مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۹، شماره۸، آبان ۱۳۹۳(شماره پی در پی۹۱)

الگوی حساسیت میکروبی و اپیدمیولوژی مولکولی پسودوموناس *آئروژینوزا* جدا شده از بیماران سوختگی

مجتبی انوری‌نژاد، عزیز ژاپونی، نورالدین رفعت‌پور، ابراهیم علیپور، پژمان عباسی، مانلی امین‌شهیدی، جلال مردانه*

مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

تاریخ وصول: ۱۳۹۲/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۲٤

چکیده

زمینه و هدف: به دلیل ظهور سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چنددارو، درمان افراد آلوده به این باکتری مشکل است. هدف از این مطالعه الگوی حساسیت میکروبی و اپیدمیولوژی مولکولی پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی بود.

روش بررسی: این مطالعه مقطعی بر روی ۲۷۰ سویه پسودوموناس آئروژینوزا جداشده از زخم بیماران سوختگی انجام گرفت. شناسایی سویه‌های تولیدکننده آنزیم متالوبتالاکتاماز با استفاده از روش E-test انجام شد. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های متالوبتالاکتاماز مثبت به روش دیسک دیفیوژن نسبت به ۱۱ آنتی‌بیوتیک بررسی شد. ارتباطات ژنتیکی و اپیدمیولوژی سویه‌ها به وسیله روش پالس فیلد ژل الکتروفورز انجام شد.

یافته‌ها: شصت ایزوله (۲۲/۲ درصد) به ایمی‌پنم و مروپنم مقاوم و تولیدکننده آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند، که۱۰ الگوی آنتی‌بیوتیکی در میان آنها مشاهده گردید و به ۵ مورد از آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی کاملا مقاوم بودند. میزان حساسیت به سفتازیدیم، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین به ترتیب ۲۳/۳ درصد، ٦/۷ درصد و ۱/۷ درصد بود. بر اساس نتایج پالس فیلد ژل الکتروفورز و تجزیه و تحلیل باندهای به دست آمده از ژنوم پسودوموناس آئروژینوزا، اغلب سویه‌ها(۷۱/٦ درصد) بیش از ۸۰ درصد شباهت نشان دادند.

نتیجه‌گیری: هیچ یک از آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش جهت تجویز مناسب به نظر نمی‌رسند. پالسوتایپ‌های حاصل از پالس فیلد ژل الکتروفورز نشان دادند که تیپ‌های خاصی از پسودوموناس آئروژینوزا در بخش سوختگی بیمارستان شایع هستند و بیماران را درگیر می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: بیماران سوختگی، عفونت‌های بیمارستانی، پسودوموناس آئروژینوزا، آنزیم متالوبتالاکتاماز، پالس فیلد ژل الکتروفورز.

***نویسنده مسئول: جلال مردانه**، شیراز، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز.
Email: Jalalmardaneh@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

پسودوموناس آئروژینوزا باسیلی گرم منفی، متحرک، فاقد اسپور و غیرتخمیر کننده است که از طیف وسیعی از اجسام بی‌جان، حیوانات و محیط اطراف انسان‌ها جداشده و در نقاط جغرافیایی مختلف جهان یافت می‌شود(۱). این باکتری به طور وسیعی در محیط‌های مرطوب از جمله؛ آب، خاک و فاضلاب وجود دارد. گاهی برای گیاهان و سبزی‌جات بیماری‌زا است و به عنوان یکی از پاتوژن‌های ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی مطرح است و به فراوانی در محیط‌های بیمارستانی یافت می‌شود. این ارگانیسم در طیف وسیعی از بیماران از جمله بیماران سوختگی سبب ایجاد عفونت می‌گردد و روند بهبود آن‌ها را پیچیده و مشکل می‌نماید(۲ و۱). بیماران سوختگی اغلب در معرض عفونت ناشی از پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها قرار دارند و از این افراد به بیماران دیگر از طرق مختلف از جمله پرستاران و دیگر کادر پزشکی، وسایل و حمام‌های مشترک منتقل می‌شوند. مشاهده شده پسودوموناس آئروژینوزا دستگاه‌ها، سینک‌ها، کف و دیوارهای بخش‌های بیمارستان‌ها و تخت‌های بیماران را آلوده می‌نماید و به دلیل مقاومت بسیار بالا به ترکیبات ضدعفونی‌کننده مورد استفاده به طور معمول در بیمارستان‌ها در چنین محیط‌هایی به سهولت دوام می‌آورند و زنده می‌ماند(٤ و۳). به منظور جستجوی منبع عفونت و روش انتقال ارگانیسم و نیز شناسایی سویه‌های بیماری‌زا روش‌های فنوتیپی و ژنتیکی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. در بین روش‌های ملکولی مورد استفاده جهت مطالعه‌های اپیدمیولوژیک میکروارگانیسم‌ها روش پالس فیلد ژل الکتروفورز (PFGE)[1] به عنوان یک روش استاندارد قابل اعتماد و تکرارپذیر محسوب می‌شود و به عنوان روش استاندارد طلایی جهت مطالعه‌های اپیدمیولوژی و ملکولی استفاده می‌گردد(۷ـ۵).

افزایش شیوع عفونت‌های ناشی از پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو با مرگ و میر و اختلالات و عوارض قابل توجهی همراه است، زیرا درمان جایگزین برای این قبیل عفونت‌ها وجود ندارد(۸). اخیراً برخی مطالعات تیگسیکلین و کلیستین به عنوان عوامل مؤثر علیه سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چنددارو مورد استفاده قرار می‌گیرند، با وجود این تجویز آن‌ها در بالین به دلیل اثرات جانبی این داروها به ویژه کلیستین محدود است و همچنین مواردی از مقاومت به این داروها گزارش شده است (۱۰و۹). کاربا‌پنم‌ها از گروه‌های آنتی‌بیوتیکی مؤثر در درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله پسودوموناس آئروژینوزا تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBL)[2] است(۱۱). در سال‌های اخیر چندین مورد شیوع عفونت بیمارستانی ناشی از سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتاماز(MBL) [3] مثبت

1-Pulse Field gel Electrophoresis
2-Extended Spectrum Betalactamase
3-Metalobeta lactamase

Archive of SID

www.SID.ir

از سراسر جهان گزارش شده است. مقاومت به کاربا‌پنم‌ها در نتیجه ژن‌های مقاومت قرارگرفته بر روی اینتگرون کلاس یک است (۱۲و۱۳). راجپوت و همکاران سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتاماز مقاوم به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در بیمارستان را در بیماران سوختگی گزارش نموده‌اند(۱٤). در مطالعه‌ای صادری و همکاران موارد پسودوموناس آئروژینوزا MBL مثبت را در بیماران سوختگی شهر تهران شناسایی کرده‌اند(۱۵).

با وجود این در ایران مطالعات محدودی بر روی بیماران سوختگی و عفونت‌های ناشی از پسودوموناس آئروژینوزا در بیماران سوختگی و عفونت ناشی از این ارگانیسم تولیدکننده MBL به منظور مطالعه ملکولار اپیدمیولوژی و حساسیت آنتی‌بیوتیکی گزارش شده است. هدف از این مطالعه بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و هم‌چنین الگوی PFGE سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا جداشده از بیماران سوختگی بود.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی که در طی اردیبهشت ۱۳۸۸ تا فروردین ۱۳۸۹ انجام شد، نمونه‌های سواب از زخم بیماران دچار سوختگی بستری در بیمارستان سوختگی قطب‌الدین شیراز گرفته شدند و وارد محیط انتقالی تریپتیک سوی براث گشتند. برای هر یک از افراد پرسشنامه تنظیم و کد گذاری گردید. نمونه‌گیری از افراد پس از مشخص نمودن هدف مطالعه برای آن‌ها و کسب رضایت کتبی آگاهانه از هر یک از افراد تحت مطالعه صورت گرفت. اطلاعات مربوط به جنس، سن، مدت بستری در بیمارستان، علت سوختگی، درجه سوختگی در فرم‌های کدگذاری شده وارد گردید. در آزمایشگاه میکروب‌شناسی سواب‌های جمع‌آوری شده از بیماران سوختگی بر روی محیط‌های بلاد آگار، شکلات آگار و مک‌کانکی آگار (ساخت شرکت oxoid) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱٦ تا ۱۸ ساعت انکوبه گردیدند. سپس از کلونی‌های مشکوک کشت مجدد انجام و کلونی خالص از ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا به دست آورده شد. ایزوله‌های خالص به منظور داشتن کلونی‌های تازه و جوان بر روی محیط نوترینت آگار مجددا کشت داده شدند. سپس با استفاده از تست‌های میکروبیولوژی شامل خصوصیات مورفولوژیک و نیز تست‌های بیوشیمیایی شامل؛ اکسیداز، کاتالاز، توانایی تولید پیگمان پیوسیانین، بو، سیترات، محیط آگار آهن سه قندی مورد تایید نهایی قرار گرفتند. ایزوله‌ها تا زمان انجام آزمایش‌ها در محیط تریپتیک سوی براث(TSB) براث حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. شناسایی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا MBL مثبت با استفاده از روش‌های فنوتیپی شامل استفاده از نوارهای MBLE-test (AB Biodisk, Sweden) به منظور شناسایی سویه‌های تولید کننده کلاس B بتالاکتاماز استفاده شد. آنالیز

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج بر اساس روش‌کار تعریف شده به وسیله شرکت سازنده در تفسیر نتایج انجام شد.

الگوی حساسیت ایزوله‌های سودوموناس آئروژنیوزا نسبت به ۱۱ آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش نواری E-test و بر اساس راهنمای ارایه شده به وسیله موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی بررسی شد(۱۶). آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده و حداقل غلظت مهارکنندگی و (MIC)[1] مقاومت آنها شامل؛ ایمی‌پنم (IMI، بیشتر یا مساوی ۱۶)، مروپنم (MEM، بیشتر یا مساوی ۱۶)، سفپیم (CPM، بیشتر یا مساوی ۳۲)، سفتازیدیم (CAZ، بیشتر یا مساوی ۳۲)، پیپراسیلین/تازوباکتام (PTZ، بیشتر یا مساوی ۱۲۸)، سیپروفلوکساسین (CIP، بیشتر یا مساوی ٤)، توبرامایسین (TN، بیشتر یا مساوی ۱۶)، آمیکاسین (AK، بیشتر یا مساوی ٦٤)، جنتامایسین (GM، بیشتر یا مساوی ۱۶)، آمپی‌سیلین (AP، بیشتر یا مساوی ۳۲) و آزترونام (ATM، بیشتر یا مساوی ۳۲) بودند.

در این مطالعه از پسودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به عنوان سویه کنترل جهت تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی استفاده شد. جهت انجام آنتی‌بیوگرام کشت بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام و نوارهای E-test بر روی محیط قرار داده شد و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت صورت پذیرفت.

به منظور بررسی الگوی ژنوتیپی ایزوله‌های سودوموناس ائروژینوزا با روش پالس فیلد ژل الکتروفورز ابتدا سویه‌های مورد نظر بر روی محیط تریپتیک سوی آگار (TSA) کشت داده شده و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس با استفاده از بافر CSB کدورت در طول موج ۶۰۰ نانومتر برابر ۱/۷ تنظیم شد. با استفاده از بافر TE 5X از غلظت ۱ درصد آگارز Agarose NA (Fermentase Co, USA) در تهیه پلاگ استفاده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول لیز ۱ به هر یک از میکروتیوب‌های حاوی پلاگ اضافه و میکروتیوب‌ها به مدت ٦ـ۲ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس شستشو با بافر TE 1X انجام و محلول لیز ۲ به هر میکروتیوب اضافه کرده و میکروتیوب‌ها به مدت ۲۰ـ۱۶ ساعت در بن ماری ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. آنگاه شستشوی سریع پلاگ با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر TE 5X و سپس بافر TE 1X انجام شد.

جهت هضم آنزیمی هر پلاگ به مدت ٦۰ـ۳۰ دقیقه در ۳۰۰ میکرولیتر Enzyme Buffer 1X (Fermentase Co, USA) در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از خالی کردن بافر H 1X از میکروتیوب‌ها، ۳۰۰ میکرولیتر H 1X باقی مانده به میکروتیوب‌ها اضافه شد و ۵ میکرولیتر(۱۰ یونیت بر میکرو لیتر) آنزیم *XbaI* نیز اضافه گردید و میکروتیوب‌های حاوی پلاگ به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس پلاگ‌ها در ژل آگارز معمولی Molecular Grade ، ۱ درصد مورد استفاده معمول جهت

1-Minimum Inhibitory Concentration

Archive of SID

www.SID.ir

الکتروفورز قرار داده شد و بر اساس برنامه زیر در دستگاه PFGE الکتروفورز گردید.

برنامه PFGE با استفاده ار دستگاه پالس فیلد ژل الکتروفورز آمرشام بر اساس این پروتکل صورت پذیرفت؛ زمان تبدیل اولیه ۵ ثانیه، زمان تبدیل ثانویه ۲۰ ثانیه، زمان تبدیل نهایی ٤٠ ثانیه، زمان کل برنامه پالس فیلد ۳۳ ساعت، ولتاژ برابر 6V، برابر ۱۲۰ درجه و دمای ٦ درجه سانتی‌گراد. در هر سری آزمایش PFGE از ۱۰۰۰bp فاژ لامبدا به عنوان مارکر ملکولی استفاده شد. جهت آنالیز باندهای حاصله و ارایه پالسوتایپ‌ها از نرم افزار PhotoCapt (Vilber Loumart, Marnesla Valle, France) جهت تعریف وزن‌های ملکولی پروفایل‌های حاصله استفاده شد. باندها بر اساس مارکر DNA تعریف شد و تصویر ژل هر نمونه بر اساس باندها ثبت گردید. در صورت وجود باند به عنوان هدف ۱ و در صورت عدم وجود باند به عنوان عدد صفر ثبت می‌گردید. سپس اطلاعات به محاسبه ضریب Pair-wis Similarity با استفاده از روش Jaccard انجام شد. به منظور رسم دندروگرام نمونه‌ها از نرم‌افزار Unweighted pair-group Method (UPGMA) استفاده شد. جهت محاسبه ارتباط‌های متغیرها از یک ماتریکس داده‌های استاندارد استفاده شد. در نهایت از نرم‌افزار افزار NTSYSpc نسخه 2.02i (Exeter Software, New York) جهت آنالیز عددی مورد استفاده قرار گرفت.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آمار توصیفی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

از بیماران دچار سوختگی بستری در بیمارستان قطب‌الدین شیراز ۲۷۰ سویه پسودوموناس آئروژینوزا جدا شدند. در بین ایزوله‌های مورد بررسی ٦٠ ایزوله(۲۲/۲ درصد) آنزیم متالوبتالاکتاماز را تولید می‌نمودند. این ایزوله‌های MBL مثبت از ۲۹ مرد و ۳۱ زن جدا شده بودند. در بین بیماران طیف سنی ۲۱ تا ۳۰ سال این سویه‌ها شایع‌تر (٤٠ مورد، ۳۹ درصد) بودند و پس از آن گروه سنی ۳۱ تا ٤٠ سال (١٤ بیمار، ۲۳ درصد) قرار داشتند. اغلب بیماران (٥٣ بیمار، ٨٨/٤ درصد) دچار سوختگی درجه ۳ شده بودند که این نوع سوختگی شایع‌ترین نوع سوختگی است. میزان سوختگی‌های تصادفی در بیماران مرد بالاتر بود درحالی که سوختگی‌هایی که به دنبال خودکشی اتفاق افتاده بود در زنان شایع‌تر بودند.

به طور کلی ٦٠ (۲۲/۲ درصد) سویه پسودوموناس آئروژینوزا جداشده از بیماران سوختگی MBL مثبت بودند. ۱۰ الگوی مقاومت در میان سوش‌ها تشخیص داده شد. همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود تمام ایزوله‌ها به ۳ یا تعداد بیشتری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند و به عنوان سوش‌های با مقاومت چند دارویی(MDR) [1] شناخته شدند. بیشترین الگوی فنوتیپی که در میان نمونه‌ها دیده شد مقاومت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی بود که در میان ۳۹ نمونه تکرار شد. در این

1-Multidrug Resistance

www.SID.ir

Archive of SID

میان ارگانیسم‌های دارای مقاومت چند گانه دارویی کاملاً به آنتی‌بیوتیک‌های؛ ایمی‌پنم، مروپنم، پیپراسیلین/تازوباکتام، آمپی‌سیلین و آزترونام مقاوم بودند. حدود ۱/۷ درصد سویه‌ها به سفپیم، جنتامایسین، توبرامایسین و سیپروفلوکساسین حساس بودند و ٦/٧ درصد آنها به آمیکاسین و ۲۳/٤ درصد ایزوله‌ها به سفتازیدیم حساس بودند.

آنالیز پالسوتایپ‌های حاصله در روش PFGE نشان داد که ایزوله‌های دارای باندهای ١٦-١٠ باند شایع‌ترین بودند و ٤٨/٣ درصد سویه‌های دارای باندهای ١٤-١٣ را به خود اختصاص می‌دادند. وزن ملکولی باندها بین ٤٠ تا ٤٦٠ کیلو جفت باز متغیر بود. با استفاده از تجزیه و تحلیل تعداد و اندازه باندها شباهت بالا(۸۰ تا ۸۵ درصد) در اغلب ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کاربپنم‌ها مشاهده گردید(تصویر ۱). این هم‌خوانی ژنتیکی نشان دهنده آن است که احتمالاً این سویه‌ها از یک منبع می‌باشند و بین بیماران مختلف در بخش سوختگی منتقل می‌گردند.

بحث

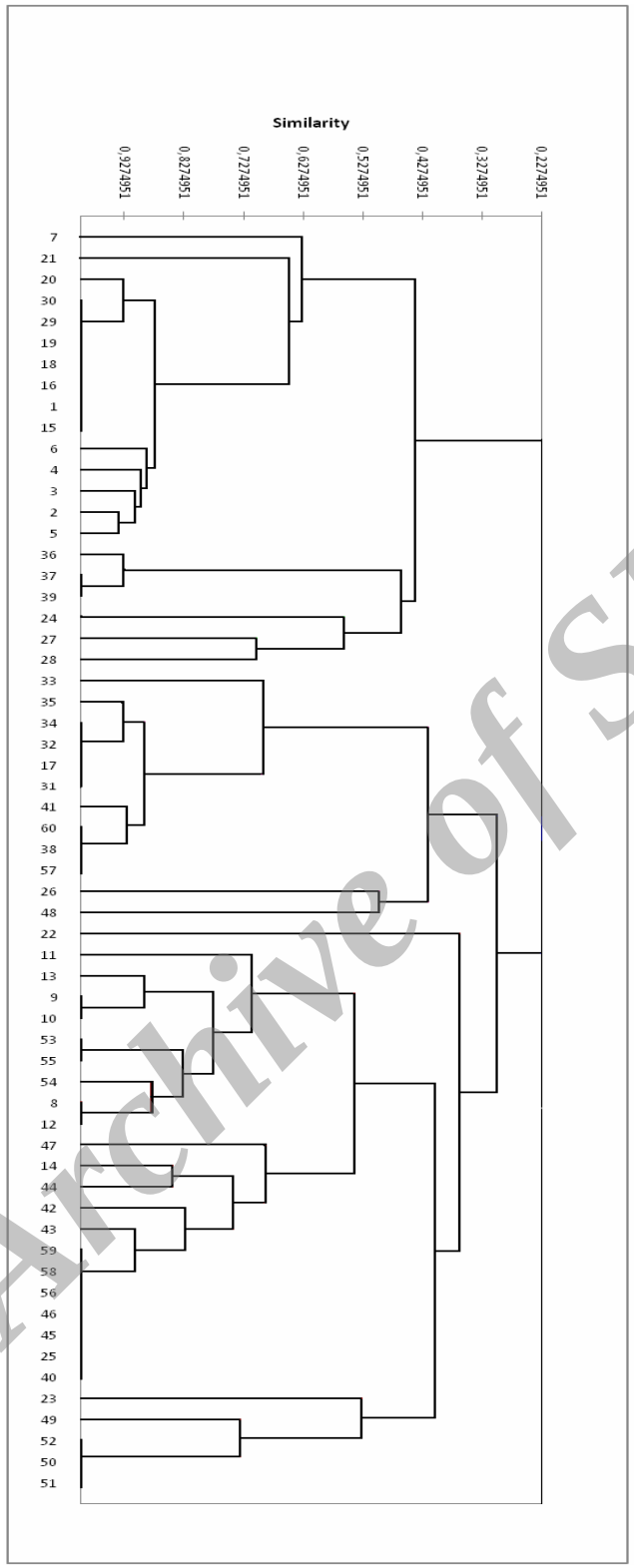
افزایش شیوع عفونت‌های ناشی از پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو با مرگ و میر و اختلالات و عوارض قابل توجهی همراه است، زیرا درمان جایگزین برای این قبیل عفونت‌ها وجود ندارد(۸). هدف از این مطالعه بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و همچنین الگوی PFGE سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا جداشده از بیماران سوختگی بود.

جدول ۱: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتاماز جدا شده از بیماران سوختگی

ردیف	الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی	فراوانی
۱	ایمی پنم، مروپنم، سفتازیدیم، آزترونام، توبرامایسین، جنتامایسین، پیپراسیلین/تازوباکتام، سفپیم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، آمپی سیلین.	۳۹
۲	ایمی پنم، مروپنم، آزترونام، توبرامایسین، جنتامایسین، پیپراسیلین/تازوباکتام، سفپیم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، آمپی سیلین.	۸
۳	ایمی پنم، مروپنم، آزترونام، توبرامایسین، جنتامایسین، پیپراسیلین/تازوباکتام، سفپیم، آمیکاسین، آمپی سیلین.	٦
٤	ایمی پنم، مروپنم، سفتازیدیم، آزترونام، توبرامایسین، پیپراسیلین/تازوباکتام، سفپیم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، آمپی سیلین.	۱
٥	مروپنم، سفتازیدیم، آزترونام، توبرامایسین، جنتامایسین، پیپراسیلین/تازوباکتام، سفپیم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین	۱
٦	ایمی پنم، مروپنم، سفتازیدیم، آزترونام، پیپراسیلین/تازوباکتام، سفپیم، آمپی سیلین.	۱
۷	ایمی پنم، مروپنم، سفتازیدیم، آزترونام، پیپراسیلین/تازوباکتام، سفپیم، آمیکاسین، آمپی سیلین.	۱
۸	ایمی پنم، سفتازیدیم، آزترونام، توبرامایسین، جنتامایسین، سفپیم، آمیکاسین، آمپی سیلین.	۱
۹	ایمی پنم، مروپنم، آمیکاسین، آمپی سیلین.	۱
۱۰	ایمی پنم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، آمپی سیلین.	۱

Archive of SID

www.SID.ir



تصویر ۱. پالسوتایپ‌های حاصل از انجام PFGE بر روی ۶۰ سویه پسودوموناس آئروژینوزا تولیدکننده متالوبتالاکتاماز و مشابهت ژنتیکی بین ایزوله‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

ریشه‌کنی باکتری پسودوموناس آئروژینوزا به دلیل دارا بودن مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا و مقاومت به ضدعفونی‌کننده‌های متداول مشکل است. شناسایی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا تولید کننده آنزیم متالوبتالاکتاماز بسیار مهم است، زیرا در درمان صحیح بیماران سوختگی و کنترل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌ها اهمیت دارد. گزارش‌های متعدد در خصوص سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا MBL مثبت گزارش شده‌اند(۲۴ـ۱۷). سویه‌های تولید کننده این آنزیم‌ها سبب عفونت‌های بیمارستانی طولانی مدت و شدیدی هستند (۲۵). ایزوله‌هایMBL مثبت در بخش‌های بیمارستان یک چالش درمانی و نیز موضوعی مهم در کنترل عفونت‌ها است. بر طبق مطالعه حاضر اغلب بیماران بالغین جوان بودند که سوختگی‌های تصادفی اغلب در مردان و سوختگی‌های ناشی از خودکشی در زنان شایع‌تر بودند که این نتایج با مطالعات دیگر تطابق دارد(۲۶). فراوانی بالای سوختگی‌ها در بالغین جوان از سراسر جهان و نیز ایران گزارش شده است(۳۱ـ۲۷). در مطالعه حاضر ۲۲/۲ درصد ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا توانایی تولید متالوبتالاکتاماز را داشتند در صورتی که در مطالعه کومار و همکاران ۳۲ درصد سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا MBL مثبت گزارش شده‌اند(۳۲). که این میزان تفاوت می‌تواند با میزان بالاتر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های شایع در بیمارستان‌های مختلف کشور هند مرتبط باشد. فراوانی بالای سوختگی‌ها در بین مردان جوان می‌تواند در نتیجه عدم رعایت نکات ایمنی در حین انجام کار بوده است. افزایش شیوع خودکشی‌ها به ویژه در بین زنان جوان در نواحی روستایی عمدتاً در نتیجه بحث‌های خانوادگی رخ می‌دهد(۳۳).

شباهت بالا (۸۰ تا ۸۵ درصد) در اغلب ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کاربا‌پنم‌ها قابل توجه بود. به نظر می‌رسد ایزوله‌های با بیش از ۸۰ درصد شباهت را می‌توان به عنوان سویه‌های مرتبط طبقه‌بندی کرد(۳۴). مقایسه کلاس‌تر ژنی ۶۰ ایزوله میزان بالایی از شباهت را در پالسوتایپ‌های PFGE نشان داد. مشابهت بالای ژنتیکی در اغلب ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کاربا‌پنم‌ها نشان دهنده آن است که احتمالاً این سویه‌ها از یک منبع می‌باشند و بین بیماران مختلف در بخش سوختگی منتقل می‌گردند. این نتایج بیانگر آن است که تیپ‌های محدودی از ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا با عفونت‌ها در مراکز سوختگی مرتبط است و اعمال روش‌های مراقبتی ویژه به منظور جلوگیری از گسترش این سویه‌ها در بین بیماران، بین بخش‌های مختلف بیمارستانی و نیز بین کادر پزشکی بیمارستان و بیماران حیاتی است. ارتباط ژنتیکی بین اغلب سویه‌ها که بیش از ۸۰ درصد شباهت دارند نشان‌دهنده آن است که از کلون‌های بسیار نزدیک هستند اگر چه برخی از ایزوله‌ها به

Archive of SID

www.SID.ir

گروه‌های ژنتیکی مختلفی تعلق دارند. ایزوله‌ها ممکن است دچار تغییرات ژنتیکی شامل موتاسیون‌های نقطه‌ای، حذف یا اضافه شدن در DNA کروموزومی می‌باشند. ۲۶/۶ درصد نمونه‌ها دارای ۱۳ باند بودند و ۶/۶ درصد ایزوله‌ها دارای ۱۶ باند بودند. وجود شباهت بین الگوهای باندهای PFGE ایزوله‌های مختلف می‌تواند به شناسایی جایگاه ژن‌های شایع غالب سویه‌های پاتوژنیک کمک کند(۶).

یکی از نگرانی‌های جامعه پزشکی افزایش ارگانیسم‌های MDR و مشکلات عدیده‌ای که در کشورهای در حال توسعه به وجود آمده است فرد آلوده با میکروارگانیسم‌های MDR بیشتر احتیاج به مراقبت و بستری شدن دارد چون خطر مرگ در این بیماران افزایش بیشتری دارد، و هم‌چنین درمان بیماران مبتلا به این دسته از ارگانیسم‌ها احتیاج به داروهای گران‌تر دارد(۳۵). در این تحقیق شیوع بالای MDR در میان ایزوله‌ها دیده شد و تمام سویه‌های مورد مطالعه به ۳ آنتی‌بیوتیک یا بیشتر مقاوم بودند. افزایش درصد مقاومت چند دارویی سویه‌های پسودوموناس در بیمارستان‌های ایران قبلاً نیز گزارش شده است(۳۸-۳۶).

کارباپنم‌ها مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده علیه پسودوموناس آئروژینوزا هستند. در مطالعات قبلی نشان داده شد زخم‌های سوختگی عفونی شده با پسودوموناس آئروژینوزا به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های تجویز شونده در بخش سوختگی‌ها می‌توانند مقاوم باشند(۱۱). تجویز دوزهای بالاتری از آنتی‌بیوتیک‌ها در افرادی که دچار سوختگی شده‌اند می‌تواند سبب تسهیل تغییرات ژنتیکی در برخی سویه‌ها شود و این فشار آنتی‌بیوتیکی مداوم می‌تواند سبب ظهور ایزوله‌های با مقاومت وسیع‌الطیف به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیک گردد. در بخش‌های سوختگی آلودگی متقاطع به ارگانیسم‌های مقاوم به روش‌های مختلف رخ می‌دهد. در مجموع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی نسبت به مطالعه‌های دیگر که در داخل و خارج کشور انجام گرفته بیشتر است(۳۹ و ۴۰).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصله هیچ یک از آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی برای درمان بیماران آلوده به پسودوموناس آئروژینوزا MBL مثبت مناسب نیستند. با توجه به این که آنتی‌بیوتیک کلیستین هم غشاء سلولی و هم LPS باکتری را مورد هدف قرار می‌دهد شاید بتوان از آن به عنوان درمان جایگزین استفاده کرد. می‌باید قبل از تجویز حساسیت ایزوله‌ها در محیط آزمایشگاه این آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گیرد. درمان‌های ترکیبی نیز ممکن است مفید باشند. بر اساس نتایج حاصله از PFGE برخی از ایزوله‌های مقاوم به چند دارو می‌توانند زخم‌های سوختگی را آلوده نمایند. آلودگی متقاطع و

Archive of SID

www.SID.ir

کلونیزاسیون زخم‌ها با سویه‌های مقاوم می‌تواند با افزایش میزان مصرف آنتی‌بیوتیک به ویژه نسل جدید در مراکز سوختگی باعث افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیک می‌گردد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با پشتیبانی مالی مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به انجام رسید.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES:

1.Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. Biosynthesis of the *pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, pel, and psl. Front Microbiol 2011; 2:167.
2.Coetzee E, Rode H, Kahn D. *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infection in a dedicated paediatric burns unit. South African Journal of Surgery 2013; 51(2):50-3.
3.Rao SD, Kumar EA. Antimicrobial resistance and metallo β lactamase in gram-negative isolates of hospital-acquired burn wound infections. J NTR Univ Health Sci 2013; 2:181-5.
4.Japoni A, Farshad S, Alborzi A, Kalani M, Mohamadzadegan R. Comparison of arbitrarily primed-polymerase chain reaction and plasmid profiles typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from burn patients and hospital environment. Saudi Med J 2007; 28(6): 899-903.
5.Matsumoto CK, Chimara E, Bombarda S, Duarte RS, Leão SC. Diversity of pulsed-field gel electrophoresis patterns of Mycobacterium abscessus type 2 clinical isolates. J Clin Microbiol 2011; 49(1): 62-8.
6.Anvarinejad M, Farshad SH, Ranjbar R, Giammanco GM, Alborzi A, Japoni J. Genotypic Analysis of *E. coli* Strains Isolated from the Patients with Cystitis and Pyelonephritis. Iran Red Crescent Med J 2012; 14(7): 408-16.
7.Snyder LA, Loman NJ, Faraj LA, Levi K, Weinstock G, Boswell TC, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a six-year-long hospital outbreak using high-throughput whole genome sequencing. Euro Surveill 2013; 18(42):20611.
8. Morelli P, Ferrario A, Tordato F, Piazzo A, Casari E. Successful treatment of post-neurosurgical multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* meningo-encephalitis with combination therapy of colistin, rifampicin and doripenem. J Antimicrob Chemother 2014; 69(3):857-9.
9.Lewis JR, Lewis SA. Colistin interactions with the mammalian urothelium. Am J Physiol Cell Physiol 2004; 286(4): 913-22.
10.Gómez-Garcés JL, Aracil B, Gil Y, Burillo A. Susceptibility of 228 non-fermenting gram-negative rods to tigecycline and six other antimicrobial drugs. J Chemother 2009; 21(3): 267-71.
11.Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad S. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. Burns 2006; 32 (3):343-7.
12.Bosnjak Z, Bedenić B, Mazzariol A, Jarza-Davila N, Suto S, Kalenić S. VIM-2 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Zagreb, Croatia. Scand J Infect Dis 2010; 42(3):193-7.
13.Hocquet D, Plésiat P, Dehecq B, Mariotte P, Talon D, Bertrand X, et al. Nationwide investigation of extended-spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54 (8):3512-5.
14.Rajput A, Saxena R, Singh KP, Kumar V, Singh S, Gupta A, et al. Prevalence and antibiotic resistance pattern of metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa from burn patients-experience of an Indian tertiary care hospital. J Burn Care Res 2010; 31(2): 264-8.
15.Saderi H, Lotfalipour H, Owlia P, Salimi H. Detection of Metallo-β-Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burn Patients in Tehran, Iran. LabMedicin 2010; 41,609-12.
16. Clinical and laboratory standard institute (2006). Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. M100_S16. Wayne, PA: CLSI.
17.Ejrnaes K, Sandvang D, Lundgren B, Ferry S, Holm S, Monsen T, et al. Pulsed field gel electrophoresis typing of Escherichia coli strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. J Clin Microbiol 2006; 44(5):1776-81.
18.Toleman MA, Rolston K, Jones RN. Walsh TR. BlaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo-β-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2004; 48 (1): 329-32.
19.Mendes RE, Castanheira M, Garcia P, Guzman M, Toleman MA, Walsh TR, et al. First isolation of bla (VIM-2) in latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48 (12):1433-4.
20.Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J Antimicrob Chemother 2003; 52 (1): 116-9.

Archive of SID

www.SID.ir

21.Walsh K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance Group VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. in Korean hospitals. Emerg Infect Dis 2003; 9: 868-71.
22.Cardoso O, Leitão R, Figueiredo A, Sousa JC, Duarte A, Peixe LV. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa* from portugal. Microb Drug Resist 2002; 8 (2): 93-7.
23.Patzer J, Toleman MA, Deshpande LM, Kamińska W, Dzierzanowska D, Bennett PM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual blaVIM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001). J Antimicrob Chemother 2004; 53(3): 451-6.
24.Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, Vlahaki A, Miriagou V, Kontou S, et al. VIM-1 Metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. J Clin Microbiol 2003; 41(8):3893-6.
25.Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-{beta}-lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. J Antimicrob Chemother 2005; 56(6):1148-51.
26.Lari AR, Alaghehbandan R, Panjeshahin MR, Joghataei MT. Suicidal behavior by burns in the province of Fars, Iran. Crisis 2009; 30(2):98-101.
27.Holmes WJ, Hold P, James MI. The increasing trend in alcohol-related burns: it's impact on a tertiary burn centre. Burns 2010; 36(6): 938-43.
28.Theodorou P, Spanholtz TA, Amini P, Maurer CA, Phan TQ, Perbix W, et al. Cologne burn centre experience with assault burn injuries. Burns 2009; 35 (8):1152-7.
29.Onarheim H, Jensen SA, Rosenberg BE, Guttormsen AB. The epidemiology of patients with burn injuries admitted to Norwegian hospitals in 2007. Burns 2009; 35 (8):1142-1146.
30.Ekrami A, Hemadi A, Latifi M, Kalantar E. Epidemiology of hospitalized burn patients in Taleghani Hospital during 2003-2007. Bratisl Lek Listy 2010; 111(7): 348-84.
31.Sadeghi-Bazargani H, Mohammadi R, Svanstrom L, Ekman R, Arshi S, Hekmat S, et al. Epidemiology of minor and moderate burns in rural Ardabil, Iran. Burns 2010; 36(6): 933-7.
32.Kumar SH, De AS, Baveja SM, Gore MA. Prevalence and risk factors of Metallo β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and Acinetobacter species in burns and surgical wards in a tertiary care hospital. J Lab Physicians 2012; 4(1): 39-42.
33.Alaghehbandan R, Lari AR, Joghataei MT, Islami A, Motavalian A. A prospective population-based study of suicidal behavior by burns in the province of Ilam, Iran. Burns 2011; 37(1): 164-9.
34.Valdezate S, Vindel A, Martín-Dávila P, Del Saz BS, Baquero F, Cantón R. High genetic diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* strains despite their originating at a single hospital. J Clin Microbiol 2004; 42(2): 693-9.
35.Farshad SH, Ranjbar R, Anvarinejad M, Amin Shahidi M, Hosseini M. Emergence of multi drug resistant of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection. The Open Conference Proceeding Journal 2010; 1: 192-6.
36.Bojary Nasrabadi MR, Hajia M. Multidrug resistant *pseudomonas aeruginosa* strains in Tehran reference burn hospital, Tehran, Iran. Afr J Microbiol Res 2012; 6(7): 1393-6.
37.Salimi H, Yakhchali B, Owlia P, Lari RA. Molecular epidemiology and drug susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. Labmedicine 2010; 41: 540-4.
38.Mardaneh J, Ahmadi K, Jahan Sepas A. Determination antimicrobial resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in Taleghani Hospital (Ahvaz, Iran) from 2011-2012. JFUMS 2013; 3(3):188-93.
39.Anil C, Mohammad Shahid R. Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates at a Tertiary Care Hospital In Kathmandu, Nepal. Asian J Pharm Clin Res 2013; 6(3): 235-8.
40. Anvarinejad M, Japoni A, Rafaatpour N, Mardaneh J, Abbasi P, Amin Shahidi M, et al. Burn Patients Infected With Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*: Multidrug-Resistant Strains. Arch Trauma Res 2014; 3(2):e18182.

Archive of SID

www.SID.ir

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Antimicrobial Susceptibility Patterns and Molecular Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Patients

Anvarinejad M, Japoni A, Rafaatpour N, Alipour E, Abbasi P, Shahidi MA, Mardaneh J*

Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Nemazee Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Received:1 Feb 2014 Accepted: 13 April 2014

Abstract

Background & aim: Because of emerging multi-drug resistance (MDR) *Pseudomonas aeruginosa strains,* treatment of burn patients infected by this bacterium is difficult. The aim of this study was to detect antimicrobial profile and molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase (MBL) producer strains.

Methods: In this cross-sectional investigation 270 *Pseudomonas aeruginosa* isolates were collected from the burn patients. Carbapenem sresistance strains were detected by phenotypic E-test method. Susceptibility profiles of metallo-β-lactamase (MβL) enzyme producing isolates of this bacterium to 11 antimicrobial drug were determined by disc diffusion method according Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. The genetic correlations between isolates were determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) method.

Results: Among 270 *P. aeruginosa* isolates, 60 (22.2%) strains showed resistant to meropenem (MEM) and imipenem (IMI) and were considered as metallo-β-lactamase positive. All metallo-β-lactamase positive isolates were resistant to five tested antimcrobial while their sensitivities to the three best effective antibiotics including ciprofloxacin, amikacin and ceftazidime were 1.7%, 6.7 % and 23.3%, respectively. Majority of the isolates (71.6%) showed more than 80% similarity based on the drawn dendrogram.

Conclusion: Our results showed, the tested antimicrobials are not safe to prescribe for burn patients. According PFGE pulsotypes, a limited number of *P.aeruginosa* types are common in the hospital burn unit which infect the patients hospitalized in this ward.

Keywords: Burn Patients, Drug Resistance, Nosocomial Infections, *Pseudomonas aeruginosa*, metallo-β-lactamase (MBL) Enzyme, Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).

***Corresponding Author: Mardaneh J,** Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Nemazee Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
Email: Jalalmardaneh@yahoo.com.

Please cite this article as follows:
Anvarinejad M, Japoni A, Rafaatpour N, Alipour E, Abbasi P1, Shahidi MA, Mardaneh J. Antimicrobial susceptibility patterns and molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Burn patients. Armaghane-danesh 2014; 19(8): 694-706.

Archive of SID