[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.159]

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 23:13 IRST on Friday December 14th 2018

جدا سازی و شناسایی سویه های سودوموناس آئروجینوزای مقاوم به ایمی پنم از نمونه های کلینیکی چهار بیمارستان بزرگ تهران با روش MIC

عذرا باقری[۱]، غلامرضا اولاد[۲]، فرشته شاهچراغی[۳]، رحیم سروری[۴*]

۱) مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران

۲) مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران

۳) گروه میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۲ **تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۱**

چکیده

مقدمه: سودوموناس آئروجینوزا عامل اصلی عفونت های حاد بیمارستانی، دارای مقاومت ذاتی به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها می باشد. مقاومت آن به آنتی بیوتیک های بتالاکتام به دلیل تولید آنزیم های بتالاکتامازها و متالوبتالاکتامازها می باشد، که معضلات زیادی را در درمان این عفونت ها ایجاد می نماید. هدف از این مطالعه جداسازی و بررسی سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک های بتالاکتام و ایمی پنم در نمونه های کلینیکی جدا شده از چهار بیمارستان بزرگ تهران می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تحلیلی-توصیفی، طی ۲ سال، ۶۰۰ نمونه سودوموناس آئروجینوزا از بیماران بستری و یا مراجعه کننده به بیمارستان های بقیه الله(عج)، امام خمینی، مرکز طبی کودکان و سوانح سوختگی شهید مطهری جمع آوری گردید. بررسی اولیه مقاومت باکتریایی با استفاده از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف مختلف از روش دیسک دیفیوژن(Kirby-Bauar) انجام گردید. سپس تست MIC نسبت به سفتازیدیم و ایمی پنم با روش Microdiution tube و پروتکل CLSI برای آن ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: در این مطالعه بالاترین حساسیت باکتری(۹۲ درصد) به ایمی پنم(IPM) و بیشترین مقاومت(۹۱/۲ درصد) به تتراسیکلین(Te) نشان داده شد. هم چنین نتایج روش MIC نشان داد که ۶ درصد از سویه ها دارای مقاومت به ایمی پنم($MIC \geq ۴\mu g/ml$) می باشند و ۳۹/۵ درصد از آن ها دارای مقاومت به سفتازیدیم($MIC \geq ۱۶\mu g/ml$) می باشند.

بحث و نتیجه گیری: نتایج حاصل نشان می دهد که به دلیل مقاومت بالای این باکتری نسبت به ایمی پنم و سفالوسپورین های نسل سوم، حتماً در مصرف این آنتی بیوتیک ها دقت بیشتر ضروری است، چرا که در غیر این صورت خطر انتقال این مقاومت به دیگر سویه ها و از جمله دیگر باکتری های گرم منفی دور از انتظار نخواهد بود.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروجینوزا، مقاومت آنتی بیوتیکی، ایمی پنم، MIC

*نویسنده مسئول: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران

Email: R_Sorouri@yahoo.com

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.159]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 23:13 IRST on Friday December 14th 2018

مقدمه

سودوموناس آئروجینوزا یکی از مهم ترین جنس های موجود در خانواده سودوموناداسه بوده و به شکل میله ای، به شدت هوازی بوده از ملکول اکسیژن به عنوان گیرنده نهایی الکترون استفاده می کنند(۵-۱). برخی سویه ها برای انسان و حیوانات بیماریزا هستند. این جنس دارای ۷۶ گونه است که شاخص آن سودوموناس آئروجینوزا می باشد(۹-۶).

سودوموناس آئروجینوزا بیشتر از سایر انواع این جنس با بیماری های انسانی در ارتباط اند(۱۰). برای اولین بار در سال ۱۸۸۲ توسط کسارد جداسازی و باسیلوس پیوژنز نام گرفت(۱).

سودوموناس آئروجینوزا مخزن عظیمی از ژن های ویرولانس خارج سلولی از جمله کازئین، الاستین، فیبرین همولیزین ها ، پیوسین‌ها ، لیپازها، اگزوتوکسین و اندوتوکسین است که در توانایی بیماریزایی ارگانیسم به عنوان پاتوژن فرصت طلب ایفای نقش می کنند(۱).

این باکتری عامل۱۰ درصد عفونت های بیمارستانی، ۱۱ درصد عفونت های خونی و ۴ درصد اپیدمی های بیمارستانی به شمار می رود و در بیماران با ضعف ایمنی مانند مبتلایان به ایدز، سیستیک فیبروز، مراکز سوختگی یا سرطان، پس از زخم های تروماتیک، در معتادان تزریقی و حتی عفونت های ناشی از آب در اثر شنا و عفونت های قرنیه اهمیت ویژه ای دارد. میزان مرگ و میر پنومونی سودوموناسی به ۷۰ درصد می رسد که شکل حاد آن در بیماران سرطانی و بستری در ICU دیده می شود(۱،۱۱).

گونه های این باکتری از مقاومت نسبی در برابر ترکیبات چهار ظرفیتی آمونیوم، به خصوص ستریماید، دتول و بنزوالکونیم کلراید برخوردار هستند. این ارگانیسم حساس به اسید و نمک های نقره است. بدین منظور از نقره جهت درمان عفونت های ناشی از سوختگی استفاده شده است، با این حال سویه های مقاوم به نقره نیز گزارش شده است(۱۵-۲،۸،۱۰،۱۲).

آنتی بیوتیک های موثر بر سودوموناس آئروجینوزا عبارتند از: بتالاکتام ها(مهارکننده سنتز دیواره)، برخی از سفالوسپورین های قارچی نسل سوم و چهارم، کرباپنم هایی مانند ایمی پنم و آمینوگلیکوزیدها که با اتصال به زیر واحد ۲۶s ریبوزوم، از اتصال EF-G ممانعت می نمایند(۱۶). مشکل دیگر که در رابطه با سودوموناس آئروجینوزا مطرح است، عدم پاسخ بسیاری از سویه های این باکتری در مقابل آنتی بیوتیک های یاد شده است. چنین به نظر می رسد که علی رغم این که این سویه ها در برابر برخی از آنتی بیوتیک ها در آزمایشگاه حساسیت نشان می دهند، اما در داخل بدن نسبت به آن ها مقاومت می کنند. این پدیده در مورد آنتی بیوتیک های گروه آمینوگلیکوزید تا حدی قابل توجیه است، زیرا این آنتی بیوتیک ها در بافت های بدن و در مقابل کاتیون های دو ظرفیتی یونیزه شده و از طرفی به راحتی قادر به نفوذ در بافت های بدن می باشند. به علاوه لایه پلی ساکاریدی گلیکوکالیکس سودوموناس آئروجینوزا در اثر کاتیون های دو ظرفیتی موجود در بافت های بدن به سرعت به ژل تبدیل شده و میکروکلنی هایی از باکتری را تشکیل می دهند که اطراف این میکروکلنی ها را مواد پلی ساکاریدی گلیکوکالیکس در بر می گیرد. این مواد همانند سدی در برابر ورود ملکول های باردار برخی از آنتی بیوتیک ها به درون سلول باکتری عمل می کنند(۱۳،۱۵،۱۷،۱۸-۱۰). هم چنین استفاده روزافزون و خودسرانه آنتی بیوتیک ها منجر به سازگار شدن ارگانیسم های پاتوژن از طریق به کارگیری مکانیسم های دفاعی در جهت حفظ حیات و بالاخره پیدایش مقاومت های باکتریایی پیچیده و متنوع گردیده است. برخی از این مقاومت ها در کروموزوم و برخی دیگر توسط DNA خارج کروموزومی نظیر پلاسمید ایجاد می شوند. در صورتی که فاکتورهای انتقال(Transfer-factors) وجود داشته باشند، این مکانیسم ها می توانند از یک باکتری به باکتری دیگر و شاید هم از یک گونه به گونه دیگر انتقال پیدا کنند(۱۶). سودوموناس آئروجینوزا به دلیل تعداد ۵۵۶۷ ژن و ظرفیت ژنتیکی بالای ۶/۲۶ M pb ارگانیسمی است که به راحتی می تواند نسبت به تغییرات محیطی ذیل پاسخ داده و سازگار باشد(۱۹):

الف)کاهش نفوذپذیری دیواره سلولی: مقاومت ذاتی آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروجینوزا معمولاً به دلیل نفوذپذیری پایین دیواره سلولی است(۱).

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.159]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 23:13 IRST on Friday December 14th 2018

ب)پمپ های تراوشی: مکانیسم تراوشی آنتی بیوتیک ها که در آن دارو به صورت فعال از دیواره سلولی به بیرون پمپ می‌شود(۱).

ج)تغییر در اهداف آنتی بیوتیک ها: گاهی به علت موتاسیون، ژنوم باکتری ها دچار تغییر شده و در نتیجه باعث خنثی نمودن آنتی بیوتیکی می شود(۲۰).

د)تغییر در ساختار آنتی بیوتیکی قبل از رسیدن به هدف مورد نظر: این روش موثرترین مکانیسم مقاومت، دو دسته اند: دسته اول شامل ترشح آنزیم هایی از باکتری که منجر به هیدرولیز و تجزیه آنتی بیوتیک ها مانند β لاکتام ها می گردد. اما دسته دوم واکنش هایی هستند که با جایگزینی گروه های شیمیایی مانند استیل، فسفریل و ادنیل در ساختمان آنتی بیوتیک هایی مانند نئومایسین و کانامایسین و جنتامیسین. و کلرآمفنیکل، مقاومت ایجاد می نمایند(۱،۲۱،۲۲).

ه)تولید بیوفیلم و ایجاد مقاومت: سلول های سودوموناس آئروجینوزا می توانند با ایجاد بیوفیلم و محصور شدن در آلژینات محافظت جمعیت باکتری در برابر حداقل قسمتی از سیستم ایمنی و نیز ایجاد سد در برابر فاگوسیتوز نمایند(۲۶-۲۳).

و)انواع مقاومت ژنتیکی در برابر آنتی بیوتیک ها: ژن های مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها می تواند بر اثر کروموزومی، پلاسمیدی و یا ترانسپوزونی باشند. هر گونه تغییر بر روی کروموزوم شامل جهش می تواند منجر به مقاومت شوند. پلاسمیدها نیز به عنوان عناصر ژنتیکی مستقل از کروموزوم باکتریایی می توانند حامل ژن های مقاومت باشند. ترانسپوزون ها نیز توالی های DNA متحرکی هستند که قابل انتقال بین ملکول های DNA دهنده و گیرنده می باشند. اینتگرون ها نیز از عناصر ژنتیکی متحرکی هستند که قادرند ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک ها را به وسیله آنزیم اینتگراز که در قسمت َ۵ آن ها کد می شود به ترنسپوزون ها و پلاسمیدهای R انتقال دهند(۲۹-۲۷).

یکی از مراحل مهم درمان بیماران مبتلا به عفونت های سودوموناسی سنجش مقاومت آنتی بیوتیکی(Antimicrobial susceptibity testing) آن ها است که از روش های زیر استفاده می شود:

روش انتشار در آگار(disc diffusion): در این روش طبق دستور CLCI قطر هاله عدم رشد بیانگر مقاومت یا حساسیت باکتری است.

روش تعیین میزان(MIC): که سنجش میزان حداقل غلظت آنتی بیوتیکی ممانعت کننده از رشد باکتری(بر اساس کدورت ناشی از رشد باکتری) انجام می شود و اولین چاهکی که رشد باکتری در آن دیده نمی شود به عنوان MIC آن و انتخاب داروی مناسب علیه باکتری منظور می گردد(۳۰).

روش مولکولی PCR: از تکنیک PCR با استفاده از ژنوم تخلیص شده از باکتری و پرایمرهای اختصاصی برای ژن های IMP, VIM, SPM, GIM، جهت بررسی ژن های متالوبتالاکتاماز نیز را می توان استفاده نمود(۳۱).

اهمیت مطالعه بر روی این آنزیم ها، میزان شیوع، شناسایی و تشخیص سریع آن ها در بین نمونه های کلینیکی جهت کنترل و جلوگیری از گسترش آن ها را دو چندان می کند. بدین منظور مطالعه حاضر با هدف بررسی و جداسازی سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک های بتالاکتام و ایمی پنم در نمونه های کلینیکی جدا شده از چهار بیمارستان بزرگ تهران انجام گردید.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی از ۶۰۰ نمونه کلینیکی مختلفی که در عرض ۲ سال از بیماران بستری و یا مراجعه کننده به بیمارستان بقیه الله(عج)، بیمارستان سوانح و سوختگی شهید مطهری، مرکز طبی کودکان و مجتمع بیمارستانی امام خمینی جمع آوری شده و به وسیله تست های بیوشیمیایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شد و جهت انجام آزمایشات بعدی به محیط نگهدارنده و هم چنین نگهداری شده به صورت لیوفیلیزه در ۸۰- درجه سانتی گراد استفاده گردید(جدول شماره ۱).

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.159]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 23:13 IRST on Friday December 14th 2018

جدول شماره ۱. توزیع فراوانی نسبی نمونه های کلینیکی

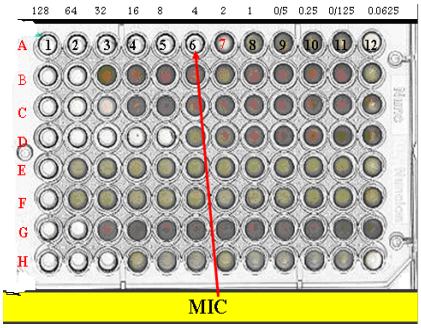
نمونه	تعداد	درصد فراوانی
ادرار	۱۴۴	۲۴
خلط	۱۸	۳
سیستیک فیبروز	۵	۰/۸۳
مایع مغزی نخاعی	۱	۱/۷
چشم	۱۴	۲/۳
گوش	۸	۱/۳
تراشه	۱۳۴	۲۲/۳
مدفوع	۴۱	۶/۸
خون	۲۵	۴/۱۷
زخم	۹۵	۱۵/۸
سایر موارد	۱۱۵	۱۹/۱۷
جمع	۶۰۰	۱۰۰

جهت بررسی اولیه مقاومت باکتری های جدا شده (۶۰۰ سویه) از روش دیسک دیفیوژن و با استفاده از آنتی بیوتیک های آمیکاسین(AN) و کربنی سیلین(CB)، سفوتاکسیم(CTX)، سفتازیدیم(CAZ)، سفتریاکسون(CRO)، سیپروفلوکسازین(CIP)، ایمی پنم(IPM)، پی یراسیلین(PC)، پی یراسیلین-تازوباکتام(PT)، جنتامیسین(GM)، و تتراسیکلین(Te)، متعلق به شرکت BBL استفاده گردید. تست(Minimum Inhibitory Concentration) MIC باکتری های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک سفتازیدیم و ایمی پنم با استفاده از روش Microdilution Tube و پروتوکل CSLI مورد بررسی قرار گرفتند(۳۲). از باکتری سودوموناس آئروجینوزای استاندارد ATCC=27853 به عنوان کنترل مثبت نیز استفاده گردید.

در این مرحله سویه هایی که با استفاده از روش دیسک دیفیوژن نسبت به ایمی پنم مقاوم و یا حد واسط تشخیص داده شده اند و قطر هاله عدم رشد آن ها کمتر یا مساوی ۱۵ میلی متر بود، برای تعیین MIC ایمی پنم مورد مطالعه قرار گرفت. محیط کشت مورد استفاده در این تست مولر هینتون براث حاوی کاتیون های ۲ ظرفیتی Ca^{++}، Mg^{++} بود که برای رشد بسیاری از باکتری های پاتوژن مناسب است ولی غلظت این کاتیون ها در محیط پائین است(۳۲).

جهت انجام این تست، سوسپانسیون میکروبی و آنتی بیوتیکی تهیه و سپس در میکروپلیت تلقیح انجام شد. از رقت های پائین آنتی بیوتیک به سمت رقت های بالا، اولین رقتی از آنتی بیوتیکی که باعث توقف رشد باکتری شده به عنوان MIC یعنی کمترین غلظت مهارکنندگی آن باکتری تلقی می گردد.

غلظت آنتی بیوتیکی به ترتیب ۱۲۸ µg/ m L- ۶۴-۳۲-۱۶-۸-۴-۲-۱-۰/۵-۰/۲۵-۰/۱۲۵-۰/۶۲۵ است(تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱. انجام تست MIC در میکروپلیت با غلظت های متفاوت آنتی بیوتیک

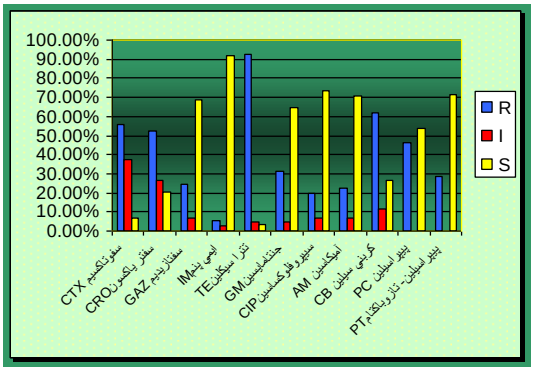
[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.159]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 23:13 IRST on Friday December 14th 2018

یافته های پژوهش

در این مطالعه تحلیلی-توصیفی پس از بررسی و تایید ۶۰۰ سویه باکتری سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از نمونه های کلینیکی به وسیله تست های بیوشیمیایی استاندارد، مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از آنتی بیوگرام این نمونه های ایزوله نشان داد که ۳۱ درصد مقاوم به جنتامیسین(GM)، ۱۹/۵ درصد مقاوم به سیپروفلوکسازین(CIP)، ۲۲/۶ درصد مقاوم به آمیکاسین(AN) و ۶۱/۷ درصد مقاوم به کربنی سیلین(CB) بودند که بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک تتراسایکلین با ۹۲/۲ درصد و کمترین میزان مقاومت مربوط به ایمی پنم(IPM) با ۵/۴ درصد می باشد(جدول شماره ۲)(نمودار شماره ۱).

جدول شماره ۲. درصد نسبی مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی ۶۰۰ سویه سودوموناس آئروجینوزای مورد مطالعه

نوع آنتی بیوتیک مورد تست	تعداد و درصد سویه های مقاوم	تعداد و درصد سویه های نسبتاً مقاوم	تعداد و درصد سویه های حساس
پیپراسیلین_تازوباکتام PT	۱۷۰ (٪۲۸/۲)	_	۴۳۰ (٪۷۱/۷)
پیپراسیلین PC	۲۷۷ (٪۴۶/۲)	_	۳۲۳ (٪۵۳/۸)
سفوتاکسیم CTX	۳۳۳ (٪۵۵/۵)	۲۲۵ (٪۳۷/۵)	۴۲ (٪۷)
سفتریاکسون CRO	۳۱۶ (٪۵۲/۷)	۱۶ (٪۲۶/۷)	۱۲۴ (٪۲۰/۶)
سفتازیدیم CAZ	۱۴۸ (٪۲۴/۶)	۴۱ (٪۶/۹)	۴۱۱ (٪۶۸/۵)
ایمی پنم IMP	۳۲ (٪۵/۴)	۱۴ (٪۲/۴)	۵۵۲ (٪۹۲)
تتراسیکلین TE	۱۷۰ (٪۹۲/۲)	۲۸ (٪۴/۷)	۱۸ (٪۳/۱)
جنتامایسین GM	۱۸۶ (٪۳۱)	۲۷ (٪۴/۵)	۳۸۷ (٪۶۴/۵)
سیپروفلوکسازین CIP	۱۱۷ (٪۱۹/۵)	۴۱ (٪۶/۷)	۴۴۲ (٪۷۳/۸)
آمیکاسین AN	۱۳۵ (٪۲۲/۶)	۴۱ (٪۶/۷)	۲۴۲ (٪۷۰/۷)
کربنی سیلین CB	۳۷۰ (٪۶۱/۷)	۷۰ (٪۱۱/۸)	۱۵۹ (٪۲۶/۵)



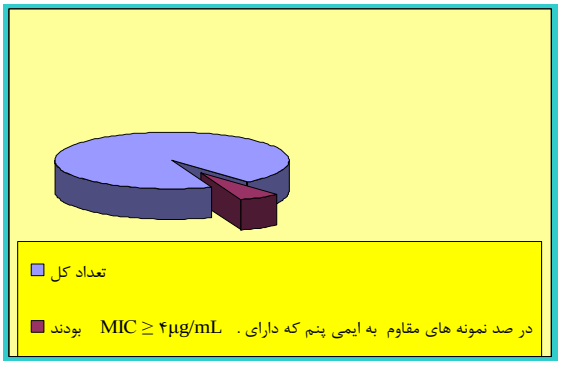
نمودار شماره ۱. درصد فراوانی نسبی مقاومت، مقاومت نسبی و حساسیت ۶۰۰ سویه مورد مطالعه نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف

نتایج MIC سوش های ایزوله شده نسبت به سفتازیدیم نشان داد که ۲۳۷ مورد یعنی ۳۹/۵ درصد از نمونه ها دارای MIC مساوی و یا بالاتر از ۱۶ میکروگرم در هر میلی لیتر(MIC≥۱۶μg/ml) می باشند(نمودار شماره ۲).

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.159]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 23:13 IRST on Friday December 14th 2018

نمودار شماره ۲. درصد نمونه های مقاوم به سفتازیدیم

در حالی که ۶ درصد از سویه های ایزوله شده در این مطالعه دارای MIC مساوی و یا بالاتر از ۴ میکروگرم در هر میلی لیتر(MIC≥۴ µ g/ml) نسبت به ایمی پنم بودند(نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳. درصد نمونه های مقاوم به ایمی پنم

در این بررسی ۳ نمونه مربوط به بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس بوده که هیچ سویه مقاوم به ایمی پنم و سفتازیدیم در بین این نمونه ها مشاهده نشد. هم چنین در این مطالعه بیشترین نمونه های جدا شده مقاوم به ایمی پنم، مربوط به نمونه های سوختگی جدا شده از بیمارستان سوانح سوختگی مطهری و سپس نمونه های کلینیکی مربوط به بیمارستان امام خمینی مشاهده گردید.

بحث و نتیجه گیری

باکتری های گرم منفی مقاوم به کربوپنم از قبیل سودوموناس آئروجینوزا مشکلات زیادی را در درمان عفونت های ناشی از این باکتری ایجاد کرده اند. باکتری سودوموناس باکتری فرصت طلبی است که می تواند عفونت های مختلفی را در انسان ایجاد کند و این باکتری جزء مقاوم ترین باکتری ها بوده که از مکانیزم های مختلفی جهت مقاوم شدن آنتی بیوتیک ها استفاده می کنند، از جمله این مکانیزم ها efflux pumps (پمپ های خارج کننده دارو) و تغییر در نفوذپذیری غشاء و... می باشد. شایع ترین مکانیسم های مقاومت کربوپنما در سودوموناس آئروجینوزا به دلیل کاهش نفوذپذیری دارو و تولید بتالاکتامازهای هیدرولیزکننده کربوپنما می باشد. سودوموناس آئروجینوزا تولیدکننده متالوبتالاکتاماز اولین بار از ژاپن در سال ۱۹۸۸ گزارش شد و پس از آن از نواحی مختلف دنیا شامل آسیا، اروپا، استرالیا، آمریکای شمالی دیده شد. متالوبتالاکتامازها آنزیم هایی هستند که توسط کروموزم ها و یا پلاسمیدها کد می گردند. آنزیم های متالوبتالاکتاماز بر اساس ساختمان مولکولی به چهار گروه با نام های GIM، SPM، VIM، IMP تقسیم می شوند(۳۳).

در این مطالعه از ۶۰۰ سویه کلینیکی سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از ۴ بیمارستان تهران، ۵/۴ درصد

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.159]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 23:13 IRST on Friday December 14th 2018

نسبت به ایمی پنم و ۲۴/۶ درصد نسبت به سفتازیدیم مقاومت نشان دادند. از جمله آنتی بیوتیک های بتالاکتام که آنزیم های Extended- (ESBLS) Spectrum -Beta- Lactamases بر روی آن ها اثر می گذارند، آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفتری آکسون می باشند، که میزان مقاومت نسبت به این دو آنتی بیوتیک در این مطالعه بالا(۵۲ درصد و ۵۵ درصد) و تقریباً یکسان بودند. هم چنین میزان مقاومت نسبت به پی پراسیلین در این مطالعه ۴۶ درصد می باشد اما میزان مقاومت نسبت به پی پیراسیلین–تازوباکتام تقریباً به نصف آن(۲۸ درصد) کاهش پیدا کرده است. با توجه به این که تازوباکتام یک مهارکننده بتالاکتاماز می باشد، می توانیم نتیجه بگیریم که یکی از دلایل مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک به علت ترشح آنزیم Extended-spectrum-β-lactamase می باشد. دکتر اصغر حبیبی و همکاران(۲۰۱۵) گزارش نمودند که از ۲۵۰ نمونه بیمارستانی عفونت ادراری جدا شده ۳/۲ درصد آن ها سودوموناس آئروجینوزا بوده که حدود ۱۳ درصد آن ها مقاوم به ایمی پنم می باشند(۳۴). دکتر منصور صدیقی(۲۰۱۵) در مطالعه خود مشاهده نمود که از ۹۶ نمونه بیمارستانی چدا شده در اصفهان ۳۵/۴ درصد به ایمی پنم مقاومت دارند و MIC آن ها بالای ۳۲ میکروگرم در هر سی سی می باشد(۳۵). دکتر فرج زاده(۲۰۱۴) نیز گزارش نمود از میان نمونه های سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از بیمارستان های اهواز، ۵۸ درصد آن ها مقاوم به ایمی پنم و از میان آن ها ۴۴ درصد مقاومت هم زمان به چند آنتی بیوتیک داشتند(۳۶). دکتر رمضان رجب نیا (۲۰۱۴) گزارش نمود که از ۵۰ نمونه سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از بیمارستان های بابل ۳۶ درصد مقاوم به ایمی پنم و با تست PCR نشان داد که ۱۸ درصد از آن ها واجد ژن VIM_1 هستند و تمام(۱۰۰ درصد) آن ها تولیدکننده متالوبتالاکتاماز بوده و دارای قدرت مقاومت چند آنتی بیوتیکی از جمله ایمی پنم هستند(۳۷). دکتر آنیل چاندرا و همکاران(۲۰۱۵) نیز نشان دادند که از ۱۲۰ نمونه سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از بیمارستان سینامانگال کشور نپال همگی مقاوم به ایمی پنم بوده و حدود ۲۱ درصد از آن ها مقاومت هم زمان به چند آنتی بیوتیک آمیکاسین، سیپروفلاکسسین و ایمی پنم دارند(۳۸). دکتر عربستانی و همکاران(۲۰۱۵) گزارش نمودند که در مطالعه بیان ژن های پمپ کننده در سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از نمونه های کلینیکی با استفاده از qRT-PCR، از بین ۸ آنتی بیوتیک انتخاب شده بیشترین مقاومت با ۶۱/۲ درصد مربوط به لووفلوکسسین کمترین مقاومت مربوط به ایمی پنم است(۳۹). هم چنین در مطالعات دیگر در کانادا میزان مقاومت نسبت به ایمی پنم ۱۴/۴ درصد گزارش شده که در این مطالعه میزان مقاومت به ایمی پنم ۵/۴ درصد مشاهده شد(۳۳،۴۰). مقایسه نتایج به دست آمده در این مطالعه با مطالعات قبلی بر روی باکتری سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از بیماران سوختگی در ایران که توسط دکتر شاهچراغی و همکاران انجام شده(۸–۶) نشان می دهد که میزان مقاومت این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف از سوش های جدا شده از بیماران سوختگی بسیار بالاتر می باشد، به عنوان مثال در رابطه با سفتازیدیم در مطالعه قبلی میزان مقاومت بیش از ۹۵ درصد گزارش گردید، در صورتی که در این مطالعه مقاومت سویه های جدا شده از بیمارستان های مهم تهران نسبت به سفتازیدیم ۲۴/۶ درصد مشاهده شد. در یک نتیجه گیری کلی از این مطالعه باید اذعان داشت که از آن جایی که ایمی پنم آنتی بیوتیکی است که در کشور ما جزء آنتی بیوتیک های صرفاً بیمارستانی به شمار می رود و به راحتی در دسترس مردم قرار نمی گیرد و مصرف آن پایین می باشد، به همین علت میزان مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک در کشور ایران به کشورهای دیگر پایین تر می باشد.

بنا بر این ضرورت دارد که جامعه پزشکی کشور با تجویز مناسب و به جای آنتی بیوتیک های موثر مانع از ایجاد و یا گسترش سویه های مقاوم این باکتری و دیگر باکتری های گرم منفی به سفتازیدیم و ایمی پنم شوند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات و همکاری دلسوزانه کارشناسان آزمایشگاه میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران تشکر و قدردانی می گردد.

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.159]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 23:13 IRST on Friday December 14th 2018

References

1. Otton LM, Silvacampos M, Meneghetti KL, Corçao G. Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in Pseudomonas strains. Arch Microbiol2017;2: 15.
2. Johanson LS. Integrating global health concepts into study abroad curricula. Nursing 2017;47:17-8.
3.Milstein JB, Gellin BG, Kane M, di Fabio JL, Homma A. Global DTP manufacturing capacity and capability. Status report. Vaccine 1995; 14: 313-320
4.Mueller JH. A simplified formula for diphtheria toxin broth. J Immun1939; 37:103-12.
5.Edwards DC. The growth and toxin production of Corynebacterium diphtheriae in submerged culture. J Gen Microbiol1960:22:698-704.
6.Righelato RC, Vanhemert PA. Growth and toxin synthesis in batch and chemostat cultures of Corynebacterium diphtheria. J Gen Microbiol1969:58:403-10.
7.Pope CG, Muriel F. Purification of diphtheria toxoid. J Bacteriol1975;139:61-4.
8.Mitamura T, Higashiyama S, Taniguchi N, Klagsbrun M, Mekada E. Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. J Biol Chem 1995 20; 270:1015-9.
9.Kasauli H P. Manual for the production and standardization of Diphtheria pertussis-tetanus vaccine. Cent Res Ins India J1989; 22:131-8.
10.Agarwal M, Sahoo AK, Bose B. Receptor-mediated enhanced cellular delivery of nanoparticles using recombinant receptor binding domain of Diphtheria toxin. Mol Pharm2017; 14:23-30.
11.Sundaran B, Rao Y. Udaya bhaskara boopathy ratnam process optimization for enhanced production of diphtheria toxin by submerged cultivation of Diphtheria. Biosci Bioengin2001; 91: 123-8.
12.Prenetablanc R, Rigsby P, Wilhelmsen ES, Tierney R, Brierley M, Sesardic D. Calibration of replacement international standards of diphtheria and tetanus toxoids for use in flocculation test. Biologicals2008;36:315-26.
13.Seamer PA. Estimation of microgram quantities of iron in culture medium using bathophenanthroline. Nature1959; 184: 636-7.
14.Laemmli UIL. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature1970; 227: 680-5.
15.Niclas R. Development of new oral vaccine against Diphtheria and the study of its immunogenicity in Mouse and Man. Acta Uni J2004;6:23-8.
16.Majorbrown HC. Further observations on the standardization of bacterial suspensions. Ind J Med Res 1919; 7: 238-50.
17.Ramon G. Flocculation test for assaying toxin, toxoid and antitoxin. Compt Rend Soc Biol 1922; 86:711-2.
18.Tasman A, Braod wijk AC. Experiments on metabolism with diphtheria. J Infect Dis1938; 63:10-20.
19.Pappenheimer AM, Johnson SJ. Studies in diphtheria production I. The effect of iron and copper. Br J Exp Path 1936;17:335-41.
20.Mueller JH, Pauline AM. Production of diphtheria toxin of high potency oh a reproducible medium. J Immunol1941; 48: 21-32.
21.Stainer DW. Separation of Bovine sensitizing material from papain digest of beef broth. Can J Microbiol1967; 13: 1001-8.
22.Taghavimoghadam A, Afsharpad K. Application of fermentor technology in production of diphtheria toxin. Jundishapur J Microbiol2008; 1: 24-7.
23.Tchorbanov AL, Dimtrov JD, Vassilev TL. Optimization of casein based semi synthetic medium for growing of toxigenic Corynbacterium diphtheria in fermentor. Canadian J Microbial2004;50:821-6.
24.Karin L, Pascal D, Michel LO, Cecile FR, Frederic D, Evelyne L, et al. Towards a recombinant vaccine against diphtheria toxin. Infect Immun1998; 66:418-23.
25.Eliane N, Miyajirogerio P. Nascimento, Rugimar M, Denise S, Isaias R, et al. Induction of neutralizing antibodies against diphtheria toxin by priming with recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing CRM_{197}, a mutant diphtheria toxin. Infect Immun2001; 69: 869-74.

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.159]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 23:13 IRST on Friday December 14th 2018

26. Abulmagd S, Emara M, Aziz S, Eldomany R. Evaluation and characterisation of A and B fragments of Corynebacterium diphtheriae toxin towards recombinant diphtheria vaccine. Indian J Med Microbiol2013;31:3-9.

27.Kingston HG, Mills A. A mucosal vaccine against diphtheria formulation of cross reacting material CRM_{197} of diphtheria toxin with chitosan enhances local and systemic antibody and Th2 responses following nasal delivery . Vaccine 2001;19:1188-98.

28.Rusel D, Sambrook J. Molecular cloning a laboratory Manual. 3th ed. New York Cold Spring Harbor Laboratory Publication. 2001;P.232.

29.Pappenheimer A. Diphtheria toxin. Ann Rev Biochem1977;46:69 -94.

30. Kamiya H, Cho BH, Messonnier ML, Clark TA, Liang JL. Impact and cost-effectiveness of a second tetanus toxoid reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine dose to prevent pertussis in the United States. Vaccine2016 4;34:1832-8.

31. WHO. Expert committee on biological standardization.1981; 659: 16-9.

32.Jonathan W. Francisrobert H, Brown J, Dayse F, Mary P, Orlando C. Enhancement of diphtheria toxin potency by replacement of the receptor binding domain with tetanus toxin C-fragment a potential vector for delivering heterologous proteins to neurons. J Neurochem2000; 74:2528- 36.

33.Mykola V, Alexander K, Paul K, Onkar S, Yevgen O, Posokhov R, et al. Conformational switching of the diphtheria toxin t domain. J Mol Bio 2010; 402: 1-7.

34.Efstratiou A, Roure C. The European laboratory working group on diphtheria a global microbiogic network. J Infect Dis2000;181:146-51.

35.Habibi MA, Honarmand R. Profile of virulence factors in the multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa strains of human urinary tract infections. Iran Red Crescent Med J2015;17:26095.

36.Sedighi M, Hasanzadeh A, Safiri S, Syedi N, Mostafaei Sh, Faghri J. Detection of blaSPM-1 Metallo-β-Lactamase Gene in Imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa strains isolated from hospitalized patients in Isfahan Hospitals. J Arch Mil Med2015; 3:26977.

37.Farajzadehsheikh A, Rostami S, Jolodar A, Tabatabaiefar MA, Khorvash F, Saki A, et al. Detection of metallo-beta lactamases among carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa. Jundishapur J Microbiol2014;7:12289.

38.Rajabnia R, Asgharpour F, Moulana Z. Imipenem resistant Pseudomonas aeruginosa strains carrying VIM-TYPE metallo-beta-lactamases isolated from intensive care unit Shahid Beheshti hospital North of Iran. Res Mol Med 2015; 3: 26-31.

39.Anil C, Shahid RM. Antimicrobial susceptibility patterns of pseudomonas aeruginosa clinical isolates at a tertiary care hospital in Kathmandu Nepal. Asian J Pharm Clin Res 2013; 6:235-8.

40.Arabestani M R, Rajabpour M, Yousefimashouf R, Alikhani MY, Mousavi SM. Expression of efflux pump MexAB-OprM and OprD of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical samples using qRT-PCR. Arch Iranian Med 2015; 18: 102-8.

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.159]

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 23:13 IRST on Friday December 14th 2018

Isolation and Identification of Strains of Imipenem Resistant Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated in Clinical Samples from 4 Major Hospitals of Tehran Using MIC Method

Bagheri O[1], Olad G[2], Shahecheraghi F[3], Sarvari R[4]*

(Received: November 3, 2015 Accepted: October 22, 2016)

Abstract

Introduction: Pseudomonas aeruginosa is a major agent of hospital infection which has a resistance intrinsic to a wide range of Antibiotics. It is resistant to beta-lactam antibiotics because of Beta-lactamase and Metalo-lactamase enzymes production. They have crucial problems in the treatment. The goal of this research is to isolate and characterize strains which are resistant to beta-lactam and Imipenem Antibiotics in clinical samples from four major hospitals in Tehran.

Methods & methods: In this study 600 samples of Pseudomonas aeruginosa were collected from patients and those people referring to Baqyiatallah hospital , Imam Khomeini hospital , Shahid Motahari Burns Center and Pediatrics Center during two years, In the first step Antibacterial resistance were prefer by wide range of Antibiotics (Kirby-Bauar). The MIC test was used to Ceftazidime and Imipenem by Microdiution tube and CLSI protocol.

Findings: This research demonstrated that the highest sensitivity of bacteria is to Imipenem (92%) and Tetracycline (91.2%) The results showed that 6 % of the MIC of strains are resistant to imipenem (4µg/ml≤ MIC) and the 39/5 % of them are resistant to Ceftazidime (16µg/ml ≤ MIC), respectively.

Discussion & conclusions: These results showed that consumption of these Antibiotics should be used precisely due to the highest resistance of these bacteria to Imipenem and third generation Cephalosporin's otherwise it can transfer to other strains Gram-Negative bacteria special.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, Imipenem, Antimicrobial resistance, MIC

1. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Applied Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Dept of Microbiology, Pasteur Institute ,Tehran, Iran
4. Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
** Correspondin author Email: R_Sorouri@yahoo.com*