مطالعه پروفیل پلاسمیدی و مقاومت آنتی بیوتیکی در *Pseudomonas aeruginosa* بیمارستانی

احیا عبدی عالی، وجیهه سادات نیک بین، محمد مهدی فیض آبادی، سارا غروی و زهرا فلاحی

بخش زیست شناسی , دانشکده علوم, دانشگاه الزهرا (س)، تهران

چکیده

Pseudomonas aeruginosa یکی از مهمترین پاتوژنهای انسانی فرصت طلب است که در همه جا حضور دارد و به طیف وسیعی از عوامل ضد میکروبی مقاومت ذاتی نشان می دهد. هدف از پژوهش حاضر مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و .پروفیل پلاسمیدی در سویه های بیمارستانی *P. aeruginosa* است. مدت ۸ ماه ۱۰٤ سویه *P. aeruginosa* از نمونه های بالینی مختلف (خلط ، ادرار، خون، مدفوع و...) و بخشهای محیطی بیمارستان (سینک، مایع دستشویی، دست کارکنان، تخت بیماران و...) جمع آوری گردید، و تست حساسیت آنتی بیوتیک به روش انتشار در آگار (Kirby-Bauer) بر روی آنها انجام شد. از روش لیز قلیایی (Alkaline Lysis) نیز بمنظور استخراج پلاسمید سویه های مورد بررسی استفاده گردید. ازمیان ۱۰٤ سویه *P. aeruginosa* ۸ درصد آنها سویه های محیطی بودند.مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده شده سویه ها بدین شرح می باشد: لینکومایسین(۱۰۰ درصد) ، سفتیزوکسیم(۹۹ درصد) ، لومه فلوکساسین (۹٤ درصد)، سفتازیدیم (٦۰ درصد)، تیکارسیلین(۵۰ درصد)، سفتریاکسون، (٤٤ درصد)،سفوپرازون(۳۷ درصد)،توبرامایسین وسیپروفلوکساسین ۱۰mg (۳۵ درصد)، پیپراسیلین و جنتامایسین(۳٤ درصد)، کربنی سیلین(۲۵ درصد)، سیپروفلوکساسین ۳۰mg(۲٤ درصد)، آمیکاسین(۲۲ درصد) و ایمی پنم(۱ درصد). ۲۹/۸ درصد سویه ها واجد پلاسمید می باشد که در ۱۵ پروفیل پلاسمیدی مختلف قراردارند و ٦۱/۷ درصد کل سویه هایِ مقاوم به حداقل ۱۰ آنتی بیوتیک را تشکیل می دهند. بین بعضی از پلاسمیدها ومقاومت به بعضی آنتی بیوتیکها نیزارتباط معنا داری مشاهده شد. با توجه به اینکه تمام سویه های جدا شده MDR هستند، تنها ۲۹/۸ درصد سویه ها واجد پلاسمید می باشند، بنابراین مقاومت در آنها بیشتر کروموزومی است. گرچه فرکانس پایین پلاسمید در سویه های *P. aeruginosa* مطالعه ارتباط آنرا با مقاومت آنتی بیوتیکی محدود می سازد اما بدلیل آسانتر بودن این روش نسبت به سایر روشهای تایپینگ ملکولی، می توان از این روش بهمراه روشهای دیگر در رد یابی منشاء سویه ها استفاده شود.

واژه های کلیدی: *Pseudomonas aeruginosa*، مقاومت آنتی بیوتیکی، پلاسمید

مقدمه

سودوموناس آئروجینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) باکتری گرم منفی میله ای از گروه باکتریهای غیر تخمیر کننده گلوکز است که بخشی از فلور طبیعی را در افراد سالم در نواحی مختلف بدن (پری نئوم، زیر بغل، دستگاه تنفسی و حلق) تشکیل می دهد. این باکتری می تواند در مایعات و سطوح مختلف (صابون ، سینک ، حمام ، ترمومترهای دهانی ، وسایل تنفسی ، مایعات دیالیز، آب شیر، لباس و ملافه) برای زمانهای طولانی باقی بماند. باکتری مزبور یک پاتوژن فرصت طلب مهم است که عامل عفونت بویژه در بیماران دارای ضعف ایمنی مانند ایدز، مبتلایان به نقص ژنتیکی سیستیک فیبروز، بیماران بخش مراقبتهای ویژه و سوختگیها بشمار می رود. بعلت مقاومت ذاتی این باکتری به اکثر آنتی بیوتیکهای متداول در بیمارستانها

Archive of SID

www.SID.ir

عامل مهم عفونتهای بیمارستانی بویژه پنومونی وابسته به دستگاه تنفسی ، عفونتهای بعد از جراحی ، عفونت ادراری و سپسیس در بخش مراقبتهای ویژه و سوختگی است. ظهور سویه های دارای مقاومت چند گانه MDR در این بخشها رو به افزایش است و یکی از مشکلات کنترل عفونت در بیمارستانها می باشد (۲، ۳، ۹ و۱۳).

روشهای تایپینگ متعددی برای رد یابی انتشار باکتریها و تشخیص نقش آنها در عفونتها وجود دارد که عبارتند از : بیوتایپینگ ، سروتایپینگ ، فاژ تایپینگ ، طرح حساسیت ضد میکروبی و پیوسین تایپینگ و روشهای مولکولی شامل تعیین طرح پلاسمیدی , PFGE , PCR AFLP , RFLP, است (۱، ۲، ٦، ۹ و١٤). در بین این روشها استفاده از روشهای مولکولی از جمله طرح پلاسمیدی بعنوان ابزار بیولوژیکی در سالهای اخیر کاربرد زیادی پیدا کرده است که البته در مورد سودوموناس آئروجینوزا اطلاعات زیادی در دسترس نیست. در این پژوهش سعی شده است تا پس از جدا سازی سویه های *P. aeruginosa* ارتباط بین طرح پلاسمیدی با ا لگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مورد بررسی قرار گیرد و بدین وسیله اطلاعاتی از پراکندگی و انتشار این باکتری در بیمارستانها بدست آید.

مواد و روشها

در مطالعه حاضر ۱۰٤ سویه مختلف *Pseudomonas aeruginosa* از منابع مختلف بالینی (شامل خلط، خون، ادرار، مدفوع زخم، ترشحات گوش و...) و محیطی (شامل سینک، تخت، ساکشن، دست کارکنان، لوله اکسیژن و...) از دو بیمارستان تهران جمع آوری و با انجام آزمونهای بیوشیمیایی (اکسیداز، کاتالاز، TSI، استامید آگار، سودوسل آگار PA، رشد در دمای٤٢ درجه سانتی گراد) مورد تأیید قرار گرفت. آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی بر اساس روش انتشار در آگار (Kirby-Bauer) و طبق استانداردهای NCCLS همراه با سویه استاندارد *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 بعنوان شاهد برای ۱۵ آنتی بیوتیک مختلف (لینکومایسین، لومه فلوکساسین، سفتیزوکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، تیکارسیلین، پیپراسیلین، جنتامیسین، سفوپرازون، توبرامایسین، کربنی سیلین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین ۳۰mg، سیپروفلوکساسین ۱۰mg و ایمی پنم) انجام گردید.

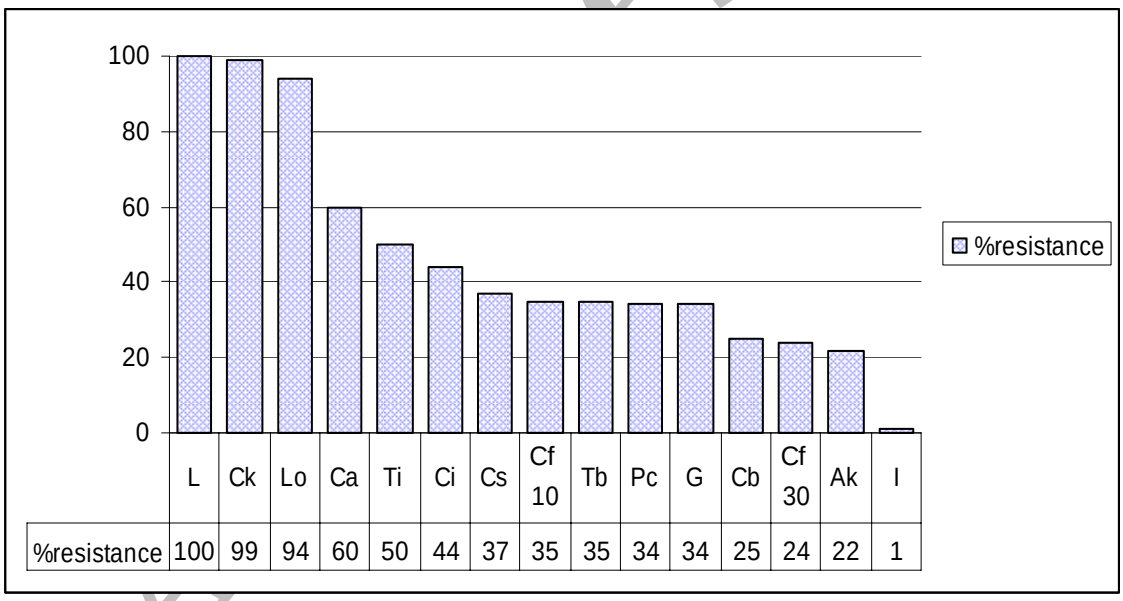
برای استخراج پلاسمید بمنظور بدست آوردن پروفایل پلاسمیدی سویه ها از روش لیز قلیایی استفاده شد. در این روش یک کلنی از کشت ٢٤ ساعته سویه ها در محیط LB جامد به محیط مایع LB دارای آنتی بیوتیک آمپی سیلین انتقال داده شد پس از انکوباسیون ۱۸-۱٦ ساعته سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل در ۱۰۰ µl از محلول I (۵۰ میلی مول گلوکز، ۲۵ میلی مول Tris-HCl (pH=۸) و ۱۰ میلی مول EDTA) حل شده سپس با ۲۰۰µl از محلول II(۲N/. NaOH و ۱٪ SDS) به آرامی مخلوط گردید. سپس ۱۵۰ µl از محلول سرد III (استات پتاسیم ۵ مولار و ۱۱/۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۲۸/۵ میلی لیتر آب مقطر) به آن اضافه کرده و مدت ۵-۳ دقیقه در یخ قرار گرفت. بعد از این مرحله نمونه ها سانتریفوژ گردیده و محلول رویی جدا شد. سپس هم حجم آن محلول فنل : کلروفرم : ایزوآمیل الکل به نسبت ۲٤:۲۵: ۱ اضافه و سانتریفوژ گردید. بعد از جدا کردن محلول رویی، اتا نول ۹۹ درصد بمیزان دو برابر حجم اضافه و سانتریفوژ شد. اتانول را خارج و رسوب با اتانول ۷۰درصد شستشو داده شد و دو باره سانتریفوژ گردید. در مرحله آخررسوب پلاسمیدی در ۵۰ µl محلول TE (۱۰ میلی مول Tris-HCl , ۱ میلی مول EDTA) دارای آنزیم RNase حل می شود(۱۱).

Archive of SID
www.SID.ir

باندهای پلاسمیدی روی آگارز ۷٪ درصد پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برو ماید با سیستم Gel-Doc و نور UV مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین وزن پلاسمیدی سویه ها از نرم افزار Labworks استفاده شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و با آزمون t-test و Spearman انجام گردید.

نتایج

از بین ۱۰٤ سویه جدا شده ۸ سویه محیطی و ۹٦ سویه بالینی است. نمونه های بالینی شامل ۳٤ نمونه ادرار (۳۳ درصد)، ۱۳ نمونه مدفوع (۱۳ درصد)، ۳ نمونه خون (۳ درصد)، ۲۵ نمونه خلط (۲٤ درصد)، ۵ نمونه نامشخص و ۱٦ نمونه سایر موارد(زخم، گوش، سوختگی ...) می باشند. مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها نیز بدین شرح می باشد: لینکومایسین(L) ۱۰۰ درصد، سفتیزوکسیم (Ck) ۹۹ درصد، لومه فلوکساسین (Lo) ۹٤ درصد، سفتازیدیم (Ca) ٦۰ درصد، سفتریاکسون (Ci) ٤٤/۲ درصد، تیکارسیلین (Ti) ۵۰ درصد، پیپراسیلین و جنتا میسین (Pc, G) ۳٤ درصد، سفوپرازون (Cs) ۳۷ درصد، توبرامایسین (Tb)۳۵ درصد، کربنی سیلین (Cb) ۲۵ درصد، آمیکاسین (Ak) ۲۲ درصد، سیپروفلوکساسین ۳۰mg (Cf_{30}) ۲٤ درصد، سیپروفلوکساسین ۱۰mg (Cf_{10}) ۳۵ درصد وایمی پنم(I) یک درصد (شکل ۱).



شکل ۱- میزان مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *P. aeruginosa*

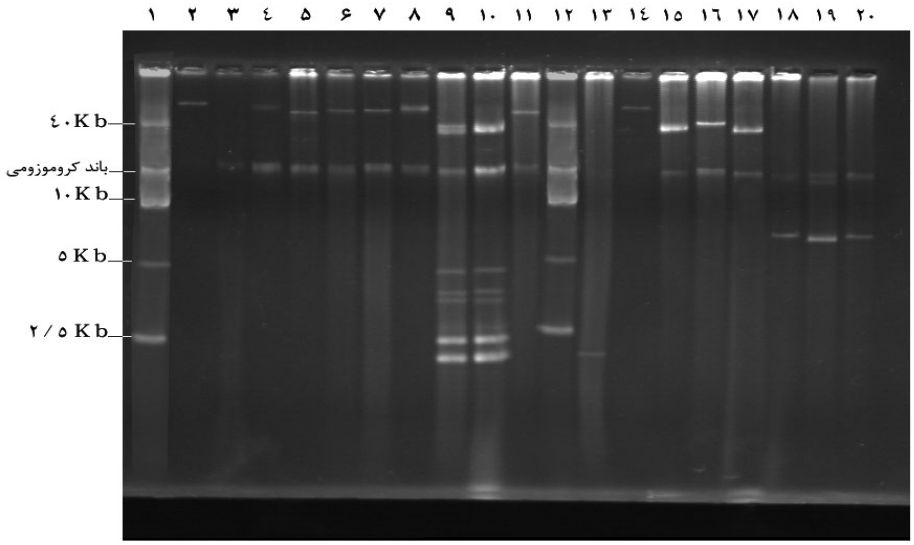
(I: ایمی پنم، Ak: آمیکاسین، Cf: سیپروفلوکساسین، Cb: کربنی سیلین، G: جنتامایسین، Tb: توبرامایسین، Cs: سفوپرازون، Ci: سفتریاکسون، Ti: تیکارسیلین، Ca: سفتازیدیم، Lo: لومه فلوکساسین، Ck: سفتیزوکسیم، L: لینکومایسین)

وجود پلاسمید در۲۹/۸ درصد از نمونه ها (۳۱ نمونه) مشاهده گردید که این تعداد در ۱۵ الگوی متفاوت پلاسمیدی با وزن بین ۱/۷ تا ۱۰۰ کیلو باز قرار گرفت (جدول ۱ و شکل ۲).

www.SID.ir

جدول ۱- پروفیل پلاسمیدی بدست آمده از ۳۱ سویه دارای پلاسمید

پروفیل پلاسمیدی	اندازه تقریبی پلاسمیدها(kb)	شماره سو یه ها	تعداد باند پلاسمیدی
۱	۲	۲٤۷	یک باند پلاسمیدی
۲	۵/۵	۳۰٤	
۳	٦	۲۷۰-۲٦۹-۲٦۵	
٤	۷	۳۰۲-۲۹۹-۲۹۵-۲۷٤	
۵	۳٤	۲۵۱-۲٤۹	
٦	۳۸/۵	۲۵۰	
۷	٤٦	۳۰۱-۲۸۲	
۸	٦۳	۲٤٤-۲۲۳-۲۱۸-۲۱۱	
۹	۷۵	۲۸۳-۲۲٦-۲۰۸	
۱۰	۸۵	۳۱۸	
۱۱	۱۰۰	۳۱٤-۲۷۷-۲۷٦-۳۰٦	
۱۲	۲و۱۰۰	۲۸۸	دو باند پلاسمیدی
۱۳	۳/۵و٦/۱و۳۸/۵	۲۷۸	سه باند پلاسمیدی
۱٤	۱/۷و۲/۱و۲/۳و۳و۳/٤و٤/۲و۳٤	۲۳۵-۲۲۸	هفت باند پلاسمیدی
۱۵	۱/۹و۲/۲و۲/٤و۳/۱و٤/۱و٤/۵و۷۵	۲۸٤	



شکل ۲ - الکتروفورز DNA پلاسمیدی استخراج شده از سویه های مختلف *P.aeruginosa*. چاهک ۱و۱۲ مارکر سوپرکویل پلاسمیدی و چاهک۲و۱٤پلاسمید۱۰۰Kbاست.(ستونهای۳و٤و۵و٦و۷و۸و۹و۱۰و۱۱و۱۳و۱۵و۱٦و۱۷و۱۸و۱۹و۲۰ بترتیب مربوط به سویه های E.coli DH5α، ۲۰۸، ۲۱۸-۲۱۱-۲۲۳-۲۲٦-۲۲۸-۲۳۵-۲٤٤-۲٤۷-۲٤۹-۲۵۰-۲۵۱-۲٦۵-۲٦۹و ۲۷۰ است)

Archive of SID
www.SID.ir

با توجه به مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی با پروفیل پلاسمیدی (جدول ۲) ارتباط نزدیکی بین آنها مشاهده می شود.

جدول ۲- مقایسه پروفیل پلاسمیدی با الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها (تمام سویه ها به آنتی بیوتیکهای لومه فلوکساسین و لینکومایسین و سفتیزوکسیم مقاوم بودند) -شماره های ۱و۲و۳ بترتیب مربوط به بیمارستانهای مهر، مصطفی خمینی و مرکز سوختگی می باشد

شماره سویه	وزن پلاسمیدی	بیمارستان	Tb	Ti	Cs	Ca	Ci	G	Pc	Cb	Ak	I	Cf 10	Cf 30
۲۴۷	۲	۱	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
۳۰۴	۵/۵	۱	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
۲۶۵	۶	۲	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	I
۲۶۹	۶	۱	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S
۲۷۰	۶	۱	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
۲۷۴	۷	۱	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	I
۲۹۵	۷	۲	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I
۲۹۹	۷	۱	R	R	I	I	R	R	R	R	I	S	I	S
۳۰۲	۷	۱	R	R	I	I	R	R	R	R	I	S	I	S
۲۲۸	۳۴ و۲/۴و۴/۳و۳و۳/۲و۲/۱و۱/۷	۳	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
۲۳۵	۳۴ و۲/۴و۴/۳و۳و۳/۲و۲/۱و۱/۷	۳	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I
۲۴۹	۳۴	۱	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I
۲۵۱	۳۴	۱	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I
۲۵۰	۳۸/۵	۱	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	R	I
۲۷۸	۳۸/۵و۶/۱و۳/۵	۱	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	I
۲۸۲	۴۶	۲	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I
۳۰۱	۴۶	۱	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	I
۲۱۱	۶۳	۱	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
۲۱۸	۶۳	۱	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
۲۲۳	۶۳	۱	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
۲۴۴	۶۳	۱	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
۲۰۸	۷۵	۱	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
۲۲۶	۷۵	۱	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
۲۸۳	۷۵	۱	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
۲۸۴	۱/۹و۲/۲و۲/۴و۳/۱و۴/۱و۴/۵و ۷۵	۱	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
۳۱۸	۸۵	۲	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
۲۷۶	۱۰۰	۱	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	I
۲۷۷	۱۰۰	۱	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S
۳۰۶	۱۰۰	۱	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	I
۳۱۴	۱۰۰	۲	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
۲۸۸	۱۰۰و۲	۱	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	R	I

Archive of SID

www.SID.ir

بطوریکه بعضی از سویه های دارای پروفیل پلاسمیدی یکسان که از یک بیمارستان جدا شده اند دارای مقاومت یکسانی نیز هستند (جدول۳). همچنین آزمون آماری نشان می دهد که بین بعضی پلاسمید های جدا شده از سویه ها و مقاومت به بعضی آنتی بیوتیکها ارتباط معنی داری وجود دارد (جدول ٤).

جدول۳- ارتباط بین پلاسمیدهای جداشده با مقاومت آنتی بیوتیکی

وزن پلاسمیدی	آنتی بیوتیک
۱۰۰	Ca ,Cs, G, Pc , Tb, Cf10mg
۷۵	I
۴۶	Ak, Ca, Cs, Ci, G, Pc, Cf10mg
۳۸/۵	Ak, Ca, Cs, Ci, G, Pc, Tb, Cf10mg
۳۴	Ak, Ca, Cs, Ci, ,G, Pc, Tb, Cf10mg, Cf30mg, I, Cb, Ti
۷	Ak, Ca, Cs, Ci, G, Pc, Ti, Tb
۶	Ak, Ca, Cs, Ci, Cb, G, Pc, Tb

جدول ٤ – ارتباط موجود بین وزن پلاسمیدی و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها با استفاده از آزمون spearman و t-test

AB / kb	Ak	Ck	Cb	Ca	Cs	Ci	G	Pc	Ti	Tb	Cf30	Cf10	I	Lo
100	0.055	0.823	0.98	0.012	0.045	0.058	0.025	0.021	0.172	0.029	0.106	0.029	0.75	0.485
75	0.964	0.843	0.889	0.832	0.603	0.502	0.712	0.701	0.294	0.701	0.687	0.148	0	0.601
63	0.128	0.843	0.141	0.187	0.793	0.102	0.149	0.138	0.038	0.149	0.687	0.295	0.778	0.601
46	0.007	0.889	0.171	0.016	0.036	0.042	0.025	0.02	0.086	0.346	0.778	0.006	0.780	0.751
38.5	0.007	0.889	0.171	0.016	0.036	0.042	0.025	0.02	0.086	0.028	0.778	0.004	0.245	0.751
34	0	0.843	0	0.002	0.008	0.011	0.004	0.003	0.046	0.005	0.025	0	0	0.601
7	0	0.843	0.174	0.002	0.008	0.011	0.004	0.003	0.046	0.005	0.687	0.849	0.778	0.601
6	0	0.843	0	0.002	0.009	0.013	0.004	0.004	0.05	0.006	0.687	0.604	0.808	0.601

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

Pseudomonas aeruginosa یکی از مهمترین پاتوژنهای فرصت طلب و عامل مهم عفونتهای بیمارستانی است. درمان عفونتهای ناشی از آن یکی از مشکلات بهداشتی بشمار می آید که بعلت طیف وسیعی از مقاومت آنتی بیوتیکی دراین باکتری است. مقاومت آنتی بیوتیکی در *P. aeruginosa* ناشی از مقاومت ذاتی بدلیل نفوذ پذیری کم، وجود سیستمهای تراوش آنتی بیوتیک (efflux system)، اکتساب ژن مقاومت ازطریق پلاسمید، ترانسپوزون و اینتگرونها و تولید بیوفیلم است (۵). علاوه بر این، حضور همه جایی آن در محیط بیمارستان مانع ریشه کن شدن آن می شود(۱۳).

با توجه به مطالعه حاضر موثرترین آنتی بیوتیکها در درمان عفونتهای ناشی از *P. aeruginosa* بترتیب از گروه بتالاکتامها ایمی پنم، از کینولونها سیپروفلوکساسین واز آمینو گلیکوزیدها آمیکاسین می باشد. در مقایسه با دیگر تحقیقاتی که در سالهای اخیر از بیمارستانهای تهران صورت گرفته است افزایش نسبی درصد سویه های مقاوم به آنتی بیوتیکها مشاهده می شود بطوریکه در سال ۱۹۷٤ مقاومت به سفتازیدیم (٦٪ درصد)، سفتریاکسون (٤۱٪ درصد)، آمیکاسین (۱۱/۸ درصد)، سفوپرازون (۳۲/٤ درصد)، توبرامایسین (۳٤/۸ درصد) و ایمی پنم(٦٪ درصد)بوده است که در این مطالعه بترتیب به ٦۰ درصد، ٤٤/۲ درصد، ۲۲ درصد، ۳۷ درصد، ۳۵ درصد و ۱ درصد افزایش یافته است(٦). البته مقاومت سویه های جدا شده از مراکز سوختگی بمراتب بیشتر از سایر سویه ها گزارش شده می باشد(۱۳و٤). در مقایسه باسایر کشورها علیرغم متفاوت بودن درصد مقاومت که معمولاً درصد کمتری را نسبت به ایران دارا می باشند، بهترین داروهای ضد سودوموناسی بترتیب در میان آنتی بیوتیکهای آمینوگلیکوزیدی آمیکاسین واز بتالاکتامها سفتازیدیم و ایمی پنم و از کینولونها نیز سیپروفلوکساسین می باشد(۲، ۳، ۱۲ و۷).

DNA پلاسمیدی در این پژوهش تنها در ۲۹/۸ درصد از سویه های مورد بررسی مشاهده شد. همچنین مطالعات دیگر در مورد این باکتری ۱۸ درصد ، ۱۵ درصد و۳۱/۹ درصد را نیز گزارش نموده اند که نتایج حاصل در این بررسی را تأیید می کند(۲، ۸ و۹). با توجه به اینکه تمامی سویه ها دارای مقاومت آنتی بیوتیکی چند گانه بودند(MDR), بنابراین می توان نتیجه گرفت که ژنهای مقاومت در این باکتری بیشتر بر روی کروموزوم قرار گرفته است(۹). پژوهش حاضر نشان می دهد که سویه های دارای الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی یکسان می توانند پروفیل پلاسمیدی یکسان یا متفاوتی داشته باشند. اما سویه های دارای الگوی پلاسمیدی یکسان که از یک بیمارستان و در فاصله زمانی اندک جدا شده اند، مقاوت یکسانی را نیز نشان می دهند. مثلا سویه های ۲۷٦ و ۳۰۲ که از یک بیمارستان و بفاصله چند روز جدا شده اند پروفیل مقاومت و پلاسمیدی یکسانی دارند در حالیکه سویه ۳۱٤ که از منبع متفاوتی است الگوی مقاومت کاملاً متفاوتی را نیز نشان می دهد(جدول۲). این موضوع اهمیت زمانی و مکانی را در مطالعات اپیدمیولوژیک می رساند. گرچه بین پروفیلهای پلاسمیدی و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها ارتباط معنی داری وجود ندارد اما بدلیل آنکه از ۱۰٤ سویه مورد بررسی ۳٤ سویه حداقل به ۱۰ آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند که ۲۱ سویه از آنها (٦۱/۷درصد) دارای پلاسمید بود و بین ژنهای موجود در این پلاسمیدها و مقاومت سویه ها به برخی از آنتی بیوتیکهای مورد مطالعه می تواند ارتباط معنا داری وجود داشته باشد که آزمون آماری آنرا تأیید می نماید (جدول ۳). درصد پایین سویه های دارای پلاسمید و تفاوت زیاد در الگوی پلاسمیدی سویه ها و

Archive of SID
www.SID.ir

ناپایداری آنها استفاده از پروفیل پلاسمیدی را به تنهایی در مطالعات اپیدمیولوژیک این باکتری با محدودیت مواجه می کند، گرچه بعضی مطالعات پایداری پروفیل پلاسمیدی را تا بیش از سه ماه نیز گزارش نموده اند(۱۵).

علیرغم فرکانس پایین پلاسمید در سویه های مورد مطالعه *Pseudomonas aeruginosa*, سادگی انجام روش تهیه پروفیل پلاسمیدی سویه ها و همراه شدن آن با تکنیکهای دیگری همچون تهیه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی می تواند در شناسایی و رد یابی سویه های بیمارستانی و در نتیجه کمک به اهداف درمانی عفونتهای ناشی از آنها مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به مقاومت بالای این باکتری که در پژوهش حاضر و پژوهشهای مشابه گزارش شده است (۲، ٦، ۱۰ و۱۳) و انتشار آسان و همه جایی آن در محیطهای بیمارستانی، جهت پیشگیری از انتشار سویه های مقاوم، روشهای کنترل مؤثرتر و کاراتری در ضد عفونی محیط بیمارستان از یک طرف و کاهش مصرف بی رویه آنتی بیوتیکهای وسیع الطیف از طرف دیگر باید در نظر گرفته شود.

منابع

1-Bingen E, and et al.(1996) Molecular epidemiology provides evidence of genotyping heterogeneity of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* serotype O:12 outbreak isolates from a pediatric hospital. *J.Clin.Microbiol*.3226-3229.

2-Corona-Nakamura AL, and et al.(2001) Epidemiologic study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs.Archiv.Med.Res. 32: 238-242

3-Douglas WM, Mulholand K, Denyer V, Gottlieb T.(2001)Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burns unit- an infection control study.*Burns.* 27: 131-135.

4-Karimi Estahbanati H, Pour Kashani P and Ghanaatpisheh F.(2002) Frequency of *Pseudomona aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns.* 28:340-348.

5-Lambert PA.(2002) Mechanisms of antibiotic resistant in *Pseudomonas aeruginosa. R.Soc.Med.* 22-26.

6-Malekzadeh F,Abdi-Ali A,Levin M, Shahamat M. (1995) Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* pyocin and antibiotic biotype in four Tehran hospitals.Int. *J.Environ. Health. Res*.5:229-238 .

7-Patrick P.(2000) Pseudomonas and multidrug resistance:Institute Pasteur euroconference Paris. Microorganisms responsible for nosocomial infections.15-18 November.

8-Plesiat P, Alkhalaf B, Michel-Briand Y.(1988) Prevalence and profiles of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 261-264.

9-Poh CL, Yap EH,Tay L ,Bergan T.(1988) Plasmid profiles compared with serotyping and pyocin typing for epidemiological surveillance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Med.Microbiol*.25:109-114.

10-Pujana P, Galleo L,Canduela MJ, Cisterna R.(2000) Specific and rapid identification of multiple-antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones isolated in an intensive care unit.*Diag.microbial.Infect.Dis*.36: 65-68.

11-Sambrook and Russell.(2001) Molecular cloning: A laboratory Manual.3th Edition,Vol 1,p:1:31-1: 34.Cold Spring Harbor, New York

12-Shahid M, Malik A and Sheeba.(2003) Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa strains harbouring R plasmids and AmpC β-lactamases isolated from hospitalized burn patients in a tertiary care hospital of north India. *FEMS Microbial Letters*.228:181-186.

13- Shahgherraghi F, Feizabadi MM, Yamin V, Abiri R, Abedian Z.(2003) Serovar determination, drug resistance patterns and plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients at two hospitals of Tehran (Iran).*Burns*. 29: 547-551.

14-Speijer H,Savelkoul PHM, Bonten MJ, Stobberingh E.(1999)Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an

Archive of SID
www.SID.ir

intensive care unit.*J.Clinic.Microbiol*.3654-3661.

15-Teyler DN etal.(1982) Salmonellosis associated with marijuana: a multistate outbreak traced by plasmid fingerprinting. *New.Eng.J.Med.*1249-1253.

Study of Plasmid Profiles and Antibiotic Resistance in Hospital *Pseudomonas aeruginosa*

Abdi Ali A., Nikbin V., Feizabadi MM., Gharavi S.,Fallahi Z

Biology Dept., Faculty of Science , Alzahra Univ., Tehran, I.R. of Iran

Archive of SID

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is one of the most important opportunistic human pathogens. This bacterium is ubiquitous and exhibits innate resistance to a wide range of antimicrobial agents. The purpose of this study was to compare antimicrobial susceptibility patterns and plasmid profiles in hospital *P.aeruginosa*.

During 8 months, 104 isolates of *P.aeruginosa* from different clinical (urine, blood, stool, sputum…) and environmental samples (sink, disinfectant solution, bed , hand,…) were collected. Susceptibility pattern of these isolates was obtained by disc diffusion (Kirby-Bauer) method. The alkaline lysis method was used for detection of plasmids.

8% of 104 isolates of *P.aeruginosa* was environmental. Antimicrobial resistance was as follows: linkomycin (100%), ceftazoxime (99%), lomefloxacin (94%), ceftazidime (60%), ticarcillin (50%), ceftriaxone (44%) cefoperazone (37%), tobramicyne and ciprofloxacin10mg (35%), piperacillin and gentamicin (34%) , carbenicillin (25%) , ciprofloxacin30mg (24%), amikacin (22%), imipeneme (1%). All isolates were MDR but plasmids were detected in 29.8% isolates with 15 different plasmid profiles. The latter constituted 61.7% of total isolates which showed resistance to 10 or more antibiotics. There were specific correlations between some plasmid and resistance to antibiotics.

The frequency of plasmids in *P.aeruginosa* was low (29.8%), indicating that the resistance genes are likely to be chromosomal. In spite of limitation of plasmid profiling, it is easy to perform and thus can be a useful method in epidemiological study.

Keyword: *Pseudomonas aeruginosa,* antibiotic resistance, plasmid

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir