مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۰، شماره۸، آبان ۱۳۹۴(شماره پی در پی۱۰۳)

تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* ایجادکننده عفونت‌ها در بیمارستان شهید فقیهی شیراز و شناسایی سویه‌های دارای ژن *bla*CTX

زهرا ربانی[۱]، جلال مردانه[۲]

[۱]گروه میکروبیولوژی، پردیس علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران، [۲]گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران.

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۴/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: به دلیل طبیعت منحصر به فرد، توانایی زنده ماندن در محیط‌های مرطوب و مقاومت ذاتی به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌سپتیک‌ها، سودوموناس آئروژینوزا پاتوژن شایع در بیمارستان به ویژه در بخش‌های مراقبت ویژه است. اهداف این مطالعه شناسایی سودوموناس آئروژینوزا دارای ژن bla_{CTX} ایجادکننده عفونت در بیمارستان، تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آنها و بررسی توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف(ESBL) بودند.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های شیراز جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت میکروب‌شناسی کشت داده شدند. باکتری‌های رشد کرده به کمک تست‌های بیوشیمیایی و سیستم API 20NE اختصاصی باکتری‌های غیرتخمیرکننده مورد تایید نهایی قرار گرفتند. بر اساس پروتکل CLSI 2014، به ترتیب از روش‌های استاندارد دیسک دیفیوژن، Combination Disk، تست اصلاح‌شده هاج [MHT] و E-test برای بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی، شناسایی سویه‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، سویه‌های تولید کننده آنزیم کارباپنماز و تعیین MIC ایمی‌پنم استفاده گردید. از روش ملکولی PCR برای شناسایی سویه‌های دارای ژن bla_{CTX} استفاده شد.

یافته‌ها: در این مطالعه ۴۵ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* از نمونه‌های مختلف بالینی ایزوله گشتند. ۱۹ بیمار مرد و ۲۶ مورد آنها زن بودند. ۵۷/۸ درصد سویه‌ها از نمونه خلط ایزوله شدند. مؤثرترین داروها بر روی ایزوله‌ها آمیکاسین و کلیستین بودند به طوری که ۹۷/۸ درصد آنها به این داروها حساسیت نشان دادند. ایزوله‌ها بالاترین مقاومت را به ترتیب به سفوتاکسیم (۹۷/۸ درصد) نشان دادند. تنها ۷۷/۸ درصد سویه‌ها به کارباپنم‌های گروه ۲ (یعنی ایمی‌پنم و مروپنم) پاسخ دادند. همه ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم دارای MIC بیشتر از ۳۲ بودند. ۱۷ سویه به کینولون‌های مورد بررسی (سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین) مقاومت نشان دادند. بر اساس نتایج PCR ۱۵/۵ از ایزوله‌های سودوموناس ژن bla_{CTX} بودند.

نتیجه‌گیری: آنتی‌بیوتیک‌های گروه کارباپنم در ۲۲ درصد عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* مؤثر نیستند و با تجویز بی رویه این داروها میزان مقاومت افزایش خواهد یافت.

واژه‌های کلیدی: عفونت بیمارستانی، *سودوموناس آئروژینوزا*، مقاوم چندداروی، ژن *bla*CTX ، حساسیت آنتی‌بیوتیکی

*نویسنده مسئول: **جلال مردانه**، گناباد، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی.

Email: Jalalmardaneh@yahoo.com

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یکی از پاتوژن‌های فرصت‌طلب مسئول طیفی از بیماری‌های تهاجمی شامل؛ عفونت‌های مجرای ادراری، پنومونی، مننژیت، عفونت‌های پوست و بافت نرم و باکتریمی در بخش‌های مراقبت‌های بهداشتی است(۱). عفونت‌ها خصوصاً در بیماران دارای سیستم ایمنی تضعیف شده از قبیل بیماران نوتروپنیک یا دارای سرطان، می‌تواند شدید باشد. برای چنین عفونت‌هایی درمان ضدمیکروبی ممکن است کار مشکلی باشد، زیرا این باکتری به طور طبیعی به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است و دارای توانایی قابل توجهی در کسب مکانیسم‌های مقاومت بیشتر به کلاس‌های متعدد آنتی‌بیوتیکی حتی در طی دوره‌های درمانی است(۲). در این خصوص عفونت‌های ایجادشونده به وسیله *سودوموناس آئروژینوزا* دارای مقاومت اکتسابی به داروهای بتالاکتام، به عنوان یکی از پرچالش‌ترین اهداف برای درمان ضدمیکروبی مطرح است و مسئول میزان بالایی از شکست‌های درمانی، افزایش مرگ و میر و عوارض و هزینه‌های درمانی می‌گردد(۳).

کارباپنم‌ها از درمان‌های انتخابی برای عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی هستند که به کلاس‌های دیگر آنتی‌بیوتیکی مقاوم هستند. ارتاپنم از جمله کاربا‌پنم‌های گروه ۱ است که در واقع یک آنتی‌بیوتیک غیرسودوموناید و غیر آسینتوباکتر است، در صورتی که کاربا‌پنم‌های گروه ۲ (ایمی‌پنم، مروپنم، دوریپنم) علیه این پاتوژن‌ها فعال هستند. تحقیقات نشان داده که ارتاپنم همانند دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها مؤثر و ایمن است(۴)، با وجود این به دلیل عدم فعالیت علیه باسیل‌های گرم منفی غیرتخمیرکننده سؤالاتی در خصوص اثر استفاده از ارتاپنم بر روی مقاومت به گروه ۲ کاربا‌پنم‌ها و انتخاب باکتری‌هایی که ارتاپنم علیه آنها مؤثر نیست، مطرح است(۵).

آمبلر کلاس B بتالاکتامازها (متالوبتالاکتامازها[MBLs]) و کلاس A بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف(ESBLs) سبب کسب عوامل مقاومت می‌شوند که دارای اثر سوء بالینی بسیار بالایی است. این آنزیم معمولاً به وسیله ژن‌های مرتبط با عناصر ژنتیکی متحرک کد می‌شوند و به دلیل توانایی ویژه آنها در گسترش، یکی از موضوعات نگران‌کننده بزرگ برای شیمی‌درمانی ضدمیکروبی آینده محسوب می‌شوند. ESBLها از قبیل؛ CTX، SHV، TEM، BEL، PER و دیگر بتالاکتامازها به عنوان یک مشکل سلامت ملی ظهور کرده‌اند زیرا این آنزیم‌ها مقاومت به همه سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف را سبب می‌شوند و کارآیی سفتازیدیم که به عنوان یک داروی مهم برای *سودوموناس آئروژینوزا* محسوب می‌شود را تضعیف کرده است(۶ و۳).

ESBLها آنزیم‌هایی هستند که مقاومت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف(ESCs) از قبیل سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم و آزترونام را سبب می‌شوند(۷). وجود بتالاکتامازهای مشابه در تایپ‌های مختلف سویه‌ها، نشان دهنده آن است که

گسترش افقی ژن ممکن است مسئول فراوانی بالای ESBLهای شناسایی شده در این باکتری باشد. این مشاهدات نشان دهنده آن است که گستردگی ESBLها در خانواده انتروباکتریاسیه ممکن است به فراوانی در *سودوموناس آئروژینوزا* دیده شده و به عنوان مخزنی برای گسترش این نوع آنزیم‌ها محسوب شود. روش‌های حاضر شناسایی ESBL برای *سودوموناس آئروژینوزا* تکرارپذیری ندارند و تعداد موارد گزارش شده تولیدکننده‌های ESBL در *سودوموناس آئروژینوزا* معمولا به دلیل سرکوب جهش آنزیم AmpC واسطه‌گری شده از طریق کروموزوم، فراتنظیمی سیستم‌های افلاکس و کاهش تراوایی غشاء خارجی، اندک است(۸). وقوع ESBLها در *سودوموناس آئروژینوزا* در سراسر جهان در حال افزایش بوده و یک تست تکرارپذیر برای شناسایی ESBLها در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* نیاز است که برای استفاده روتین در آزمایشگاه بالینی کاربردی باشد(۹)، از این رو شناسایی ملکولی ژن‌های مقاومت بسیار حائز اهمیت است. علی‌رغم این، داده‌های اپیدمیولوژی گزارش کننده شیوع *سودوموناس آئروژینوزا* تولیدکننده متالوبتالاکتاماز(MBL) و ESBL به صورت پراکنده است، این موضوع به دلیل عدم وجود روش‌های استانداردسازی برای شناسایی فنوتیپی تولید ESBL و MBL است و مشکلات پیچیدگی استفاده از روش‌های بر پایه PCR در آزمایشگاه‌های بالینی روتین است. به منظور فائق آمدن بر این مشکل، تعدادی از تست‌های ملکولی سریع تجاری در حال تولید و تکامل هستند که پاتوژن‌ها و وجود عوامل ژنتیکی مقاومت را شناسایی می‌کنند(۱۰ و۳).

به دلیل طبیعت منحصر به فرد، توانایی زنده ماندن در محیط‌های مرطوب و مقاومت ذاتی به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌سپتیک‌ها، *سودوموناس آئروژینوزا* پاتوژن شایع در بیمارستان به ویژه در بخش‌های مراقبت ویژه است. واضح است که گسترش مقاومت در *سودوموناس آئروژینوزا* چندفاکتوری است که شامل موتاسیون در ژن‌های کدکننده پورین‌ها، پمپ‌های افلاکس، پروتئین‌های متصل‌شونده به پروتئین و بتالاکتامازهای کروموزومی و همه عواملی که در مقاومت به کاربا‌پنم‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون‌ها نقش دارند(۱۱).

افزایش سطح مقاومت دارویی *سودوموناس آئروژینوزا* در نتیجه ظهور مقاومت جدید در ارگانیسم‌های خاص پس از تماس با ترکیب‌های ضدمیکروبی و هم‌چنین گسترش بیمار به بیمار ارگانیسم‌های مقاوم است. تجمع مقاومت پس از در معرض آنتی‌بیوتیک‌های مختلف قرار گرفتن و مقاومت متقاطع ممکن است منجر به ظهور *سودوموناس آئروژینوزا* MDR شود. خطر کسب ارگانیسم‌های مقاوم به چنددارو(MDR) ممکن است مرتبط با فاکتورهای Temporospatial (ذاتی، خصوصیات اکولوژیکی) از قبیل تعداد ناقلین در یک بخش، نسبت پرستار به بیمار و پیچیدگی کنترل عفونت و هم‌چنین فاکتورهای خطر فردی از قبیل؛ خصوصیات بیماران و

رخـــدادهای درون بیمارســـتانی شـــامل درمـــان آنتی‌بیوتیکی باشد(۱۱). در مطالعـه لـویس و همکـاران بـر روی ایزولـه‌هـای انتروباکتریاسـیه تولیدکننـده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف شناسـایی شـده بـه صورت فنوتیپی، ۹۳/۶ درصد سویه‌هـا دارای توانـایی تولید حداقل یکی یا بیشتر ESBL بوده‌اند و شـایع‌تـرین ژن ESBL شناسایی‌شده ژن‌های گروه CTX بوده است. در سال‌های اخیر ESBLهای گروه CTX بـه عنـوان یـک تیپ غالب ESBL در بسیاری از نواحی جهـان از قبیـل؛ ایـالات متحـده آمریکـا، آمریکـای جنـوبی، اروپـا و بخش‌هایی از کانـادا گـزارش شـده اسـت. CTX سـبب بـــروز مقاومـــت بـــه آمینـــوپنی‌ســـیلین‌هـــا، کربوکسـی‌پنـی‌سـیلین‌هـا، یوریـدوپنی‌سـیلین‌هـا و سفالوسـپورین‌هـای وسـیع‌الطیف محـدود مـی‌شـود. سوبسترای ترجیحی CTX سفوتاکسیم است(۱۲).

به منظور شناسایی و رفـع مشـکلات مقاومـت آنتی‌بیوتیکی در بیمارستان‌ها این مطالعه طراحی شـد. اهداف این تحقیق شامل؛ تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزولـه‌هـای *سـودوموناس آئروژینـوزا* ایجادکننـده عفونت‌ها در بیمارستان، شناسایی فنوتیپی ایزوله‌های تولیدکننـده کارباپنمـاز، تعیـین کمتـرین غلظـت مهارکنندگی(MIC) ایمـی‌پـنم در ایزولـه‌هـا و شناسـایی سویه‌های دارای ژن *bla*CTX بودند.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعـی کـه در طـی ۱۰ مـاه از مرداد ۱۳۹۳ تا اردیبهشت سـال ۱۳۹۴ انجـام شـد، ۴۵ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* جمع‌آوری شد. بـدین منظـور نمونـه‌هـای مختلـف(خلـط، ادرار، زخـم، گلـو، پوسـت، خـون، مایعـات بـدن) از بیمـاران بسـتری در بخش‌هـای مختلـف بیمارسـتان شـهید فقیهـی شـیراز (بخش‌های داخلـی، ICU، زنـان، فوریـت‌هـای داخلـی، نورولـوژی) جمـع‌آوری شـدند و بـرای هـر یـک پرسشنامه تنظیم‌شده و کدگـذاری گردیـد. بـر اسـاس اصول اخلاق در پزشکی نمونـه‌گیـری از افـراد مـورد مطالعه پس از مشـخص نمـودن اهـداف تحقیـق بـرای بیماران و کسب رضایت کتبـی آگاهانـه از هـر یـک از آنهـا انجـام شـد. همـه نمونـه‌هـایی کـه بـاکتری *سودوموناس آئروژینوزا* از آنها جدا مـی‌شـدند وارد مطالعه شدند، در مقابل نمونه‌هایی کـه ارگانیسـم‌هـای دیگـر از آنهـا ایزولـه مـی‌گشـتند از مطالعـه خـارج می‌شدند.

نمونـه‌هـای مختلـف گرفتـه شـده از بیمـاران بسـتری، بـر روی محـیط‌هـای کشـت روتـین مـورد استفاده جهت جداسـازی بـاکتری‌هـای در آزمایشـگاه میکروب‌شناسی بالینی شامل محـیط‌هـای بـلاد آگـار، شـکلات آگـار و مـک کـانکی آگـار کشـت انجـام شـد. محیط‌های کشت در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد بـه مـدت ۱۸-۱۶ سـاعت انکوبـه شـدند و از نظـر رشـد باکتری و تشـکیل کلـونی بـر روی محـیط‌هـا بررسـی شـدند. پـس از آن محـیط‌هـا از نظـر هـر گونـه رشـد بررسی شده و کلونی‌های باکتری‌های گـرم منفـی بـه کمک تست‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی اولیه شامل مورفولوژی و رنگ کلونی، رنگ‌آمیزی گرم، اکسـیداز،

کاتالاز، DNase و حرکت مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند. برای تأیید نهایی ایزوله‌ها از سیستم API 20NE اختصاصی باکتری‌های غیرتخمیرکننده استفاده و کد حاصله ثبت شد، آنگاه کد به دست آمده وارد نرم افزار اختصاصی API شده و نام ارگانیسم ثبت گردید.

برای تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* بر اساس پروتکل پیشنهادی سازمان استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI, 2014)(۱۲) با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن وضعیت پاسخ ایزوله‌ها به ۱۶ آنتی‌بیوتیک (Rosco, Danish) پیشنهادی به وسیله CLSI برای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی شد. این آنتی‌بیوتیک‌ها شامل ارتاپنم (ETP، 10µg)، ایمی‌پنم (IMP، 10µg)، مروپنم (MRP، 10µg)، کلیستین (CO، 10µg)، توبرامایسین (TOB، 10µg)، آمیکاسین (AMI، 30µg)، جنتامایسین (GEN، 10µg)، سیپروفلوکساسین (CIPR، 5µg)، نورفلوکساسین (NORFX، 10µg)، پیپراسیلین (PIPRA، 100µg)، پیپراسیلین-تازوباکتام (PI+TZ، 100+10µg)، تیکارسیلین-کلاولانات (TIM، 85µg)، آزترونام (AZT)، سفتازیدیم (CAZ، 30µg)، سفوتاکسیم (CTX، 30µg) و سفپیم(FEP، 30µg) بودند. در این روش با استفاده از نرمال سالین، رقت ۰/۵ مک‌فارلند از باکتری تهیه گردید و کشت بر روی محیط مولرهینتون آگار انجام و پس از انکوباسیون، محیط‌ها در دمای ۲ ± ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت، نتایج ثبت شدند. جهت ارزیابی صحت تست، از سویه *E.coli* ATCC 25922 به عنوان کنترل استفاد شد.

بر اساس پروتکل CLSI 2014 برای شناسایی سویه‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف از روش Combination Disk استفاده شد، در مرحله اول رقت ۰/۵ مک فارلند از باکتری مورد نظر در ۵ میلی‌لیتر محیط براث یا نرمال سالین تهیه گردید. سپس کشت شطرنجی از رقت تهیه‌شده بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام گشت. آنگاه دیسک‌های سفوتاکسیم و سفوتاکسیم- کلاوولانیک و سفتازیدیم و سفتازیدیم - کلاوولانیک با فاصله ۲۴ میلی‌متر (center to center) بر روی پلیت مولر هینتون آگار کشت داده شده، قرار داده شدند. پس از آن انکوباسیون در دمای ۱±۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت صورت گرفت و در پایان پلیت محیط کشت از نظر تشکیل هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت. در صورتی که تفاوت قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف هر دیسک به تنهایی در مقایسه با دیسک ترکیبی خود ۵ میلیمتر یا بیشتر می‌بود به عنوان سویه تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL-positive) در نظر گرفته می‌شد. از سویه *E. coli* ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی استفاده می‌شود.

بر اساس پروتکل پیشنهادی CLSI در سال ۲۰۱۴ از تست اصلاح‌شده هاج (Modified Hodge Test [MHT]) جهت شناسایی سویه‌های تولید کننده آنزیم کارباپنماز استفاده شد(۱۲). تست اصلاح‌شده هاج بر اساس پروتکل زیر انجام گردید، ابتدا از سویه

استاندارد *E. coli* ATCC 25922 با استفاده از نرمال سالین از رقت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سپس با اضافه نمودن ۰/۵ میلی‌لیتر از نیم مک فارلند تهیه شده در مرحله قبل به یک لوله حاوی ۴/۵ میلی‌لیتر نرمال سالین استریل رقت ۱/۱۰ تهیه شد. در مرحله بعد با استفاده از سواب کشت شطرنجی از رقت ۱/۱۰ تهیه شده بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت انجام شد. آنگاه یک دیسک ارتاپنم (10 میکروگرم) در مرکز پلیت مولر هینتون آگار کشت داده شده قرار داده، سپس ارگانیسم مورد بررسی ار نظر توانایی تولید کارباپنماز به صورت یک خط مستقیم از لبه دیسک تا لبه پلیت کشت داده شد و پلیت مولر هینتون در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوبه شدند و پس از این زمان پلیت محیط کشت از نظر تشکیل شکلی شبیه برگ شبدر (Clover Leaf-type) در محل تقاطع ارگانیسم مورد نظر با *E. coli* ATCC 25922 در ناحیه تشکیل حاله بررسی شد و در صورت مشاهده شکل برگ شبدری، مثبت در نظر گرفته شد. در انجام این تست از سویه بالینی کلبسیلا پنومونیه هاج تست مثبت به عنوان کنترل مثبت و از *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 به عنوان کنترل منفی استفاد گردید.

از نوار E-test ایمی‌پنم که حاوی گرادیانت‌های تعریف‌شده مختلف ایمی‌پنم از ۱ تا ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر است جهت تعیین MIC آزمایش استفاده گردید. همه ایزوله‌های کشت داده شده به صورت شبانه تهیه گردیدند، سپس نوارهای Etest ایمی‌پنم بر روی محیط قرار داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوبه گردیدند و با توجه به حاله‌ای که ایجاد می‌شود و پروتکل ارایه شده در خصوص چگونگی تفسیر نتایج، داده‌ها آنالیز گشتند.

برای شناسایی ژن blaCTX ابتدا استخراج DNA از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* تأیید شده، انجام شد. ابتدا بر روی محیط TSA باکتری کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد انکوبه گشتند. سپس با استفاده از روشBoiling (جوشاندن) ژنوم ارگانیسم استخراج گردید. در روش Boiling یک میلی‌لیتر از کشت باکتری رشد کرده به صورت شبانه در محیط TSB در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه در دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شد. مایع رویی بیرون ریخته شده و رسوب حاصله در ۱ میلی‌لیتر TE Buffer (۱۰mM Tris، ۱mM EDTA، pH=۷/۸) حل و مجدداً سانتریفیوژ گردید و سپس رسوب حاصله در ۱۰۰ میکرولیتر TE Buffer حل گشته و میکروتیوب در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد، آنگاه به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ گشت. مایع رویی در میکروتیوب‌های کدگذاری شده ذخیره و به عنوان نمونه DNA در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. قبل از انجام PCR نمونه DNA استخراج شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر و نیز بردن بر روی ژل آگارز

و انجام الکتروفورز و سپس مشاهده باند زیر نور UV، مورد ارزیابی قرار گرفت.

شرایط اندازه محصول (جفت باز) واکنش PCR شامل مرحله واشرست‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد(۵ دقیقه)، واشرست‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، اتصال پرایمرها در دمای ۶۲ (۳۰ ثانیه) و بسط پرایمرها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) بود و یک مرحله بسط نهایی پرایمرها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه اعمال گردید. واکنش PCR در طی ۳۰ سیکل انجام شد. محصول PCR با استفاده از آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و با استفاده از دستگاه ترانسلومیناتور به منظور جستجو باند 544 جفت بازی، مورد آنالیز قرار گرفت. در طی این مطالعه از سویه‌های استاندارد *K.pneumoniae* ATCC 7881 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارSPSS نسخه ۱۹ و آزمون آماری کای دو برای تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها

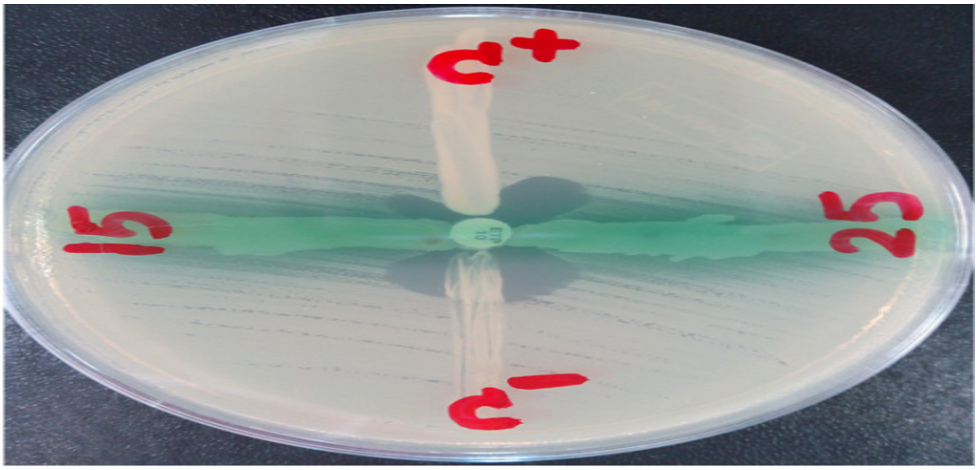
در این مطالعه مقطعی به طور کلی ۴۵ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* از نمونه‌های مختلف بالینی ایزوله گشتند. ۴۲/۲ درصد بیماران مرد و ۵۷/۸ درصد آنها زن بودند. ۵۱/۱ درصد(۲۳ مورد) بیماران در بخش مراقبت‌های ویژه(ICU) بیمارستان بستری بودند. ۵۷/۸ درصد(۲۶ مورد) سویه‌ها از نمونه خلط ایزوله شدند(جدول ۲). آنالیز نتایج تست بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که مؤثرترین داروها بر روی ایزوله‌ها آمیکاسین و کلیستین بودند به طوری که ۹۷/۸ درصد آنها به این داروها حساسیت نشان دادند. ایزوله‌ها بالاترین مقاومت را به ترتیب به سفوتاکسیم (۹۷/۸ درصد) تیکارسیلین- کلاوولانیک اسید (۶۴/۴ درصد) و ارتاپنم (۶۲/۲ درصد) نشان دادند. تنها ۷۷/۸ درصد سویه‌ها به کاربابپنم‌های گروه ۲ (یعنی ایمی‌پنم و مروپنم) پاسخ دادند(نمودار۱، جدول۳).

از نتایج قابل توجه آنکه ۹۷/۸ درصد ایزوله‌ها ESBL مثبت بودند و توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز را داشتند. تفسیر نتایج MIC بر روی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به ایمی‌پنم نشان داد که همه ایزوله‌ها دارای MIC بیشتر از ۳۲ بودند. نتایج بررسی توانایی تولید آنزیم‌های کاربابپنماز به وسیله سویه‌های مقاوم به ایمی‌پنم نشان داد که ۴/۴ درصد ایزوله‌ها این توانایی را دارند و تست هاج همه آنها مثبت بود(شکل ۱).

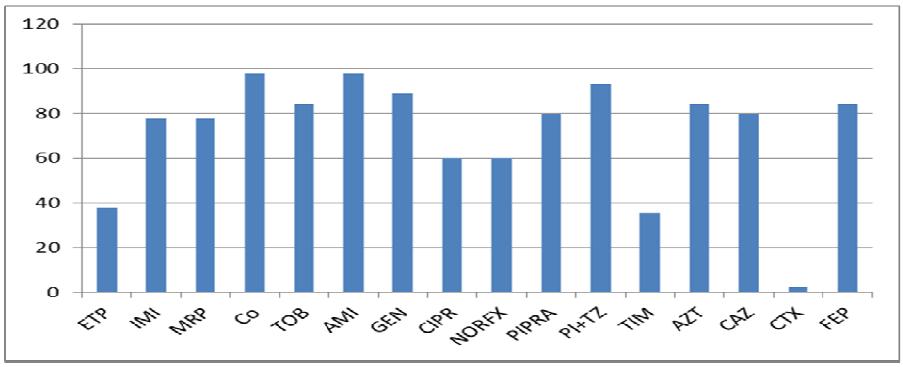
جدول ۱: توالی الگونوکلوئیدی پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی *blaCTX* در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

نام ژن	نام پرایمر	توالی	طول پرایمر(باز)	اندازه محصول (جفت باز)
blaCTX	*blaCTX-F*	5′-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA-3′	۲۳	۵۴۴
	blaCTX-R	5′-CGATATCGTTGGTGGTGCCATA-3′	۲۲	

آنالیز نتایج مقاومت متقاطع نشان داد که ۱۷ سویه (۳۷/۷ درصد) از ۴۵ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* به کینولون‌های مورد بررسی (سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین) مقاوم بودند. بیست درصد سویه‌ها همزمان به کاربا‌پنم‌های گروه ۱ (ارتاپنم) و گروه ۲ (ایمی‌پنم و مروپنم) مقاوم بودند. سه سویه همزمان به داروهای ترکیبی پیپراسیلین ـ تازوباکتام و تیکارسیلین‌ـ کلاوولانیک اسید مقاوم بودند(جدول ۲). نتایج انجام PCR به منظور جستجوی ژن bla_{CTX} در همه ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد که ۱۵/۵ درصد سویه‌ها دارای این ژن هستند(شکل ۲).



شکل ۱: بررسی توانایی تولید آنزیم‌های کاربا‌پنماز با استفاده از Modified Hodge Test (MHT). C^-، کنترل منفی (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)، C^+، کنترل مثبت (سویه بالینی *Klebsiella pneumoniae*)، ۱۵ و ۲۵ (نمونه‌های مقاوم به ایمی‌پنم MHT مثبت *سودوموناس آئروژینوزا*).



ETP, ertapenem; IMI, imipenem; MRP, meropenem; Co, colistin; TOB, tobramycin; AMI, amikacin; GEN, gentamicin; CIPR, ciprofloxacin; NORFX, norfloxacin; PIPRA, piperacillin; PI+TZ, piperacillin-tazobactam; TIM, ticarcillin clavulanic acid; AZT, aztreonam; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; FEP, cefepime.

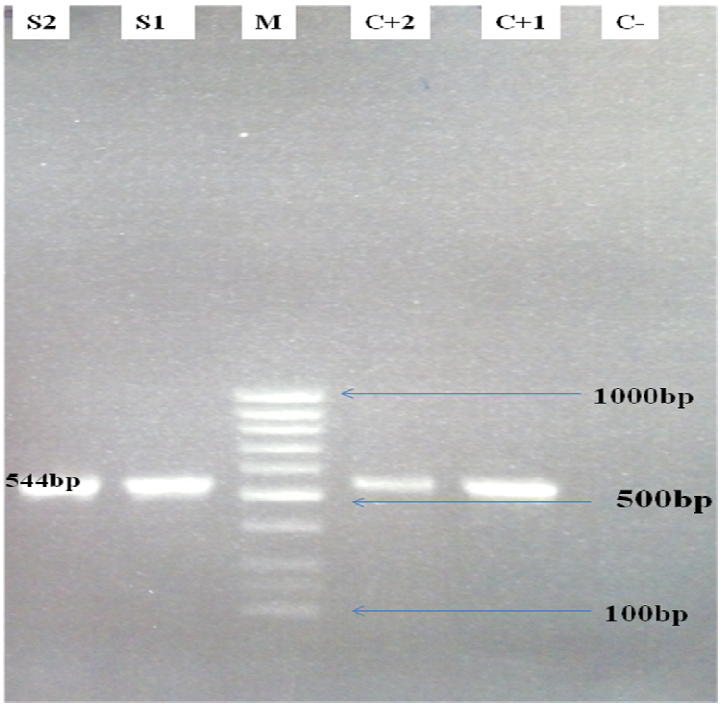
نمودار۲: الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی

جدول ۱: اطلاعات دموگرافیک بیماران

دسته‌بندی	تعداد (درصد)
جنس	
مذکر	۱۹ (۴۲/۲)
مؤنث	۲۶ (۵۷/۸)
بخش بیمارستانی	
داخلی	۵ (۱۱/۱)
ICU	۲۳ (۵۱/۱)
زنان	۱ (۲/۲)
فوریت‌ها	۲ (۴/۴)
پوست	۵ (۱۱/۱)
فوریت‌های داخلی	۷ (۱۵/۶)
نورولوژی	۱ (۲/۲)
اتفاقات	۱ (۲/۲)
نمونه بیماران	
خلط	۲۶ (۵۷/۸)
ادرار	۷ (۱۵/۶)
زخم	۴ (۸/۹)
حلق	۳ (۶/۷)
پوست	۳ (۶/۷)
خون	۱ (۲/۲)
مایعات دیگر	۱ (۲/۲)

جدول ۲. بررسی الگوی مقاومت و Cross-resistance ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

الگو	مقاومت آنتی‌بیوتیکی	تعداد (درصد)
A	سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین	۱۷ (۳۷/۷)
B	ارتاپنم، ایمی‌پنم، مروپنم	۹ (۲۰)
C	سفپیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم	۵ (۱۱/۱)
D	نورفلوکساسین، سفپیم، جنتامایسین	۵ (۱۱/۱)
E	ایمی‌پنم، مروپنم، سفتازیدیم	۴ (۸/۸)
F	سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم، جنتامایسین	۴ (۸/۸)
G	پیپراسیلین، پیپراسیلین+تازوباکتام، تیکارسیلین-کلاوولانیک اسید	۳ (۶/۶)
H	پیپراسیلین+تازوباکتام، تیکارسیلین-کلاوولانیک اسید	۳ (۶/۶)
I	آزترونام، سفتازیدیم، آمیکاسین	۱ (۲/۲)
J	سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم، آمیکاسین	۱ (۲/۲)



شکل ۲: انجام PCR بر روی ژن bla_{CTX} -C: کنترل منفی، C+1: کنترل مثبت شماره ۱ (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 7881)، C+2: کنترل مثبت شماره ۲ (سویه بالینی کلبسیلا پنومونیه)، M: مارکر 100bp، S1 و S2: نمونه‌های مثبت.

بحث

سویه‌هایی از *سودوموناس آئروژینوزا* با مقاومت دارویی وسیع در بسیاری از بیمارستان‌ها ظهور نموده و تهدید کننده جدی سلامت ملی می‌باشند. انتخاب‌های دارویی برای عفونت‌های ناشی از این میکروارگانیسم‌های مقاوم محدود می‌شود. در نتیجه پدید آمدن این سویه‌های مقاوم در عفونت‌های بیمارستانی همراه با افزایش مرگ و میر و طولانی شدن زمان بستری بیمار می‌گردد. عفونت ناشی از این سویه‌های همراه با مرگ و میر بالا یعنی در حدود ۳۷ درصد می‌باشد(۱۴). هنگامی که سویه‌ها مقاومت اکتسابی یا ناشی از جهش چندگانه دارند درمان انتخابی اغلب مشکل است به ویژه این که اغلب پزشکان ترجیح می‌دهند از ترکیب‌های درمانی دارای اثر سینرژیستیک برای درمان عفونت‌های سودومونایی شدید استفاده کنند(۱۵).

آنالیز نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از بین آنتی‌بیوتیک‌های کلاس بتالاکتام ایزوله‌های *سودوموناس* بیشترین حساسیت را به ترتیب؛ پیپراسیلین ـ تازوباکتام(۹۳/۳درصد)، سفپیم (۸۴/۴ درصد)، پیپراسیلین(۸۰ درصد)، سفتازیدیم (۸۰ درصد)، ایمی‌پنم (۷۷/۸ درصد)، و مروپنم (۷۷/۸ درصد) نشان دادند. میزان مقاومت به ارتاپنم ۶۲/۲ درصد بود که در حال حاضر این درصد با توجه به عدم استفاده یا استفاده بسیار محدود از ارتاپنم در کشور ما ممکن است میزان پایه مقاومت به ارتاپنم در

کشور ما باشد. جالب آن که ارتاپنم به عنوان یک کارباپنم جدید در گروه ۱ کارباپنم در مقایسه با گروه ۲ کارباپنم‌ها (ایمی‌پنم، مروپنم) اثر بسیار ضعیفی نشان داد، که این نتایج با آنچه در خصوص ارتاپنم مطرح است هم‌خوانی دارد زیرا این دارو به عنوان یک داروی ضدسودوموناس مطرح نیست(۴). در مطالعه حاضر یک مورد مقاومت به کلیستین مشاهده شد (۱۶)، جوهانس و همکاران نیز سویه‌های مقاوم به کلیستین را گزارش داده‌اند که این نشان دهنده آن است که مقاومت به این دارو در حال گسترش است.

حساسیت بیش از ۸۴ درصد ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های گروه آمینوگلیکوزید از نکات امیدبخش در این مطالعه بود که از این میان آمیکاسین (۹۷/۸ درصد حساسیت) بهترین اثر را بر روی سویه‌ها داشت و پس از آن به ترتیب جنتامایسین و توبرامایسین قرار داشتند. در مطالعه‌ای در کشور ترکیه بر روی کل سویه‌های *سودوموناس* آئروژینوزا جدا شده از خون بیماران میزان مقاومت سویه‌ها به آمیکاسین و جنتامایسین به ترتیب؛ ۲۲ و ۳۷ درصد گزارش شده است(۱۷). که همانند نتایج تحقیق حاضر پاسخ سویه‌ها به آمیکاسین بهتر بوده و ایزوله‌ها پاسخ بسیار بهتری به این دو آنتی بیوتیک نشان دادند. هم‌چنین میزان مقاومت در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعه فیریرا و همکاران که میزان حساسیت ایزوله‌های *سودوموناس* به ایمی‌پنم و مروپنم را به ترتیب ۸۸ و ۱۰۰ درصد گزارش کردند که نشان از افزایش مقاومت به کاربا‌پنم‌ها که جزء آخرین خطوط درمانی در درمان این عفونت‌ها هستند، می‌باشد، ولی بر خلاف نتایج مطالعه آنها، سویه‌های ما پاسخ مشابهی به مروپنم و ایمی‌پنم نشان دادند. از نکات جالب توجه مطالعه حاضر این بود که آمینوگلیکوزیدها و سفتازیدیم اثر بهتری بر روی سویه‌ها داشتند که بسیار امیدوارکننده است.

در مطالعه موئه هاریو و همکاران در اندونزی میزان مقاومت ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* را به داروی سیپروفلوکساسین ۲۲/۲ درصد گزارش کرده‌اند (۱۸). در مقابل نتایج حاضر نشان داد که ۴۰ درصد ایزوله‌ها به کینولون‌های مورد بررسی (سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین) مقاوم هستند که نشان از مقاومت بالاتر به این گروه دارویی دارد. در گزارشی از ایران ۶۰ درصد سویه‌های *سودوموناس* جداشده از خون بیماران بستری در بیمارستان به سفتازیدیم حساس بوده‌اند(۱۹) در حالی که در این تحقیق میزان حساسیت به این دارو بالاتر بود (۸۰ درصد حساسیت). در مطالعه‌ای دیگر در ایران بر روی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* MBL مثبت جداشده از بیماران سوختگی گزارش شده که سفتازیدیم مؤثرترین دارو بر علیه این سویه‌ها است(۲۰)، که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد و

نشـان دهنـده آن اسـت کـه ایـن دارو جـزء داروهـای انتخابی در درمان عفونت‌های ناشی از ایـن ارگانیسـم محسوب می‌شود، اگـر چـه میـزان حساسـیت در ایـن مطالعـه بیشـتر اسـت کـه ایـن موضـوع مـی‌توانـد به آن دلیل باشد که مطالعه ما هم بر روی ایزوله‌هـای MBL مثبت و MBL منفی انجام شده است.

در ایـن مطالعـه ۹۷/۸ درصـد ایزولـه‌هـا ESBL مثبت بودند این درصد بالا بسیار نگران کننده است به طوری که اگرچه داروهای برخی از داروهای بتالاکتام در محیط آزمایشـگاه علیـه ایـن ارگانیسـم حساسـیت نشان می‌دهند، اما پس از مصرف بـه وسـیله بیمـار و تحت فشار آنتی‌بیوتیکی بالاتر تولید میزان بیشتری از آنزیم‌هـای مقاومـت مـی‌نماینـد در نتیجـه تجـویز ایـن کلاس آنتی‌بیوتیکی نه تنها به درمان عفونت‌های ناشی از ایـن بـاکتری کمکـی نمـی‌کنـد بلکـه باعـث افـزایش گسـترش مقاومـت در بـین ارگانیسـم‌هـای دیگـر بیمارستانی و در نهایت شکست درمانی مـی‌گـردد. از سوی دیگر روش‌های فنـوتیپی پیشـنهادی بـه وسـیله CLSI به منظور شناسایی سویه‌های ESBL مثبـت بـرای انتروباکتریاسیه توصیه شده است و اگر چـه محققـان بسیاری در تمـام جهـان بـرای شناسـایی سـویه‌هـای تولیدکننده ESBL در بـاکتری غیرتخمیرکننـده از جملـه *سـودوموناس آئروژینـوزا* از ایـن روش اسـتفاده می‌کننـد، امـا در برخـی از مـوارد نتـایج قابـل تفسـیر نیستند.

در مطالعـه حاضـر ۱۵/۶ درصـد ایزولـه‌هـا مقاومـت چنـدداروییMDR) از خـود نشـان دادنـد. در مطالعه کازلی و همکاران با مطالعه بر روی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران مبتلا بـه باکتریمی گزارش کرده‌اند، که ۳۱/۴ درصـد ایزولـه‌هـا MDR هستند. میزان مـرگ و میـر در بـالغین مبـتلا بـه عفونـت MDR از ۲۰ تـا ۷۰ درصـد بسـته بـه بیمـار و فاکتورهای مرتبط با عفونت متغیـر اسـت. در مطالعـه گذشته نگر بر روی بیماران مبتلا به بـاکتریمی ناشـی از *سودوموناس آئروژینـوزا*، ۱۴/۲ درصـد ایزولـه‌هـا مقاومت چندتایی بـه سیپروفلوکساسـین، سـفتازیدیم، ایمی‌پنم، جنتامایسین و پیپراسیلین داشته‌انـد. بیمـاران مبتلا به عفونت MDR بـه طـور واضـحی مـرگ و میـر بالاتری داشته‌اند(۲۱). در مطالعـه الونـاس و همکـاران میزان حساسیت به ایمی‌پنم ۹۹/۱ درصد بـوده و تنهـا یک ایزوله حساسیت متوسط داشته اسـت. حساسـیت به ارتاپنم ۹۲/۸ درصد گزارش شده بـه طـوری کـه ۴ ایزوله (۳/۶ درصـد) مقـاوم و ۴ ایزولـه (۳/۶ درصـد) حساسیت متوسط داشـته‌انـد. همـه ایزولـه‌هـای نیمـه حساس تست Hodge آنهـا مثبـت بـوده اسـت (۲۲). در مطالعه آلوش و همکـاران اغلـب مـوارد *سـودوموناس آئروژینوزا* جداشده MDR (۸۴درصد) از بیماران کسب شده‌اند (۲۳). نتـایج تحقیـق حاضـر نشـان داد کـه ۲۰ درصد ایزوله‌های مقاوم بـه ایمـی‌پـنم، توانـایی تولیـد آنزیم‌های کارباپنماز را دارند که این نشـان از آن دارد

که مقاومت به کاربـاپنم‌هـا در ایزولـه‌هـای مـا در ۸۰ درصد موارد مرتبط با مکانیسم‌هایی غیر از آنزیم‌های کارباپنماز است.

در مطالعه انجام شده بـه وسـیله پورعبـاس و همکاران در ایـران بـر روی بـاکتری‌هـای جداشـده از کشت خون و دیگر مایعـات اسـتریل بـدن، ۹۵ درصـد ایزوله‌های سـودوموناس بـه پیپراسـیلین- تازوباکتـام حساس بوده، ۸۵ درصد بـه ایمـی‌پـنم، ۸۰ درصـد بـه آمیکاسـین و ۷۶ درصـد آنهـا بـه سیپروفلوکساسـین حساسـیت نشـان داده‌انـد کـه در مقایسـه بـا مطالعـه حاضر میزان حساسیت در طی سال‌های اخیـر نسـبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌هـا کـاهش پیـدا کـرده اسـت، بـه طوری که نتایج مطالعه مـا مشـخص نمـود تنهـا ۷۷/۸ درصد سویه‌ها به کاربـاپنم‌های گروه ۲ (یعنی ایمی‌پـنم و مروپنم) پاسخ دادنـد(۲۴). در مطالـه انـوری نـژاد و همکـاران سـفتازیدیم مـؤثرترین آنتـی‌بیوتیـک علیـه ایزوله‌های تولیدکننـده متالوبتالاکتامـاز سـودوموناس آئروژینوزا بوده است(۲۵).

آنزیم‌های کدشونده به وسیله ژن *blaCTX* یـک کلاس مجـزا از ESBLهـا هسـتند و اغلـب سـویه‌هـای حمل‌کننده این ژن مقاوم به چنددارو هستند، به طوری کـه نـه تنهـا بـه بتالاکتـام‌هـا بلکـه بـه کینولـون‌هـا، تری‌متوپریم، تتراسایکلین‌ها و اغلـب آمینوگلیکوزیـدها مقاوم هستند. این موضوع درمان عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها را با مشکل مواجه نموده و بستری شـدن طولانی مدت بیماران را سبب می‌شود(۲۶). در مطالعـه حاضرنتایج PCR نشان داد که ۱۵/۵ درصـد سـویه‌هـا این ژن را با خود دارند. در مطالعه پولوتو و همکـاران بر روی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در برزیل ایزوله‌های دارای ژن *bla*CTX را ۱۹/۶ درصـد گـزارش نموده‌اند (۲۷). در مطالعه جیانگ و همکـاران در چـین ۵۳/۳ درصد سویه‌ها دارای ژن *bla*CTX بـوده‌انـد(۲۸). در مقایسـه بـا ایـن مطالعـه درصـد ایزولـه‌هـای *سودوموناس آئروژینوزا* دارای این ژن بالاتر است که در این خصوص می‌توان چنـین بیـان کـرد کـه ممکـن است ژن‌ها یا مکانیسم‌های دیگر مقاومت در سویه‌های شایع در کشور ما سـبب بـروز مقاومـت شـوند. عـدم همکاری برخی بخش‌ها در جمع‌آوری نمونه، عدم رشد مجـدد برخـی ایزولـه‌هـای ذخیـره‌شـده از جملـه محدودیت‌هایی بود کـه در ایـن مطالعـه بـا آن مواجـه بودیم. با توجه به مشـاهده مشـکل مقاومـت در نتـایج این تحقیق پیشنهاد می‌شود که برنامه جـامع کشـوری مصرف صحیح و به جا آنتی‌بیوتیک برای جلوگیری از بروز و گسترش مقاومت دارویی در جامعـه و مراکـز درمانی، تنظیم و اجرا گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که آنتی‌بیوتیک‌های گروه کاربـاپنم در درمان ۲۲ درصد عفونت‌های ناشـی از ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مـؤثر نیسـتند

و بـا تجـویز بـی‌رویـه ایـن گـروه از داروهـا در بیمارستان‌های ایران بـه وسـیله پزشـکان ایـن میـزان مقاومت افزایش خواهد یافت. مشاهده سویه‌های دارای ژن bla_{CTX} در این مطالعه خطر گسـترش ایـن ژن را بـه دیگر باکتری‌های بیمارستانی افزایش مـی‌دهـد. اعتقـاد بر این است که به منظور حفظ کاربـاپنم‌هـا بـه عنـوان راهکار نهایی جهت درمان، استفاده از کارباپنم‌ها برای درمان *سودوموناس آئروژینوزا* بایـد بـرای بیمـارانی مـدنظر قـرار گیرنـد کـه دارای عفونـت پلـی‌میکروبـی هستند، به ویژه وقتی که بـاکتری‌هـای بـی هـوازی در محـل عفونـت حضـور دارنـد یـا بـرای ایزولـه‌هـای *سودوموناس* مقاوم به دیگر آنتی‌بیوتیـک‌هـا اسـتفاده شوند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل پایان‌نامه مـی‌باشـد کـه بـا حمایـت مـالی دانشـگاه آزاد اسـلامی واحـد شـیراز صورت پذیرفت.

REFERENCES

1.Slama TG. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. Crit Care 2008; 12(4):1-7.
2.Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev 2009; 22(4): 582-610.
3.Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rúbio FG, Nogueira ML, de Almeida MT, et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. BMC Infect Dis 2012; 12: 176.
4.Falagas ME, Peppas G, Makris GC, Karageorgopoulos DE, Matthaiou DK. Meta-analysis: ertapenem for complicated intra-abdominal infections. Aliment Pharmacol Ther 2008; 27(10): 919-31.
5.Falagas ME, Tansarli GS, Kapaskelis A, Vardakas KZ. Ertapenem use and antimicrobial resistance to group 2 carbapenems in Gram-negative infections: a systematic review. Expert Rev Anti Infect Ther 2013; 11(1): 69-78.
6.Tian GB, Adams-Haduch JM, Bogdanovich T, Wang HN, Doi Y. PME-1, an extended-spectrum β-lactamase identified in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(6): 2710-3.
7.Livermore DM, Brown DFJ. Detection of β-lactamase mediated resistance. J Antimicrob Chemother 2001; 35: 281-94.
8.Livermore DM. Beta-lactamase in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 557-84.
9.Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(9): 2990-95.
10.Aggarwal R, Chaudhary U, Bala K. Detection of extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Indian J Pathol Microbiol 2008; 51(2): 222-4.
11.Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(1): 43-8.
12.Lewis JS, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH. First Report of the Emergence of CTX-M-Type Extended-Spectrum-lactamases (ESBLs) as the Predominant ESBL Isolated in a U.S. Health Care System. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2007; 51(11): 4015-21.
13.Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) .2014, M100-S21 .Vol. 31 No. 1.
14.Liew YX, Tan TT, Lee W, Ng JL, Chia DQ, Wong GC, et al. Risk factors for extreme-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with hematologic malignancies. Am J Infect Control 2013; 41(2):140-4.
15.Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?. Clin Infect Dis 2002; 34(5): 634-40.
16.Johansen HK, Moskowitz SM, Ciofu O, Pressler T, Høiby N. Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros 2008; 7(5): 391-7.
17.Ferreira CM, Ferreira WA, Almeida NC, Naveca FG, Barbosa Md. Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from hematologic patients in Manaus, State of Amazonas, Brazil. Braz J Microbiol 2011; 42(3):1076-84.
18.Moehario LH, Tjoa E, Kiranasari A, Ningsih I, Rosana Y, Karuniawati A. Trends in antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from blood in Jakarta from 2002 to 2008. J Infect Dev Ctries 2009; 3(11):843-8.
19.Jasemi SS, Alipoor F, Dehbashi S, Mardaneh J. Isolation *pseudomonas* and *acinetobacter* from blood specimens in patients hospitalized in emam khomeini Hospital (Kermanshah). ISMJ 2015; 18(2): 323-33.
20.Anvarinejad M, Japoni A, Rafaatpour N, Mardaneh J, Abbasi P, Amin Shahidi M, et al. Burn Patients Infected With Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*: Multidrug-Resistant Strains. Arch Trauma Res 2014; 3(2): e18182.
21.Caselli D, Cesaro S, Ziino O, Zanazzo G, Manicone R, Livadiotti S, et al. Multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa infection in children undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. Haematologica 2010; 95(9):1612-15.
22.Elouennass M, Zohoun A, El Ameri A, Alem N, Kasouati J, Benlahlou Y, et al. In Vitro Activities of Ertapenem and Imipenem against Clinical Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing

Enterobacteriaceae Collected in Military Teaching Hospital Mohammed V of Rabat. Interdiscip Perspect Infect Dis 2012; 2012: 646480.
23.Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(1): 43-8.
24.Poorabbas B, Mardaneh J, Rezaei Z, Kalani M, Pouladfar Gh, Alami MH, et al. Nosocomial Infections: Multicenter surveillance of antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* and Gram negative rods isolated from blood and other sterile body fluids in Iran. Iranian Journal of Microbiology 2015; 7(3): 127-35.
25.Anvarinejad M, Japoni A, Rafaatpour N, Mardaneh J, Abbasi P, Amin Shahidi M, et al. Burn patients infected with metallo-beta-lactamase-producing *pseudomonas aeruginosa*: multidrug-resistant strains. Arch Trauma Res 2014; 3(2): e18182.
26.Potz NA, Hope R, Warner M, Johnson AP, Livermore DM. london & south east esbl project group. prevalence and mechanisms of cephalosporin resistance in enterobacteriaceae in london and south-east england. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2006; 58: 320-6.
27.Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rúbio FG, Nogueira ML, de Almeida MT, et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. BMC Infect Dis 2012; 12: 176.
28.Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(9): 2990-5.

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

Original Article

The Antibiotics Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Causing Infections in Shahid Faghihi (Shiraz) Hospital and Idetify the Strains Harboring the *bla*CTX Gene

Rabani Z[1], Mardaneh J[2*]

[1]Department of Microbiology, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran, [2]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

Received: 28 Jun 2015 Accepted: 8 Sep 2015

Abstract

Background & aim: Because of its ubiquitous nature, ability to survive in moist environments, and innate resistance to many antibiotics and antiseptics, *P. aeruginosa* is a common pathogen in hospitals. The goals of this study were detection of *Psudomonas aeruginosa* harboring *bla*CTX gene causing infections in hospitals and determination of their susceptibility to antibiotics and ESBL production**.**

Methods: In the present cross-sectional study, clinical samples from hospitalized patients were collected and culture was done on apropriate media. Final identification was performed using biochemical tests and API 20NE system. According to the protocol CLSI 2014 disc diffusion, combination disk, modified hodge test (MHT) and E-test were used for antibiotic susceptibility, ESBL production, carbapenemas production, and MIC values of imipenem respectively. The bla_{CTX} gene was detected in the isolates by PCR molecular method.

Results: In the current study, 45 isolates of *Pseudomonas aeroginosa* were obtained from hospitalized patients, consisting of 19 males (42.2%) and 26 females (57.8%). As observed, 57.8% (26 strains) of isolates were recovered from sputum. The most effective antibiotics against isolates were amikacin and colistin with 97.8% suseptibility whereas the highest resistance was to cefotaxime (97.8%). As revealed 77.8% of isolates showed response to group 2 carbapenems (imipenem, meropenem). All imipenem resistant strains had the MIC more than 32. Seventeen strains (37.7%) were showed resistant to quinolones (ciprofloxacin, norfloxacin). The results of PCR on bla_{CTX} gene indicated that 15.5% of the isolates possess the gene.

Conclusion: Carbapenem group of antibiotic in 22% of infections caused by Pseudomonas aeruginosa were ineffective and indiscriminate prescribing of these drugs will increase the ratet of resistance.

Keywords: Hospital infection, *Pseudomonas aeruginosa,* Multidrug-resistant (MDR), *bla*CTX gene, antibiotic susceptibility.

***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:
Rabani Z, Mardaneh J. The Antibiotics Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa Isolates Causing Infections in Shahid Faghihi (Shiraz) Hospital and Idetify the Strains Harboring the blaCTX Gene. Armaghane-danesh 2015; 20 (8): 689-705.