

# شناسایی باکتری‌های غیر تخمیر کننده مقاوم به چنددارو تولید کننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) جدا شده از خون بیماران، با استفاده از روش‌های فنوتایپی در شیراز

مانلی امین شهیدی<sup>1</sup>، مجتبی انوری نژاد<sup>1</sup>، امین عباسیان<sup>1</sup>، پژمان عباسی<sup>1</sup>، نورالدین رفعت پور<sup>1</sup>، محمدعلی دهیادگاری<sup>1</sup>، بهمن پورعباس<sup>1</sup>، غلامرضا پولادفر<sup>1</sup>، جلال مردانه<sup>2</sup>

## چکیده

زمینه و هدف: ظهور باکتری‌های غیر تخمیر کننده مقاوم به چنددارو تولید کننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs)، هم‌اکنون به عنوان یک مشکل عمده در بیماران بستری مطرح است. هدف این مطالعه، بررسی گسترش باکتری‌های غیر تخمیر کننده مقاوم به چنددارو تولید کننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) جدا شده از خون بیماران، با استفاده از سیستم اتوماتیک BACTEC 9240 در شیراز (ایران) بود.

روش تحقیق: در این مطالعه مقطعی، 4825 نمونه خون از بیماران مشکوک به باکتری‌های بستری در بیمارستان‌های شهر شیراز گرفته شد و وارد شیشه‌های محیط کشت خون سیستم اتوماتیک BACTEC 9240 گردید. با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی تعبیه شده در سیستم API 20E اختصاصی، باکتری‌های غیر تخمیر کننده، مورد شناسایی نهایی قرار گرفتند. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی سویه‌های تولید کننده ESBL، با استفاده از تست فنوتیپی DDST بر اساس پروتکل (2014) CLSI انجام پذیرفت.

یافته‌ها: از کل 4825 نمونه خون جمع‌آوری شده، 1145 کشت خون (24 درصد)، توسط سیستم BACTEC از نظر رشد میکروارگانیزم مثبت تشخیص داده شدند. از بین تمام ارگانیزم‌های جدا شده از کشت‌های خون مثبت، 206 ارگانیزم، باکتری‌های گرم منفی غیر تخمیر کننده بودند. شایع‌ترین باکتری‌های غیر تخمیر کننده جدا شده به ترتیب: پseudomonas (48%)، اسینتوباکتر (41/7%) و استنوتروفوموناس (8/2%) بودند. در ایزوله‌های اسینتوباکتر، تولید ESBL در 70 ایزوله (81/4%) مشاهده شد. در بین آنتی‌بیوتیک‌های کلاس بتالاکتام، ایزوله‌های pseudomonas، بهترین حساسیت را به پیراسیلین-تازوباکتام (46/5%) نشان دادند. نتیجه گیری: بتالاکتام‌ها بر روی 40% عفونت‌های ناشی از pseudomonas و 78% عفونت‌های اسینتوباکتر اثر ندارند. ظهور سویه‌های با مقاومت‌های چندارویی، یک مشکل بزرگ سلامت ملی در ایران است که باید مورد توجه بیشتر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: عفونت گردش خون، باکتری‌های غیر تخمیر کننده، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ESBL

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1394؛ 22 (3): 256-265.

دریافت: 1393/10/08 پذیرش: 1394/06/24

<sup>1</sup> مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

<sup>2</sup> نویسنده مسؤل؛ استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران.

آدرس: گناباد - دانشگاه علوم پزشکی گناباد - دانشکده پزشکی - گروه میکروب‌شناسی

تلفن: +985157229233 شماره: +985157229233 پست الکترونیکی: Jalalmardaneh@yahoo.com

## مقدمه

ملکولی متفاوت حمل می‌کنند (12) و می‌توانند به روش‌های مختلف به ارگانسیم‌های دیگر منتقل شوند. اسینتوباکتر می‌تواند به‌عنوان یک مخزن بالقوه ژن‌های کدکننده مقاومت دارویی به‌ویژه در محیط‌های بیمارستان عمل نمایند (13). در بخش ICU، به طرز خطرناکی همه بیماران همیشه در خطر بالاتری از گسترش عفونت‌های بیمارستانی ناشی از سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند. ظهور و گسترش اسینتوباکتر بومانی مقاوم به دارو و توانایی ژنتیکی در حمل و انتقال عناصر مقاومت آنتی‌بیوتیکی مختلف، تهدید بزرگی را در بیمارستان‌ها به‌وجود آورده است (14). مشکل بزرگ اسینتوباکتر بومانی آن است که توانایی آن را دارد که مقاومت به کلاس‌های بزرگ آنتی‌بیوتیکی را به دست آورد (2).

عفونت‌های ناشی از ارگانسیم‌های مقاوم به چنددارو، منجر به بستری شدن طولانی‌تر، افزایش میزان مرگ و میر و افزایش هزینه‌های درمانی می‌گردد. پseudomonas آئروژینوزا، پاتوژن بیمارستانی خاص با فاکتورهای بیماری‌زایی قابل توجه است که توانایی نشان‌دادن مقاومت آنتی‌بیوتیکی را دارد (15). مهمترین فاکتورها برای کاهش شیوع عفونت‌های ناشی از pseudomonas و اسینتوباکتر در ICU، مدیریت عقلانی آنتی‌بیوتیک‌ها، تحقیق بر روی منابع محیطی عفونت و به‌کاربردن روش‌های ایزولاسیون سخت‌گیرانه است. بهینه‌نمودن درمان تجربی، نیاز به اطلاع از الگوهای مقاومت ضد میکروبی دارد. متأسفانه بسیاری از متخصصان عفونی هم‌اکنون با ایزوله‌های pseudomonas و اسینتوباکتر سروکار دارند که به تمام بتالاکتام‌ها و کینولون‌ها مقاوم هستند. در حقیقت درمان ناکارآمد تجربی، منجر به افزایش مرگ و میر تا 30 درصد می‌شود (16). در این خصوص، هدف این مطالعه بررسی گسترش باکتری‌های غیرتخمیرکننده مقاوم به چنددارو تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) جدا شده از خون بیماران، با استفاده از سیستم اتوماتیک BACTEC 9240 در شیراز (ایران) بود.

پseudomonas آئروژینوزا، اسینتوباکتر بومانی و استنوتروفوموناس مالتوفیلیا، از جمله شایع‌ترین باکتری‌های غیرتخمیرکننده ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی در بخش‌های مختلف بیمارستان هستند (1-3). مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های بیمارستانی در حال افزایش است؛ به‌طوری‌که مرگ و میر و عوارض ناشی از عفونت هنگامی که عفونت توسط ارگانسیم‌های مقاوم به دارو ایجاد می‌شود، بالاتر است (1). این افزایش مقاومت، در نتیجه استفاده زیاد و نابه‌جا از عوامل ضد میکروبی، افزایش بیماران دارای ضعف سیستم ایمنی و انتقال آگزوجنوس باکتری‌ها به‌ویژه توسط پرسنل بیمارستانی است. عفونت‌های بیمارستانی به‌طور معمول، آگزوجنوس هستند و منبع هر بخشی می‌تواند اکوسیستم بیمارستان شامل: افراد، غذا، آب و هوای بیمارستان باشد (2).

اسینتوباکتر بومانی، یکی از شایع‌ترین ایزوله‌های ایجادکننده سپسیس در بیماران نقص سیستم ایمنی است و همراه با افزایش خطر مرگ و میر است (3). اسینتوباکتر بومانی، پاتوژن مهمی در بخش مراقبت‌های ویژه است (4). این ارگانسیم بر روی پوست و ابزارهای پلاستیکی مورد استفاده برای بیماران بستری در بیمارستان کلونیزه می‌شود (5). دوام ایزوله‌های آندمیک اسینتوباکتر بومانی در ICU، به‌نظر می‌رسد مرتبط با توانایی آنها برای زنده‌ماندن به‌مدت طولانی بر روی سطوح بی‌جان و نیز گسترش مقاومت به عوامل ضد میکروبی است (6-8). ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو (MDR)، یک مشکل در حال رشد بوده و به‌طور وسیع گزارش شده است (9). مقاومت در اسینتوباکتر بومانی، به طیف عظیمی از ترکیبات ضد میکروبی در دسترس به‌صورت تجاری (آمینوگلیکوزیدها، سفالوسپورین‌ها، کینولون‌ها، ایمی‌پنم) افزایش یافته و به یک مشکل درمانی مهم تبدیل شده است (10، 11). بیش از 80 درصد ایزوله‌های اسینتوباکتر، چندین پلاسمید با اندازه‌های

## روش تحقیق

**جامعه مورد مطالعه:** در این مطالعه مقطعی که در طی یک سال، از فروردین تا اسفند سال 1392 انجام شد، 4825 نمونه خون از بیماران مشکوک به باکتری می‌بستری در بیمارستان‌های شهر شیراز گرفته شد و برای هر یک پرسشنامه تنظیم و کدگذاری گردید. نمونه‌گیری از خون افراد، پس از تشریح هدف مطالعه برای آن‌ها و کسب رضایت کتبی آگاهانه از هر یک از افراد تحت مطالعه صورت پذیرفت.

**نمونه‌گیری:** خون‌گیری از بیماران بستری در بیمارستان، توسط فرد کارآموده انجام شد. روش کار بدین صورت بود که ابتدا محل خونگیری با بتادین و سپس با الکل 70 درصد شستشو داد شد؛ سپس نمونه‌گیری از خون محیطی افراد به عمل آمد. نمونه‌های خون وارد شیشه‌های محیط کشت خون رزین‌دار سیستم اتوماتیک BACTEC گردید و به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی ارسال شد. در آزمایشگاه، شیشه محیط کشت به سرعت وارد دستگاه اتوماتیک BACTEC 9240 شد. موارد مثبت پس از رشد اولیه ارگانیزم و شناسایی توسط دستگاه، از آن خارج و پس از ثبت TTD بر روی محیط‌های کشت میکروبی‌شناسی ساب‌کالچر انجام شد.

**جداسازی و شناسایی باکتری:** نمونه‌های کشت خون مثبت، از دستگاه خارج شد؛ سپس بر روی محیط‌های معمول میکروبی‌شناسی شامل: محیط‌های بلاد آگار، شکلات آگار و مک‌کانکی آگار (Merck Co. Germany) کشت انجام شد. محیط‌های کشت، پس از انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز، از نظر رشد باکتری و تشکیل کلونی بر روی محیط‌ها مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های گرم منفی ایزوله شده از نمونه‌های ارسالی، به کمک تست‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی اولیه شامل: رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز و حرکت و به دنبال آن با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی تعبیه شده در سیستم API 20E (Biomerieux Co., France) اختصاصی غیرتخمیرکننده‌ها و ثبت کد ارگانیزم و وارد نمودن کد در

نرم‌افزار API، مورد شناسایی نهایی قرار گرفتند.

**تعیین پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی:** در این مطالعه با استفاده از دیسک‌های 25 آنتی‌بیوتیک (MAST, UK) شامل: سفوروکسیم (30?g, CXM)، سفتازیدیم (30?g, CAZ)، سفتریاکسون (30?g, CRO)، سفپیم (30?g, CPM)، آمپی‌سیلین (10?g, AP)، آزترونام (30?g, ATM)، آگمتین (30?g, AUG)، سفالکسین (30?g, CFX)، سفوتاکسیم (30?g, CTX)، سفتی‌زوکسیم (30?g, CZX)، سفکسیم (5?g, CFM)، ایمی‌پنم (10?g, IMI)، مروپنم (10?g, MEM)، پپراسیلین (100?g, PRL)، تیکارسیلین (75?g, TC)، پپراسیلین-تازوباکتام (100/10?g, PTZ)، سیپروفلوکساسین (5?g, CIP)، کلرامفنیکل (30?g, C)، کوتریموکسازول (1.25/23.75?g, TS)، توبرامیسین (10?g, TN)، آمیکاسین (30?g, AN)، جنتامیسین (10?g, GM) و تتراسایکلین (30?g, T)، کلیستین (10?g, CO) و پلی‌میکسین B (300?g, PB) و با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن بر اساس پروتکل ارائه شده توسط سازمان استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI 2013) (17)، حساسیت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های جدا شده مورد بررسی قرار گرفت. در این روش با استفاده از نرمال‌سالین، رقت 0/5 مک‌فارلند از باکتری تهیه گردید و کشت بر روی محیط مولر هیتتون آگار (Merck Co. Germany) انجام شد. پس از انکوباسیون محیط‌ها در دمای 36 درجه سانتی‌گراد به مدت 18 ساعت، نتایج خوانده شدند.

**شناسایی سویه‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) با استفاده از تست فتوتیپی Double Disk Synergy Test:** شناسایی سویه‌های تولیدکننده ESBL با استفاده از تست فتوتیپی DDST، بر اساس پروتکل ارائه شده توسط CLSI 2013 انجام پذیرفت. در روش DDST، از دیسک سفوتاکسیم (30µg) به همراه دیسک ترکیبی سفوتاکسیم+کلاوولانیک اسید (10µg+30µg) و همچنین دیسک سفتازیدیم (30µg) به همراه دیسک ترکیبی

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج حاصل از مطالعه، به کمک نرم افزار SPSS (USA، IL، Chicago، SPSS Inc) (ویرایش 19) جمع بندی و مورد بررسی قرار گرفت.

### یافته‌ها

از کل 4825 نمونه خون ارسال شده، 1145 کشت خون (24 درصد) از نظر رشد میکروارگانیسم مثبت بودند. از بین تمام ارگانیسم‌های جدا شده از کشت‌های خون مثبت، 206 ارگانیسم، باکتری‌های گرم منفی غیرتخمیرکننده بودند. شایع‌ترین باکتری‌های غیرتخمیرکننده جدا شده به ترتیب شامل: پseudomonas (48%)، اسینتوباکتر (41/7%) و استنوتروفوموناس (8/2%) بودند. در مطالعه ما همه ایزوله‌های استنوتروفوموناس ESBL مثبت بودند (جدول 1). غیرتخمیرکننده‌های تولیدکننده ESBL 77/6% همه ایزوله‌های غیرتخمیرکننده (160 سویه از 206 ایزوله) را تشکیل می‌دادند. یکی از مهمترین ارگانیسم‌های تولیدکننده ESBL، باکتری پseudomonas بود که 44/3 درصد (71 سویه از 160 سویه ESBL مثبت) ایزوله‌های غیرتخمیرکننده ESBL مثبت را به خود اختصاص می‌داد. در ایزوله‌های اسینتوباکتر، تولید ESBL در 70 ایزوله (81/4%) از 86 سویه جدا شده این باکتری شناسایی شد. در مطالعه حاضر، 2 سویه بورخولدريا ایزوله شدند که یکی از آنها تولیدکننده ESBL بود.

سفتازیدیم+کلاوولانیک اسید (10µg+30µg) MAST, UK) استفاده شد. به منظور انجام این تست، از ارگانیسم مورد آزمایش با استفاده از نرمال سالین، غلظت 0/5 مک‌فارلند تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت شطرنجی صورت پذیرفت؛ سپس دیسک‌های ذکر شده با فاصله حداقل 25 میلی‌لیتر قرار داده شده و پلیت‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز انکوبه شدند. سپس هاله عدم رشد در اطراف هر یک از دیسک‌ها اندازه‌گیری شد. اگر قطر هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک ترکیبی حداقل 5 میلی‌متر یا بیشتر از قطر هاله عدم رشد دیسک منفرد همان آنتی‌بیوتیک بود، به عنوان سویه تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در نظر گرفته شد. از سویه‌های استاندارد K. pneumoniae ATCC 700603 به عنوان سویه کنترل ESBL-positive و از E. coli 25922 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

شناسایی سویه‌های Multi-drug resistant (MDR)، Pan-drug resistant و Extensively-drug resistant (XDR) (PDR): بر اساس تعریف، سویه‌هایی که حداقل به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی اصلی مقاوم بودند، به عنوان MDR در نظر گرفته شدند. سویه‌هایی که به همه کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی بجز یک یا دو دارو مقاوم بودند، به عنوان XDR و ایزوله‌هایی که به همه آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند به عنوان PDR در نظر گرفته شدند (2، 7، 17).

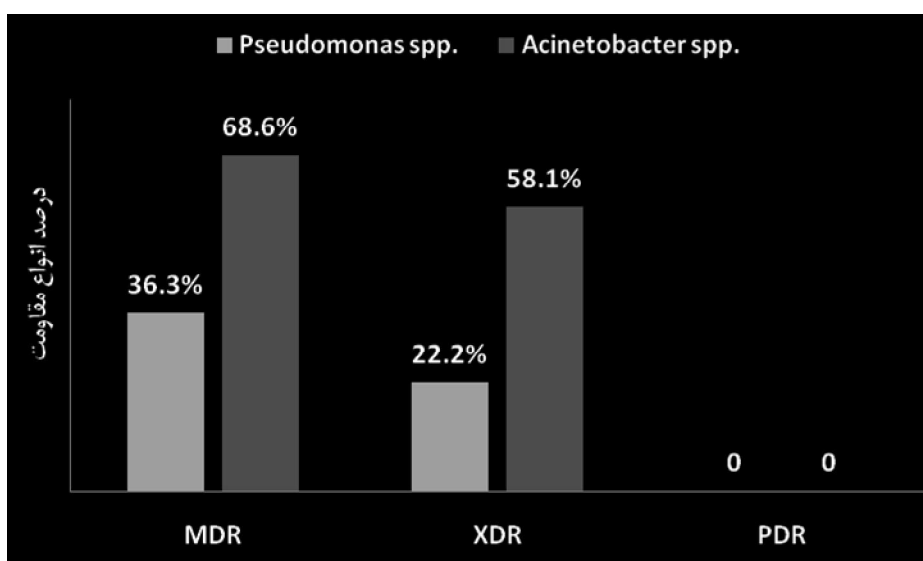
جدول 1- فراوانی مطلق و نسبی هر یک از باکتری‌های غیرتخمیرکننده (ESBL positive و ESBL negative) جدا شده از کشت خون بیماران با استفاده از سیستم BACTEC 9240

Total	ESBL Positive	ESBL Negative	ارگانیسم
(100)99	(71/7)71	(28/3)28	<i>Pseudomonas</i> spp.
(100)86	(81/4)70	(18/6)16	<i>Acinetobacter</i> spp.
(100)17	(100)17	(0)0	<i>Stenotrophomonas</i> spp.
(100)2	(50)1	(50)1	<i>Burldkholderia</i> spp.
(100)1	(0)0	(100)1	<i>Moraxella</i> spp.
(100)1	(100)1	(0)0	Other nonfermenters
206	160	46	Total

پس از کلیستین و پلی‌میکسین B، مؤثرترین آنتی‌بیوتیک بر ضد ایزوله‌های ESBL مثبت پسودوموناس، داروی سیپروفلوکساسین بود؛ به طوری که 52/1% سویه‌ها به آن حساسیت نشان دادند (جدول 2). در بین آنتی‌بیوتیک‌های کلاس بتالاکتام، ایزوله‌های پسودوموناس بهترین حساسیت را به پیراسیلین-تازوباکتام (46/5%) نشان دادند. همه سویه‌های پسودوموناس به کلیستین و پلی‌میکسین B حساس بودند. ایزوله‌های ESBL مثبت پسودوموناس در بین داروهای آمینوگلیکوزیدی بهترین پاسخ را به آمیکاسین دادند (جدول 2). از نتایج بسیار نگران کننده آن بود که همه سویه‌های استنتروفوموناس به ایمپنم و مروپنم مقاوم بودند. میزان حساسیت ایزوله‌های ESBL مثبت پسودوموناس و اسینتوباکتر به سیپروفلوکساسین به ترتیب: 52/1% (37 مورد) و 12/9% (9 مورد) بود. پاسخ ایزوله‌های شایع غیر تخمیر کننده به آنتی‌بیوتیک ایمپنم بهتر از مروپنم بود (جدول 2). فراوانی ایزوله‌های MDR، XDR و PDR پسودوموناس و اسینتوباکتر جدا شده از کشت خون بیماران در نمودار یک نشان داده شده است.

جدول 2- پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های گرم منفی غیر تخمیر کننده شایع (کل ایزوله‌ها، ESBL positive و ESBL negative) جدا شده از کشت خون بیماران با استفاده از سیستم BACTEC 9240

Pseudomonas spp.			Acinetobacter spp.			Stenotrophomonas maltophilia			آنتی‌بیوتیک
ESBL positive (N=71)	ESBL negative (N=28)	Total (N=99)	ESBL positive (N=70)	ESBL negative (N=16)	Total (N=86)	ESBL positive (N=17)	ESBL negative (N=0)	Total (N=17)	
(100)71	(85/7)24	(96)95	(100)70	(68/8)11	(94/2)81	(100)17	(0)0	(100)17	(AP) Ampicillin
(91/5)65	(50)14	(79/8)79	(100)70	(68/8)11	(94/2)81	(100)17	(0)0	(100)17	(ATM) Aztreonam
(97/2)69	(82/1)23	(92/4)92	(100)70	(68/8)11	(94/2)81	(100)17	(0)0	(100)17	(AUG) Augmentin
(66/2)47	(21/4)6	(53/5)53	(78/6)55	(12/5)2	(66/3)57	(29/4)5	(0)0	(29/4)5	(AN) Amikacin
(100)71	(96/4)27	(99)98	(100)70	(81/3)13	(96/5)83	(100)17	(0)0	(100)17	(CFX) Cephalexin
(98/6)70	(64/3)18	(88/9)88	(100)70	(43/8)7	(89/5)77	(100)17	(0)0	(100)17	(CTX) Cefotaxime
(100)71	(71/4)20	(91/9)91	(100)70	(25)4	(86)74	(100)17	(0)0	(100)17	(CZX) Ceftizoxime
(100)71	(92/9)26	(98)97	(100)70	(81/3)13	(96/5)83	(100)17	(0)0	(100)17	(CFM) Cefixime
(47/9)34	(14/3)4	(38/4)38	(87/1)61	(6/3)1	(72/1)62	(5/9)1	(0)0	(5/9)1	(CIP) Ciprofloxacin
(100)71	(96/4)27	(99)98	(98/6)69	(56/3)9	(90/7)78	(100)17	(0)0	(100)17	(CXM) Cefuroxime
(66/2)47	(3/6)1	(48/5)48	(97/1)68	(25)4	(83/7)72	(52/9)9	(0)0	(52/9)9	(CAZ) Ceftazidime
(100)71	(50)14	(85/9)85	(100)70	(43/8)7	(89/5)77	(100)17	(0)0	(100)17	(CRO) Ceftriaxone
(81/7)58	(21/4)6	(64/6)64	(97/1)68	(25)4	(83/7)72	(88/2)15	(0)0	(88/2)15	(CPM) Cefepime
(93)66	(85/7)24	(90/9)90	(90)63	(50)8	(82/6)71	(58/8)10	(0)0	(58/8)10	(C) Chloramphenicol
(63/4)45	(64/3)18	(63/6)63	(84/3)59	(31/3)5	(74/4)64	(5/9)1	(0)0	(5/9)1	(TS) Cotrimoxazole
(69)49	(28/6)8	(57/6)57	(87/1)61	(6/3)1	(72/1)62	(35/3)6	(0)0	(35/3)6	(GM) Gentamicin
(59/1)42	(17/9)5	(47/5)47	(97/1)68	(12/5)2	(81/4)70	(100)17	(0)0	(100)17	(IMI) Imipenem
(67/6)48	(25)7	(55/6)55	(100)70	(37/5)6	(88/4)76	(100)17	(0)0	(100)17	(MEM) Meropenem
(73/2)52	(35/7)10	(62/6)62	(98/6)69	(43/8)7	(88/4)76	(70/6)12	(0)0	(70/6)12	(PRL) Piperacillin
(53/5)38	(10/7)3	(41/4)41	(91/4)64	(0)0	(74/4)64	(64/7)11	(0)0	(64/7)11	(PTZ) Piperacillin tazobactam
(81/7)58	(74/1)20	(78/8)78	(92/9)65	(31/3)5	(81/4)70	(94/1)16	(0)0	(94/1)16	(T) Tetracycline
(74/6)53	(25)7	(60/6)60	(100)70	(31/3)5	(87/2)75	(82/4)14	(0)0	(82/4)14	(TC) Ticarcillin
(76/1)54	(32/1)9	(63/6)63	(84/3)59	(18/8)3	(72/1)62	(35/3)6	(0)0	(35/3)6	(TN) Tobramycin
(0)0	(0)0	(0)0	(0)0	(0)0	(0)0	(11/8)2	(0)0	(11/8)2	(CO) Colistin
(0)0	(0)0	(0)0	(0)0	(0)0	(0)0	(11/8)2	(0)0	(11/8)2	(PB) polymyxin B



نمودار 1- فراوانی ایزوله‌های MDR، XDR و PDR پseudوموناس و اسینتوباکتر جدا شده از کشت خون بیماران

## بحث

بیمارستان‌ها در ایران، از سیستم‌های کشت خون سیستماتیک BACTEC استفاده نمی‌شود و ارگانیسیم‌های معمول نیز با چند روز تأخیر به پزشک گزارش می‌گردند. در این مطالعه شایع‌ترین باکتری‌های غیرتخمیر کننده جدا شده به ترتیب: پseudوموناس، اسینتوباکتر و استنتروفوموناس بودند. در مطالعه حاضر، ایزوله‌های استنتروفوموناس مالتوفیلیا به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاومت نشان دادند که این نتیجه قابل انتظار است؛ زیرا این ارگانیسیم به‌طور ذاتی به بتالاکتام‌ها مقاوم است. بنابراین نباید در بالین برای درمان عفونت‌های ناشی از استنتروفوموناس، از بتالاکتام‌ها استفاده کرد.

صد در صد ایزوله‌های استنتروفوموناس و پس از آن 81/4 درصد ایزوله‌های اسینتوباکتر و سپس 71/7 درصد سویه‌های پseudوموناس، ESBL مثبت بودند. غیرتخمیرکننده‌های تولیدکننده ESBL، 77/6 درصد همه ایزوله‌های غیرتخمیرکننده را تشکیل می‌دادند. یکی از مهمترین ارگانیسیم‌های تولیدکننده ESBL، باکتری پseudوموناس بود که 44/3 درصد ایزوله‌های غیرتخمیرکننده ESBL مثبت را به خود اختصاص می‌داد. درصد بالای

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از مشکلات اصلی سلامت ملی در دهه آینده خواهد بود. باکتری‌های گرم منفی، بسیاری از ژن‌های مقاومت را در طی سال‌های گذشته دریافت نموده‌اند و اکنون به نسل سوم سفالوسپورین‌ها مقاومت بالایی دارند. سویه‌های بیمارستانی از قبیل: پseudوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتر به سفنازیدیم، کارباپنم‌ها و کینولون‌ها مقاومت نشان می‌دهند. این مقاومت گسترده، به بسیاری از فاکتورها از جمله: استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها در انسان و در دامپزشکی و انتقال متقاطع سویه‌های مقاوم از انسان به انسان و نیز از حیوانات به انسان مرتبط است (18).

سیستم اتوماتیک کشت خون BACTEC، این امکان را دارد که در هر لحظه که سطح رشد ارگانیسیم به اندازه‌ای برسد که قابل شناسایی توسط دستگاه باشد، میکروبیولوژیست را مطلع می‌سازد. این مسئله، در تصمیم‌گیری سریع برای بیمار خیلی اهمیت دارد؛ از سوی دیگر، با TTD که این دستگاه ارائه می‌دهد، افتراق عفونت‌های واقعی از آلودگی مؤثر است. اما متأسفانه در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی

به ترتیب: 7 درصد و 36 درصد گزارش شده است (19) ولی در مطالعه ما مقاومت کل سویه‌های پseudomonas (ESBL مثبت و منفی) به این دو دارو به ترتیب: 66/3 درصد و 72/1 درصد بود. همچنین میزان مقاومت در مطالعه Ferreira و همکاران در مقایسه با همین مطالعه که میزان حساسیت ایزوله‌های پseudomonas به ایمی‌پنم و مروپنم را به ترتیب: 88 درصد و 100 درصد و حساسیت اسینتوباکتر را به این دو دارو 93 درصد گزارش نموده‌اند، بسیار بالاتر بود و نشان از افزایش مقاومت به کاربامپنم‌ها که از آخرین خطوط درمانی در درمان این عفونت‌ها است، دارد؛ ولی بر خلاف نتایج مطالعه آنها، پاسخ سویه‌ها در بررسی ما به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم بهتر بود.

از نتایج بسیار نگران‌کننده آن بود که همه سویه‌های استنوتروفوموناس به کاربامپنم‌ها یعنی ایمی‌پنم و مروپنم مقاوم بودند؛ همچنین مقاومت به کلیستین و پلی‌میکسین B در 11/8 درصد ایزوله‌های استنوتروفوموناس مشاهده شد که نشان از مقاومت دارویی بسیار بالای این ارگانیسم دارد؛ در نتیجه، این ارگانیسم، انتخاب درمانی بسیار محدودی را در دسترس پزشک قرار می‌دهد و مبتلایان به باکتری‌می ناشی از این سویه‌ها، شانس اندکی برای درمان موفقیت‌آمیز دارند. مؤثرترین داروها بر ضد سویه‌های استنوتروفوموناس، کوتریموکسازول و سیپروفلوکساسین بودند؛ به طوری که 94/1 درصد ایزوله‌ها به این دو دارو حساس بودند و داروهای انتخابی در این خصوص محسوب می‌شوند.

Moehario و همکاران در مطالعه خود در اندونزی، میزان حساسیت ایزوله‌های پseudomonas آئروژینوزا به داروی سیپروفلوکساسین را 77/8 درصد گزارش کرده‌اند (20). در مقابل، در مطالعه حاضر، 61/6 درصد کل ایزوله‌های پseudomonas به این دارو حساس بودند که نشان از کاهش حساسیت به این دارو دارد. همچنین در مطالعه حاضر مشاهده شد که به ترتیب: 52/1 درصد و 12/9 درصد سویه‌های ESBL مثبت پseudomonas و اسینتوباکتر، به سیپروفلوکساسین

ایزوله‌های تولیدکننده ESBL ممکن است به دلیل فشار انتخابی ایجاد شده در نتیجه استفاده وسیع از داروهای ضد میکروبی در بیمارستان‌ها باشد. همچنین یک سویه موراکسلا نیز ایزوله گشت که حساسیت آنتی‌بیوتیکی بسیار خوبی از خود نشان داد و ESBL منفی بود.

بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های پseudomonas تولیدکننده ESBL نشان شد که بیش از 90 درصد آنها مقاوم به کلرامفنیکل، بیش از 81/7 درصد آنها مقاوم به تتراسایکلین و بیش از 63 درصد آنها مقاوم به کوتریموکسازول، پیراسیلین، تیکارسیلین و توبرامایسین بودند. سیپروفلوکساسین (52/1% حساسیت نشان دادند) مؤثرترین کینولون بر ضد ایزوله‌های ESBL مثبت پseudomonas بود. در بین آنتی‌بیوتیک‌های کلاس بتالاکتام، ایزوله‌های پseudomonas بهترین حساسیت را به ترتیب به: پیراسیلین-تازوباکتام (46/5%)، ایمی‌پنم (40/9%)، سفنازیدیم (33/8%) و مروپنم (32/4%) نشان دادند. همه سویه‌های پseudomonas به کلیستین و پلی‌میکسین B حساس بودند. Blot و همکاران، برای بیماران با باکتری‌می ناشی از اسیتوباکتر بومانی، میزان مرگ و میر را 42 درصد گزارش کرده‌اند (15).

در مطالعه حاضر، ایزوله‌های ESBL مثبت پseudomonas از بین آمینوگلیکوزیدها بالاترین مقاومت را به آمیکاسین نشان دادند (66/2% مقاوم بودند). پس از آن، 69 درصد آنها به جنتامایسین و 76/1 درصد آنها به توبرامایسین مقاوم بودند. در مطالعه Ferreira و همکاران (2011) بر روی سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا جدا شده از خون بیماران، 22 درصد سویه‌ها به آمیکاسین و 37 درصد آنها به جنتامایسین مقاوم بودند (19). در مطالعه Ferreira همانند نتایج مطالعه حاضر، پاسخ سویه‌ها به آمیکاسین بهتر بود، اما درصد مقاومت در مطالعه حاضر بسیار بالا بود که نشان از افزایش روز افزون مقاومت در کشور ایران دارد. در مطالعه Ferreira میزان مقاومت ایزوله‌های اسینتوباکتر به آمیکاسین و جنتامایسین

81/4 درصد بود؛ در مقابل میزان مقاومت به مروپنم در این دو ارگانیزم به ترتیب: 55/6 درصد و 88/4 درصد بود. نتایج این مطالعه در این خصوص بسیار نگران کننده است، زیرا کارباینها به عنوان یکی از آخرین حربه‌های دفاعی برای از بین بردن عفونت‌های ناشی از پseudomonas و اسینتوباکتر تولیدکننده بتالاکتاماز در بیمارستان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند و افزایش مقاومت نسبت به آنها، خطر گسترش عفونت‌های ناشی از آنها و نیز بالا رفتن مرگ و میر و عوارض در بیماران را به همراه خواهد داشت (6، 23).

### نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کشور ایران به یک مشکل عمده سلامت ملی تبدیل شده است. بر طبق نتایج این مطالعه، داروهای بتالاکتام که جزء پرمصرف‌ترین و از نظر اقتصادی به صرفه‌ترین داروها در کشور ما می‌باشند، برای درمان حداقل 40% عفونت‌های ناشی از پseudomonas و 78% عفونت‌های اسینتوباکتر مؤثر نیستند. بدین منظور، انجام مطالعات اپیدمیولوژیک کشوری با استفاده از روش‌های فنوتایپینگ و ژنوتایپینگ با هدف ارائه راهکارهای مؤثر برای جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم موجود و از بین بردن آنها و جلوگیری از به وجود آمدن سویه‌های مقاوم جدید در جامعه ضروری است.

حساس بودند. در مقابل به ترتیب: 85/7 درصد و 93/7 درصد ایزوله‌های ESBL منفی پseudomonas و اسینتوباکتر به این آنتی‌بیوتیک حساسیت نشان دادند. در واقع اسینتوباکتر حساسیت بسیار بهتری نسبت به این دارو نشان داد. در گزارشی از ایران، 60% سویه‌های پseudomonas جدا شده از خون به سیپروفلوکساسین، سفنازیدیم، آمیکاسین، کوتریموکسازول و تتراسایکلین مقاوم بودند (21)؛ در حالی که در این مطالعه، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده به ترتیب: 38/4%، 48/5%، 53/5%، 63/6% و 78/8% بود. در مطالعه‌ای دیگر در ایران، میزان مقاومت به کوتریموکسازول و آمیکاسین به ترتیب: 85/8 درصد و 35/8 درصد گزارش شد (22).

کل ایزوله‌های استنوتروفوموناس، بهترین پاسخ را به ترتیب به: کوتریموکسازول (94/1%)، سیپروفلوکساین (94/1%)، کلیستین (88/2%)، پلی‌میکسین B (88/2%)، آمیکاسین (70/6%)، توبرامایسین (64/7%) و جنتامایسین (64/7%) نشان دادند. بیش از 66 درصد کل ایزوله‌های اسینتوباکتر به 23 مورد از 25 آنتی‌بیوتیک مورد بررسی مقاوم بودند و تنها به کلیستین و پلی‌میکسین پاسخ دادند. از نکات جالب توجه در مطالعه حاضر این بود که پاسخ ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک ایمپنم بهتر از مروپنم بود؛ به طوری که میزان مقاومت به ایمپنم در ایزوله‌های پseudomonas و اسینتوباکتر به ترتیب: 47/5 درصد و

### منابع:

- 1- Vasudevan A, Memon BI, Mukhopadhyay A, Li J, Tambyah PA. The costs of nosocomial resistant gram negative intensive care unit infections among patients with the systemic inflammatory response syndrome- a propensity matched case control study. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2015; 4(1): 3.
- 2- Patwardhan RB, Dhakephalkar PK, Niphadkar KB, Chopade BA. A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multiresistant *Acinetobacter baumannii* harbouring multiple plasmids. *Indian J Med Res*. 2008; 128(2): 178-87.
- 3- Jasemi SS, Alipoor F, Dehbashi S, Mardaneh J. Isolation *Pseudomonas* and *Acinetobacter* from Blood Specimens in Patients Hospitalized in Emam Khomeini Hospital (Kermanshah). *Iran South Med J*. 2015; 18(2): 323-33. [Persian]
4. Camp C, Tatum OL. A Review of *Acinetobacter baumannii* as a Highly Successful Pathogen in Times of War. *Lab Med*. 2010; 41(11): 649-57.



- 5- Karakoc C, Tekin R, Yeşilbağ Z, Cagatay A. Risk factors for mortality in patients with nosocomial Gram-negative rod bacteremia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013; 17(7): 951-7.
- 6- Obeidat N, Jawdat F, Al-Bakri AG, Shehabi AA. Major biologic characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environmental and patients' respiratory tract sources. *Am J Infect Control*. 2014; 42(4): 401-4.
- 7- Kamalbeik S, Talaie H, Mahdavinejad A, Karimi A, Salimi A. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in intensive care unit patients in a hospital with building construction: is there an association? *Korean J Anesthesiol*. 2014; 66(4): 295-9.
- 8- Gulati S, Kapil A, Das B, Dwivedi SN, Mahapatra AK. Nosocomial infections due to *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ICU. *Neurol India*. 2001; 49(2): 134-7.
- 9- Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2006; 55(Pt 12):1619-29.
- 10- Jafari S, Najafipour S, Kargar M, Abdollahi A, Mardaneh J, Fasihy Ramandy M, et al. Phenotypical evaluation of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Fasa Univ Med Sci*. 2013; 2(4):254-58. [Persian]
- 11- Towner KJ. Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. Proceedings of a symposium held on 4-5 November 1996 at Eilat, Israel. *J Med Microbiol*. 1997; 46(9): 721-46.
- 12- Gerner-Smidt P. Frequency of plasmids in strains of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Hosp Infect*. 1989; 14(1): 23-8.
- 13- Chopade BA, Wise PJ, Towner KJ. Plasmid transfer and behaviour in *Acinetobacter calcoaceticus* EBF65/65. *J Gen Microbiol*. 1985; 131(10): 2805-11.
- 14- Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr Opin Infect Dis*. 2005; 18(4): 306-13.
- 15- Cornejo-Juarez P, Vilar-Compte D, Pérez-Jiménez C, Amendys-Silva SA, Sandoval-Hernández S, Volkow-Fernández P. The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. *Int J Infect Dis*. 2015; 31: 31-4.
- 16- Weinbren MJ, Borthwick MA. Rapid detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing organisms in blood culture. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55(1): 131-2.
- 17- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Pennsylvania: Wayne; 2014.
- 18- Carlet J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2012; 1(1): 39.
- 19- Ferreira CM, Ferreira WA, Almeida NCO, Naveca FG, Barbosa MDGV. Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from hematologic patients in Manaus, State of Amazonas, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2011; 42(3): 1076-84.
- 20- 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.
- 21- Ghadiri H, Vaez H, Khosravi S, Soleymani E. The antibiotic resistance profiles of bacterial strains isolated from patients with hospital-acquired bloodstream and urinary tract infections. *Crit Care Res Pract*. 2012; 2012: 890797.
- 22- Kalantar E, Motlagh M, Lordnejad H, Beiranvand S. The prevalence of bacteria isolated from blood cultures of Iranian children and study of their antimicrobial susceptibilities. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2008; 3(1): 1-7.
- 23- 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. *J Fasa Univ Med Sci*. 2013; 3(3):188-93. [Persian]

## Characterization of nonfermenter bacteria resistant to multi-drug ESBL producing isolated from patients blood samples using phenotypic methods in Shiraz (Iran)

Maneli Amin Shahidi<sup>1</sup>, Mojtaba Anvarinejad<sup>1</sup>, Amin Abbasian<sup>1</sup>, Pejman Abbasi<sup>1</sup>,  
Noroddin Razaatpour<sup>1</sup>, Mohammad Ali Dehyadegari<sup>1</sup>, Bahman Pourabbas<sup>1</sup>,  
Gholam Reza Pouladfar<sup>1</sup>, Jalal Mardaneh<sup>2\*</sup>

**Background and Aim:** The emergence of nonfermenter bacteria that are resistant to multidrug resistant ESBL are nowadays a principal problem for hospitalized patients. The present study aimed at surveying the emergence of nonfermenter bacteria resistant to multi-drug ESBL producing isolated from patients blood samples using BACTEC 9240 automatic system in Shiraz.

**Materials and Methods:** In this cross-sectional study, 4825 blood specimens were collected from hospitalized patients in Shiraz (Iran), and positive samples were detected by means of BACTEC 9240 automatic system. The isolates containing nonfermenter bacteria were identified based on biochemical tests embedded in the API-20E system. Antibiotic sensitivity test was performed and identification of ESBL producing strains were done using phenotypic detection of extended spectrum beta-lactamase producing isolates (DDST) according to CLSI(2013) guidelines.

**Results:** Out of 4825 blood samples, 1145 (24%) specimen were gram-positive using BACTEC system. Among all isolated microorganisms, 206 isolates were non-fermenting gram-negative bacteria. The most common non-fermenter isolates were *Pseudomonas* spp. (48%), *Acinetobacter* spp. (41.7%), and *Stenotrophomonas* spp. (8.2%). Seventy of them (81.4%) were *Acinetobacter* spp. which were ESBL positive. Among  $\beta$ -lactam antibiotics, *Pseudomonas* spp. showed the best sensitivity to piperacillin-tazobactam (46.5%).

**Conclusion:** It was found that  $\beta$ -lactam antibiotics are not effective against more than 40% of *Pseudomonas* spp. infections and 78% *Acinetobacter* infections. Emergence of multi-drug resistant strains that are resistant to most antibiotic classes is a major public health problem in Iran. To resolve this problem using of practical guidelines is critical.

**Key Words:** Blood stream infection, Nonfermenter bacteria, Antibiotic resistance, ESBL

*Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2015; 22 (3): 256-265.*

*Received: December 29, 2014*

*Accepted: September 15, 2015*

<sup>1</sup> Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Nemazee Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

<sup>2</sup> Corresponding author; Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Khorasan Razavi, Iran. [Jalalmardaneh@yahoo.com](mailto:Jalalmardaneh@yahoo.com)