

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

حکیمہ

سابقه و هدف: هدف از این مطالعه، تعیین شیوه رُن‌های متالوپلاکتاماز (MBL) و کلبسیلا پنومونیه کارباپنماز (KPC) در بین ایزولهای سودوموناس آگرورژنوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی و سیستیک فیبروروزیس بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی بر روی ۷۰ و ۳۰ ایزوله سودوموناس آنروژنوزای 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 متالوبیاتکامازها از روش CDDT (combined double disk synergy test) و کارباپنماز از روش MHT (Modified Hodge test) و برای تشخیص ژن‌های VIM و KPC از روش Sequencing PCR استفاده گردید.

یافته‌ها: مقاومت سویه‌های سودوموناس آنروژینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی و سیستیک فیبروزیس بر اساس تست آنتی‌بیوگرام به شرح زیر به دست آمد: ایمی‌پنم (۱٪/۷۱)، مروپن (۸٪/۸۵) و (۳٪/۶۰)، سفتازیدیم (۱٪/۳۶) و (۱٪/۳۳)، سفپیم (۲٪/۷۸)، پیپراسیلیین (۱٪/۷۴) و (۶٪/۵۵)، سیپروفلوکسازین (۱٪/۱۲) و (۱٪/۵۴)، آزرتئونام (۲٪/۷۹)، جنتامیسین (۲٪/۸۱) و (۶٪/۵۶)، CDDT (۳٪/۷۹) و (۶٪/۱۶)، آر.٪ سویه‌های سودوموناس آنروژینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی و سیستیک فیبروزیس، مولد متالوبیلتاتاماز و با روش MHT، هیچ کدام از سویه‌ها مولد KPC نبودند. شیوع ژن‌های VIM و IMP در سویه‌های سودوموناس آنروژینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی به ترتیب ۱۰٪، ۰٪ و در سویه‌های سودوموناس آنروژینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس، هیچ کدام از ژن‌ها مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: به دلیل افزایش سویه‌های سودوموناس آئروبیوزای مولد متالوبتالاکتماز در بیماران مبتلا به سوختگی و سیستیک فیبروزیس، شناسایی سویه‌های حاوی متابولیتاکتماز و کارپیماز برای اجرای برنامه‌های کنترل عفونت، ضروری می‌باشد.

وازگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، سوختگی، سیستیک فیبروز پیس، متالوبیتاالاكتاماز

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Tarhani M, Hashemi A, Hakemi Vala M, Nowroozi J, Khanbabae G. Frequency of the KPC and MBL genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burn and cystic fibrosis patients. Pejouhandeh 2016;20(6):350-358.

مشکلات عمدی بیمارستان‌ها محسوب می‌شوند. در بیماران مبتلا به سوتگی، عفونت، به خصوص با سودوموناس ائرورژینوزا 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

مقدمة

اعفونت‌های بیمارستانی، همراه در همه‌ی کشورها یکی از

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

مبلا 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 سیستیک 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 قرار گرفته و سریعاً به آزمایشگاه گروه میکروبیولوژی داشتکده پزشکی، داشتگاه 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 آغاز کشت داده شدند. بالافاصله، 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، ۳۰ µg، سفپیم ۳۰ µg، آزرتئونام ۱۰ µg، ایمی‌پن ۱۰ µg، مروپن ۱۰ µg، جنتامیسین ۱۰ µg، سیپروفلوکساسین ۳۰ µg، پیپراسیلین ۱۰۰ µg بودند. در ضمن، برای کنترل آزمایش‌ها از سودوموناس ATCC27853 به عنوان 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 ۲۰۱۳ CLSI جهت جداسازی سویه‌های تولید کننده‌ی ESBL، از دیسک مروپن و آنتی‌بیوتیک مروپن به اضافه EDTA استفاده شد (۲). برای انجام این آزمایش، ابتدا حجمی از محلول تهیه شد که حاوی ۷۵۰ میکروگرم EDTA بود، به دیسک‌های مروپن اضافه شد و سپس در انکوباتور خشک گردید. سپس از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده توسط سواب استریل در سطح محیط مولر

این بیماران مؤثر است (۱).

سودوموناس آئروژینوزا پاتوژن فرصت طلبی است که به صورت ژنتیکی به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها 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 لوسومی، 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 متالوبتاکتامازها (MBLS) است. بر اساس مطالعات مولکولی، آنزیم‌های هیدرولیزکننده‌ی بتالاکتام‌ها (بتالاکتامازها) در چهار گروه A، B، C و D طبقه‌بندی شده‌اند که متالوبتاکتامازها 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 متالوبتاکتامازها در سرتاسر جهان در چند سال گذشته در بسیاری از ایزوله‌های کلینیکی، به تناب 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. کارباپن‌ها به ویژه ایمی‌پن، 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 متالوبتاکتامازها IMP و SPM، VIM و oprD می‌شوند (۴). در برای کارباپن‌ها مقاوم می‌شوند (۴). مهتم‌ترین متالوبتاکتاماز از نظر کلینیکی هستند که bla-SPM، bla-VIM، bla-IMP به وسیله‌ی ژن‌های VIM و ۲۳ نوع IMP می‌شوند. حداقل ۱۴ نوع VIM و ۲۳ نوع IMP متفاوت، تعیین هویت شده‌اند. از طرف دیگر، متالوبتاکتامازها به چند خانواده تقسیم می‌شوند که عبارتند از: IMP، SPM، VIM، GIM، SIM و AIM (۵،۶). در بعضی از مطالعات، میزان مرگ و میر ناشی از سودوموناس آئروژینوزای تولید کننده‌ی MBL را بیش از سویه‌های فاقد آن گزارش نموده‌اند (۶-۹).

در این مطالعه، با جدا نمودن سودوموناس آئروژینوزای مولد متالوبتاکتاماز از نمونه‌های بالینی به دست آمده از بیماران

bla_{KPC}, bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{Aer} در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا ایزوله شده با استفاده از دما و پرایمرهای اختصاصی این ژن‌ها انجام گرفت (جدول ۱). محتويات هر میکروتیوب شامل ۱۰۰ μl از DNA استخراج شده و ۱۰ μl از هر پرایم، به کیت PCR (شرکت Bioneer کشور کره جنوبی) با حجم نهایی ۲۵ μl بود. از سویه‌های P. aeruginosa strain FSH2 (آهدایی از دکتر میرنژاد VIM IMP Bioneer) به ترتیب حاوی ژن‌های KPC⁺ و KPC به عنوان کنترل مثبت و از مارکر ۱۰۰ bp برای تأیید وزن مولکولی استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ۷٪ انجام شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، نتایج با دستگاه UV Gel doc 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.

توالی ژن	ژن شناسایی شده
5'-GAAGGCGTTTATGTTCATAC-3'	IMP-A
5'-GTATGTTCAAGAGTGATGC -3'	IMP-B
5'-GTTGGTCGCATATCGAAC -3'	VIM-A
5'-AATGCGCAGCACCAAGGATA -3'	VIM-B
5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTG-3'	KPC-A
5'-CTTGTCACTCCTGTTAGGCG-3'	KPC-B

یافته‌ها

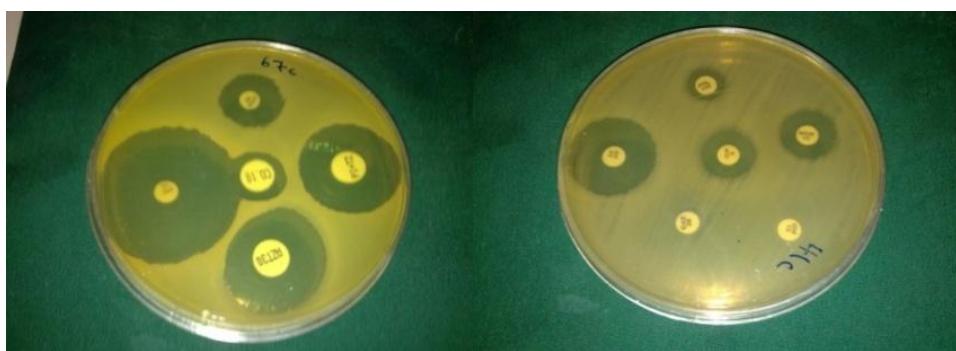
بر اساس تست‌های تشخیصی آزمایشگاهی که برای شناسایی جنس و گونه استفاده شد، ۱۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا شامل ۷۰ سویه جدا شده از زخم بیماران دچار سوختگی و ۳۰ سویه جدا شده از خلط بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس مراجعه کننده به بیمارستان شهید مطهری و بیمارستان مفید طی سال ۹۳ به دست آمد.

برای کل ۷۰ نمونه 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.

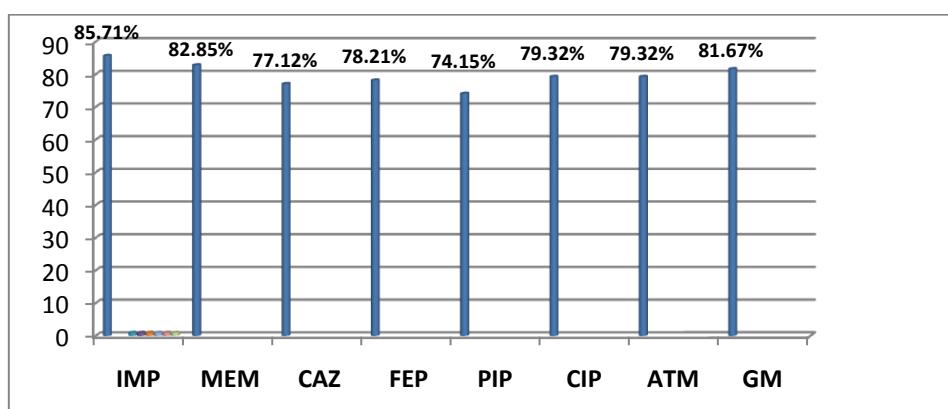
هینتون اگر به روش متراکم (سفره‌ای) کشت داده شد و پس از ۱۵ دقیقه و حصول اطمینان از خشک شدن محیط کشت، دیسک‌های مروپنم و مروپنم به اضافه EDTA به کمک پنس استریل روی محیط کشت طوری قرار داده شد که دیسک‌ها از هم، فاصله‌ی ۳۰ میلی‌متری داشتند. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت نگهداری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

تست (Modified Hodge test) MHT کارباپنماز طبق دستور کار CLSI 2013 انجام شد. بدین صورت که سوسپانسیون باکتری با رقت نیم مک فارلند از ۱/۱۰ E. coli ATCC 25922 به 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 تولیدکننده کارباپنماز به عنوان نمونه مولد کارباپنماز، در نظر گرفته شد (۲). به طور همزمان از یک سویه / سینتوباکتر بومانی KPC مثبت تهیه شده از انستیتو پاستور، به عنوان 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 ورتسک 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 ۱۰۰۰ 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

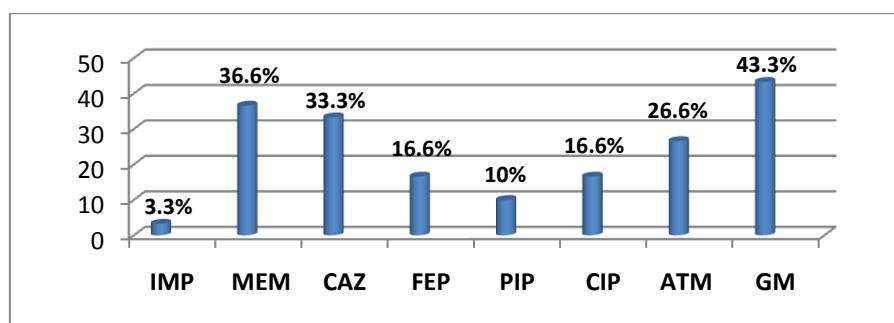


شکل ۱. آنتی بیوگرام دو نمونه از باکتری‌های بررسی شده.



نمودار ۱. مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های سودوموناس آنروژینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی.

.MEM: meropenem .IMP: imipenem .CAZ: ceftazidime .FEP: cefepime .PIP: piperacillin .CIP: ciprofloxacin .ATM: Aztreonam .GM: Gentamicin



نمودار ۲. مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های سودوموناس آنروژینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس.
.GM: Gentamicin .ATM: Aztreonam .CIP: ciprofloxacin .PIP: piperacillin .FEP: cefepime .CAZ: ceftazidime .meropenem

ایزوله‌های سودوموناس آنروژینوزا/ از هر دو گروه جدا شده از سوختگی یا سیستیک فیبروزیس که مقاوم به آنتی بیوتیک مروپنام بودند به روش CDDT از نظر تولید متالوباتالکتامازها مورد شناسایی قرار گرفتند. در تفسیر CDDT اگر قطر هاله عدم رشد دیسک MEM به تنها یابی نسبت به دیسک MEM+EDTA، بزرگتر یا مساوی ۸ mm می‌بود، بیانگر تولید متالوباتالکتاماز در نظر گرفته می‌شد (شکل ۲). لذا در این بررسی از ۷۰ ایزوله‌ی سودوموناس آنروژینوزای جدا شده از سوختگی، ۴۶ ایزوله (۶۱٪) و از ۳۰ ایزوله‌ی

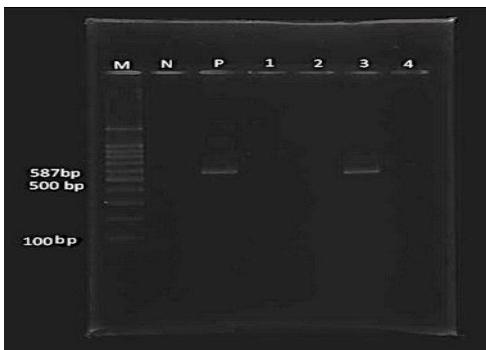
مقدار MIC برای ایمی پنم سودوموناس آنروژینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس با توجه به حساس بودن همه‌ی نمونه‌ها برابر یا بیش از $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ به دست آمد (جدول ۲).

جدول ۲. نتایج تست MIC برای ایمی پنم سودوموناس آنروژینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی.

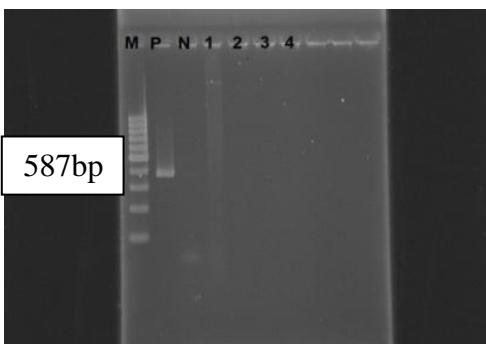
گونه	MIC _{۵۰}	MIC _{۹۰}	MIC range
سودوموناس آنروژینوزا/	۳۲ $\mu\text{g}/\text{ml}$	۶۴ $\mu\text{g}/\text{ml}$	۲-۱۲۸ ml

فراوانی ژن‌های KPC و MBL در بین سویه‌های سودوموناس آنروزینوزای ...

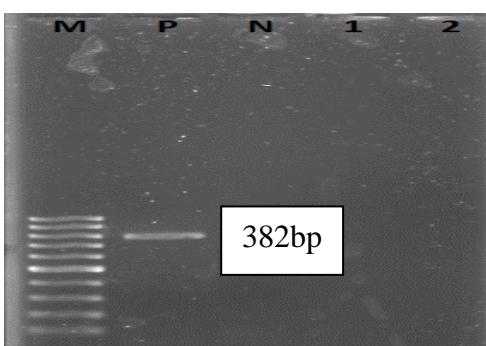
از بین ۷۰ نمونه‌ی سودوموناس آنروزینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی، ۱۰٪ (۷ نمونه) دارای ژن IMP بودند (شکل ۴) ولی در هیچ یک از نمونه‌ها باندی مبتنی بر حضور ژن‌های VIM (شکل ۵) و KPC (شکل ۶) مشاهده نشد. همچنین، هیچ کدام از ۳۰ نمونه‌ی سیستیک فیبروزیس واجد ژن‌های IMP، VIM و KPC نبودند.



شکل ۴. باند ۵۸۷ جفت بازی مربوط به ژن IMP با روش PCR: M: مارکر، P: کنترل مثبت برای ژن (587 bp)، N: نمونه مثبت برای ژن (587 bp)، A: کنترل منفی.



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

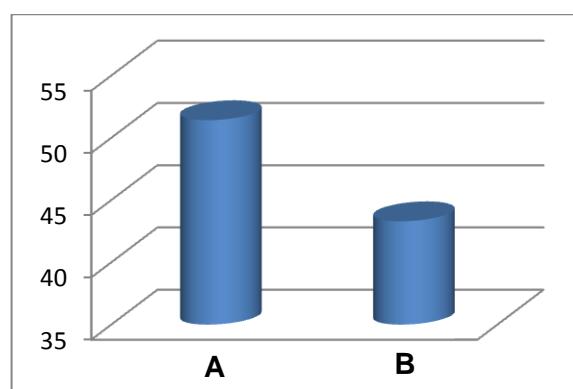


شکل ۶. باند ۷۹۸ جفت بازی مربوط به ژن KPC با روش PCR: M: مارکر، P: کنترل مثبت برای ژن (798 bp)، N: blaKPC (798 bp)، A: کنترل منفی، (۱ و ۲) نمونه‌های منفی برای ژن (blaKPC (798 bp).

سودوموناس آنروزینوزای جدا شده از سیستیک فیبروزیس ۱۳٪ (۴/۴۳٪) ایزوله دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند (شکل ۲، نمودار ۳).

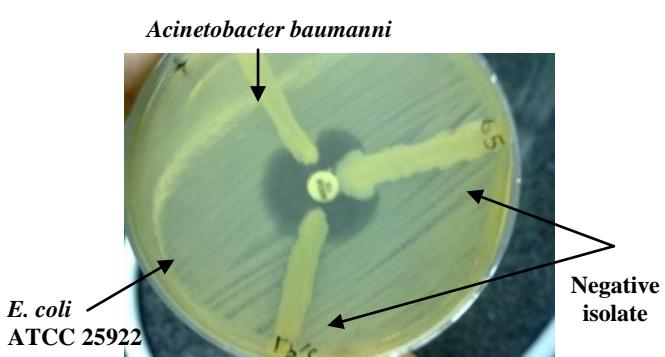


شکل ۲. تست فنوتیبی DDST برای غربالگری توانایی تولید متالوبتالاکتاماز، A: دیسک مروپین و B: دیسک مروپین به همراه EDTA و افزایش قطر هاله عدم رشد در کنار دیسک B.



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

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



شکل ۲. تست فنوتیبی MHT برای بررسی تولید آنزیم کارباپنماز.

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 به کارگیری وسائل 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 میکرووارگانیسم‌ها نسبت به داروها می‌باشد. منشاء تولید بتالاکتماز در سودوموناس آئروژینوزا ممکن است پلاسمیدی و یا کروموزومی باشد (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 ایمی‌پنیز بیشتر از طریق بتالاکتمازهای گروه B صورت می‌گیرد که به آنها کارباپنماز می‌گویند (۱۳).

در این مطالعه، ۷۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا/ جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی بیمارستان مطهری و ۳۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا/ جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس بیمارستان مفید توسط تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شد. میزان مقاومت در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا/ جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنیز، مروپنام،

softazیدیم، سفپیم، پیپراسیلین، سیپروفلوکساسین، آزترئونام و جنتامیسین، به ترتیب ۸۵/۷۱٪، ۸۲/۸۵٪، ۷۷/۱۲٪، ۷۸/۲٪، ۷۴/۱۵٪، ۷۹/۳۲٪، ۷۹/۳۲٪ و ۸۱/۶٪ بود. این در حالی است که میزان مقاومت نسبت به همین آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا/ جدا شده از بیماران مبتلا به CF به ترتیب ۳۶/۶٪، ۳۳/۳٪، ۱۶/۶٪، ۱۰٪، ۱۶/۶٪، ۲۶/۶٪ و ۴۳/۳٪ بود. مقایسه‌ی نتایج به دست آمده از بررسی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا/ جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی در بیمارستان مطهری و سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا/ جدا شده از بیماران مبتلا به CF در بیمارستان مفید نشان می‌دهد که میزان مقاومت در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا/ جدا شده از بیماران مبتلا به CF به سوختگی، بسیار بالاتر از میزان مقاومت در سویه‌های CF می‌باشد، به طوری که مقاومت نسبت به ایمی‌پنیز در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا/ جدا شده از سوختگی، ۸۵/۷۱٪ بود، در حالی که در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا/ 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 کارباپنام (۸۵/۷۱٪ و ۸۲/۸۵٪) در سودوموناس آئروژینوزا/ جدا شده از سوختگی در این مطالعه، قابل مقایسه با نتایج مطالعه‌ی Rossolini و Mantengoli در نمونه‌های جدا شده از آمریکای لاتین (softazیدیم ۷۴/۶٪، سفپیم ۶۷٪، ایمی‌پنیز ۷۶٪ و مروپنام ۸٪) می‌باشد (۱۴).

در مطالعه‌ی میرصالحیان و همکاران، میزان مقاومت سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا/ جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی نسبت به ایمی‌پنیز، ۷۵٪ گزارش شد، در حالی که در مطالعه‌ی حاضر، میزان مقاومت نسبت به ایمی‌پنیز، 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 آئروژینوزا/ جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی در زمانی متفاوت به دست آورده‌اند (۱۵).

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

bla_{VIM} مشاهده نشد. این در حالی است که تمامی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از سیستیک فیروزیس، فاقد ژن‌های bla_{KPC}, bla_{IMP} و bla_{VIM} بودند. در سال ۲۰۰۴ PCR و E-test MBL در ایتالیا، با انجام آزمایشات Luzzaro روی ۵۰۶ سویه سودوموناس آئروژینوزا نشان داد که چهار VIM سویه (۷٪) تولیدکننده متابولبلاکتماز، حامل ژن VIM می‌باشند (۱۹). در سال ۲۰۰۷، خسروی و همکاران در اهواز با انجام آزمایش MBL و PCR روی ۱۰۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا نشان دادند که ۸ سویه (۵٪) از ۴۱ سویه، مقاوم به ایمیپنیم تولیدکننده متابولبلاکتماز و هر ۸ سویه، حامل ژن VIM بوده‌اند (۲۰). در سال ۲۰۰۷، بهزادیان نژاد 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 بقیة الله و شریعتی نشان دادند که ۸ سویه (۱۱٪) از ۷۰ سویه‌ی مقاوم به ایمیپنیم، تولیدکننده متابولبلاکتماز 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 متابولبلاکتماز نسبت به مطالعه‌ی فعلی کمتر بوده و مهم‌ترین ژن مولد متابولبلاکتماز، ژن VIM بوده است. بهنظر می‌رسد که همانند روند افزایشی مقاومت نسبت به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله کارباپن‌ها در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا، توانایی تولید متابولبلاکتماز در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای ایران نیز در حال افزایش می‌باشد. در حالی که در مطالعه‌ی حاضر، این ژن از هیچ‌یک از سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی و یا CF جدا نشده و به عکس، 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 ایمیپنیم، مروپنیم، سفتازیدیم، سفپیم، پیپراسیلین، سیپروفلوکساسین، آزترئونام و جنتامیسین به ترتیب ۷۱/۷۵٪، ۸۵/۸۵٪، ۸۲/۸۵٪، ۷۷/۱۲٪، ۷۸/۲٪، ۷۴/۱۵٪، ۷۹/۳۲٪، ۷۹/۳۲٪، ۱۶/۱۰٪ 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٪، ۱۶/۶٪ و ۴۳/۳٪ به دست آمد. همان‌طور

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 شکیبائی 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 آئروژینوزا در طی ۴ سال از بیماران مختلف بیمارستانی در کلگری جمع‌آوری شده بودند. تفاوت مختصی که در بین فراوانی تولید متابولبلاکتماز 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 چراجی 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 کارباپن‌ها 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_{VIM}, bla_{KPC} و bla_{IMP} مورد بررسی قرار گرفتند که ۷ نمونه از سویه‌های سودوموناس bla_{IMP} آئروژینوزای جدا شده از سوختگی از نظر وجود ژن PCR مثبت شدند ولی هیچ کدام از ژن‌های bla_{KPC} و

بزرگسال بوده‌اند) باشد. شناسایی باکتری‌های تولید‌کننده‌ی MBL و KPC، گزارش دقیق و سریع چنین آنزیم‌هایی به منظور نظارت هر چه بهتر و دقیق‌تر در رديابی مقاومت‌های چندگانه و همچنین انتخاب آنتی‌بيوتیک مناسب و جلوگیری از شیوع چنین آنزیم‌هایی می‌تواند از گسترش عفونت‌های بیمارستانی جلوگیری نماید. همچنین اقدامات پیشگیرانه به منظور کاهش شیوع این ژن‌ها از طریق درمان مناسب و رعایت بهداشت در بیمارستان‌ها به عمل آید.

که از نتایج مشخص است، جدایه‌های سودوموناس اثروژنوز/ از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس نسبت به جدایه‌های سوختگی، از مقاومت کمتری نسبت به آنتی‌بيوتیک‌های 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 آنتی‌بيوتیک‌ها در مقایسه با افراد مبتلا به سوختگی (که اکثر آن‌ها در مقایسه با افراد مبتلا به سوختگی)

REFERENCES

- Van Mansfeld R, Willems R, Brimicombe R, Heijerman H, Van Berkhouw 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.
- 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.
- 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 Mikrobiologów= The Polish Society of Microbiologists)* 2009;59(1):45–8.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, Mathai D, Jones RN. Carbapenem resistance among *Pseudomonas 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.
- 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.
- 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.
- Doggett R. Microbiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa: Clin Manifest Infect Curr Ther* 1979;1–8.
- 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.
- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35(1):147–51.
- Rossolini G, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(s4):17–32.
- Hakemi Vala M, Hallajzadeh M, Hashemi A, Goudarzi H, Tarhani M, Sattarzadeh Tabrizi M, et al. Detection of Ambler class A, B and D β-lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from burn patients. *Ann Burns Fire Disasters* 2014;27(1):8–13.
- Shakibaie MR, Shahcheraghi F, Hashemi A, Adeli NS. Detection of TEM, SHV and PER Type Extended-Spectrum β-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.

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- β -Lactamase and resistance rate of *P. aeruginosa* isolates 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.