مقاله اصیل پژوهشی

شناسایی باکتری‌های غیرتخمیرکننده مقاوم به چنددارو تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) جداشده از خون بیماران، با استفاده از روش‌های فنوتایپی در شیراز

مانلی امین‌شهیدی[1]، مجتبی انوری‌نژاد[1]، امین عباسیان[1]، پژمان عباسی[1]، نورالدین رفعت‌پور[1]، محمدعلی دهیادگاری[1]، بهمن پورعباس[1]، غلامرضا پولادفر[1]، جلال مردانه[2]

چکیده

زمینه و هدف: ظهور باکتری‌های غیرتخمیرکننده مقاوم به چنددارو تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs)، هم‌اکنون به‌عنوان یک مشکل عمده در بیماران بستری مطرح است. هدف این مطالعه، بررسی گسترش باکتری‌های غیرتخمیرکننده مقاوم به چنددارو تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) جداشده 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 باکتریمی بستری در بیمارستان‌های شهر شیراز گرفته شد و وارد شیشه‌های محیط کشت خون سیستم اتوماتیک BACTEC 9240 گردید. با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی تعبیه‌شده در سیستم API 20E اختصاصی، باکتری‌های غیرتخمیرکننده، مورد شناسایی نهایی قرار گرفتند. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی سویه‌های تولیدکننده ESBL، با استفاده از تست فنوتیپی DDST بر اساس پروتکل CLSI(2014) انجام پذیرفت.

یافته‌ها: از کل 4825 نمونه خون جمع‌آوری‌شده، 1145 کشت خون (24درصد)، توسط سیستم BACTEC از نظر رشد میکروارگانیسم مثبت تشخیص داده شدند. از بین تمام ارگانیسم‌های جداشده از کشت‌های خون مثبت، 206 ارگانیسم، باکتری‌های گرم منفی غیرتخمیرکننده بودند. شایع‌ترین باکتری‌های غیرتخمیرکننده جداشده به‌ترتیب: پسودوموناس (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 پسودوموناس، بهترین حساسیت را به پیپراسیلین-تازوباکتام (46/5%) نشان دادند.

نتیجه‌گیری: بتالاکتام‌ها بر روی 40% عفونت‌های ناشی از پسودوموناس و 78% عفونت‌های اسینتوباکتر اثر ندارند. ظهور سویه‌های با مقاومت‌های چنددارویی، یک مشکل بزرگ سلامت ملی در ایران است که باید مورد توجه بیشتر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: عفونت گردش خون، باکتری‌های غیرتخمیرکننده، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ESBL

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

دریافت: 1393/10/08 **پذیرش: 1394/06/24**

[1] مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

[2] نویسنده مسؤول؛ استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران.

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

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

مقدمه

پسودوموناس 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 ارگانیسم‌های مقاوم به دارو ایجاد می‌شود، بالاتر است (1). این افزایش مقاومت، در نتیجه استفاده زیاد و نابه‌جا از عوامل ضدّ میکروبی، افزایش بیماران دارای ضعف سیستم ایمنی و انتقال اگزوجنوس باکتری‌ها به‌ویژه توسط پرسنل بیمارستانی است. عفونت‌های بیمارستانی به‌طور معمول، اگزوجنوس 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 ارگانیسم 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 ضدّ 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 ضدّ 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 ملکولی متفاوت حمل می‌کنند (12) و می‌توانند به روش‌های مختلف به ارگانیسم‌های دیگر منتقل شوند. اسینتوباکتر می‌تواند به‌عنوان یک مخزن بالقوّه 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 ارگانیسم‌های مقاوم به چنددارو، منجر به بستری‌شدن طولانی‌تر، افزایش میزان مرگ و میر و افزایش هزینه‌های درمانی می‌گردد. پسودوموناس 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 پسودوموناس 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 ضدّ میکروبی دارد. متأسفانه بسیاری از متخصصان عفونی هم‌اکنون با ایزوله‌های پسودوموناس و اسینتوباکتر سروکار دارند که به تمام بتالاکتام‌ها و کینولون‌ها مقاوم هستند. در حقیقت درمان ناکارآمد تجربی، منجر به افزایش مرگ و میر تا 30درصد می‌شود (16). در این خصوص، هدف این مطالعه بررسی گسترش باکتری‌های غیرتخمیرکننده مقاوم به چنددارو تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) جداشده از خون بیماران، با استفاده از سیستم اتوماتیک BACTEC 9240 در شیراز (ایران) بود.

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 باکتریمی بستری 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 کارآزموده 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 میکروب‌شناسی ارسال شد. در آزمایشگاه، شیشه محیط کشت به‌سرعت وارد دستگاه اتوماتیک BACTEC 9240 شد. موارد مثبت پس از رشد اولیه ارگانیسم و شناسایی توسط دستگاه، از آن خارج و پس از ثبت TTD بر روی محیط‌های کشت میکروب‌شناسی ساب‌کالچر انجام شد.

جداسازی و شناسایی باکتری: نمونه‌های کشت خون مثبت، از دستگاه خارج شد؛ سپس بر روی محیط‌های معمول میکروب‌شناسی شامل: محیط‌های بلاد آگار، شکلات آگار و مک‌کانکی آگار (Merck Co. Germany) کشت انجام شد. محیط‌های کشت، پس از انکوباسیون در دمای 37درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شبانه‌روز، از نظر رشد باکتری و تشکیل کلونی بر روی محیط‌ها مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های گرم منفی ایزوله‌شده از نمونه‌های ارسالی، به‌کمک تست‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی اولیه شامل: رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز و حرکت و به دنبال آن با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی تعبیه‌شده در سیستم API 20E (Biomerieux Co., France) اختصاصی غیرتخمیرکننده‌ها و ثبت کد ارگانیسم 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 (CXM، 30?g)، سفتازیدیم (CAZ، 30?g)، سفتریاکسون (CRO، 30?g)، سفپیم (CPM، 30?g)، آمپی‌سیلین (AP، 10?g)، آزترونام (ATM، 30?g)، آگمنتین (AUG، 30?g)، سفالکسین (CFX، 30?g)، سفوتاکسیم (CTX، 30?g)، سفتی‌زوکسیم (CZX، 30?g)، سفکسیم (CFM، 5 ?g)، ایمی‌پنم (IMI، 10?g)، مروپنم (MEM، 10?g)، پیپراسیلین (PRL، 100?g)، تیکارسیلین (TC، 75?g)، پیپراسیلین-تازوباکتام (PTZ، 100/10?g)، سیپروفلوکساسین (CIP، 5?g)، کلرامفنیکل (C، 30?g)، کوتریموکسازول (TS، 1.25/23.75?g)، توبرامایسین (TN، 10?g)، آمیکاسین (AN، 30?g)، جنتامایسین (GM، 10?g)، تتراسایکلین (T، 30?g)، کلیستین (CO، 10?g) و پلی‌میکسینB (PB، 300?g) و با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن بر اساس پروتکل ارائه‌شده توسط سازمان استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI 2013)(17)، حساسیت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های جداشده مورد بررسی قرار گرفت. در این روش با استفاده از نرمال‌سالین، رقّت 0/5مک‌فارلند از باکتری تهیه گردید و کشت بر روی محیط مولر هینتون آگار (Merck Co. Germany) انجام شد. پس از انکوباسیون محیط‌ها در دمای 36 درجه سانتی‌گراد به‌مدّت 18ساعت، نتایج خوانده شدند.

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

سفتازیدیم+کلاوولانیک‌اسید (10µg+30µg)(MAST, UK) استفاده شد. به‌منظور انجام این تست، از ارگانیسم مورد آزمایش با استفاده از نرمال‌سالین، غلظت 0/5مک‌فارلند تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت شطرنجی صورت پذیرفت؛ سپس دیسک‌های ذکرشده با فاصله حداقل 25میلی‌لیتر قرار داده شده و پلیت‌ها در دمای 37درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 5میلی‌متر یا بیشتر از قطر هاله عدم رشد دیسک منفرد همان آنتی‌بیوتیک بود، به‌عنوان سویه تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در نظر گرفته شد. از سویه‌های استاندارد *K. pneumoniae* ATCC 700603 به‌عنوان سویه کنترل ESBL-positive و از *E. coli* 25922 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

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

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

یافته‌ها

از کل 4825 نمونه خون ارسال‌شده، 1145 کشت خون (24درصد) از نظر رشد میکروارگانیسم مثبت بودند. از بین تمام ارگانیسم‌های جداشده از کشت‌های خون مثبت، 206 ارگانیسم، باکتری‌های گرم منفی غیرتخمیرکننده بودند. شایع‌ترین باکتری‌های غیرتخمیرکننده جداشده به‌ترتیب شامل: پسودوموناس (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 پسودوموناس بود که 44/3درصد (71سویه از 160سویه ESBL مثبت) ایزوله‌های غیرتخمیرکننده ESBL مثبت را به خود اختصاص می‌داد. در ایزوله‌های اسینتوباکتر، تولید ESBL در 70 ایزوله (81/4%) از 86 سویه جداشده این باکتری شناسایی شد. در مطالعه حاضر، 2 سویه بورخولدریا ایزوله شدند که یکی از آنها تولیدکننده ESBL بود.

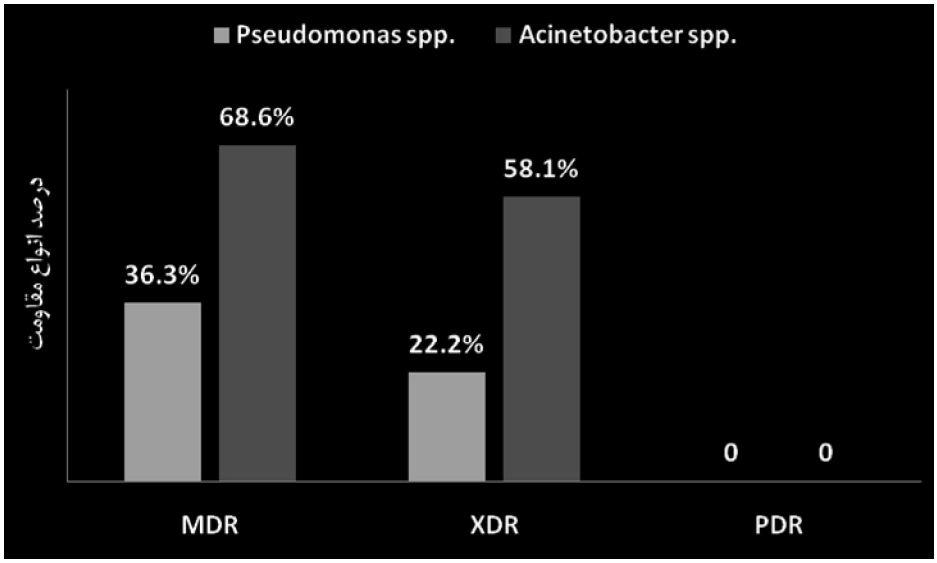
جدول 1- فروانی مطلق و نسبی هر یک از باکتری‌های غیرتخمیرکننده (ESBL positive و ESBL negative) جدا شده از کشت خون بیماران با استفاده از سیستم BACTEC 9240

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

پس از کلیستین و پلی‌میکسین B، مؤثّرترین آنتی‌بیوتیک بر ضدّ ایزوله‌های ESBL مثبت پسودوموناس، داروی سیپروفلوکساسین بود؛ به‌طوری‌که 52/1% سویه‌ها به آن حساسیت نشان دادند (جدول 2). در بین آنتی‌بیوتیک‌های کلاس بتالاکتام، ایزوله‌های پسودوموناس بهترین حساسیت را به پیپراسیلین-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 نگران‌کننده آن بود که همه سویه‌های استنوتروفوموناس به ایمی‌پنم و مروپنم مقاوم بودند. میزان حساسیت ایزوله‌های ESBL مثبت پسودوموناس و اسینتوباکتر به سیپروفلوکساسین به‌ترتیب: 52/1% (37 مورد) و 12/9 % (9 مورد) بود. پاسخ ایزوله‌های شایع غیرتخمیرکننده به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم بهتر از مروپنم بود (جدول 2). فراوانی ایزوله‌های MDR، XDR و PDR پسودوموناس و اسینتوباکتر جداشده از کشت خون بیماران در نمودار یک نشان داده شده است.

جدول 2- پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های گرم منفی غیرتخمیرکننده 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 پسودوموناس و اسینتوباکتر جداشده از کشت خون بیماران

بحث

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: پسودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتر به سفتازیدیم، 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 ارگانیسم 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 مؤثّر است. اما متأسفانه در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بیمارستان‌ها در ایران، از سیستم‌های کشت خون سیستماتیک BACTEC استفاده نمی‌شود و ارگانیسم‌های معمول نیز با چند روز تأخیر به پزشک گزارش می‌گردند.

در این مطالعه شایع‌ترین باکتری‌های غیرتخمیر کننده جداشده به‌ترتیب: پسودوموناس، اسینتوباکتر و استنوتروفوموناس بودند. در مطالعه حاضر، ایزوله‌های استنوتروفوموناس مالتوفیلیا به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاومت نشان دادند که این نتیجه قابل انتظار است؛ زیرا این ارگانیسم به‌طور ذاتی به بتالاکتام‌ها مقاوم است. بنابراین نباید در بالین برای درمان عفونت‌های ناشی از استنوتروفوموناس، از بتالاکتام‌ها استفاده کرد.

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

ایزوله‌های تولیدکننده ESBL ممکن است به‌دلیل فشار انتخابی ایجاد شده در نتیجه استفاده وسیع از داروهای ضدّ 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 پسودوموناس تولیدکننده ESBL نشان شد که بیش از 90درصد آنها مقاوم به کلرامفنیکل، بیش از 81/7درصد آنها مقاوم به تتراسایکلین و بیش از 63درصد آنها مقاوم به کوتریموکسازول، پیپراسیلین، تیکارسیلین و توبرامایسین بودند. سیپروفلوکساسین (52/1% حساسیت نشان دادند) مؤثّرترین کینولون بر ضدّ ایزوله‌های ESBL مثبت پسودوموناس بود. در بین آنتی‌بیوتیک‌های کلاس بتالاکتام، ایزوله‌های پسودوموناس بهترین حساسیت را به‌ترتیب به: پیپراسیلین-تازوباکتام (46/5%)، ایمی‌پنم (40/9%)، سفتازیدیم (33/8%) و مروپنم (32/4%) نشان دادند. همه سویه‌های پسودوموناس به کلیستین و پلی‌میکسین B حساس بودند. Blot و همکاران، برای بیماران با باکتریمی ناشی از اسیتوباکتر بومانی، میزان مرگ و میر را 42درصد گزارش کرده‌اند (15).

در مطالعه حاضر، ایزوله‌های ESBL مثبت پسودوموناس از بین آمینوگلیکوزیدها بالاترین مقاومت را به آمیکاسین نشان دادند (66/2% مقاوم بودند). پس از آن، 69درصد آنها به جنتامایسین و 76/1درصد آنها به توبرامایسین مقاوم بودند. در مطالعه Ferreira و همکاران (2011) بر روی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا جداشده از خون بیماران، 22درصد سویه‌ها به آمیکاسین و 37درصد 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 به‌ترتیب: 7درصد و 36درصد گزارش شده است (19) ولی در مطالعه ما مقاومت کل سویه‌های پسودوموناس (ESBL مثبت و منفی) به این دو دارو به‌ترتیب: 66/3درصد و 72/1درصد بود. همچنین میزان مقاومت در مطالعه Ferreira و همکاران در مقایسه با همین مطالعه که میزان حساسیت ایزوله‌های پسودوموناس به ایمی‌پنم و مروپنم را به‌ترتیب: 88درصد و 100درصد و حساسیت اسینتوباکتر را به این دو دارو 93درصد گزارش نموده‌اند، بسیار بالاتر بود و نشان از افزایش مقاومت به کارباپنم‌ها 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 کارباپنم‌ها یعنی ایمی‌پنم و مروپنم مقاوم بودند؛ همچنین مقاومت به کلیستین و پلی‌میکسین B در 11/8درصد ایزوله‌های استنوتروفووناس 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. مؤثّرترین داروها بر ضدّ سویه‌های استنوتروفوموناس، کوتریموکسازول و سیپروفلوکساسین بودند؛ به‌طوری‌که 94/1درصد 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 پسودوموناس آئروژینوزا به داروی سیپروفلوکساسین را 77/8درصد گزارش کرده‌اند (20). در مقابل، در مطالعه حاضر، 61/6درصد کل ایزوله‌های پسودوموناس به این دارو حساس بودند که نشان از کاهش حساسیت به این دارو دارد. همچنین در مطالعه حاضر مشاهده شد که به‌ترتیب: 52/1درصد و 12/9درصد سویه‌های ESBL مثبت پسودوموناس و اسینتوباکتر، به سیپروفلوکساسین

حساس بودند. در مقابل به‌ترتیب: 85/7درصد و 93/7درصد ایزوله‌های ESBL منفی پسودوموناس 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 پسودوموناس جداشده از خون به سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم، آمیکاسین، کوتریموکسازول و تتراسایکلین مقاوم بودند (21)؛ در حالی‌که در این مطالعه، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های ذکرشده به‌ترتیب: 38/4%، 48/5%، 53/5%، 63/6% و 78/8% بود. در مطالعه‌ای دیگر در ایران، میزان مقاومت به کوتریموکسازول و آمیکاسین به‌ترتیب: 85/8درصد و 35/8درصد گزارش شد (22).

کل ایزوله‌های استنوتروفوموناس، بهترین پاسخ را به‌ترتیب 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 66درصد کل ایزوله‌های اسینتوباکتر به 23مورد از 25آنتی‌بیوتیک 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 ایمی‌پنم بهتر از مروپنم بود؛ به‌طوری‌که میزان مقاومت به ایمی‌پنم در ایزوله‌های پسودوموناس و اسینتوباکتر به‌ترتیب: 47/5درصد و 81/4درصد بود؛ در مقابل میزان مقاومت به مروپنم در این دو ارگانیسم به‌ترتیب: 55/6درصد و 88/4درصد بود. نتایج این مطالعه در این خصوص بسیار نگران‌کننده است، زیرا کارباپنم‌ها به‌عنوان یکی از آخرین حربه‌های دفاعی برای از بین‌بردن عفونت‌های ناشی از پسودوموناس 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).

نتیجه‌گیری

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 به‌صرفه‌ترین داروها در کشور ما می‌باشند، برای درمان حداقل 40% عفونت‌های ناشی از پسودوموناس و 78% عفونت‌های اسینتوباکتر مؤثّر نیستند. بدین‌منظور، انجام مطالعات اپیدیمولوژیک کشوری با استفاده از روش‌های فنوتایپینگ و ژنوتایپینگ با هدف ارائه راهکارهای مؤثّر برای جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم موجود و از بین بردن آنها و جلوگیری از به‌وجود آمدن سویه‌های مقاوم جدید در جامعه ضروری است.

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 Uni 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-Ju?rez P, Vilar-Compte D, Pérez-Jiménez C, ? amendys-Silva SA, Sandoval-Hern?ndez S, Volkow-Fern?ndez 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 β-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 NCODS, 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]

Abstract *Original Article*

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

Maneli Amin Shahidi[1], Mojtaba Anvarinejad[1], Amin Abbasian[1], Pejman Abbasi[1], Noroddin Rafaatpour[1], Mohammad Ali Dehyadegari[1], Bahman Pourabbas[1], Gholam Reza Pouladfar[1], Jalal Mardaneh[2]*

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 β-lactam antibiotics, *Pseudomonas* spp. showed the best sensitivity to piperacillin-tazobactam (46.5%).

Conclusion: It was found that β-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***

[1] *Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Nemazee Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.*
[2] *Corresponding author; Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Khorasan Razavi, Iran. Jalalmardaneh@yahoo.com*