Archive of SID

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 59, No. 3 P: 139-147
Jul-Aug 2016

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۵۹، شماره ۳
مرداد- شهریور ۹۵، صفحه ۱۳۹-۱۴۷

مقاله اصلی

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: ۹۵/٤/۱۹

[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

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 حاضر۵۱ 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 بتالاک تاماز blaIMP و blaVIM در سویه های فوق با روشPCR 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٪، ایمی 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.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مقاومت ضد میکروبی که اغلب به عنوان مقاومت دارویی شناخته می‌شود، هنگامی اتفاق می‌افتد که میکروارگانیسم هایی 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 باکتری های پاتوژن انسانی می باشند که عفونت های اکتسابی بیمارستانی را ایجاد کرده و حامل مقاومت چندگانه دارویی هستند (۲،۱). سودوموناس آئروژینوزا باکتری بیماری زا و فرصت طلبی است که عاملی عمده در بروز مرگ و میر بیماران با ضعف سیستم ایمنی محسوب می شود. مقاومت ذاتی به مواد ضد میکروبی در این باکتری سبب وخیم تر شدن وضعیت درمان عفونت های ناشی از آن می گردد (۳). لیپوپلی ساکارید ، پیلی و تاژک قطبی در این پاتوژن فرصت طلب سبب چسبیدن باکتری به غشای سلولی شده و نقش مهمی را در بیماری زایی این باکتری ایفا می کند. بتالاکتام ها داروهای مناسبی جهت درمان سودوموناس آئروژینوزا محسوب می شود اما پس از مدتی برخی از باکتری ها با تولید آنزیم های بتالاکتاماز به این آنتی بیوتیک مقاومت نشان می دهند(۴). عفونت های بیمارستانی یکی از معضلات مطرح پزشکی در کشورهای توسعه یافته و نیز در حال توسعه می باشد که موجب اشاعه بیماریهای عفونی در جامعه می گردد (۵). در سال های اخیر توجه به عفونت های بیمارستانی از اهمیت زیادی برخوردار شده است، زیرا فقط در سال ۱۹۹۵ هشتاد و هشت هزار مورد مرگ در اثر عفونت های بیمارستانی در دنیا گزارش شده است (۶). سودوموناس آئروژینوزا از شایع ترین عوامل عفونت بیمارستانی به ویژه در زخم های سوختگی است. عفونت با این باکتری می تواند سپتی سمی، پنومونی، منتژیت و بیماری های کشنده دیگری را نیز به دنبال داشته باشد (۷). سودوموناس دارای مقاومتی ذاتی نسبت به طیف وسیعی از مواد ضد میکروبی و ضد عفونی کننده، مانند ترکیبات آمونیوم، هگزاکلروفن، صابون ها و محلول های ید دار می باشد(۹،۸). سودوموناس آئروژینوزا از پاتوژن های فرصت طلب گرم منفی، غیر تخمیرکننده، اکسیداز مثبت و دارای شیوع بالا در عفونت های بیماران بستری با زخم های عفونی است. اغلب سویه های مقاوم به چندین آنتی بیوتیک، قادر به تولید طیف وسیعی از آنزیم های بتالاکتامازی هستند (۱۰). بروز مقاومت در باکتری های حامل این ژن ها از چند طریق ایجاد می گردد :۱- پمپ افلوکس، ۲- تولید آنزیم های بتالاکتامازی۳-تغییر در غشای خارجیکرباپنمازهای گروه B(متالوبتالاکتاماز ها) شامل آنزیم هایVIM (متالو بتا لاکتاماز اینتگرونی ورونا) وIMP (موثر بر ایمی پنم) هستند. نخستین عضو از آنزیم های این کلاس IMP-۱ بود که در سال ۱۹۹۱ در ژاپن گزارش شد. و پس از آن در نقاط مختلف جهان گزارش شدندیکی از عوامل اصلی پیدایش مقاومت توانایی باکتری در تولید آنزیم هایی است که داروها را غیر فعال می کنند . از جمله این آنزیم ها می توان بتا لاکتاماز که توسط بسیاری از باکتری های هوازی وبی هوازی تولید می شود را نام برد. متالو بتا لاکتاماز ها آنزیم هایی هستند که برای فعالیت به کوفاکتوری مانند روی نیاز دارند ونه تنها کاربابنم هارا بلکه می توانند همه آنتی بیوتیک های بتالاکتام ها را هیدرولیزکنند (۱۱). معرفی کاربابنم ها (همچون ایمی پنم و مروپنم) به سیستم های بهداشتی و درمانی باعث یک پیشرفت بزرگ و مهم در درمان عفونتهای شدید و جدی ناشی از باکتری های مقاوم به عوامل بتالاکتام گردید، البته سویه های مقاوم به کاربابنم ها بطور مکرر در کشورهای مختلف مشاهده شده اند بر پایه مطالعات مولکولی آنزیم های هیدرولیز کننده کاربابنم ها"متالو بتالاکتامازها۱ به طور موثری تمامی عوامل بتالاکتام بجز آزترونام را هیدرولیز می کنند. VIM، SPM،IMP از مهمترین متالوبتالاکتاماز ها از نظر کلینیکی هستند به وسیله ژن های bla-IMP، bla-VIM، bla-SPM کد می شوند. حداقل ۱۴ نوع vim و ۲۳ نوع imp متفاوت، تعیین هویت شده اند. از طرف دیگر متالو بتالاکتاماز ها به چند خانواده تقسیم می شوند که عباتند از: VIM، SPM، IMP،GIM، SIM،AIM، DIM. در میان خانواده انتروباکتریاسه دو ژن bla IMP و bla VIM به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته اند که این دو ژن به روش انتقال افقی واز طریق پلاسمید به سایر باکتری ها منتقل می شوند. ژنهای کد کننده متالو بتالاکتامازها بر روی اینتگرونها (integrons) قرار دارندکه در این مناطق ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی به صورت دستجات ژنی تجمع می یابند. بسیاری از سویه های سودوموناس آئروژینوزا قادرند چندین نوع از بتالاکتامازهای وسیع الط یف را تولید کنند، که آنها را قادر می سازد علیه آنتی بیوتیک های رایج مصرفی مقاوم باشند بتالاکتامازها توسط مهارکننده های بتالاکتام مانند - کلاولانیک اسید مهار می شوند (۱۲). هدف از این مطالعه، جداسازی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و شناسایی سویه های

[1] MBLs: Metallo-β-Lactamases

www.SID.ir

Archive of SID

واجد ژن کدکننده بتالاکتاماز blaIMP و blaVIM 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 الزهرا، شریعتی، 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 قرارگرفتند (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 شرکتMAST انگلستان، در محیط مولر هینتون آگار مورد بررسی قرار گرفت .برای تفسیر نتایج از جدول CLSI استفاده شد (۱۴). باکتری های جداشده با انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی با روش استاندارد شده ی انتشار دیسک در آگار [1] مورد بررسی قرار گرفتند. جهت انجام این روش، دیسک های مصرفی آنتی بیوتیکی عبارت بودند از : اریترومایسین (E) 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) نیتروفورانتوئین (NIF) آمیکاسین (AN) کربنی سیلین (CB) تازوسین (TA) پیپراسیلین (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 سواپ پنبه ای کاملا استریل باکتری ها را در ۴ جهت مختلف بر روی محیط مولر هینتون 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 [2] 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 دستورالعملNCCLS 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 درسه 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

[1] Agar Disk Diffusion

[2] Incubation

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده گردید . به این صورت که مقدار ۲۰۰ میکرولیتر ار 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 دقیق 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 blaIMP و blaVIM در سویه های سودوموناس آئروژینوزا ایزوله شده با استفاده از دما و پرایمرهای اختصاصی این ژن ها انجام گرفت .

از *سودوموناس آئرووژینوزا* PTCC 17589 و Acinetobacter baumanni KPC+ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محتویات هر میکروتیوب شامل µl۲ از DNAاستخراج شده و µl۱ از هر پرایمر به کیتPCR MASTER با حجم نهایی µl۲۵ 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 اسپکتروفوتومتر استفاده شد. آزمون PCR برای شناسایی ژن بتالاکتامازی با اندازه انجام شد.

پرایمرهای مورد استفاده برای انجام PCRعبارت بودند از : VIM-F (5′-GCATGGTCGCATATCGCAAC-3′) ،VIM-R (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

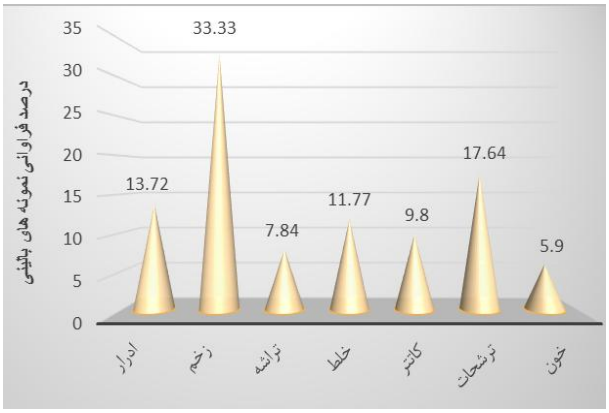
جدول ۱– فراوانی و درصد *سودوموناس آئروژینوزا* مورد مطالعه به تفکیک هر بیمارستان (الزهرا، شریعتی، امام موسی کاظم، غرضی و متفرقه) در شهر اصفهان

بیمارستان	باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*	
	تعداد	درصد
الزهرا	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 توجیه 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 نمونه‌های بالینی جداسازی شده از بیماران در بیمارستان‌ها و چندین آزمایشگاه خصوصی در شهر اصفهان

www.SID.ir

Archive of SID

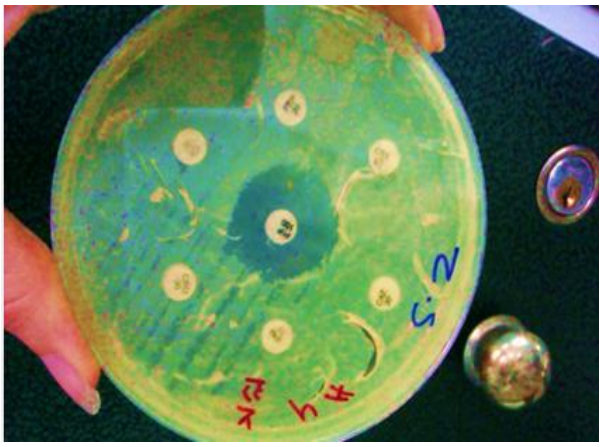
نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی در *سودوموناس آئروژینوزا*

تمامی سویه های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از عفونت های مختلف بیماران نسبت به آنتی بیوتیک های توبرامایسین، آمپی سیلین، جنتامایسین، ایمی پنم، سفتازیدیم، نیتروفورانتوئین، آمیکاسین، سفاتاکسیم، کاربنی سیلین، سیپروفلوکساسین، پیپراسیلین، سفالکسین، تازوسین مورد بررسی قرار گرفتند .بیشترین مقاومت نمونه های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین 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 پیپراسیلین 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*

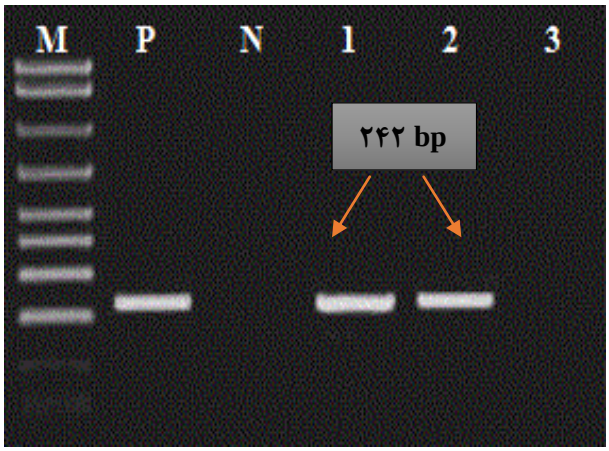
نوع آنتی بیوتیک	حساس	مقاوم	نیمه حساس
توبرامایسین (TOB)	۳۳/۳۳	۶۱	۵/۶۷
آمپی سیلین (AM)	۲۷/۴۵	۷۲/۵۵	–
جنتامایسین (GM)	۴۳/۱۴	۵۰	۶/۸۶
ایمی پنم (IPM[1])	۱۱/۷۶	۸۰	۸/۲۴
سیپروفلوکساسین (CP)	۳/۹۲	۹۶/۰۸	-
سفتازیدیم (SF)	۴۱/۱۸	۵۸/۸۲	–
نیتروفورانتوئین (NIF)	۲۱/۵۷	۷۸/۴۳	–
آمیکاسین (AN)	۳۰	۶۲/۷۵	۷/۲۵
سفاتاکسیم (CTX)	۳۹/۲۲	۶۰/۷۸	–
کاربنی سیلین (CB)	۷/۸۴	۹۲/۱۶	–
تازوسین (TA)	۴۷/۰۶	۵۱	۱/۹۴
پیپراسیلین (PIP)	۴۱	۴۹/۳۵	۹/۶۵
سفالکسین (CN)	۳۷/۲۵	60	۲/۷۵

یافته های حاصل از این پژوهش پس از سه بار تکرار برای هر کدام از نمونه ها ی 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 سیپروفلوکساسین 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 برروی رشد باکتری MDR

از بین ۵۱ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به چند دارو تعداد 32سویه (۶۳٪) از ۵۱ سویه مقاوم به دارو تولید کننده ژن بتالاکتاماز blaIMP و در هیچ یک از باندها حضور ژن blaVIM مشاهده نشد.

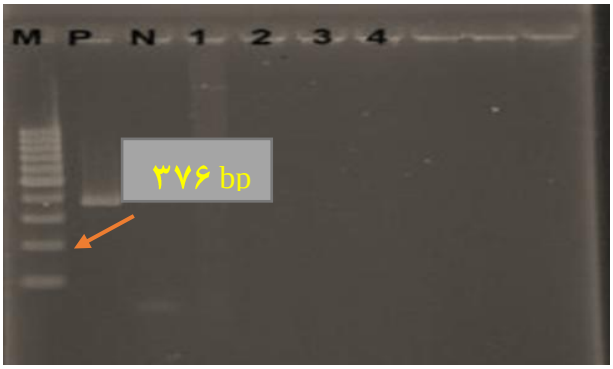


شکل ۲- یافته های PCR برای ژن bla IMP ; M مارکر، P: کنترل مثبت، N: کنترل منفی، ۱و 2سویه های حامل ژن ژن bla IMP در ۲۴۲ bp

[1] Imipenem

www.SID.ir

Archive of SID



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

بحث

در مطالعه ای که در کانادا انجام شد ۳۵ ٪ از ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای مولد mbl بودند و از این تعداد ۹۶٪ ژنVIM و ۴ ٪ژن IMP مشاهده شد (۱۶). به عنوان مثال، در مطالعه ای که در شهر تهران انجام شده است، شایع ترین ارگانیسم 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 ها ی 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 کاربانم 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).

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٪، سفتازیدیم۱۵٪ 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 بتا لاکتاماز 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 دادن 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 سفتازیدیم، 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 سفتازیدیم ۵۷/۵٪، آمیکاسین ۹۰٪، سیپروفلوکساسین ۶۵٪، جنتامایسین ۶۷/۵٪ و ایمیپنم 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 سفتازیدیم۴/۶ ٪ و نسبت به آنتی بیوتیک ایمی پنم۱۵/۷٪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 نیتروفورانتوئین (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 درسال ۲۰۱۱ودر شهر قم بر روی نمونه های سوختگی انجام شده است باکتری سودوموناس آئروژینوزا به عنوان شایعترین عامل عفونت بیمارستانی معرفی شده است

www.SID.ir

Archive of SID

(۳۱). ظهور مقاومت روز افزون به عوامل ضد میکروبی در این باکتری به عنوان تهدیدی برای بهداشت عمومی، باعث بروز نگرانی هایی از قبیل کاهش انتخاب های درمانی، افزایش هزینه ها و مرگ و میر شده است. در مطالعه حاضر تعداد ۵۱ سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم بیمارانمورد بررسی قرار گرفت .بررسی نتایج الگوی مقاومت سویه های سودوموناس آئروژینوزای به دست آمده از این بیماران ، نشان دهنده میزان مقاومت بالای سویه ها در مقابل آنتی بیوتیک های درمانی می باشد .در مورد مقاومت دارویی این باکتری، تا کنون مطالعات زیادی انجام گرفته است. در این تحقیق بیشترین مقاومت نمونه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین 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 پیپراسیلین ۴۹/۳۵ ٪بود. .از طرف دیگر در بین عفونت های مورد بررسی بالاترین میزان از عفونت ها مربوط به نمونه زخم در سودوموناس آئروژینوزا۳۳/۳۳ ٪ بود و بالاترین درصد فراوانی باکتری های MDR از بیمارستان فوق تخصصی الزهرا واقع در جنوب اصفهان به دست آمد. تعداد ۳۸ سویه (۷۰٪) تولید کننده ژن بتالاکتاماز بودنددر مطالعه شکیبایی و همکاران که روی سویه های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیمارستان شفای کرمان انجام شده بود هیچ سویه ای مولد mbl نبود که چنین تفاوت هایی می تواند ناشی از تفاوت زمانی (اختلاف زمانی حدود ۱۱ سال) و جغرافیایی(کرمان نسبت به اصفهان) و حتی روش انجام آزمایشات باشد (۳۲).

نتیجه گیری

نتایج به‌دست آمده در زمینه تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری‌های جدا شده از بیماران نشان می دهد که به سختی می توان آنتی بیوتیکی را بدون دغدغه مقاومت به کاربرد .بررسی انجام شده حاکی از آن است که اگرچه بعضی از آنتی بیوتیک ها هنوز تاثیر نسبتا خوبی بر *سودوموناس آئروژینوزا* دارند؛ ولی برخی دیگر عملا 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 آنتی‌بیوتیک‌ها به گزینش باکتری های با مقاومت چند دارویی می انجامد. 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 پیپراسیلین (۵۰/۹۸٪) بود.

تشکر و قدردانی

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

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, Padmakrishnan1, 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 Sl, 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. Thorax1998; 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, Chmielewaski 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].

www.SID.ir

Archive of SID

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-betalactamase 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, Eliospoulos 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-β-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 Microbial Immunol Infect 2006; 39:264-277.
20.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; 57:293–295.
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 i*solates to ceftazidim and imipenem. Iran J Inf Trop Dis 2007; 36:19–22.
23.Jamali SH, Bahar MA, Hoshmand M. Prevalence of VIM & IMP metallobetalactamase in imipenem resistant Pseudomonas aeroginosa 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-β-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 blaVIMgenes 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 Fukashima prefecture. Jpn J Antibiot 2001; 54:79-87.
30.Amutha R, Padmakrishnan1, 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 ß-Lactamase Genes among Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burnt Patients at Shafa-Hospital, Kerman, Iran. Iran J Basic Med Sci 2008; 11:104–111.

www.SID.ir

Archive of SID

Original Article

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

Received26 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, Carbapenmase genes, *Pseudomonas aeruginosa*, PCR

Acknowledgement: There is no conflict of interest.

www.SID.ir