

## حساسیت آنتی‌بیوتیکی و ژنوتیپ پseudomonas آئروژینوزا در بیماران مبتلا به فیروز کیستیک

دکتر سیداحمد طباطبایی\*<sup>۱</sup>، دکتر شاهین نریمان<sup>۲</sup>، دکتر رضا تقی‌پور<sup>۳</sup>، دکتر قمر تاج‌خان بابایی<sup>۴</sup>، نازنین حسین‌خان<sup>۵</sup>، دکتر فرشته افتخار<sup>۶</sup>، دکتر علی آقایارماکویی<sup>۷</sup>، دکتر سعید صدر<sup>۸</sup>

تاریخ دریافت: 1391/11/29 تاریخ پذیرش: 1392/01/19

## چکیده

**پیش زمینه و هدف:** بیماری فیروز کیستیک از فراوان‌ترین بیماری‌های کشنده اتوزومال مغلوب در کودکان سفید پوست می‌باشد. موتاسیون در ژن CFTR باعث عدم تعادل یون‌ها در طرفین غشاء شده و نهایتاً مایع سطح مجاری اصلی تنفسی کاهش قابل توجهی یافته و زمینه را برای کلونیزه شدن باکتری‌های فرصت طلب، به ویژه پseudomonas آئروژینوزا در ریه این بیماران فراهم می‌نماید که باعث اختلال عملکرد ریه‌ها می‌شود. هدف از این بررسی تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و ژنوتیپ پseudomonas آئروژینوزا در بیماران مبتلا به فیروز کیستیک است.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه مقطعی توصیفی-تحلیلی از ۴۶ بیمار برای تعیین سویه‌های باکتری از نمونه خلط و یا سوآب فارنژیال تحتانی استفاده شد. جهت تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی از سویه استاندارد P. aeruginosa ATCC27853 استفاده شد و از یک سویه B. Cepacia به عنوان استاندارد و جهت مقایسه استفاده شد. جهت تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی از ۱۱ دیسک آنتی‌بیوتیکی استفاده شد و جهت تعیین الگوی ژنتیکی سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا از روش RAPD با استفاده از PCR بهره گرفتیم.

**یافته‌ها:** از مجموع ۴۶ بیمار مورد بررسی، ۱۹ بیمار (۴۸/۳٪) مؤنث و ۲۷ بیمار (۵۸/۷٪) مذکر بودند. در بیماران مذکر ۲۰ بیمار (۷۴/۱٪) و در بیماران مؤنث ۱۱ بیمار (۵۷/۹٪) آلوده به پseudomonas آئروژینوزا بودند. در این مطالعه هیچ سویه B. cepacia شناسایی نشد. در بین بیماران، ۹ بیمار آلوده با استافیلوکوک اورئوس و ۷ بیمار با کلیسیلا و ۱۱ مورد با کاندیدا آلبیکنس و ۱ بیمار با سراشيامارسنس شناسایی شد. از ۳۱ بیمار (۶۷/۴٪) میکروب پseudomonas آئروژینوزا بدست آمد که ۱۵ مورد سویه‌های موکوئیدی و ۱۲ مورد سویه‌های غیر موکوئیدی و ۴ بیمار همزمان سویه‌های موکوئیدی و غیر موکوئیدی داشتند. در تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی تمام موارد حساس به تورامایسین و سیروفلوکساسین بوده، ۷/۸ درصد حساس به آمیکاسین و پیراسیلین، ۹۳/۳ درصد به جنتامایسین، ۹۱/۱ درصد به تیکارسیلین، ۸۶/۷ درصد به کولیستین، ۸۰ درصد به کاربنی سیلین، ۴۸/۹ درصد به سفوتاکسیم، ۲۶/۷ درصد به ایمی پنم و ۱۱/۱ درصد به سفنازیدیم حساس بودند. در بررسی الگوی ژنتیکی با RAPD-PCR برای اکثر سوش‌ها یکسان بود.

**بحث و نتیجه گیری:** این بررسی نشان داد که سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا مقاومت بالایی به ایمنی پنم و سفالوسپورین‌ها دارند. ارتباط خاصی بین سن بیماران و جنس آن‌ها با الگوی ژنتیکی و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی، مشاهده نشد. همچنین تفاوتی بین کلون‌های خاصی که از قابلیت انتقال بالاتر و یا قدرت بیماری‌زایی بیشتری نسبت به سایر کلون‌ها برخوردار هستند، مشاهده نشد.

**کلید واژه‌ها:** پseudomonas آئروژینوزا، فیروز کیستیک، آنتی بیوگرام، RAPD-PCR

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره سوم، ص ۱۹۲-۱۸۴، خرداد ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز آموزشی درمانی کودکان مفید، بخش ریه، تلفن: ۰۹۱۲۱۵۹۹۰۱۴

Email: seyedtabatabaai@hotmail.com

<sup>۱</sup> متخصص کودکان، فلو شپ فوق تخصصی بیماریهای ریه کودکان، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> متخصص کودکان، فوق تخصص نوزادان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۳</sup> متخصص کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۴</sup> متخصص کودکان، فلوشیپ فوق تخصصی ریه اطفال، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۵</sup> کارشناس ارشد میکروبیولوژی

<sup>۶</sup> دکترای میکروبیولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۷</sup> متخصص کودکان، فوق تخصص نوزادان، استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

<sup>۸</sup> متخصص کودکان، فوق تخصصی ریه اطفال، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

## مقدمه

بیماری فیبروز کیستیک (CF) از فراوانترین بیماری‌های ارثی اتوزومال کشنده در میان سفید پوستان است. شیوع بیماری در کشورها و نژادهای مختلف بسیار متفاوت است ولی شیوع تقریبی آن یک در هر ۲۵۰۰ تولد زنده می‌باشد. این بیماری در اثر نقص در انتقال یون کلر به علت اشکال در ساختمان پروتئین Transmembrane Regulator (CFTR) Cystic Fibrosis رخ می‌دهد و عدم تعادل یون‌ها در طرفین غشاء منجر به کمبود آب در مواد مترشحه غدد آپوکرین می‌شود. ترشحات بسیار چسبناک باعث تنگی مجرا، انسداد و از بین رفتن این غدد می‌گردد (۱). در اثر موتاسیون در ژن CFTR، نهایتاً مایع سطح مجاری اصلی تنفسی کاهش قابل توجه یافته و زمینه برای کلونیزه شدن باکتری‌های فرصت طلب به ویژه پseudomonas آئروژینوزا در ریه بیماران فراهم می‌گردد (۲). کلونیزه شدن و عفونت ریه‌ها توسط باکتری‌های پاتوژن در بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک منجر به اختلال عملکرد ریه‌ها در این بیماران شده و پس از ایجاد نارسایی ریوی منجر به مرگ این بیماران می‌شود (۳). گونه‌های متفاوتی از باکتری‌ها منجر به عفونت تنفسی در بیماران CF می‌گردد که برخی از آنها شامل: *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*، *Staphylococcus aureus*، *Haemophilus influenzae* و *Burkholderia cepacia* می‌باشند (۴). در بین این پاتوژن‌ها *pseudomonas aeruginosa* یک علت اصلی بیماری‌زایی و مرگ و میر در این بیماران می‌باشد (۵). پس از کلونیزه شدن پseudomonas آئروژینوزا در ریه این بیماران بندرت ممکن است که بتوان با مصرف آنتی‌بیوتیک این میکروب را نابود کرد (۴). عفونت با پseudomonas آئروژینوزا در بیش از ۸۰ درصد موارد بیماران CF رخ می‌دهد و منجر به اختلال پیش‌رونده ریه‌ها و مرگ زود رس می‌شود (۶). پseudomonas آئروژینوزا به طور قابل توجهی به اکثریت عوامل ضد میکروبی مقاوم می‌باشد و درک نقش این ارگانیسم در عفونت ریه بیماران CF می‌تواند منجر به درمان تعداد قابل توجهی از این بیماران گردد (۷). هدف از این مطالعه بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تنوع ژنتیکی سویه‌های پseudomonas آئروژینوزای ایزوله شده از بیماران CF چند مرکز مراقبت از بیماران به روش RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) PCR بود.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی (توصیفی - تحلیلی) می‌باشد. جهت تهیه نمونه برای تعیین سویه‌های باکتری از نمونه خلط و یا سوآب گلو از بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک در محدوده سنی

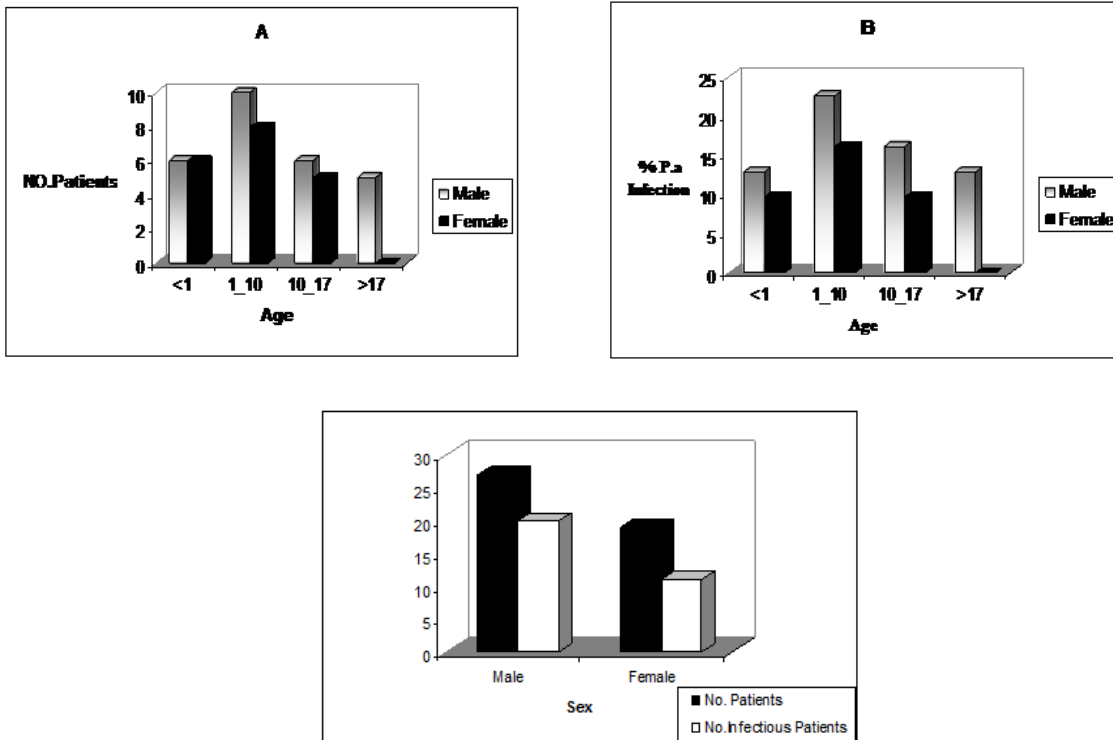
۳ ماه تا ۲۳ سال از مهر ۱۳۸۲ تا اسفند ۱۳۸۳ استفاده شد. بیماران مورد مطالعه از دو مرکز درمانی شامل درمانگاه ۳۳ بیمار (۶۹/۶٪) و بیماران بستری ۱۴ بیمار (۳۰/۴٪) بودند. نمونه‌های متوالی با فاصله یک ماه یا بیشتر از بیماران تهیه شد. جهت تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی از سویه استاندارد P. aeruginosa ATCC27853 استفاده شد و از یک سویه B. cepacia به عنوان استاندارد و جهت مقایسه استفاده شد. کشت نمونه‌های خلط بلافاصله پس از نمونه گیری در دو محیط BHIA (Brain Heart Infusion Agar) و محیط ناقل و غنی کننده مالاشیت گرین برات انجام شد. جهت شناسایی کلونی‌های مشکوک به پseudomonas آئروژینوزا از معرف اکسیداز ۱ درصد استفاده گردید و در صورت مثبت بودن تست اکسیداز رنگ آمیزی کلونی‌ها صورت می‌گرفت. سویه‌ها در ۲ میلی متر محیط کشت BHI حاوی ۰/۲ میلی لیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) در دمای ۱۵- تا ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. جهت تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیک از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سیپروفلوکساسین (5mg)، جنتامایسین (۱۰mg)، کاربنی سیلین (۱۰۰mg)، آمیکاسین (۳۰mg)، توبراماسین (۱۰mg) و سفوتازیدیم (۳۰mg) از شرکت پادتن طب و از دیسک‌های تیکار سیلین (۷۵mg) و پپراسیلین (۱۰mg) از شرکت most انگلستان و دیسک‌های ایمی پنم (۱۰mg) و سفوتاکسیم (۳۰mg) از شرکت ایران دارو دیسک کولیسیتین (10mg) از شرکت Biomerieux استفاده شد. جهت تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا از روش آنتی بیو گرام به کمک دیسک با روش Kirby & Bauer 1996 و از کشت ۲۴ ساعته در محیط BHI استفاده شد. به این صورت که ۳- ۲ کلونی به حدود ۴ میلی لیتر محیط مایع مولر هینتون (Mueller-Hinton Agar) در سه جهت مختلف کشت داده شد و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به کمک پنس استریل به فاصله از هم و از کناره پلیت گذارده شد و پس از ۲۴ ساعت رعایت دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بررسی انجام گرفت. جهت تعیین الگوی ژنتیکی سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا از روش RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) و با استفاده از PCR - AP (Arbitrary Primed PCR) استفاده شد. در این تحقیق جهت استخراج DNA از روش انجماد و ذوب کردن استفاده شد چرا که باز دهی، سرعت و تکرار پذیری آن در تحقیقات گذشته به اثبات رسیده بود (۸). پس از تهیه کلیه یافته‌ها آنالیز خوشه‌ای (cluster analysis) انجام و از ضریب تشابه Jacard به منظور تعیین میزان شباهت سویه‌های مختلف به یکدیگر استفاده گردید. سویه‌هایی که بیش از ۸۵ درصد به یکدیگر شباهت داشتند یکسان در نظر گرفته شدند. در نهایت درختچه تکاملی (Dendrogram) با استفاده از

تقسیم شدند: گروه سنی زیر یک سال ۱۲ بیمار (۲۶/۱٪)، گروه سنی یک تا ۹ سال ۱۸ بیمار (۳۹/۱٪)، گروه سنی ۱۰-۱۷ سال ۱۱ بیمار (۲۳/۹٪) و گروه ۱۸ سال و بالاتر ۵ بیمار (۱۰/۹٪) (شکل ۱: پراکندگی سن و جنس در بیماران آلوده به پseudomonas). کولونی‌های پseudomonas آئروژینوزا بر روی محیط BHI به سه شکل دیده شدند. تیپ یک بیضی شکل با ظاهر خشن و دارای حاشیه باریک، تیپ دو کوچک، گنبدی و شفاف و تیپ سه که موکوئیدی بود و اغلب سویه‌ها از این نوع بودند. در این تحقیق هیچ سویه بورخولدريا سپاشیا شناسایی نشد. در میان بیماران CF مورد مطالعه ۹ بیمار آلوده به استافیلوکوکوس آئروس و هفت بیمار آلوده به کلبسیلا و ۱۱ بیمار آلوده به کاندیدا آلبیکانس و یک بیمار آلوده به سراشيامارسنس شناسایی شد.

تکنیک UPGMA (Unweighted Paired Group Mean Average) و نرم افزار آماری NTSYS ترسیم شد.

### نتایج

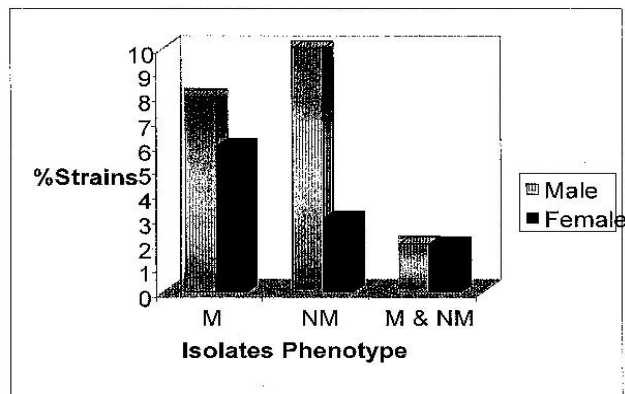
از ۴۶ بیمار مورد بررسی، ۳۲ بیمار (۶۹/۶٪) از درمانگاه و ۱۴ بیمار (۳۰/۴٪) از بیماران بستری مورد بررسی قرار گرفتند. ۲۲ بیمار مورد بررسی در درمانگاه همزمان ناراحتی گوارشی و تنفسی داشتند و چهار بیمار ناراحتی شدید تنفسی و ۱ بیمار ناراحتی شدید گوارشی داشت. ۱۹ بیمار (۴۱٪) ساکن شهرستان ۲۷ بیمار (۵۹٪) ساکن شهر تهران بودند. از ۳۱ بیمار (۶۷/۴٪) باکتری پseudomonas آئروژینوزا بدست آمد که ۱۵ مورد سویه‌ها موکوئیدی و ۱۲ مورد سویه‌ها غیر موکوئیدی و در چهار بیمار به طور همزمان سویه‌های موکوئیدی و غیر موکوئیدی بودند. بیماران در چهار گروه



شکل شماره (۱): پراکندگی سن و جنس در بیماران آلوده به پseudomonas

مؤنث ۱۱ بیمار (۵۷/۹٪) آلوده به پseudomonas آئروژینوزا بودند. حضور فرم موکوئیدی در گروه سنی دوم (۹-سال) بیش از سایر گروه‌ها (۸۳/۳٪) بود و پس از آن به ترتیب در گروه‌های سوم (۶۲/۵٪)، چهارم (۵۰٪) و اول (۲۸/۵٪) کاهش می‌یافت (شکل ۲ فنوتیپ پseudomonas).

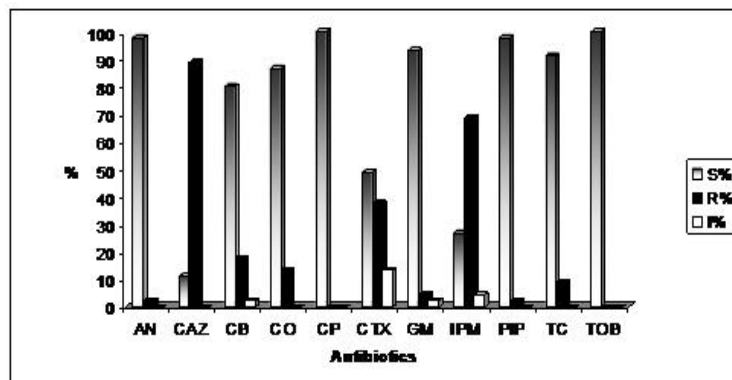
از ۳۱ (۶۷/۴٪) بیمار مبتلا به پseudomonas آئروژینوزا، ۷ بیمار (۲۲/۶٪) در گروه اول و ۱۲ بیمار (۳۸/۷٪) در گروه دوم، ۸ بیمار (۲۵/۵٪) در گروه سوم و ۴ بیمار (۱۲/۹٪) در گروه چهارم قرار داشتند. ۱۹ بیمار (۴۱/۳٪) مؤنث و ۲۷ بیمار (۵۸/۷٪) مذکر بودند. در میان بیماران مذکر ۲۰ بیمار (۷۴/۱٪) و در میان بیماران



شکل شماره (۲): فنوتیپ پseudomonas جدا شده از بیماران مبتلا به تفکیک جنس موکوئید M غیرموکوئید NM

کولیسیتین ۸۶/۷ درصد، کاربنی سیلین ۸۰ درصد، سفو تاکسیم ۴۸/۹ درصد، ایمی پنم ۲۶/۷ درصد و سفنازیدیم ۱۱/۱ درصد بود (شکل ۳).

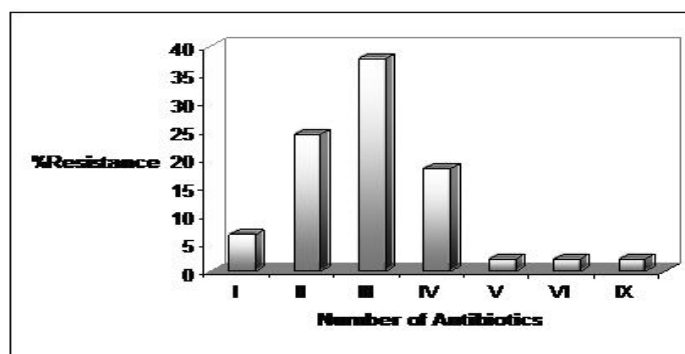
در تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به کمک روش انتشار در دیسک مشخص شد که حساسیت در تویرامایسین و سیپروفلوکساسین ۱۰۰ درصد و آمیکاسین و پپراسیلین ۹۷/۸ درصد، جنتا مایسین ۹۳/۳ درصد، تیکارسیلین ۹۱/۱ درصد،



شکل شماره (۳): الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پseudomonas بدست آمده از بیماران CF حساس S= متوسط M= مقاوم R=

سویه (۴/۴%) نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند و ۳۲ سویه (۷۱/۱%) مقاومت چندگانه حداقل به سه آنتی‌بیوتیک داشتند (شکل ۴).

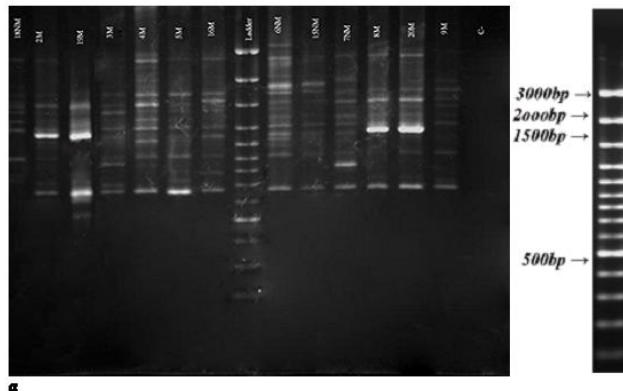
نکته جالب توجه این بود که داروی ایمی پنم علی‌رغم اینکه در درمان بیماران CF در ایران استفاده نمی‌شود، مقاومت بالایی نسبت به آن وجود دارد. از مجموع ۴۵ سویه حاصل شده، تنها دو



شکل شماره (۴): میزان مقاومت پseudomonas آئروژینوزا به یک یا چند آنتی‌بیوتیک

غیرموکوئیدی (NM) به دست آمده بود، در سه مورد الگوی ژنتیکی هر دو سویه یکسان بود سویه‌های ۲۸ و ۲۹ در گروه D، سویه‌های ۳۶ و ۴۳ در گروه I و سویه‌های ۲۵، ۲۶ و ۴۴ در گروه M قرار داده شدند. سویه‌های مربوط به بیماران مختلف که الگوی باندهای یکسان داشتند و در گروه‌های مشترک قرار می‌گرفتند، شامل سویه‌های ۱۴، ۳۱، ۳۰، ۳۳، ۲۴، ۱۲، ۲۳ و ۲۷ با پروفایل باندهای DNA یکسان در گروه C، سویه‌های ۳۴ و ۴۵ با الگوی یکسان در گروه D، سویه‌های ۴۱ و ۴۲ در گروه E سویه ۲۱ در گروه M قرار داده شدند. تکرار پذیری الگوی RAPD-PCR نیز با انجام حداقل دو آزمایش برای هر نمونه مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

جهت تمایز ژنتیکی سویه‌ها با استفاده از روش RAPD-PCR و با استفاده از دو پرایمر ۲۰۸ و ۲۷۲ بر روی ۴۵ سویه مورد مطالعه انجام شد که سویه‌ها در ۱۶ گروه مجزا قرار گرفتند. در بین سویه‌هایی که به طور متوالی از ۹ بیمار به دست آمده بودند هشت بیمار (۸۹/۸٪) الگوی باندی کاملاً یکسان داشتند: سویه‌های شماره ۱۸ از یک بیمار در گروه A، ۱۹ و ۲۰، ۲۰ و ۱۱، ۱۶ از سه بیمار مختلف با الگوی ژنتیکی یکسان در گروه C، سویه‌های ۲۶، ۲۵ و ۴۴ از یک بیمار در گروه M، سویه‌های ۱۰، ۱۳ و ۳۷ از یک بیمار در گروه H سویه‌های ۵ و ۳۸ از یک بیمار در گروه J، ۱۵ و ۶ از یک بیمار در گروه G قرار داده شدند. سویه‌های ۲۴ و ۴۲ که هر دو از یک بیمار بدست آمده بودند، الگوی باندی کاملاً متفاوتی را نشان دادند. از ۴ بیماری که به طور همزمان سویه‌های موکوئیدی (M) و



شکل شماره (۵): الگوی ژنتیکی سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا با استفاده از روش RAPD-PCR و پرایمر ۲۰۸

آلوده نبودند و ۱۱ بیمار آلوده به کاندیدا آلبیکانس بودند که با توجه به فعالیت ضد قارچی در پseudomonas آئروژینوزا، حضور این دو عجیب به نظر می‌رسد. ۹ بیمار به استافیلوکوکوس اورئوس و ۷ بیمار آلوده به کلیسیلا و ۱ بیمار به سریشیا مارسنس بودند. متوسط سن بیماران مورد بررسی ۷/۶ سال بود و در این پژوهش مشخص شد که بین سن و میزان آلودگی با پseudomonas آئروژینوزا ارتباط مستقیم وجود دارد. نتایج تحقیقات این‌گونه نشان می‌دهد که درمان‌های اولیه عفونت پseudomonas آئروژینوزا تنها ۸۰ درصد موفقیت آمیز است و این امر نشان دهنده اهمیت جلوگیری از عفونت اولیه توسط باکتری می‌باشد (۱۳، ۱۴). در این تحقیق میزان آلودگی با فرم موکوئیدی پseudomonas آئروژینوزا در گروه سنی دوم از همه بیشتر بود (۸۳/۳٪) و پس از آن به ترتیب در گروه‌های سنی سوم، چهارم و اول بود. شاید علت فراوانی فرم موکوئید در گروه دوم این باشد که ۵۵ درصد این بیماران ساکن شهرستان بودند و به علت کمبود امکانات تشخیصی، تشخیص

## بحث

بیماران مبتلا به CF مستعد به عفونت‌های مزمن تنفسی هستند که این عفونت‌ها بوسیله ارگانیسم‌های متعددی ایجاد می‌شوند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها پseudomonas آئروژینوزا می‌باشد. بیماران CF از عفونت‌های مکرر تنفسی با آسیب‌های غیر قابل بازگشت در عملکرد ریه‌ها به طور دائم رنج می‌برند که منجر به بیماری زایی و مرگ و میر می‌گردد (۴ و ۹). سوش‌های پseudomonas آئروژینوزا که به طور مزمن در بیماران CF کلونیزه شده‌اند به طور قابل توجهی از فنو تیپ‌ها و سوش‌های سایر بیماران و موارد محیطی این میکروارگانیسم متفاوت می‌باشد (۱۰، ۱۱). در این تحقیق از ۴۶ بیمار CF مورد مطالعه که بیماری آن‌ها از طریق تست عرق و معاینات بالینی به اثبات رسیده بود، ۳۱ بیمار (۶۷/۴٪) آلوده به پseudomonas آئروژینوزا بودند که این میزان در مقایسه با اغلب مراکز CF در دنیا (۳۸٪) بسیار بالاتر است (۱۲). هیچ کدام از این بیماران به Burkholderiacepacia

بیماری CF در سن بالاتری صورت می‌گیرد و به علت عدم درمان مناسب، آلودگی با پسودوموناس آئروژینوزا به صورت مزمن در آمده است. در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای به دست آمده از بیماران CF نشان داد که توربا مایسین و سیپروفلوکساسین بیشترین تأثیر را بر روی سویه‌های مورد مطالعه داشتند. حساسیت نسبت به توربا مایسین در مراکز مختلف بین ۴۴ تا ۷۵ درصد متغیر است که به علت استفاده بی رویه از این آنتی‌بیوتیک است، در حالی که این آنتی‌بیوتیک در ایران به ندرت جهت درمان عفونت پسودوموناس آئروژینوزا مورد استفاده قرار می‌گیرد. سیپروفلوکساسین تنها در کودکان بالای ۱۰ سال مورد استفاده قرار می‌گیرد و حساسیت میکروارگانیسم نسبت به آن در اغلب مراکز درمانی دنیا بین ۵۷ تا ۸۰ درصد متغیر است (۱۶،۱۵). در طی این تحقیق مشخص شد که علی‌رغم استفاده بسیار کم از آنتی‌بیوتیک ایمی پنم جهت درمان عفونت پسودوموناس آئروژینوزا در ایران، حساسیت این میکروارگانیسم نسبت به ایمی پنم بسیار ناچیز است (۲۶/۷٪) در حالی که دکتر افتخار و همکاران در طی تحقیقی حساسیت ۱۰۰ درصد پسودوموناس آئروژینوزا را نسبت به این آنتی‌بیوتیک نشان دادند (۱۷). در تحقیقات انجام شده در سایر کشورها حساسیت ۴۸ درصد تا ۶۳ درصد را نسبت به ایمی پنم گزارش کرده‌اند (۱۸،۱۵) در تحقیق انجام شده توسط Graziana Manno و همکاران در ایتالیا مقاومت به ایمی پنم افزایش یافته بود ولی در حد سایر تحقیقات نبود (۲۰٪) که علت آن افزایش مصرف مروپنم و بروز مقاومت به طور آهسته‌تر نسبت به این آنتی‌بیوتیک بود (۱۹). علت افزایش بروز مقاومت نسبت به ایمی پنم می‌تواند به دلایل زیر باشد:

۱- از آنجا که پروتئین غشاء خارجی OprD در ورود ایمی پنم به داخل سلول باکتری نقش دارد، بروز این پروتئین در حضور ناقل دارویی MexEF-OprN که در ایجاد مقاومت نسبت به کلرا مفینیکل و کینولون‌ها وتری متو پریم نقش دارد، به شدت کاهش می‌یابد.

۲- اخیراً کلاس‌های جدیدی از بتا متالوبتا لاکتاماز از سویه‌های مقاوم به (کاربی پنم) جدا شده است. این آنزیم شش نوع مختلف (VIM 1-6) دارد که در هیدرولیز کلیه بتالاکتام‌ها به ویژه کاربی پنم نقش دارند. ژن‌های این آنزیم‌ها بر روی قطعات متحرک ژنتیکی قرار گرفته و قابلیت بروز و انتشار در پاتوژن‌های گرم منفی بالاست (۲۱). این نوع مقاومت بوسیله ی مهار کننده‌های بتا لاکتاماز متداول قابل برگشت نمی‌باشد (۲۲). حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم در این تحقیق ۱/۱ درصد بود در حالی که در سایر تحقیقات به ویژه تحقیق انجام شده توسط Manno

حساسیت بالایی (۸۶٪) نسبت به این آنتی‌بیوتیک نشان داده شده است. حساسیت نسبت به آمیکاسین ۹۷/۸ درصد و جنتامایسین ۹۳/۳ درصد بود که در تحقیق انجام شده توسط yagci A (۲۳) نیز مؤثرترین آمینو گلیکوزید علیه پسودوموناس آئروژینوزا، آمیکا سین با حساسیت ۹۱/۴ درصد شناخته شده است. در رابطه با پیپراسیلین نیز در تحقیق انجام شده توسط گروه‌ها حساسیت ۹۷/۸ درصد وجود داشت که با سایر تحقیقات اخیر به ویژه آخرین تحقیق در سال ۲۰۰۶ میلادی توسط Nazik M (۲۴) در استامبول (ترکیه) با حساسیت ۸۶ درصد این مطلب تأیید می‌گردد. در این تحقیق ۲۸ سویه (۶۱٪) فنو تیپ مقاومت چند دارویی داشتند (مقاومت به بیش از دو آنتی‌بیوتیک) که این میزان بسیار بالاتر از سایر مطالعات می‌باشد که در آن‌ها ۱۳/۳ درصد مقاومت چند دارویی گزارش شده بود (۱۲). جفت موکوئیدی و غیر موکوئیدی که به طور همزمان از ۴ بیمار بدست آمد، در سه مورد (۷۵٪) الگوی ژنتیکی کاملاً یکسان بود که این نتایج مطابق با نتایج Adams و همکاران است که وجود ارتباط کلونال بین جفت‌های موکوئید و غیرموکوئید را نشان دادند (۲۵). در این تحقیق تنوع اساسی در بین سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران CF مشاهده شد، که البته تمامی این سویه‌ها در سطح تشابه متعلق به یک دودمان سلولی می‌باشد. در تحقیقات انجام شده توسط Anthony و همکاران نیز که بر روی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران CF استرالیایی صورت گرفته بود، در سطح تشابه ۷۵٪ به یک دودمان سلولی تعلق داشتند (۲). در بین ۱۶ گروه خوشه‌ای (cluster) بیشترین تعداد سویه‌ها (۱۵ سویه) در گروه C قرار داشتند، که این ۱۵ سویه از ۱۲ بیمار CF جدا شده بودند که ۸۳/۳ درصد آن‌ها مربوط به مطب پزشک بودند با توجه به نقش مهمی که قابلیت انتقال سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا در اپیدمیولوژی عفونت ریوی در بیماران CF دارد، این احتمال وجود دارد که این سویه‌ها دارای قابلیت انتقال بالا و عامل ایجاد عفونت متقاطع در بیماران مراجعه کننده به مطب پزشک باشند. البته تماس و ارتباط نزدیک بین بیماران مراجعه کننده به مطب پزشک که سویه‌ی خاصی را حمل می‌کردند وجود نداشته است و احتمال عفونت متقاطع ضعیف به نظر می‌رسد، ولی از آنجا که علی‌رغم در صد کم، امکان بروز عفونت متقاطع همواره وجود دارد، لذا توصیه می‌شود که به منظور جلوگیری از بروز سویه‌های مقاوم و انتشار آن‌ها، بیماران در منازل خود تحت در مان آنتی‌بیوتیکی قرار گیرند و تا حد امکان از بستری نمودن بیماران CF در بیمارستان‌ها و مراکز CF جلوگیری شود. سویه‌های ۸،۱۵،۶ و ۲۰ متعلق به دو بیمار بودند که به دلیل شدت عارضه‌ی تنفسی فوت شدند. این سویه‌ها متعلق به دوکلون

خوشه‌ای متفاوت قرار داشتند. به همین صورت سویه‌هایی که مقاومت چند دارویی یکسان داشتند به کلون‌های متفاوتی تعلق داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فنو تیپ برای تعیین نوع پseudomonas آئروژینوزا مناسب نیستند.

### پیشنهادات

پس از بررسی کامل این تحقیق و مطالعات مشابه در نهایت توصیه می‌گردد که: جهت انتخاب داروی موثر علیه پseudomonas آئروژینوزا، تست آنتی بیوگرام انجام شود. از آنتی‌بیوتیک‌های استنشاقی به ویژه توبرا مایسین در دوز مناسب استفاده شود. در بزرگسالان آلوده به پseudomonas آئروژینوزا از سیپروفلوکساسین استفاده شود. استفاده از پرایمرهای بیشتر جهت بررسی دقیق تر ژنتیکی سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا پیشنهاد می‌گردد. جهت تایید نتایج RAPD-PCR از تکنیک PFGE استفاده شود.

مجزا بودند و به نظر نمی‌رسد که از قدرت بیماری زایی بیشتری نسبت به سایر سویه‌ها برخوردار باشند. این مطابق با نتایج تحقیقات Adams و دیگران است که معتقدند ارتباط قابل ملاحظه‌ای بین وضعیت کلینیکی بیمار و سویه پseudomonas آئروژینوزای کلونیزه شونده وجود ندارد (۲۵). مقایسه‌ی کلون‌های مختلف پseudomonas آئروژینوزا ارتباطی را بین کلون‌های خاصی از پseudomonas آئروژینوزا در بیماران ساکن تهران یا شهرستان نشان نداده که این نشان دهنده گستردگی وسیع این سویه‌ها از لحاظ جغرافیایی است. همچنین مشخص نشد که کلون‌های خاصی در جنس‌های مذکر یا مؤنث قدرت بیماری زایی یا شیوع بیشتری داشته باشند. مقایسه‌ی الگوی ژنتیکی کلون‌های مختلف با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌ها ارتباط خاصی را بین الگوی DNA خاص و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی خاص نشان نداد. در واقع در صد بالایی (۸۰٪) از سویه‌ها که در گروه‌های یکسان از لحاظ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی قرار گرفته بودند، در گروه‌های

### References:

1. Akabas MH. Channel-lining residue in the M3 membrane sparing segment of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry* 1998; 37(35): 12233-40.
2. Anthony M, Rose B, Pegler M, Elkins M, Service H, Thamotharampillai K, et al. Genetic analysis of pseudomonas aeruginosa isolates from sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2002; 40(8):2772-8.
3. Lyczak J, Cannon B. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2): 194-222.
4. Saiman L, Siegle D. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(1): 57-71.
5. Govan JR, Harris GS. Pseudomonas aeruginosa and cystic fibrosis, unusual bacterial adaptation and pathogenesis. *Microbiol Sci* 1986; 3(10): 302-8.
6. Pier GB. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to Pseudomonas aeruginosa infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(16): 8822-8.
7. Spilker T, Coenye T, Vandamme P. PCR-based assay for differentiation of Pseudomonas aeruginosa, from other Pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patient. *J Clin Microbiol* 2004; 42(5): 2074-9.
8. Richardson AE, Vickers LA, Watson JM, Gibson AH. Differentiation of Rhizobium strain using the polymerase chain reaction with random and directed primer. *Soil Biol Biochem* 1995; 27:515-24.
9. Saiman L. Microbiology of early CF lung disease. *Pediatr Rev* 2004; 5: S367-9.
10. Mahenthalingam E, Campbell ME, Foster J, Larn JS, Speert DP. Random amplified polymorphic DNA typing of Pseudomonas aeruginosa isolates recovered from patient with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (5): 1129-35.
11. Mahenthalingam E, Campbell ME, Speert DP. Non motility and phagocytic resistance of Pseudomonas aeruginosa isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immune* 1994; 62: 596-605.

12. Da Silva F, Levi J N, Bento C, Rodngues J. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis out patients clinic. *J Med Microbiol* 2001; 50(3):261-7.
13. Lee T, Brownlee KG, Denton M, Littlewood JM, Conway SP. Reduction in prevalence of chronic *Pseudomonas aeruginosa* at regional pediatric cystic fibrosis center. *Pediatr Pulmonol* 2004; 37: 104-10.
14. Weismann HG, Steinkamp G, Ratjen F, Bauernfiend A, Przylenk B, Doring G. Placebo-controlled double blind randomized study of aerosolized tobramycin for early treatment of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cysticfibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1998; 25:88-92.
15. Lawati AD, Crouch N, Elhag K. Antibiotic consumption and development of resistance among gram- negative bacilli in intensive care unit in Oman. *Ann Saudi Med* 2000; 20:324-7.
16. Mendes C, Oplustil C, Sakagam E, Turner P, Kiffer C. Antimicrobial susceptibility in Intensive Care Unit. *Brazil J Infect Dis* 2005; 45:44-51.
17. Eftekhari F, Rostamizadeh F, Khodadad A. Study of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patient. *Iran J Infect Dis Trop Med* 2003; 20: 7-14.
18. Gençer S, Ak O, Benzonana N, Batirel A, Ozer S. Susceptibility patterns and cross resistances of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in a teachinghospital of Turkey. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2002; 1:2.
19. Manno G, Cruciani M, Romano L, Scapolan S, Mentasti M, Lorini R, Minicucci L. Antimicrobial use and *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility profile in a cystic fibrosis centre. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25(3):193-7.
20. Köhler T, van Delden C, Curty LK, Hamzehpour MM, Pechere JC. Over expression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affect all to cell signaling in *Pseudomonas aeurogenosa*. *J Bacteriol* 2001; 183(18):5213-22.
21. Lannefors L, Deenneresten U, Theander K, Martensson I, Kornfa R. Successful treatment of infants and small children. *J Cystic Fibrosis* 2003; S61-S68.
22. Sardelic S, Pallecchi L, Punda Polic V, Rossolini G. Carbapenem resistant *pseudomonas aeruginosa* carrying VIM-2metallo-B lactamase determinants, Croatia. *Emerg Infec Dis* 2003; 9(8): 1022-3.
23. Yagci A, Ciragil P, Over U, Sener B, Erturan Z, Soyletir G. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains in Turkish cystic fibrosis patient. *New Microbiol* 2003; 26(1):109-14.
24. Nazik H, Ongen B, Ertoran Z, Salaioglu M. Genotype and antibiotic susceptibility patterns of *pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients. *JPN J Infect Dis* 2007; 60(2-3):82-6.
25. Adams C, Morris-Guinn M, Mc Connel F. Epidemiology and impact of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis using AP-PCR fingerprinting. *J Infect* 1998; 37(2):151-8.



## ANTIBIOGRAM AND GENOTYPE OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN CYSTIC FIBROSIS

Seyyed Ahmad Tabatabaee<sup>1\*</sup>, Shahin Nariman<sup>2</sup>, Reza Taghipour<sup>3</sup>, Ghamar Taj Khanbabaee<sup>4</sup>, Nazanin Hosseinkhani<sup>5</sup>, Fereshte Eftekhari<sup>6</sup>, Ali Aghayar Macooie<sup>7</sup>, Saeed Sadr<sup>8</sup>

Received: 18 Feb, 2013; Accepted: 23 March, 2013

### Abstract

**Background & Aims:** Cystic Fibrosis is one of the most prevalent fatal autosomal recessive diseases among white children. Mutation in CFTR gene cause ion imbalance of membranes and reduce the fluid in the face of main pulmonary airways which in turn provide proper medium for opportunistic bacteria specially pseudomonasaeruginosa and may lead to lung dysfunction. The aim of this study was to state antibiogram and genotype of pseudomonasaeruginosa in cystic fibrosis patients.

**Material & Methods:** In this cross sectional study, we obtained specimen of sputum or deep pharyngeal swaps from 46 patients for determining the bacterial species. We used standard lineage P. aeruginosa ATCC27853 for antibiotic susceptibility test and one type of B. cepacia for standardization and comparison. We also used 11 antibiotic discs for antibiogram. The method for determination of genetic lineage was RAPD-PCR.

**Results:** from the total of 46 patients with fibrous cystic 58. 7% were male and 48. 3% were female. There were 20 patients (74. 1%) in the male group and 11 patients (57. 9%) in the female group with pseudomonasaeruginosa colonization and there was not B. cepacia colonization. There were 9 patients with staphylococcus aureus, 7 with Klebsiella, 11 with Candida albicans, and 1 with Serachia marsensis colonization. The pseudomonas aeruginosa was detected in 31 patients (67. 4%) which had three lineages: mucoid (15 patients), non-mucoid (12 patients), and mucoid & non-mucoid (4 patients). Antibiogram shows the sensitivity to Tobramycin and Ciprofloxacin in all patients; there was also sensitivity to Amikacin (7. 8%), Piperacilin (93. 3%), Gentamicin (91. 1%), Ticarcilin (86. 75), Colicitin (80%), Carbenicilin (48. 9%), Cefotaxim (26. 7%), Imipenem (26. 7%), and Ceftazidim (11. 1%). There was hemogenocity in genetic phenotyping with RAPD-PCR method.

**Conclusion:** This study showed high resistant to Imipenem and Cephalosporins in pseudomonaslineages. There was not any relation between genotype and antibiogram and demographic characteristics of patients (sex and age). In addition, there was no difference among species according to potency and transmission properties.

**Keywords:** Pseudomonas aeruginosa, Fibrous cystic, Antibiogram, RAPD-PCR

**Address:** Pulmonology Ward, Mofid Children Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran **Tel:** +98 9121599014

**E-mail:** seyedtabatabaii@hotmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2013; 24(3): 192 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> Associate Professor of Pediatric Pulmonology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> Neonatologist, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Pediatrician, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor of Pediatric Pulmonology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Major of Microbiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>6</sup> PHD of Microbiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>7</sup> Neonatologist, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

<sup>8</sup> Assistant Professor of Pediatric Pulmonologist, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran