مقاله پژوهشی

حساسیت آنتی‌بیوتیکی و ژنوتیپ پسودوموناس آئروژینوزا در بیماران مبتلا به فیبروزکیستیک

دکتر سیداحمد طباطبایی*[1]، دکتر شاهین نریمان[2]، دکتر رضا تقی‌پور[3]، دکتر قمر تاج‌خان بابایی[4]، نازنین حسین‌خان[5]، دکتر فرشته افتخار[6]، دکتر علی آقایارماکویی[7]، دکتر سعید صدر[8]

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

چکیده

پیش زمینه و هدف: بیماری فیبروز 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 پسودوموناس آئروژینوزا در ریه این بیماران فراهم می‌نماید که باعث اختلال عملکرد ریه‌ها می‌شود. هدف از این بررسی تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و ژنوتیپپسودوموناس آئروژینوزا در بیماران مبتلا به فیبروزکیستیک 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 استانداردP. aeruginosa ATCC27853استفاده شد و از یک سویهB. 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 پسودوموناس 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 پسودوموناس آئروژینوزا بودند. در این مطالعه هیچ سویه B. cepacia شناسایی نشد. در بین بیماران، ۹ بیمار آلوده با استافیلوکوک اورئوس و ۷ بیمار با کلبسیلا و ۱۱ مورد با کاندیدا آلبیکنس و ۱ بیمار با سراشیامارسسنس شناسایی شد. از ۳۱ بیمار (۶۷/۴%) میکروب پسودوموناس آئروژنیوزا 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 توبرامایسین و سیپروفلوکساسین بوده، ۷/۸درصد حساس به آمیکاسین و پیپراسیلین، ۹۳/۳درصد به جنتامایسین، ۹۱/۱درصد به تیکارسیلین، ۸۶/۷درصد به کولیستین، ۸۰درصد به کاربنی سیلین، ۴۸/۹درصد به سفوتاکسیم، ۲۶/۷درصد به ایمی پنم و ۱۱/۱درصد به سفتازیدیم حساس بودند. در بررسی الگوی ژنتیکی باRAPD-PCRبرای اکثر سوش‌ها یکسان بود.

بحث و نتیجه گیری: این بررسی نشان داد که سویه‌های پسودوموناس 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: پسودوموناس آئروژینوزا، فیبروزکیستیک، 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: seyedtabatabaii@hotmail.com

[1] متخصص کودکان، فلو شیپ فوق تخصصی بیماریهای ریه کودکان، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (نویسنده مسئول)

[2] متخصص کودکان، فوق تخصص نوزادان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[3] متخصص کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[4] متخصص کودکان، فلوشیپ فوق تخصصی ریه اطفال، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

[5] کارشناس ارشد میکروبیولوژی

[6] دکترای میکروبیولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

[7] متخصص کودکان، فوق تخصص نوزادان، استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

[8] متخصص کودکان، فوق تخصصی ریه اطفال، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

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 CFTRCystic Fibrosis) (Transmembrane Regulator 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 پسودوموناس 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 CFمی‌گردد که برخی از آن‌ها شامل: Pseudomonas aeroginosa, StenotrophomonasmaltophiliaSt، Staphylococcus aureus, Haemophilus influenza و Burkholderiacepacia 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 پسودوموناسآئروژنیوزا در ریه این بیماران بندرت ممکن است که بتوان با مصرف آنتی‌بیوتیک این میکرب را نابود کرد(۴). عفونت با پسودوموناسآئروژینوزا در بیش از۸۰درصد موارد بیماران CFرخ می‌دهد و منجر به اختلال پیش‌رونده ریه‌ها و مرگ زود رس می‌شود(۶). پسود وموناس آئروژینوزا به طور قابل توجهی به اکثریت عوامل ضد میکروبی مقاوم می‌باشد و درک نقش این ارگانیسم در عفونت ریه بیماران CFمی‌تواند منجر به درمان تعداد قابل توجهی از این بیماران گردد(۷). هدف از این مطالعه بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تنوع ژنتیکی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای ایزوله شده از بیماران CFچند مرکز مراقبت از بیماران به روش-RAPD PCR(Random Amplified Polymorphic DNA) بود.

مواد و روش‌ها

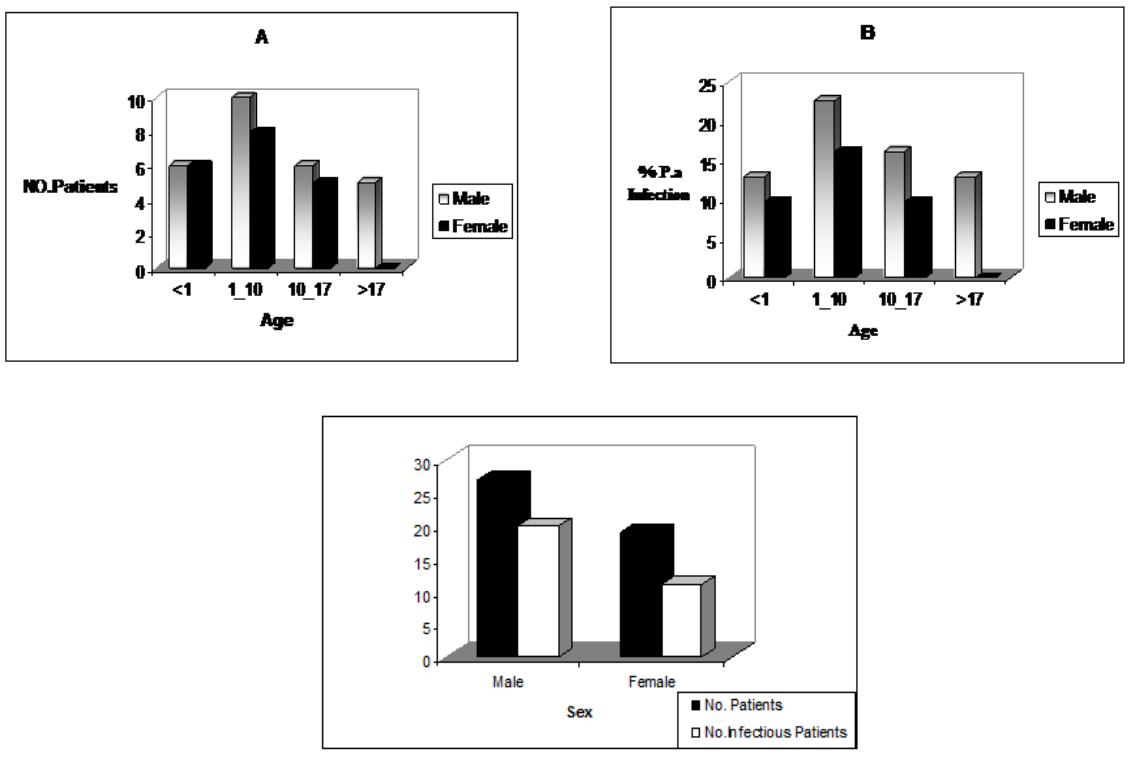
این مطالعه از نوع مقطعی (توصیفی – تحلیلی) می‌باشد. جهت تهیه نمونه برای تعیین سویه‌های باکتری از نمونه خلط و یا سوآب گلو از بیماران مبتلا به فیبروزکیستیک در محدوده سنی ۳ماه تا ۲۳سال از مهر ۱۳۸۲تا اسفند ۱۳۸۳استفاده شد. بیماران مورد مطالعه از دو مرکز درمانی شامل درمانگاه"۳۲بیمار (۶۹/۶%)"و بیماران بستری "۱۴بیمار(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 (Agarو محیط ناقل و غنی کننده مالاشیت گرین براث انجام شد. جهت شناسایی کلونی‌های مشکوک به پسودوموناسائروژینوزا از معرف اکسیداز ۱درصد استفاده گردید و در صورت مثبت بودن تست اکسیداز رنگ آمیزی کلونی‌ها صورت می‌گرفت. سویه‌ها در ۲میلی متر محیط کشت BHIحاوی۰/۲میلی لیتر DMSO(Dimethyl suffoxide)در دمای ۱۵-تا۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. جهت تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیک از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سیپروفلوکساسین (5mg)جنتا مایسین (۱۰mg) کاربنی سیلین(۱۰۰mg) آمیکاسین (۳۰mg)توبرا ماسین(۱۰mg)وسفتازیدیم(۳۰mg)از شرکت پادتن طب و از دیسک‌های تیکار سیلین(۷۵mg)وپیپراسیلین(۱۰mg)از شرکت most انگلستان و دیسک‌های ایمی پنم (۱۰mg) و سفوتاکسیم (۳۰mg) از شرکت ایران دارو دیسک کولیسیتین (10mg)از شرکتBiomerieux استفاده شد. جهت تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا از روش آنتی بیو گرام به کمک دیسک با روش Kirby&Bauer1996و از کشت ۲۴ساعته در محیط BHIاستفاده شد. به این صورت که۳-۲کلونی به حدود ۴میلی 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 ۲۴ساعت رعایت دمای ۳۷درجه‌ی سانتی‌گراد بررسی انجام گرفت. جهت تعیین الگوی ژنتیکی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا از روش RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) و با استفاده از PCR- AP(Arbitrary Primed PCR)استفاده شد. در این تحقیق جهت استخراج DNAاز 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 ۸۵درصد به یکدیگر شباهت داشتند یکسان در نظر گرفته شدند. در نهایت درختچه تکاملی (Dendrogram) با استفاده از

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

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

نتایج

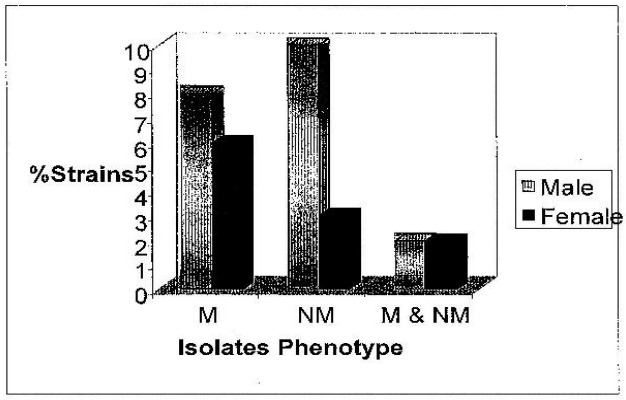
از ۴۶بیمار مورد بررسی، ۳۲بیمار(۶۹/۶%)از درمانگاه و۱۴بیمار (۳۰/۴%) از بیماران بستری مورد بررسی قرار گرفتند. ۲۲بیمار مورد بررسی در درمانگاه همزمان ناراحتی گوارشی و تنفسی داشتند و چهار بیمار ناراحتی شدید تنفسی و۱بیمار ناراحتی شدید گوارشی داشت. ۱۹بیمار (۴۱%)ساکن شهرستان و۲۷بیمار (۵۹%)ساکن شهر تهران بودند. از ۳۱بیمار(۶۷/۴%)باکتری پسودوموناس آئروژینوزا بدست آمد که ۱۵مورد سویه‌ها موکوئیدی و۱۲ مورد سویه‌ها غیر موکوئیدی و در چهار بیمار به طور همزمان سویه‌های موکوئیدی و غیر موکوئیدی بودند. بیماران در چهار گروه تقسیم شدند: گروه سنی زیر یک سال۱۲بیمار(۲۶/۱%)، گروه سنی یک تا ۹ سال ۱۸بیمار(۳۹/۱%)، گروه سنی ۱۷-۱۰ سال ۱۱ بیمار (۲۳/۹%) و گروه ۱۸سال و بالاتر ۵ بیمار(۱۰/۹%) (شکل۱: پراکندگی سن و جنس در بیماران آلوده به پسودوموناس). کولونی‌های پسودوموناسآئروژینوزا 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 بورخهولدریا سپاشیا شناسایی نشد. در میان بیماران CF مورد مطالعه ۹ بیمار آلوده به استافیلوکوکوس آورئوس و هفت بیمار آلوده به کلبسیلا و ۱۱ بیمار آلوده به کاندیدا آلبیکانس و یک بیمار آلوده به سراشیامارسسنس شناسایی شد.



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

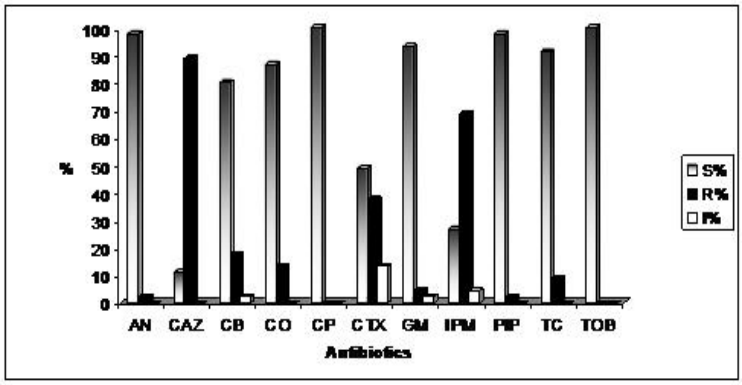
از ۳۱ (۶۷/۴%)بیمار مبتلا به پسودوموناسآئروژینوزا، ۷ بیمار (۲۲/۶%) در گروه اول و ۱۲ بیمار(۳۸/۷%) در گروه دوم، ۸بیمار (۸ /۲۵%) در گروه سوم و ۴ بیمار(۱۲/۹%) در گروه چهارم قرار داشتند. ۱۹بیمار (۴۱/۳%) مؤنث و ۲۷ بیمار (۵۸/۷%)مذکر بودند. در میان بیماران مذکر ۲۰بیمار (۷۴/۱%) و در میان بیماران مؤنث۱۱بیمار(۵۷/۹%)آلوده به پسودوموناس آئروژینوزا بودند. حضور فرم موکوئیدی در گروه سنی دوم (۹-۱سال)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(شکل۲ فنوتیپ پسودوموناس).

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]



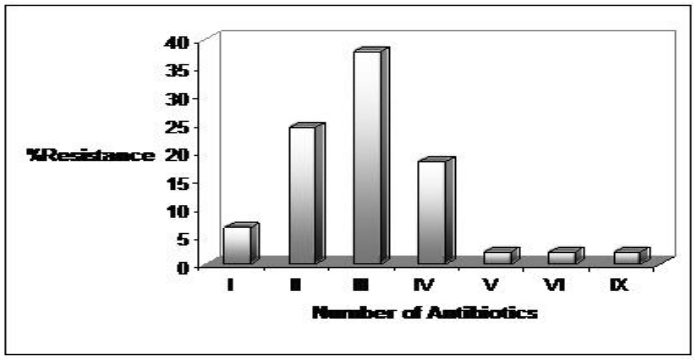
شکل شماره (۲): فنوتیپ پسودوموناس جدا شده از بیماران مبتلا به تفکیک جنس موکوئید M غیرموکوئید NM

در تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به کمک روش انتشار در دیسک مشخص شد که حساسیت در توبرامایسین و سیپروفلوکساسین ۱۰۰درصد و آمیکاسین و پیپراسیلین ۹۷/۸درصد، جنتا مایسین۹۳/۳درصد، تیکارسیلین۹۱/۱درصد، کولیستین۸۶/۷درصد، کاربنی سیلین۸۰درصد، سفو تاکسیم۴۸/۹درصد، ایمی پنم ۲۶/۷درصد و سفتازیدیم۱۱/۱درصد بود(شکل ۳).



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

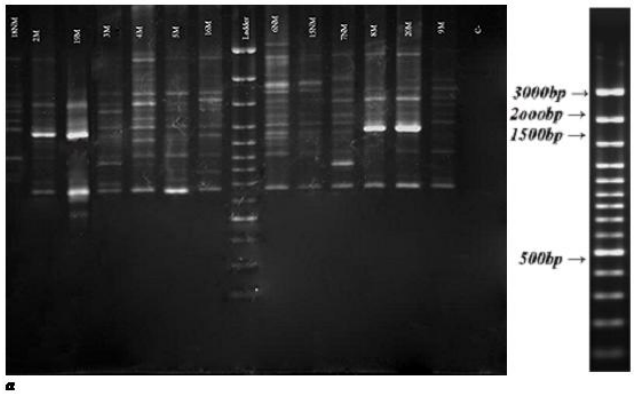
نکته جالب توجه این بود که داروی ایمی پنم علی رغم اینکه در درمان بیماران CF در ایران استفاده نمی‌شود، مقاومت بالایی نسبت به آن وجود دارد. از مجموع ۴۵ سویه حاصل شده، تنها دو سویه (۴/۴%) نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند و ۳۲ سویه (۷۱/۱%) مقاومت چندگانه حداقل به سه آنتی‌بیوتیک داشتند (شکل ۴).



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

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

جهت تمایز ژنتیکی سویه‌ها با استفاده از روشRAPD-PCR و با استفاده از دو پرایمر ۲۰۸و۲۷۲بر روی ۴۵سویه مورد مطالعه انجام شد که سویه‌ها در ۱۶گروه مجزا قرار گرفتند. در بین سویه‌هایی که به طور متوالی از ۹بیمار به دست آمده بودند هشت بیمار(۸۹/۸%) الگوی باندی کاملاً یکسان داشتند: سویه‌های شماره ۱و ۱۸ از یک بیمار در گروهA، ۲و۱۹، ۸و۲۰، ۱۱و۱۶ از سه بیمار مختلف با الگوی ژنتیکی یکسان در گروهC، سویه‌های ۲۶، ۲۵و۴۴ از یک بیمار در گروهM، سویه‌های۱۰، ۱۳و۳۷ از یک بیمار در گروهH سویه‌های ۵ و ۳۸ از یک بیمار در گروه J، ۶و۱۵از یک بیمار در گروه G قرار داده شدند. سویه‌های ۲۴و۴۲که 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 غیرموکوئیدی (NM) به دست آمده بود، در سه مورد الگوی ژنتیکی هر دو سویه یکسان بود سویه‌های ۲۸و۲۹در گروهD، سویه‌های ۳۶و۴۳ در گروهI و سویه‌های ۲۵، ۲۶و۴۴ در گروه Mقرار داده شدند. سویه‌های مربوط به بیماران مختلف که الگوی باندهای یکسان داشتند و در گروه‌های مشترک قرار می‌گرفتند، شامل سویه‌های ۱۴، ۳۵، ۳۱، ۳۰، ۳۳، ۲۴، ۱۲، ۲۳ و ۲۷ با پروفایل باندهای DNA یکسان در گروهC، سویه‌های ۳۴، ۹و۴۵ با الگوی یکسان در گروه D، سویه‌های ۴۱و۴۲ 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 تائید قرار گرفت.



شکل شماره (۵): الگوی ژنتیکی سویه‌های پسودوموناآئروجینوزابا استفاده از روش RAPD-PCR و پرایمر۲۰۸

بحث

بیماران مبتلا به CF مستعد به عفونت‌های مزمن تنفسی هستند که این عفونت‌ها بوسیله ارگانیسم‌های متعددی ایجاد می‌شوند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها پسودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. . بیماران CF از عفونت‌های مکرر تنفسی با آسیب‌های غیر قابل باز گشت در عملکرد ریه‌ها به طور دائم رنج می‌برند که منجر به بیماری زایی و مرگ و میر می‌گردد (۴ و۹). سوش‌های پسودوموناس 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(۱۱،۱۰). در این تحقیق از ۴۶بیمار CF مورد مطالعه که بیماری آن‌ها از طریق تست عرق و معاینات بالینی به اثبات رسیده بود، ۳۱بیمار (۶۷/۴%)آلوده به پسودوموناسآئروژینوزا بودند که این میزان در مقایسه با اغلب مراکز CF در دنیا (۳۸%)بسیار بالاتر است(۱۲). هیچ کدام از این بیماران به Burkholderiacepacia آلوده نبودند و۱۱بیمار آلوده به کاندیدا آلبیکانس بودند که با توجه به فعالیت ضد قارچی در پسودوموناسآئروژنیوزا، حضور این دو عجیب به نظر می‌رسد. ۹ بیمار به استافیلوکوکاورئوس و ۷ بیمار آلوده به کلبسیلا و۱بیمار به سراشیا مارسسنس بودند. متوسط سن بیماران مورد بررسی ۷/۶ سال بود و در این پژوهش مشخص شد که بین سن و میزان آلودگی با پسودوموناس آئروژینوزا ارتباط مستقیم وجود دارد. نتایج تحقیقات این‌گونه نشان می‌دهد که درمان‌های اولیه‌ی عفونت پسودوموناس آئروژینوزا تنها۸۰درصد موفقیت آمیز است و این امر نشان دهنده‌ی اهمیت جلوگیری از عفونت اولیه توسط باکتری می‌باشد (۱۴،۱۳). در این تحقیق میزان آلودگی با فرم موکوئیدی پسودوموناسآئروژینوزا 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 ۵۵درصد این بیماران ساکن شهرستان بودند و به علت کمبود امکانات تشخیصی، تشخیص

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

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 توبرا مایسین و سیپرو فلوکساسین بیشترین تأثیر را بر روی سویه‌های مورد مطالعه داشتند. حساسیت نسبت به توبرا مایسین در مراکز مختلف بین ۴۴تا ۷۵ درصد متغیر است که به علت استفاده‌ی 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 ۱۰سال مورد استفاده قرار می‌گیرد و حساسیت میکرو ارگانیسم نسبت به آن در اغلب مراکز درمانی دنیا بین ۵۷ تا ۸۰ درصد متغیر است(۱۶،۱۵). در طی این تحقیق مشخص شد که علی رغم استفاده بسیار کم از آنتی‌بیوتیک ایمی پنم جهت درمان عفونت پسودوموناس آئروژینوزا در ایران، حساسیت این میکرو ارگانیسم نسبت به ایمی پنم بسیار ناچیز است (۲۶/۷%)، در حالی که دکتر افتخار و همکاران در طی تحقیقی حساسیت ۱۰۰درصد پسودوموناس آئروژینوزا را نسبت به این آنتی‌بیوتیک نشان دادند(۱۷). در تحقیقات انجام شده در سایر کشورها حساسیت ۴۸درصد تا ۶۳درصد 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-OprNکه در ایجاد مقاومت نسبت به کلرا مفنیکل و کینئولون‌ها 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 بتالاکتام ها 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 سفتازیدیم در این تحقیق ۱۱/۱درصد بود در حالی که در سایر تحقیقات به ویژه تحقیق انجام شده توسط MannoG حساسیت بالایی (۸۶%)نسبت به این آنتی‌بیوتیک نشان داده شده است. حساسیت نسبت به آمیکاسین ۹۷/۸درصد و جنتامایسین ۹۳/۳درصد بود که در تحقیق انجام شده توسط yagci A (۲۳) نیز مؤثرترین آمینو گلیکوزید علیه پسودوموناس آئروژینوزا، آمیکا سین با حساسیت ۹۱/۴درصد شناخته شده است. در رابطه با پیپراسیلین نیز در تحقیق انجام شده توسط گروه‌ها حساسیت ۹۷/۸درصد وجود داشت که با سایر تحقیقات اخیر به ویژه آخرین تحقیق در سال ۲۰۰۶ میلادی توسط Nazik M (۲۴)در استامبول (ترکیه) با حساسیت ۸۶درصد این مطلب تائید می‌گردد. در این تحقیق ۲۸سویه (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 ۱۳/۳درصد 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 ۸۳/۳درصد 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 علی رغم 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 CFدر 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

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

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 پسودوموناس آئروژینوزای کلونیزه شونده وجود ندارد (۲۵). مقایسه‌ی کلون‌های مختلف پسودوموناس آئروژینوزا ارتباطی را بین کلون‌های خاصی از پسودوموناس 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 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 پسودوموناس آئروژینوزا مناسب نیستند.

پیشنهادات

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

References:

1. Akabas MH. Channel-lining residue in the M3 membrane sparing segment 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 pseudomonades aeruginasa isolates form sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. J Clin Microbiolo 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. SaimanL, 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 Sci1986; 3(10): 302-8.
6. Pier GB. Role of the cystic fibrosis transmemberane 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, Vicears 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. Mahenthiralingam 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. Mahenthiralingam 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.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

12. Da Silva F, Levi J N, Bento C, Rodngues J. Molecular epidemiology of Pseudomonas aerugniosa 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. Pediatc 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. Eftekhar 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 aeuroginosa. 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 maltophiliaisolated 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.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

Original Article

ANTIBIOGRAM AND GENOTYPE OF PSEUDOMONAS AEROGINOSA IN CYSTIC FIBROSIS

Seyyed Ahmad Tabatabaee [1],Shahin Nariman[2], RezaTaghipour[3], Ghamar Taj Khanbabaee[4], Nazanin Hosseinkhani[5], Fereshte Eftekhar[6], Ali Aghayar Macooie[7], Saeed Sadr[8]*

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 pseudomonasaeroginosa and may lead to lung dysfunction. The aim of this study was to state antibiogram and genotype of pseudomonasaeroginosa 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 46patients 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 pseudomonasaeroginosa colonization and there was not B. cepacia colonization. There were 9 patients with staphylococcus aureous, 7 with Klebsiela, 11 with Candida albicans, and 1 with Serachia marsensis colonization. The pseudomonas aeroginosa 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 aeroginosa, 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

[1] *Associate Professor of Pediatric Pulmonology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (Corresponding Author)*
[2] *Neonatologist, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3] *Pediatrician, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[4] *Associate Professor of Pediatric Pulmonology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[5] *Major of Microbiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[6] *PHD of Microbiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[7] *Neonatologist, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[8] *Assistant Professor of Pediatric Pulmonologist, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]