آنزیم متالوبتالاکتاماز و تعیین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم و ایمی پنم سویه های پسودوموناس آئروژینوزای مقاوم جدا شده از نمونه های کلینیکی از بیمارستانهای امام خمینی و مرکز طبی کودکان در سال ۱۳۸۴

فرشته شاهچراغی[1*]، وجیهه سادات نیک بین[2]

۱. Ph.D میکروب شناسی، استادیار بخش میکروبشناسی انستیتوپاستورایران
۲. کارشناس ارشد بخش میکروب شناسی انستیتوپاستورایران

* نشانی برای مکاتبه: تهران خیابان کارگر جنوبی خیابان پاستور، انستیتو پاستور بخش میکروب شناسی ، shahcheraghi@pasteur.ac.ir
دریافت مقاله: خرداد هشتادو پنج پذیرش برای چاپ: آذر هشتاد و پنج

چکیده

سابقه و هدف: *یکی از راههای ایجاد مقاومت باکتری پسودوموناس آئروژینوزا نسبت به کربوپنم ها تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز است که معضلات بسیاری را در درمان عفونتهای ناشی از این باکتری ایجاد کرده است. این مطالعه جهت تعیین میزان مقاومت سویه های پسودوموناس آئروژینوزازی جدا شده از نمونه های کلینیکی نسبت به ایمی پنم و بررسی وجود آنزیم متالوبتالاکتاماز در باکتری های ایزوله شده صورت گرفت.*

روش کار: *در این مطالعه توصیفی الگوی مقاومت دارویی ۳۵۰ سویه پسودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین (AN)، کربنی سیلین (CB)، سفوتاکسیم (CTX)، سفتازیدیم (CAZ)، سفتری آکسون (CRO)، سیپروفلوکسازین (CIP)، ایمی پنم(IPM)، پی پراسیلین (PC)، پی پراسیلین –تازوباکتام (Pt) ، جنتامیسین (GM)، سفتی زوکسیم (ZOX) و تتراسیکلین (Te)با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت و جهت بررسی آنزیم متالوبتالاکتاماز از روش دبل دیسک دیفیوژن استفاده گردید.*

یافته ها: *پسودومونا آئروژینوزا نسبت به ایمی پنم بیشترین حساسیت و نسبت به سفتی زوکسیم بیشترین مقاومت را داشت. در ۴۳٪ سویه ها MIC نسبت به سفتازیدیم بیشتر از ۱۶ µg/ml بود. (بیمارستان امام خمینی ۶۴/۲٪، مرکز طبی کودکان ۲۱/۵٪). نتایج حاصل از دبل دیسک دیفیوژن نشان داد که تنها ۳٪ سویه های مقاوم به ایمی پنم دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز می باشند.*

نتیجه گیری: *با توجه به نتایج بدست آمده مشکل باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک های جدید از جمله سفتازیدیم و کربا پنم در کشور یک مشکل جدی و عمده در بیماران مبتلا به عفونتهای ناشی از پسودوموناس آئروژینوزا می باشد و بایستی در مصرف این آنتی بیوتیک ها دقت کافی جهت جلوگیری از گسترش این آنزیم به سویه های دیگر و همچنین به باکتریهای گرم منفی دیگر صورت پذیرد.*

واژه گان کلیدی: ***متالوبتالاکتاماز- پسودوموناس آئروژینوزا-مقاومت آنتی بیوتیکی***

مقدمه

باکتری پسودوموناس آئروژینوزا از مقاوم ترین باکتری هایی است که می تواند بیماریهای مختلفی را در انسان ایجاد کند. این مقاومت بالای باکتری در نتیجه سینرژی بین پمپ های خارج کننده دارو (efflux pumps) و نفوذپذیری کم غشاء خارجی و آنزیمهای تجزیه کننده دارو از قبیل بتالاکتامازها رخ می دهد (۱).

آنزیم های بتالاکتاماز از مهمترین عوامل ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام در باکتریها بشمار می روند. ژن کد کننده این باکتریها بر روی پلاسمید و یا بر روی کروموزوم باکتری قرار دارند. آنزیمهای بتالاکتاماز زیادی تاکنون شناسایی شده اند و براساس عملکرد و سوبسترا ، حساسیت به مهارکننده ها و موقعیت ژنتیکی به چند دسته و گروه تقسیم می شوند. در باکتریهای گرم منفی این آنزیمها بعد از ساخته شدن به درون فضای پری پلاسمیک ترشح می شوند اما در باکتریهای گرم مثبت به خارج از سلول باکتری ریخته می شوند (۲).

متالوبتالاکتامازها از آنزیم های بتالاکتامازی است و گزارشاتی مبنی بر تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع IMP-1 توسط باکتریهای گرم منفی مقاوم به کربوپنم از قبیل پسودوموناس آئروژینوزا و سرشیا مارسیسنس در دست است (۱).

با توجه به اینکه وجود این آنزیم ها در باکتری باعث ایجاد مقاومت نسبت به همه آنتی بیوتیک های بتالاکتام (پنی سیلین ها ، سفالوسپیرین ها و کربوپنم ها) شده و تاکنون مهار کننده ای برای این آنزیم ها مشاهده نشده است(۳،۲). اهمیت مطالعه بر روی این آنزیم ها، میزان شیوع، شناسایی و تشخیص سریع آنها را در بین نمونه های کلینیکی جهت کنترل و جلوگیری از گسترش آنها دو چندان می کند.

این مطالعه با هدف تعیین میزان مقاومت سویه های مقاوم پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه های کلینیکی نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم و ایمی پنم و همچنین تعیین ارتباط بین مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ها و تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز در باکتریهای جدا شده و مقایسه بین مقاومت در سویه های جدا شده در بیمارستانهای امام خمینی و مرکز طبی کودکان انجام گرفت.

روش کار

در این مطالعه توصیفی نمونه ها در عرض ۱ سال از بیماران بستری و یا مراجعه کننده به بیمارستانهای مجتمع بیمارستانی امام خمینی و مرکز طبی کودکان جمع آوری شده و بوسیله تست های بیوشیمیایی باکتری پسودوموناس آئروژینوزا شناسایی شدو جهت انجام آزمایشات بعدی در محیط نگهدارنده و همچنین بصورت لیوفیلیزه در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

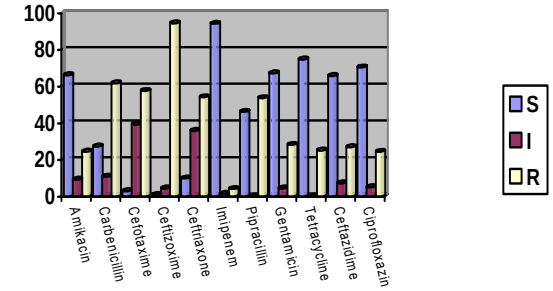
جهت بررسی اولیه مقاومت باکتریهای جدا شده (۳۵۰ سویه) از روش دیسک دیفیوژن Kirby-Bauer استفاده گردید(۴). آنتی بیوتیک های مورد آزمایش آمیکاسین (AN)، کربنی سیلین (CB)، سفوتاکسیم (CTX)، سفتازیدیم (CAZ)، سفتری آکسون (CRO)، سیپروفلوکسازین (CIP)، ایمی پنم(IPM)، پی پراسیلین (PC)، پی پراسیلاین –تازوباکتام (Pt) ، جنتامیسین (GM)، سفتی زوکسیم (ZOX) و تتراسیکلین (Te) متعلق به شرکت BBL بودند. همچنین MIC باکتریهای جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک سفتازیدیم با استفاده از روش Micro dilution Tube و پروتکل NCCLS مورد بررسی قرار گرفتند (از باکتری پسودوموناس آئروژینوزای استاندارد (ATCC = 27853)بعنوان کنترل استفاده گردید(۵).

جهت بررسی آنزیم متابتالاکتاماز از روش دبل دیسک دیفیوژن و از دیسک های ایمی پنم و سفتازیدیم و دیسک های حاوی 2-Mercapto propionic acid (2MAC)و EDTA استفاده گردید و سویه هایی از باکتری که مقاوم به سفتازیدیم بودند (MIC>64) مورد مطالعه قرار گرفتند. مهار کننده های متالوبتالاکتاماز EDTA با غلظت ۰/۵ مولار و 2MAC با غلظت ۱ مولار بطور جداگانه استفاده گردید. هاله عدم رشد بین دو دیسک نشانه ترشح آنزیم متالوبتالاکتاماز می باشد(۱،۱۰).

یافته ها

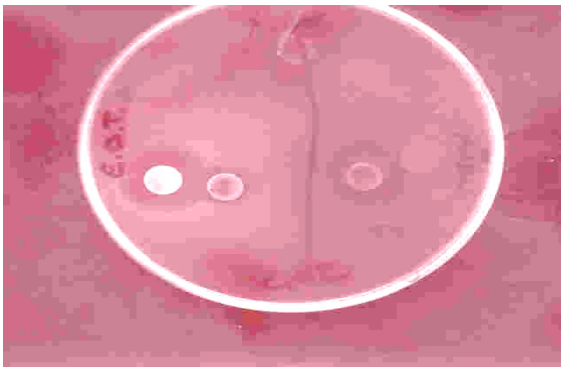
در این مطالعه مقاومت ۳۵۰ سویه باکتری پسودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از آنتی بیوگرام نشان داد که بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک سفتی زوکسیم ۹۲/۲۵٪ و کمترین میزان مقاومت مربوط به ایمی پنم ۵٪ می باشد (نمودار شماره۱).

نمودار شماره ۱: درصد فراوانی نسبی سویه های جدا شده از نمونه های مختلف آنروژینوزا مقاومت، حساسیت و مقاومت نسبی



نتایج MIC سوش های ایزوله شده نسبت به سفتازیدیم نشان داد که در ۴۳٪ از سویه ها MIC بالاتر از ug/ml ۱۶می باشد (بیمارستان امام خمینی ۶۴/۲٪ , مرکز طبی کودکان ۲۱/۵٪). بر روی ۹۲ و ۱۷ نمونه که به ترتیب به سفتازیدیم و ایمی پنم مقاوم بودند آزمایش دبل دیسک دیفیوژن انجام گردید که تنها در۵ نمونه جواب مثبت مشاهده شد (هاله عدم رشد بین دو دیسک)(تصویر شماره ۱).

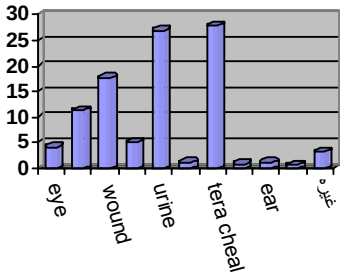
تصویر شماره ۱: آزمایش دبل دیسک دیفیوژن جهت بررسی آنزیم متالوبتالاکتاماز



مقایسه نتایج MIC سفتازیدیم با دیسک دیفیوژن نشان داد که میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفتریاکسون تقریباً اندازه هم و هر دو بالا می باشد.

نمودار شماره ۲ درصد فراوان نسبی سویه های جدا شده از نمونه های مختلف را نشان می دهد بیشترین موارد جدا شده از تراشه و درصد موارد جدا شده از مایع پلور کمتر از بقیه موارد بود.

نمودار شماره2: نمودار درصد فراوانی باکتری پسودوموناس آنروژینوزای جدا شده از نمونه های کلینیکی



بحث

باکتریهای گرم منفی مقاوم به کربوپنم از قبیل پسودوموناس آئروژینوزا مشکلات زیادی را در درمان عفونتهای ناشی از این باکتری ایجاد کرده اند. باکتری پسودوموناس باکتری فرصت طلبی است که می تواند عفونتهای مختلفی را در انسان ایجاد کند و این باکتری جزء مقاومترین باکتریها بوده که از مکانیزمهای مختلفی جهت مقاوم شدن استفاده می کند. از جمله این مکانیزمها تولید آنزیم بتالاکتاماز جهت مقاوم شدن به آنتی بیوتیک های بتالاکتام می باشد. آنزیم متالوبتالاکتاماز که توسط بعضی از باکتریهای مقاوم ترشح می شود باعث مقاومت نسبت به اکثر آنتی بیوتیک های بتالاکتام شده و مهار کننده های بتالاکتاماز از جمله کلاولانیک اسید , تازوباکتام و سالباکتام بر روی آنها اثر ندارند. با توجه به این مسائل شناسایی باکتریهای تولید کننده این آنزیم اهمیت بسزایی دارد.

در این مطالعه از ۱۶۴ سویه پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیمارستان امام ۸/۲۴٪ نسبت به ایمی پنم و ۴۸/۷۶٪ نسبت به سفتازیدیم مقاومت نشان دادند. اما در بیمارستان مرکز طبی کودکان از۱۸۶ سویه جدا شده ۲/۱۱٪ نسبت به ایمی پنم و ۹/۸۶٪ نسبت به سفتازیدیم مقاومت نشان دادند که کاهش میزان مقاومت بعلت اختلاف سن بیماران در دو بیمارستان مصرف کمتر آنتی بیوتیک ها برای بیماران مرکز طبی کودکان باشد. از جمله آنتی بیوتیک های بتالاکتام که آنزیمهای (ESBLS) Extended- Spectrum -Beta- Lactamases بر روی آنها اثر می گذارند. آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفتری آکسون می باشند که میزان مقاومت نسبت به این دو آنتی بیوتیک در هر دو بیمارستان بالا و تقریباً اندازه هم مشاهده شد.

مقایسه نتایج بدست آمده در این مطالعه با مطالعات قبلی انجام شده (۷،۶،۱۱) بر روی باکتریهای پسودوموناس جدا شده از بیماران سوختگی نشان می دهد که میزان مقاومت این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف از سوشهای جدا شده از بیماران سوختگی بسیار بالاتر می باشد. بعنوان مثال در رابطه با سفتازیدیم در مطالعه قبلی میزان مقاومت بیش از ۹۵٪ گزارش گردید در صورتیکه در این مطالعه مقاومت سویه های جدا شده از بیمارستان امام نسبت به سفتازیدیم ۶۴/۲٪ و مقاومت سویه های جدا شده از مرکز طبی کودکان ۲۱/۵٪ مشاهده شد.

از بین سویه های مقاوم به سفتازیدیم و ایمی پنم تنها ۵ سویه آزمایش دبل دیسک-دیفیوژن آنها نسبت به مهار کننده های EDTA مثبت بود که نشان دهنده وجود آنزیم متالوبتالاکتاماز در این سویه ها می باشد. در

بقیه سویه ها آزمایش متالوبتالاکتاماز منفی بود که بیان کننده آن است که مقاومت نسبت به ایمی پنم در این سویه های به علت های دیگر از جمله efflux pumps (پمپهای خارج کننده دارو) و تغییر در نفوذپذیری غشاء و... می باشد.

بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده جهت کاهش و جلوگیری از افزایش سویه های مقاوم به ایمی پنم و سفتازیدیم بایستی در رابطه با تجویز این آنتی بیوتیک ها تجدید نظر جدی صورت پذیرد.

در مطالعه انجام شده در کانادا میزان مقاومت نسبت به ایمی پنم ۱۴/۴٪ گزارش شده که ۶۱٪ متالوبتالاکتاماز مثبت بودند و در مطالعه دیگری که در ایتالیا انجام شده میزان پسودوموناس های مقاوم به ایمی پنم که دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز می باشد را ۶/۵٪ گزارش کرده اند(۹،۸).

میزان مقاومت نسبت به پی پراسیلین ۵۴٪ می باشد اما میزان مقاومت نسبت به پی پیراسیلین – تازوباکتام تقریباً به نصف آن کاهش پیدا کرده (۲۵٪). با توجه به اینکه تازوباکتام یک مهار کننده بتالاکتاماز می باشد، می توانیم نتیجه بگیریم که یکی از دلایل مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک به علت ترشح آنزیم Extended-spectrum-β-lactamase می باشد.

از آنجا که ایمی پنم آنتی بیوتیکی است که در کشور ما جزء آنتی بیوتیک های بیمارستانی می باشد و به راحتی در دسترس مردم قرار نمی گیرد و مصرف آن پایین می باشد و به همین علت میزان مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک در کشور پایین می باشد(در مقایسه با بالا بودن میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های دیگر در کشور ما و پایین بودن مقاومت در کشورهای دیگر). (۹،۸)

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری خانم ها فهیمه شورج ، دکتر ملکی و آقایان دکتر آشتیانی ناصر اخباری و قدردانی می گردد.

REFERENCES

1. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo-β-Lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compound.Journal of Clinical Microbiology. Jan 2000,P40-43

2. Oreste A, Mascaretti, Bacteria versus Anti bacterial Agents, an intergrated Approach, 2003,chapter 7:115-122

3. Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo-β-Lactamase gene bla $_{SPM-1}$ –Surrounding Seqences from Disseminated Pseudomonas aeruginosa Isolates in Recife, Brazil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Apr.2004, P.1406-1409

4. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JM, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966;45:493-6.

5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for antoimicrobil disk susceptibility test (M2-T4). 4th ed. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards: 1998.

6. Shahcheraghi F, Feizabadi MM, Yamin V, Abiri R, Abedian Z. Serovar determination, drug resistance patterns and plasmid profiles of Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients at two hospitals of Tehran (IRAN). , Burns 29, 547-551,2003

7. Abiri R, Badami N, Shahcheraghi F, Feizabadi MM, Hosseini M. Determination of resistance profile and serotypes of Pseudomonas aeroginosa isolated from burn infections. Journal of Isfahan Medical School, No 73. 2004

8. Laupland KB, Parkins MD, Church DL, Gregson DB, Louie TJ, Conly JM, Elsayed S and Pitout JDD. Population-Based Epidemiological study of Infections Caused by Carbapenem-Resistant Pseudomonas aeruginosa in the Calgary Health Region: Importance of Metallo-β-Lactamase (MBL)-Producing Strains. 2005

9. Lagatolla C, Tonin EA, Bragadin CM, Dolzain L, Gombac F, Bearzi C, Edalucci E, Gionechetti F, Rossolinit GM. Endemic carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa with acquired metallo-β-Lactamase determinants in European Hospital. Emerging infectious Diseases. Vol 10,No3,March 2004

10. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-β-Lactamase-producing clinical isolates of Pseudomonas spp. And Acinetobacter spp. 2002.

۱۱. شاهچراغی ف، فیض آبادی م.م، عابدیان ز. بررسی میزان مقاومت دارویی ، فعالیت بتالاکتامار و تعیین سروتایپ های سویه های پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران سوختگی در بیمارستان سوانح و سوختگی توحید در سال ۱۳۸۰, مجله بیماریهای عفونی،گرمسیری، ۱۳۸۳ شماره۸، ۲۳