱۰ میکروگرمی در مرکز پلیت قرار داده شد. از سوسپانسیون ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزایی* که به آنتی‌بیوتیک مروپنم مقاوم و نیمه حساس بودند، برای بررسی تولید کارباپنماز استفاده شد و بدین منظور از آنها از لبه دیسک قرار داده شده در مرکز به سمت لبه پلیت، کشت خطی داده شد (با دقت به این موضوع که سواب با دیسک برخورد نکند). پس از آن، پلیت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۲۴ ساعت نگهداری شد. هاله‌ی عدم رشد به شکل خاص برگ شبدری در نمونه‌های تولیدکننده‌ی کارباپنماز به‌عنوان نمونه‌ی مولد کارباپناماز، در نظر گرفته شد (۲). به‌طور همزمان از یک سویه *اسینتوباکتر بومانی* KPC مثبت تهیه شده از انستیتو پاستور، به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

برای استخراج نمونه‌های *سودوموناس*، از روش جوشاندن (Boiling) استفاده گردید. به این صورت که مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل را در داخل میکروتیوب ریخته و از کلنی‌های تازه کشت، ۳ تا ۴ کلنی برداشته و در داخل آن حل کرده و سپس خوب ورتکس نموده و به مدت ۱۰ دقیقه آن را در داخل آب جوش قرار دادیم. سوسپانسیون فوق در داخل سانتریفیوژ گذاشته شد و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ 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 ژن‌های bla_{IMP}، bla_{VIM}، bla_{KPC} در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* ایزوله شده با استفاده از دما و پرایمرهای اختصاصی این ژن‌ها انجام گرفت (جدول ۱). محتویات هر میکروتیوب شامل ۲ µl از DNA استخراج شده و ۱ µl از هر پرایمر، به کیت PCR Master (شرکت Bioneer کشور کره جنوبی) با حجم نهایی ۲۵ µl بود. از سویه‌های P. aeroginosa strain FSH2 jx648311، P. aeruginosa ATCC 27853 و Acinetobacter baumanni KPC^+ (اهدایی از دکتر میرنژاد بیمارستان بقیة‌الله) به ترتیب حاوی ژن‌های IMP، VIM و KPC به عنوان کنترل مثبت و از مارکر ۱۰۰ bp برای تأیید وزن مولکولی استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ژل ۱٪ انجام شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، نتایج با دستگاه Gel doc (Bio-RAD) با نور UV مشاهده گردید. محصول PCR با استفاده از کیت شرکت Bioneer ساخت کشور کره جنوبی، خالص‌سازی و برای تعیین توالی به شرکت ذکر شده فرستاده شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای انجام PCR.

ژن شناسایی شده	توالی ژن
IMP-A	5'-GAAGGCGTTTATGTTCATAC-3'
IMP-B	5'-GTATGTTTCAAGAGTGATGC -3'
VIM-A	5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC -3'
VIM-B	5'-AATGCGCAGCACCAGGATA -3'
KPC-A	5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3'
KPC-B	5'-CTTGTCATCCTTGTTAGGCG-3'

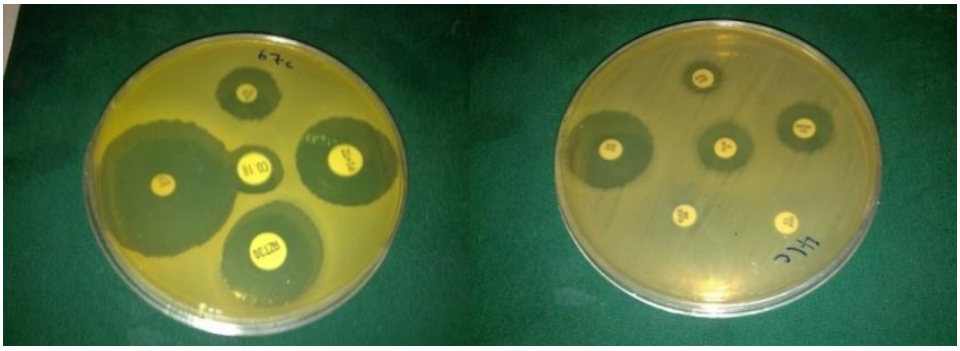
یافته‌ها

بر اساس تست‌های تشخیصی آزمایشگاهی که برای شناسایی جنس و گونه استفاده شد، ۱۰۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* شامل ۷۰ سویه جدا شده از زخم بیماران دچار سوختگی و ۳۰ سویه جدا شده از خلط بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید مطهری و بیمارستان مفید طی سال ۹۳ به‌دست آمد.

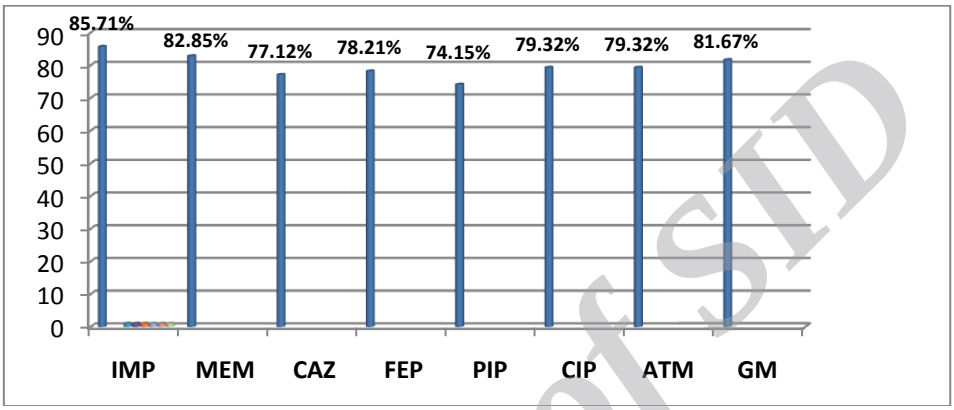
برای کل ۷۰ نمونه‌ی *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از زخم بیماران مبتلا به سوختگی و ۳۰ نمونه از خلط بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس جدا شده، تست آنتی‌بیوگرام براساس دستورالعمل CLSI 2013 انجام گرفت (شکل ۱). میزان مقاومت *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی و سیستیک فیبروزیس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده، در نمودارهای ۱ و ۲ ذکر شده است.

Archive of SID

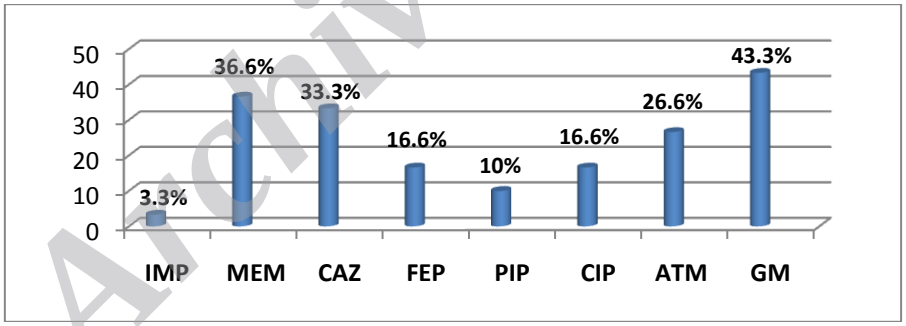
www.SID.ir



شکل ۱. آنتی‌بیوگرام دو نمونه از باکتری‌های بررسی شده.



نمودار ۱. مقاومت آنتی‌بیوتیکی درسویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی. IMP: imipenem، MEM: meropenem، CAZ: ceftazidime، FEP: cefepime، PIP: piperacillin، CIP: ciprofloxacin، ATM: Aztreonam، GM: Gentamicin.



نمودار ۲. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس. IMP: imipenem، MEM: meropenem، CAZ: ceftazidime، FEP: cefepime، PIP: piperacillin، CIP: ciprofloxacin، ATM: Aztreonam، GM: Gentamicin.

مقدار MIC برای ایمی‌پنم *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس با توجه به حساس بودن همه‌ی نمونه‌ها برابر یا بیش از ۲ µg/ml به‌دست آمد (جدول ۲).

جدول ۲. نتایج تست MIC برای ایمی‌پنم *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی.

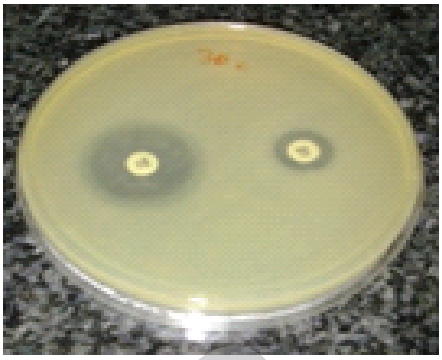
گونه	$MIC_{۵۰}$	$MIC_{۹۰}$	MIC range
سودوموناس آئروژینوزا	۳۲ µg/ml	۶۴ µg/ml	۲-۱۲۸ ml

ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* از هر دو گروه جدا شده از سوختگی یا سیستیک فیبروزیس که مقاوم به آنتی‌بیوتیک مروپنم بودند به روش CDDT از نظر تولید متالوبتالاکتامازها مورد شناسایی قرار گرفتند. در تفسیر CDDT اگر قطر هاله عدم رشد دیسک MEM به تنهایی نسبت به دیسک MEM+EDTA، بزرگتر یا مساوی ۸ mm می‌بود، بیانگر تولید متالوبتالاکتاماز در نظر گرفته می‌شد (شکل ۲). لذا در این بررسی از ۷۰ ایزوله‌ی *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از سوختگی، ۴۶ ایزوله (۵۱/۴۲٪) و از ۳۰ ایزوله‌ی

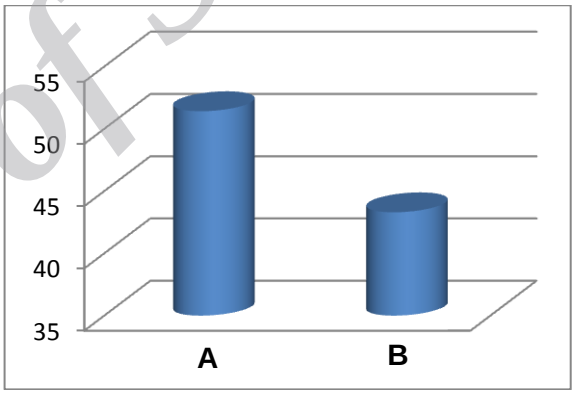
Archive of SID

www.SID.ir

سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از سیستیک فیبروزیس ۱۳ (۴۳/۳٪) ایزوله دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند (شکل ۲، نمودار ۳).

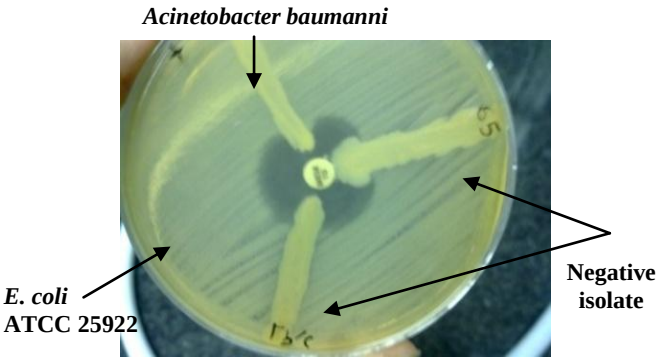


شکل ۲. تست فنوتیپی DDST برای غربالگری توانایی تولید متالوبتالاکتاماز، A: دیسک مروپنم و B: دیسک مروپنم به همراه EDTA و افزایش قطر هاله عدم رشد درکنار دیسک B.



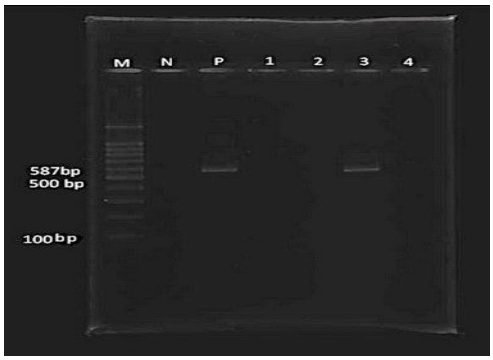
نمودار ۳. مقایسه‌ی فراوانی MBL، در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی (A) و سیستیک فیبروزیس (B).

برای کل ۷۰ نمونه‌ی *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از زخم سوختگی و ۳۰ نمونه‌ی جدا شده از خلط سیستیک فیبروزیس، تست هاچ اصلاح شده انجام گرفت. همه‌ی نمونه‌ها فاقد آنزیم کارباپنماز بودند (شکل ۳).

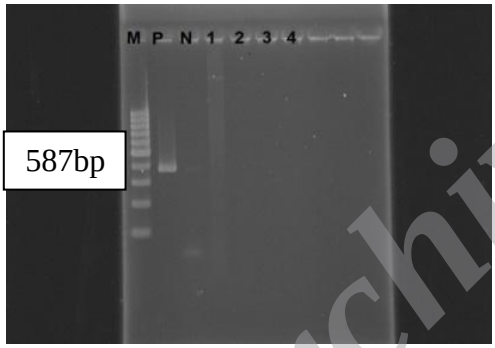


شکل ۳. تست فنوتیپی MHT برای بررسی تولید آنزیم کارباپنماز.

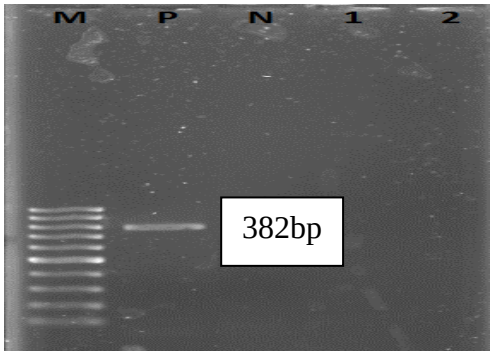
از بین ۷۰ نمونه‌ی *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی، ۱۰٪ (۷ نمونه) دارای ژن IMP بودند (شکل ۴) ولی در هیچ یک از نمونه‌ها باندی مبنی بر حضور ژن‌های VIM (شکل ۵) و KPC (شکل ۶) مشاهده نشد. همچنین، هیچ‌کدام از ۳۰ نمونه‌ی سیستیک فیبروزیس واجد ژن‌های IMP، VIM و KPC نبودند.



شکل ۴. باند ۵۸۷ جفت بازی مربوط به ژن IMP با روشPCR ؛ M: مارکر، P: کنترل مثبت برای ژن (bla_{IMP} (587 bp)، ۳ نمونه مثبت برای ژن (bla_{IMP} (587 bp)، N: کنترل منفی.



شکل ۵. باند ۳۸۲ جفت بازی مربوط به ژن VIM با روش PCR؛ M: مارکر، P: کنترل مثبت برای ژن (bla_{VIM} (382 bp)، N: کنترل منفی، (۱، ۲، ۳ و ۴) نمونه‌های منفی برای ژن (bla_{VIM} (382 bp).



شکل ۶. باند ۷۹۸ جفت بازی مربوط به ژن KPC با روش PCR؛ M: مارکر، P: کنترل مثبت برای ژن (bla_{KPC} (798 bp)، N: کنترل منفی، (۱ و ۲) نمونه‌های منفی برای ژن (bla_{KPC} (798 bp).

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

سودوموناس آئروژینوزا، پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی است که عامل اصلی مرگ و میر در افراد مبتلا به ضعف سیستم ایمنی مانند ایدز، مبتلایان به نقص ژنتیکی سیستیک فیبروزیس (CF)، بیماران بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) و سوختگی‌ها به شمار می‌رود. همچنین به علت مقاومت ذاتی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های متداول مورد مصرف در بیمارستان‌ها، عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی (Nosocomial Infections) به ویژه پنومونی‌های وابسته به دستگاه تنفسی، عفونت‌های بعد از جراحی، عفونت ادراری و سپسیس در بخش مراقبت‌های ویژه است. ظهور سویه‌های دارای مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها (MDR: Multi-drug resistant) در این بخش‌ها و بخش‌های سوختگی، رو به افزایش بوده و با توجه به پیشرفت علم پزشکی در به‌کارگیری وسایل مصنوعی و پروتزها در بدن، مانند سوندهای درون سیاهرگی، سوندهای ادراری، دریچه‌های مصنوعی قلب، لنزهای تماسی و داخل چشمی و همچنین سوختگی‌های شدید، کنترل عفونت ناشی از این باکتری‌ها، از مشکلات اصلی در بیمارستان‌ها می‌باشد (۱۰).

به دلیل توانایی‌های وسیع متابولیکی و ژنتیکی *سودوموناس آئروژینوزا* از قبیل نفوذناپذیری نسبی غشای خارجی باکتری، وجود پمپ‌های تراوشی، تولید آنزیم‌های کروموزومی و پلاسمیدی تجزیه‌کننده‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها، این باکتری یکی از مقاوم‌ترین میکروارگانیسم‌ها نسبت به داروها می‌باشد. منشأ تولید بتالاکتاماز در *سودوموناس آئروژینوزا* ممکن است پلاسمیدی و یا کروموزومی باشند (۱۱). مهم‌ترین مکانیسم مقاومت اکتسابی نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم، افزایش تولید آنزیم سفالوسپوریناز است. درصد سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با مقاومت اکتسابی به سفتازیدیم بین ۴۰-۱۰٪ است که این میزان طی ۱۰ سال گذشته رو به افزایش بوده است (۱۲). مقاومت به ایمی‌پنم نیز بیشتر از طریق بتالاکتامازهای گروه B صورت می‌گیرد که به آنها کارباپنماز می‌گویند (۱۳).

در این مطالعه، ۷۰ نمونه *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی بیمارستان مطهری و ۳۰ نمونه *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس بیمارستان مفید توسط تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شد. میزان مقاومت در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، مروپنم، سفتازیدیم، سفپیم، پیپراسیلین، سیپروفلوکساسین، آزترئونام و جنتامیسین، به ترتیب ۸۵/۷۱٪، ۸۲/۸۵٪، ۷۷/۱۲٪، ۷۸/۲٪، ۷۴/۱۵٪، ۷۹/۳۲٪، ۷۹/۳۲٪ و ۸۱/۶۷٪ بود. این در حالی است که میزان مقاومت نسبت به همین آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به CF به ترتیب ۳/۳٪، ۳۶/۶٪، ۳۳/۳٪، ۱۶/۶٪، ۱۰٪، ۱۶/۶٪، ۲۶/۶٪ و ۴۳/۳٪ بود. مقایسه‌ی نتایج به‌دست آمده از بررسی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی در بیمارستان مطهری و سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به CF در بیمارستان مفید نشان می‌دهد که میزان مقاومت در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی، بسیار بالاتر از میزان مقاومت در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به CF می‌باشد، به‌طوری‌که مقاومت نسبت به ایمی‌پنم در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از سوختگی، ۸۵/۷۱٪ بود، درحالی‌که در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از CF، میزان مقاومت، ۳/۳٪ بود.

میزان مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم (۷۷/۱۲٪ و ۷۸/۲٪) و همچنین کارباپنم‌ها (۸۵/۷۱٪ و ۸۲/۸۵٪) در *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از سوختگی در این مطالعه، قابل مقایسه با نتایج مطالعه‌ی Rossolini و Mantengoli در نمونه‌های جدا شده از آمریکای لاتین (سفتازیدیم ۷۴/۶٪، سفپیم ۶۷٪، ایمی‌پنم ۷۶٪ و مروپنم ۸۰٪) می‌باشد (۱۴).

در مطالعه‌ی میرصالحیان و همکاران، میزان مقاومت سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی نسبت به ایمی‌پنم، ۷۵٪ گزارش شد، در حالی که در مطالعه‌ی حاضر، میزان مقاومت نسبت به ایمی‌پنم، ۸۵/۷۱٪ بود. این افزایش میزان مقاومت می‌تواند ناشی از تفاوت زمانی در اجرای این دو مطالعه باشد. همچنین در مطالعه‌ی دیگری، حاکمی و همکاران نتایج مشابهی با نتایج مطالعه‌ی حاضر در مورد آنتی‌بیوگرام سویه‌های *سودوموناس ائروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی در زمانی متفاوت به‌دست آوردند (۱۵).

بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده در سراسر جهان، اثبات شده است که میزان شیوع الگوهای مختلف مقاومت به ویژه ژن‌های کدکننده‌ی ESBL و MBL در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در کشورهای مختلف، در مناطق جغرافیایی متفاوت و حتی بین بیمارستان‌های مختلف

Archive of SID

www.SID.ir

در یک ناحیه‌ی جغرافیایی، می‌تواند متفاوت باشد (۴).

با توجه به نتایج این مطالعه، ۵۱/۴۲٪ سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از سوختگی و ۴۳/۳٪ سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به CF، به ترتیب مولد MBL بودند. در مطالعه‌ی شکیبائی 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 زمانی حدود ۱۰ سال) و جغرافیایی (کرمان نسبت به تهران) و حتی روش کار (استفاده از نوارهای E test, MBL strips, Solna-Sweden در مطالعه‌ی شکیبایی در مقایسه با روش DDST در این مطالعه) باشد (۱۶).

در مطالعه‌ای که در کانادا انجام شد، ۳۵٪ از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، مولد MBL بودند و از این تعداد در ۹۶٪، ژن VIM و در ۴٪ ژن IMP مشاهده شد (۱۷). در مطالعه‌ی حاضر، ۵۱/۴۲٪ از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از سوختگی و ۴۳/۳٪ از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به CF مولد MBL بودند. همچنین در مطالعه‌ی کانادا، ایزوله‌های *سودوموناس ائروژینوزا* در طی ۴ سال از بیماران مختلف بیمارستانی در کلگری جمع‌آوری شده بودند. تفاوت مختصری که در بین فراوانی تولید متالوبتالاکتاماز در این گروه از باکتری‌ها در مطالعه‌ی حاضر نسبت به مطالعه‌ی کانادا وجود دارد، علاوه بر اختلاف زمانی و مکانی، می‌تواند ناشی از تفاوت الگوی تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها در این دو کشور باشد.

مطالعه‌ی شاه چراغی در سال ۱۳۸۶ روی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران غیر سوختگی بیمارستان امام خمینی و مرکز طبی کودکان، نشان داد که ۳٪ از سویه‌ها، مولد MBL بوده‌اند. اختلاف نتایج می‌تواند مربوط به روند رو به افزایش مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم و لذا مصرف بیشتر کاربانپم‌ها در سال‌های اخیر باشد (۱۸).

با انجام آزمون MBL و CDDT روی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی و سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به CF، هر ۷۰ نمونه‌ی سوختگی و ۳۰ نمونه‌ی CF از نظر وجود ژن‌های bla_{KPC}، bla_{VIM} و bla_{IMP} مورد بررسی قرار گرفتند که ۷ نمونه از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از سوختگی از نظر وجود ژن bla_{IMP} توسط PCR مثبت شدند ولی هیچ‌کدام از ژن‌های bla_{KPC} و bla_{VIM} مشاهده نشد. این در حالی است که تمامی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از سیستیک فیبروزیس، فاقد ژن‌های bla_{KPC}، bla_{VIM} و bla_{IMP} بودند. در سال ۲۰۰۴، Luzzaro در ایتالیا، با انجام آزمایشات E-test MBL و PCR روی ۵۰۶ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد که چهار سویه (۰/۷٪) تولیدکننده‌ی متالوبتالاکتاماز، حامل ژن VIM می‌باشند (۱۹). در سال ۲۰۰۷، خسروی و همکاران در اهواز با انجام آزمایش MBL E-test و PCR روی ۱۰۰ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* نشان دادند که ۸ سویه (۱۹/۵٪) از ۴۱ سویه، مقاوم به ایمی‌پنم تولیدکننده‌ی متالوبتالاکتاماز و هر ۸ سویه، حامل ژن VIM بوده‌اند (۲۰). در سال ۲۰۰۷، بهزادیان‌نژاد در دانشگاه تربیت مدرس با انجام آزمایش E-test MBL و PCR روی ۱۲۶ سویه *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از نمونه‌های بالینی غیر سوختگی در بیمارستان بقیة‌الله و شریعتی نشان دادند که ۸ سویه (۱۱٪) از ۷۰ سویه‌ی مقاوم به ایمی‌پنم، تولیدکننده‌ی متالوبتالاکتاماز هستند و هر ۸ سویه، حامل ژن VIM می‌باشند (۲۱).

با توجه به نتایج مطالعات مشابهی که تا سال ۲۰۰۷ در مناطق مختلف ایران انجام شده است، میزان تولید متالوبتالاکتاماز نسبت به مطالعه‌ی فعلی کمتر بوده و مهم‌ترین ژن مولد متالوبتالاکتاماز، ژن VIM بوده است. به‌نظر می‌رسد که همانند روند افزایشی مقاومت نسبت به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله کاربانپم‌ها در سویه‌های *سودوموناس ائروژینوزا*، توانایی تولید متالوبتالاکتاماز در *سویه‌های سودوموناس ائروژینوزای* ایران نیز در حال افزایش می‌باشد. در حالی‌که در مطالعه‌ی حاضر، این ژن از هیچ‌یک از سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی و یا CF جدا نشده و به‌عکس، در جدایه‌های سوختگی فقط ژن IMP دیده شده است. چنین تفاوتی را می‌توان به تغییر در مکانیسم تولید MBL در طی زمان در این گروه از باکتری‌ها مرتبط دانست.

نتیجه‌گیری

میزان مقاومت در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از زخم بیماران مبتلا به سوختگی، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، مروپنم، سفتازیدیم، سفپیم، پیپراسیلین، سیپروفلوکساسین، آزترئونام و جنتامیسین به ترتیب ۸۵/۷۱٪، ۸۲/۸۵٪، ۷۷/۱۲٪، ۷۸/۲٪، ۷۴/۱۵٪، ۷۹/۳۲٪، ۷۹/۳۲٪، ۸۱/۶۷٪ و میزان مقاومت نسبت به همین آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از خلط بیماران مبتلا به CF به ترتیب ۳/۳٪، ۳۶/۶٪، ۳۳/۳٪، ۱۶/۶٪، ۱۰٪، ۱۶/۶٪، ۲۶/۶٪ و ۴۳/۳٪ به‌دست آمد. همان‌طور

Archive of SID
www.SID.ir

که از نتایج مشخص است، جدایه‌های *سودوموناس ائروژینوزا* از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس نسبت به جدایه‌های سوختگی، از مقاومت کمتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج برخوردارند. این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت سنی دو گروه بیماران (اکثر بیماران سیستیک فیبروزیس از گروه کودکان و بیشتر بیماران مبتلا به سوختگی از بزرگسالان) و در نتیجه، تماس کمتر گروه بیماران CF (کودکان) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در مقایسه با افراد مبتلا به سوختگی (که اکثراً بزرگسال بوده‌اند) باشد. شناسایی باکتری‌های تولیدکننده‌ی MBL و KPC، گزارش دقیق و سریع چنین آنزیم‌هایی به منظور نظارت هر چه بهتر و دقیق‌تر در ردیابی مقاومت‌های چندگانه و همچنین انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب و جلوگیری از شیوع چنین آنزیم‌هایی می‌تواند از گسترش عفونت‌های بیمارستانی جلوگیری نماید. همچنین اقدامات پیشگیرانه به منظورکاهش شیوع این ژن‌ها از طریق درمان مناسب و رعایت بهداشت در بیمارستان‌ها به عمل آید.

REFERENCES

1. Van Mansfeld R, Willems R, Brimicombe R, Heijerman H, Van Berkhout FT, Wolfs T, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* genotype prevalence in Dutch cystic fibrosis patients and age dependency of colonization by various P. aeruginosa sequence types. J Clin Microbiol 2009;47(12):4096–101.

2. 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. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2014.

3. Bogiel T, Deptuła A, Gospodarek E. Evaluation of different methods for detection of metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Polish J Microbiol (Polskie Towarzystwo Mikrobiologow= The Polish Society of Microbiologists) 2009;59(1):45–8.

4. Neyestanaki DK, Mirsalehian A, Rezagholizadeh F, Jabalameli F, Taherikalani M, Emaneini M. Determination of extended spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases and AmpC-beta-lactamases among carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Burns 2014;40(8):1556–61.

5. Shahcheraghi F, Feizabadi M, 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.

6. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier J-D, *et al*. Novel acquired metallo-β-lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005;49(11):4485–91.

7. Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Sharma V. An evaluation of four different phenotypic techniques for detection of metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. Indian J Med Microbiol 2008;26(3):233.

8. Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, Mathai D, Jones RN. Carbapenem resistance among P*seudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo-β-lactamase clones (VIM-2,-5,-6, and-11 and the newly characterized VIM-18). Antimicrob Agents Chemother 2009;53(3):1225–7.

9. Chatterjee S, Kumar A, Prasad K, Mathai D, Manoharan A. Clinico epidemiologic and molecular characterization of metallo beta lactamases (MBLs) producing nosocomial *Pseudomonas aeruginosa (PSA)*. Int J Infect Dis 2010;14:e31–e2.

10. Jarvis WR, Edwards JR, Culver DH, Hughes JM, Horan T, Emori TG, *et al*. Nosocomial infection rates in adult and pediatric intensive care units in the United States. Am J Med 1991;91(3):S185–S91.

11. Doggett R. Microbiology of *Pseudomonas aeruginosa*. Pseudomonas aeruginosa: Clin Manifest Infect Curr Ther 1979:1–8.

12. 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.

13. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35(1):147–51.

14. Rossolini G, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect 2005;11(s4):17–32.

15. Hakemi Vala M, Hallajzadeh M, Hashemi A, Goudarzi H, Tarhani M, Sattarzadeh Tabrizi M, *et al*. Detection of Ambler class A, B and D ß-lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and Acinetobacter baumannii clinical isolates from burn patients. Ann Burns Fire Disasters 2014;27(1):8–13.

16. Shakibaie MR, Shahcheraghi F, Hashemi A, Adeli NS. Detection of TEM, SHV and PER Type Extended-Spectrum ß-Lactamase Genes among Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burnt Patients at Shafa-Hospital, Kerman, Iran. Iran J Basic Med Sci 2008;11(2):104–11.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Pitout JD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL. Molecular epidemiology of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. J Clin Microbiol 2007;45(2):294–8.

18. Shahcheraghi F, Nikbin V. Metallo--Lactamase and resistance rate of *P. aeruginosa i*solates to ceftazidim and imipenem. Iran J Inf and Trop Dis. 2007;36:19–22.

19. Luzzaro F, Endimiani A, Docquier J-D, Mugnaioli C, Bonsignori M, Amicosante G, et al. Prevalence and characterization of metallo-β-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;48(2):131–5.

20. Mihani F, Khosravi A. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo beta lactamases from infections in burned patients and identification of blaIMP and blaVIMgenes by PCR. Iran J Med Microbiol 2007; 1(1):23–31.

21. Yazdi HR, Nejad GB, Peerayeh SN, Mostafaei M. Prevalence and detection of metallo-β-lactamase (MBL)-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from clinical isolates in Iran. Ann Microbiol 2007;57(2):293–5.

Archive of SID

www.SID.ir