

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

مجتبی انوری نژاد، عزیز ژاپونی، نورالدین رفعت پور، ابراهیم علیپور، پژمان عباسی، مانلی امین شهیدی، جلال مردانه*

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

تاریخ وصول: ۱۳۹۲/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۲۴

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 جدا شده 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 ای‌پی‌م و مروپنم مقاوم و تولیدکننده آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند، که ۱۰ الگوی آنتی‌بیوتیکی در میان آنها مشاهده گردید و به ۵ مورد از آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی کاملاً مقاوم بودند. میزان حساسیت به سفنازیدیم، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین به ترتیب ۲۳/۳ درصد، ۶/۷ 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 (۷۱/۶ 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 میکروپوشناسی بالینی استاد البرزی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز.

Email: Jalalmardaneh@yahoo.com

مقدمه

پseudomonas آئروژینوزا باسیلی گرم منفی، متحرک، فاقد اسپور و غیرتخمیر کننده است که از طیف وسیعی از اجسام بی‌جان، حیوانات و محیط اطراف انسان‌ها جدا شده 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 ارگانیزم در طیف وسیعی از بیماران از جمله بیماران سوختگی سبب ایجاد عفونت می‌گردد و روند بهبود آن‌ها را پیچیده و مشکل می‌نماید (۲ و ۱). بیماران سوختگی اغلب در معرض عفونت ناشی از pseudomonas 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 pseudomonas آئروژینوزا دستگاه‌ها، سینک‌ها، کف و دیوارهای بخش‌های بیمارستان‌ها و تخت‌های بیماران را آلوده می‌نماید و به دلیل مقاومت بسیار بالا به ترکیبات ضد عفونی‌کننده مورد استفاده به طور معمول در بیمارستان‌ها در چنین محیط‌هایی به سهولت دوام می‌آورند و زنده می‌مانند (۴ و ۳). به منظور جستجوی منبع عفونت و روش انتقال ارگانیزم و نیز شناسایی سویه‌های بیماری‌زا روش‌های

فنتیپی و ژنتیکی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. در بین روش‌های ملکولی مورد استفاده جهت مطالعه‌های اپیدمیولوژیک میکروارگانیزم‌ها روش پالس فیلد ژل الکتروفورز (PFGE)^(۱) به عنوان یک روش استاندارد قابل اعتماد و تکرارپذیر محسوب می‌شود و به عنوان روش استاندارد طلایی جهت مطالعه‌های اپیدمیولوژی و ملکولی استفاده می‌گردد (۷-۵).

افزایش شیوع عفونت‌های ناشی از pseudomonas 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 pseudomonas 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 (۹ و ۱۰). کاربامپنم‌ها از گروه‌های آنتی‌بیوتیکی مؤثر در درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله pseudomonas آئروژینوزا تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBL)^(۲) است (۱۱). در سال‌های اخیر چندین مورد شیوع عفونت بیمارستانی ناشی از سویه‌های pseudomonas آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتاماز (MBL)^(۳) مثبت

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

از سراسر جهان گزارش شده است. مقاومت به کارباینمها در نتیجه ژنهای مقاومت قرار گرفته بر روی اینتگرون کلاس یک است (۱۲ و ۱۳). راجپوت و همکاران سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتاماز مقاوم به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در بیمارستان را در بیمارستان سوختگی گزارش نموده‌اند (۱۴). در مطالعه‌ای صادری و همکاران موارد پسودوموناس آئروژینوزا MBL مثبت را در بیمارستان سوختگی شهر تهران شناسایی کرده‌اند (۱۵).

با وجود این در ایران مطالعات محدودی بر روی بیمارستان سوختگی و عفونت‌های ناشی از پسودوموناس آئروژینوزا در بیمارستان سوختگی و عفونت ناشی از این ارگانیزم 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 جدا شده از بیمارستان سوختگی بود.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی که در طی اردیبهشت ۱۳۸۸ تا فروردین ۱۳۸۹ انجام شد، نمونه‌های سواب از زخم بیمارستان دچار سوختگی بستری در بیمارستان سوختگی قطب‌الدین شیراز گرفته شدند و وارد محیط انتقالی تریپتیک سوی برات 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 میکروپزشناسی سواب‌های جمع‌آوری شده از بیمارستان 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 ۱۶ 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 مجدداً کشت داده شدند. سپس با استفاده از تست‌های میکروبیولوژی شامل خصوصیات مورفولوژیک و نیز تست‌های بیوشیمیایی شامل؛ اکسیداز، کاتالاز، توانایی تولید پیگمان پیوسیاینین، بو، سیترات، محیط آگار آهن سه قندی مورد تایید نهایی قرار گرفتند. ایزوله‌ها تا زمان انجام آزمایش‌ها در محیط تریپتیک سوی برات (TSB) برات 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- (AB Biodisk, Sweden) test به منظور شناسایی سویه‌های تولید کننده کلاس B بتالاکتاماز استفاده شد. آنالیز

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 ۶-۲ 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 ۲۰-۱۶ 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 ۶۰-۳۰ 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 میکرولیتر) 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

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

الگوی حساسیت ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا نسبت به ۱۱ آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش نواری E-test و بر اساس راهنمای ارائه شده به وسیله موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی بررسی شد (۱۶). آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده و حداقل غلظت مهارکنندگی و (MIC)^(۱) مقاومت آنها شامل: امی‌پنم (IMI، بیشتر یا مساوی ۱۶)، مروپنم (MEM، بیشتر یا مساوی ۱۶)، سفپیم (CPM، بیشتر یا مساوی ۳۲)، سفنازیدیم (CAZ، بیشتر یا مساوی ۳۲)، پیپراسیلین/تازوباکتام (PTZ، بیشتر یا مساوی ۱۲۸)، سیپروفلوکساسین (CIP، بیشتر یا مساوی ۴)، توبراماسین (TN، بیشتر یا مساوی ۱۶)، آمیکاسین (AK، بیشتر یا مساوی ۶۴)، جنتاماسین (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 هیتون 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 پسودوموناس آئروژینوزا با روش پالس فیلد ژل الکتروفورز ابتدا سویه‌های مورد نظر بر روی محیط

1-Minimum Inhibitory Concentration

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

برنامه PFGE با استفاده از 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 ۴۰ ثانیه، زمان کل برنامه پالس فیلد ۳۳ ساعت، ولتاژ برابر 6V، برابر ۱۲۰ درجه و دمای ۶ درجه سانتی‌گراد. در هر سری آزمایش PFGE از ۱۰۰۰bp فاژ لامبدا به عنوان مارکر ملکولی استفاده شد. جهت آنالیز باندهای حاصله و ارزیابی پالسوتایپ‌ها از نرم افزار PhotoCapt (Vilber Loumart, Marnes-la-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 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 ۶۰ 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 (۴۰ مورد، ۳۹ درصد) بودند و پس از آن گروه سنی ۳۱ تا ۴۰ سال (۱۴ بیمار، ۲۳ درصد) قرار داشتند. اغلب بیماران (۵۳ بیمار، ۸۸/۴ 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 ۶۰ (۲۲/۲ درصد) سویه پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده 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)^(۱) 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

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

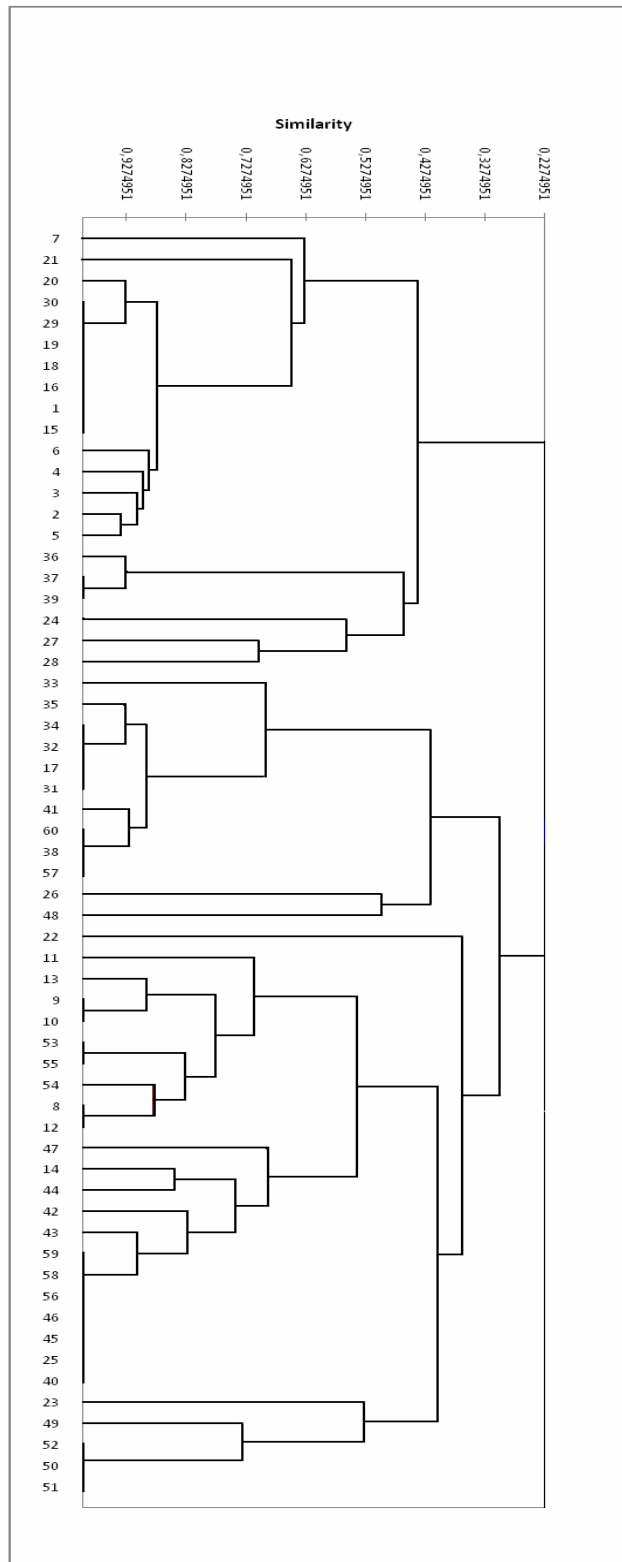
افزایش شیوع عفونت‌های ناشی از pseudomonas آئروژینوزا مقاوم به چند دارو با مرگ و میر و اختلالات و عوارض قابل توجهی همراه است، زیرا درمان جایگزین برای این قبیل عفونت‌ها وجود ندارد(۸). هدف از این مطالعه بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و هم‌چنین الگوی PFGE سویه‌های pseudomonas آئروژینوزا جدا شده از بیماران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

میان ارگانسیم‌های دارای مقاومت چند گانه دارویی کاملاً به آنتی‌بیوتیک‌های؛ ایمپنم، مروپنم، پپراسیلین/تازوباکتام، آمپی‌سیلین و آزترونام مقاوم بودند. حدود ۱/۷ درصد سویه‌ها به سفپیم، جنتامایسین، توبرامایسین و سیپروفلوکساسین حساس بودند و ۶/۷ درصد آنها به آمیکاسین و ۲۳/۴ درصد ایزوله‌ها به سفنازیدیم حساس بودند.

آنالیز پالسوتا‌یپ‌های حاصله در روش PFGE نشان داد که ایزوله‌های دارای باندهای ۱۶-۱۰ باند شایع‌ترین بودند و ۴۸/۳ درصد سویه‌های دارای باندهای ۱۴-۱۳ را به خود اختصاص می‌دادند. وزن ملکولی باندها بین ۴۰ تا ۶۰ کیلو جفت باز متغیر بود. با استفاده از تجزیه و تحلیل تعداد و اندازه باندها شباهت بالا(۸۰ تا ۸۵ درصد) در اغلب ایزوله‌های pseudomonas آئروژینوزا مقاوم به کاربایپنم‌ها مشاهده

جدول ۱: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های pseudomonas آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتامان جدا شده از بیماران سوختگی

ردیف	الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی	فراوانی
۱	ایمی پنم، مروپنم، سفنازیدیم، آزترونام، توبرامایسین، جنتامایسین، پپراسیلین/تازوباکتام، سفپیم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، آمپی‌سیلین.	۳۹
۲	ایمی پنم، مروپنم، آزترونام، توبرامایسین، جنتامایسین، پپراسیلین/تازوباکتام، سفپیم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، آمپی‌سیلین.	۸
۳	ایمی پنم، مروپنم، آزترونام، توبرامایسین، جنتامایسین، پپراسیلین/تازوباکتام، سفپیم، آمیکاسین، آمپی‌سیلین.	۶
۴	ایمی پنم، مروپنم، سفنازیدیم، آزترونام، توبرامایسین، پپراسیلین/تازوباکتام، سفپیم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، آمپی‌سیلین.	۱
۵	مروپنم، سفنازیدیم، آزترونام، توبرامایسین، جنتامایسین، پپراسیلین/تازوباکتام، سفپیم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین	۱
۶	ایمی پنم، مروپنم، سفنازیدیم، آزترونام، پپراسیلین/تازوباکتام، سفپیم، آمپی‌سیلین.	۱
۷	ایمی پنم، مروپنم، سفنازیدیم، آزترونام، پپراسیلین/تازوباکتام، سفپیم، آمیکاسین، آمپی‌سیلین.	۱
۸	ایمی پنم، سفنازیدیم، آزترونام، توبرامایسین، جنتامایسین، سفپیم، آمیکاسین، آمپی‌سیلین.	۱
۹	ایمی پنم، مروپنم، آمیکاسین، آمپی‌سیلین.	۱
۱۰	ایمی پنم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، آمپی‌سیلین.	۱



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

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 پseudomonas آئروژینوزا مقاوم به کاربامپنم‌ها 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. شباهت بالای ژنتیکی در اغلب ایزوله‌های پseudomonas آئروژینوزا مقاوم به کاربامپنم‌ها 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 پseudomonas 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 نشان دهنده آن است که از کلون‌های بسیار نزدیک هستند اگر چه برخی از ایزوله‌ها به

ریشه‌کنی باکتری پseudomonas آئروژینوزا به دلیل دارا بودن مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا و مقاومت به ضد عفونی‌کننده‌های متداول مشکل است. شناسایی سویه‌های پseudomonas 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 پseudomonas آئروژینوزا MBL مثبت گزارش شده‌اند (۱۷-۲۴). سویه‌های تولید کننده این آنزیم‌ها سبب عفونت‌های بیمارستانی طولانی مدت و شدیدی هستند (۲۵). ایزوله‌های MBL 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 (۲۷-۳۱). در مطالعه حاضر ۲۲/۲ درصد ایزوله‌های پseudomonas آئروژینوزا توانایی تولید متالوبتالاکتاماز را داشتند در صورتی که در مطالعه کومار و همکاران ۳۲ درصد سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا MBL مثبت گزارش شده‌اند (۳۲). که این میزان تفاوت می‌تواند با میزان بالاتر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های شایع در

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 ارگانسیم‌های MDR و مشکلات عدیده‌ای که در کشورهای در حال توسعه به وجود آمده است فرد آلوده با میکروارگانسیم‌های 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 ارگانسیم‌ها 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(۳۶-۳۸).

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 ارگانسیم‌های مقاوم به روش‌های مختلف رخ می‌دهد. در مجموع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های 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

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.

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.

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, Alaghebandan 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: its 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 beta-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. Alaghebandan 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, Razaatpour 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.

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

Anvarinejad M, Japoni A, Rafeatpour 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 resistance 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 antimicrobial 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, Rafeatpour 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.