مقاومت به ایمیپنم و وجود آنزیم های متالوبتالاکتاماز در ایزوله های بالینی پسودوموناس آئروژینوزا دارای بتالاکتاماز در بیمارستان سوختگی قطب الدین شیراز

فاطمه نوروزی[۱]، داوود کلانتر[۱] ، شهلا منصوری[۲*]، محمد مرادی[۲]، ابراهیم علی پور[۳]، مهروش اورنگی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۲. دکترای میکروب شناسی، استاد گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی افضلی پور دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۳. کارشناس ارشد میکروب شناسی، بیمارستان سوختگی قطب الدین شیراز، بخش میکروب شناسی
۴. دکترای علوم آزمایشگاهی، بیمارستان سوختگی قطب الدین شیراز، بخش میکروب شناسی

* نشانی برای مکاتبه: کرمان، دانشگاه باهنر، دانشکده پزشکی افضلی پور، گروه میکروب شناسی، تلفن و فاکس ۰۳۴۱-۳۲۲۱۶۶۵، smansouri@kmu.ac.ir
دریافت مقاله: فروردین هشتاد و نه پذیرش برای چاپ: خرداد هشتاد و نه

چکیده

سابقه و هدف: *ایمیپنم در درمان عفونت های ناشی از باکتری های گرم منفی مقاوم تولید کننده ESBLs و AmpC بتالاکتامازها بکار می رود. مقاومت به این دارو با پیدایش متالوبتالاکتامازها(MBLs) بوجود آمده است، با توجه به اهمیت مقاومت پسودوموناس آئروژینوزا در عفونتهای بیمارستانی به دارو، در این مطالعه مقاومت به ایمیپنم و حضور متالوبتالاکتامازها در ایزوله های بالینی پسودوموناس آئروژینوزا دارای بتالاکتاماز بررسی شد.*

روش کار: *۶۰ ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا از بیماران دچار سوختگی بستری در بیمارستان سوختگی قطب الدین شیراز جدا سازی شد. مقاومت ایزوله ها به سه آنتی بیوتیک سفوتاکسیم، سفتازیدیم و ایمیپنم به روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. برای تعیین متالوبتالاکتامازها از روش دیسک دیفیوژن به صورت دیسک ایمیپنم به تنهایی و همراه با M, EDTA ۰/۵ به مقدار ۱۰µl استفاده گردید. افزایش قطر هاله عدم رشد برابر یا بیش از ۷mm در اطراف دیسک حاوی EDTA و ایمیپنم در مقابل دیسک ایمیپنم به تنهایی نشان دهنده حضور فنوتایپی متالوبتالاکتاماز می باشد. مقاومت ایزوله های تولید کننده MBLs به ۷ آنتی بیوتیک مختلف بررسی شد.*

یافته ها: *از ۶۰ ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا تولید کننده بتالاکتاماز ۱۸ ایزوله مقاوم به ایمیپنم بودند که ۵ ایزوله با روش فنوتیپی دارای متالوبتالاکتاماز بود. تمامی ایزوله های تولید کننده MBLs به طور همزمان به بیش از ۸ آنتی بیوتیک از کلاس مختلف مقاوم بودند.*

نتیجه گیری: *با توجه به افزایش میزان ایزوله های تولید کننده ESBLs در کشور و افزایش مصرف کاربانیم ها در درمان عفونتهای حاصل از آنها افزایش ایزوله های تولید کننده متالوبتالاکتامازها و دارای مقاومت های چندگانه در کشور دور از انتظار نیست.*

واژگان کلیدی: ***ایمیپنم، متالو بتالاکتاماز، پسودوموناس آئروژینوزا***

مقدمه

پیدایش آنزیم های بتالاکتاماز در میان باکتری ها باعث پدیده مقاومت در بسیاری از آنها بویژه باکتری های ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی شده و در نتیجه درمان عفونت های حاصل ازآنها را با مشکلات جدی روبرو ساخته است(۱). این آنزیم ها که بسیاری از آنها بتالاکتاماز با طیف اثر گسترده(ESBLs) نامیده می شوند، در طبقه بندی آمبلر به چهار گروه اصلی A تا D تقسیم می شوند. گروه A سبب هیدرولیز پنی سیلین، سفالوسپورینهای با طیف اثر کم وسیع می شوند، شامل TEM.1 TEM.2،SHV.1 بوده و در باکتری های مانند اشریشیاکلی و کلبسیلاپنومونیه شناسایی شده اند. گروه B، شامل متالوبتا لاکتامازهای(MBLs) وابسته به روی(Zn) می باشند که قادر به هیدرولیز کارباپنم ها بوده و در باکتری های مانند پسودوموناس آئروژینوزا و سراشیا مارسنس گزارش شده اند. گروهC، که از آنها می توان AmpCبتالاکتامازها را نام برد، قادر به تجزیه سفومایسین ها و سفالوسپورین ها می باشند و گروه D، بتالاکتامازها با قدرت هیدرولیز زیاد مانند OXA بر علیه اکساسیلین و کلوکساسین بوده و اسید کلاولانیک به طور ضعیف از فعالیت آنها جلوگیری می کند(۲).

ایمیپنم از اعضای دسته ای داروهای بتالاکتام بنام کاربا پنم ها می باشد، که به آنزیم های بتالاکتاماز مقاوم بوده و در درمان عفونتهای حاصل از باکتری های گرم منفی مقاوم و تولید کننده ESBLs و AmpC بکار می روند، اما ظهور نوعی از آنزیم های بتالاکتاماز به نام متالوبتالاکتاماز که در گروه B از طبقه بندی آمبلر قرار دارند، سبب مقاومت به این آنتی بیوتیک ها شده اند(۳). متالو بتا لاکتاماز ها آنزیم های هستند که توسط کروموزوم ها و یا پلاسمیدها کد می شوند و روی طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام خصوصاً کارباپنم ها اثر گذاشته و باعث هیدرولیز آنها می شوند(۴). این آنزیم ها در in vitro توسط شلاتورهای فلزی مانند EDTA (اتیلن دی آمین ترا اسید استیک) و سدیم مرکاپتو استیک اسید مهار می گردند، اما توسط مهار کننده های ESBLs مانند سولباکتام و اسید کلاولانیک مهار نمی شوند(۵ و۶). معرفی کارباپنم ها به دنیای پزشکی یک امتیاز بزرگ جهت درمان عفونتهای جدی باکتریایی مقاوم به بتالاکتام ها محسوب می شود که به دلیل طیف وسیع، فعالیت و پایداری آنها در برابر اکثر آنزیم های بتالاکتاماز می باشد. مقاومت به آنتی بیوتیک های این کلاس از داروهای بتالاکتام توسط آنزیم های متالوبتالاکتاماز یکی از عوامل اصلی مقاومت به کارباپنم ها می باشد. لذا بررسی شیوع مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ها توسط متالوبتالاکتامازها به خصوص در پسودوموناس آئروژینوزا که جزئی از فلور طبیعی بدن بوده و نقش مهمی درایجاد عفونت های بیمارستانی دارد، ضروری به نظر می رسد.

روش کار

۶۰ ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا از آبان ماه ۸۸ تا تیر ماه ۸۹ از بیماران دچار سوختگی بستری در بیمارستان سوختگی قطب الدین شیراز جدا سازی شدند.

مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای سفوتاکسیم(۳۰µg)، سفتازیدیم(۳۰µg) و ایمیپنم(۱۰µg)(تهیه شده از شرکت HIMEDIA) با روش دیسک دیفیوژن تعیین شد(۷).

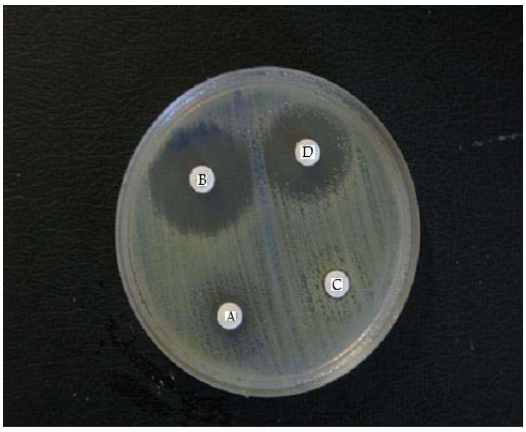
از مجموع ۶۰ ایزوله مورد بررسی ایزوله هایی که در روش دیسک دیفیوژن به یکی از آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفتازیدیم مقاوم بودند جهت تعیین ESBLs مورد بررسی قرار گرفتند. تعیین تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) در این ایزوله ها به روش دیسک ترکیبی و با دو آنتی بیوتیک سفتازیدیم(CTX) و سفوتاکسیم(CAZ) (تهیه شده از شرکت HIMEDIA) به تنهایی و همراه با اسید کلاولانیک(CA) انجام گردید، افزایش قطر هاله عدم رشد به اندازه برابر یا بیش از ۵ mm در اطراف دیسک های حاوی اسید کلاولانیک نشان دهنده حضور بتالاکتاماز های وسیع الطیف بود(۸). از سویه های استاندارد *Pseudomonas.aeruginosa ATCC* ،*E.coli ATCC 25922* *Klebsiella pneumonia ATCC* 700603، *27853* به عنوان کنترل تست های آنتی بیو گرام و تولید ESBL استفاده شد(۹).

ایزوله هایی که در روش دیسک دیفیوژن به ایمیپنم مقاوم بودند برای شناسایی آنزیم های متالوبتالاکتامازها مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین فنوتیپی متالو بتالاکتاماز در ایزوله های مقاوم به ایمیپنم(IMP) از دو روش استفاده شد. در روش اول از دیسک ایمیپنم در مجاورت دیسک ایمیپنم که به آن محلول EDTA(SIGMA) (۰/۵ مولار به مقدارµl ۱۰) اضافه شده، استفاده گردید و افزایش قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک ایمیپنم به همراه EDTA به اندازه برابر یا بیش از ۷mm در مقابل دیسک ایمیپنم به تنهایی نشان دهنده حضور متالو بتالاکتامازها بود(۱۰). در روش دوم دیسک ایمیپنم (غلظت µg ۱۰) به فاصله ۲cm از دیسک حاوی EDTA (۰/۵ مولار به مقدارµl ۱۰) قرار داده شد که افزایش قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک حاوی EDTA نشان دهنده حضور متالوبتالاکتامازها بود(۱۱). بعد از تعیین فنوتیپ متالوبتالاکتاماز در ایزوله های مقاوم به ایمیپنم مقاومت این ایزوله ها با روش استاندارد رقت در آگار نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، سفالکسین، سفتی زوکسیم و آموکسی سیلین بررسی شد.

یافته ها

تمامی ۶۰ (۱۰۰٪) ایزوله مورد بررسی به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفتازیدیم مقاوم و تولید کننده ESBLs بودند که از میان آنها ۱۸ (۳۰٪) ایزوله به ایمیپنم مقاوم بودند(شکل ۱).

از مجموع ۱۸ ایزوله بالینی پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمیپنم ۵ ایزوله با هر دو روش مورد استفاده جهت تعیین متالوبتالاکتاماز ها به عنوان تولید کننده متالوبتالاکتاماز ها شناخته شدند (شکل ۲). تمامی ایزوله های تولید کننده MBLs در روش رقت در آگار به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، سفتی زوکسیم ، سفالکسین و آموکسی سیلین مقاوم بودند به عنوان ایزوله های دارای مقاومت چندگانه شناخته شدند.



شکل شماره ۱ . پسودوموناس آئروژینوزا تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف.
(A= Cefotaxime, B= Ceftazidime, D= Ceftazidime + Clavulanic acid, C= Cefotaxime + Clavulanic acid)
اسید کلاولانیک باعث مهار آنزیم های بتالاکتاماز و تشکیل هاله عدم رشد گردیده است

شکل شماره ۲ . پسودوموناس آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتاماز EDTA(A= Imipenem, B= EDTA, C= Imipenem, D= Imipenem+EDTA).
(اتیلن دی آمین ترا اسید ااستیک) با عث مهار آنزیم های متالوبتالاکتاماز و تشکیل هاله عدم رشد در اطراف دیسک ایمیپنم و EDTA گردیده است.

بحث

کاربابنم ها مانند (ایمیپنم ، مروپنم، بیاپنم وارتاپنم) کلاس مهمی از داروهای بتالاکتام می باشند که در برابر بتالاکتامازها مقاوم می باشند و در درمان عفونت های حاصل از باکتری هایی تولید کننده ESBLs و AmpC که قادر به هیدرولیز پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها می باشند بکار می روند. در نتیجه بروز مقاومت به این آنتی بیوتیک ها در بین باکتری ها خصوصا باکتری پسودوموناس آئروژینوزا که نقش مهمی در ایجاد عفونت های بیمارستانی به خصوص در بیماران دچار سوختگی دارد، یک تهدید جدی در درمان عفونت های حاصل از آنها می باشد. ظهور و کسب متالوبتالاکتامازها در بین باکتری های گرم منفی بویژه باکتری های که نقش مهمی در ایجاد عفونت های بیمارستانی دارند از نظر اپیدمیولوژیک حداقل به دو دلیل دارای اهمیت می باشند: ۱. شیوع یا افزایش متالوبتالاکتامازها نه تنها باعث مقاومت به کاربابنم ها می شوند بلکه با مقاومت به بسیاری از آنتی بیوتیک های بتالاکتام وغیر بتالاکتام همراه می باشد، بطوری که این نوع از بتالاکتامازها می توانند به همراه ESBLs و ایزوله های دارای مقاومت چندگانه هم منتقل شوند که نتایج این بررسی تا حدودی حاکی از همراهی MBLs با ESBLs و همچنین مقاومت های چندگانه در ایزوله های مورد بررسی می باشد.۲. ژن های کد کننده متالوبتالاکتامازها معمولاً توسط عناصر ژنتیکی متحرک حمل وکد می شوند که در نتیجه به راحتی می توانند به سویه های حساس منتقل شوند(۱۲).

مطالعات اخیر نشان دهنده افزایش مقاومت به این آنتی بیوتیک ها به ویژه توسط متالوبتالاکتامازها می باشد در کشور می باشد. بررسی که در سال ۱۳۸۶ بر روی ۱۲۰ ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بخش سوختگی بیمارستان شفا شهر کرمان انجام شد، هیچ ایزوله تولید کننده متالوبتالاکتاماز گزارش نگردید(۱۳). اما در بررسی دیگری که در سال ۱۳۸۸ در کرمان انجام شد از میان ۷۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا، یک ایزوله که از عفونت های سوختگی جدا شده بود به ایمیپنم مقاوم و به عنوان تولید کننده MBL شناخته شد که این بررسی نشان دهنده شروع مقاومت به کاربابنم ها در این منطقه بود. همچنین این ایزوله تولید کننده ESBLs و دارای مقاومت چندگانه بود(۱۴). همچنین در بررسی که توسط فاطمه میهنی و همکارانش بر روی ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بخش سوختگی بیمارستان طالقانی شهر اهواز انجام گردید، از بین ۱۰۰ نمونه بالینی جدا شده، ۴۲ نمونه دارای مقاومت به ایمیپنم بوده اند، که از میان آنها ۸ نمونه به عنوان تولید کننده متالوبتالاکتامازگزارش شدند(۱۵).

مقایسه بررسی حاضر با سایر بررسی های انجام شده در ایران نشان دهنده تفاوت در الگوی مقاومتی به ایمیپنم در کشور می باشد که شاید یکی از دلایل آن تفاوت در نحوه درمان وآنتی بیوتیک تجویز شده می باشد.

در سال ۲۰۰۵ در ترکیه از میان ۱۲۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جمع آوری شده از بیماران مبتلا به عفونتهای سوختگی، ۳۰/۸٪ از آنها به ایمیپنم مقاوم بودند که از میان آنها ۲۱(۵۶/۸٪) ایزوله به عنوان تولید کننده متالوبتالاکتاماز ها شناسایی شدند و تمامی ایزوله های تولید کننده MBLs دارای مقاومت چندگانه بودند(۱۶). در بررسی که در سال ۲۰۰۸ در هند انجام شد ۲۰/۸٪ از ایزوله های پسودوموناس آئرزژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتامازها بودند(۱۷). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۵ در کشور ژاپن صورت گرفت، نشان داده شد که بیماران عفونی شده با پسودوموناس آئروژینوزا های تولید کننده متالوبتالاکتاماز جهت درمان آنتی بیوتیک های مختلفی دریافت می کنند و مرگ و میر ناشی از عفونت توسط این نوع باکتری ها بیشتر از انواع فاقد این آنزیم می باشد(۱۸).

خوشبختانه مقایسه بررسی های انجام شده در مورد شیوع متالوبتالاکتامازها در ایران با دیگر کشورها حاکی از پایین بودن شیوع این نوع از بتالاکتامازها در ایران نسبت به دیگر کشورها می باشد، اما در هر صورت به مرور استفاده از این دارو جهت درمان عفونت های حاصل از ایزوله های مقاوم و تولید کننده بتالاکتاماز و نیز وجود فشار حاصل از مصرف این دارو افزایش شیوع ایزوله های تولید کننده متالوبتالاکتامازها به خصوص در بیمارستان ها دور از انتظار نیست. بنابراین چون مطالعات نشان دهنده افزایش شیوع متالوبتالاکتامازها در کشور می باشند و از آنجائیکه پسودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب در محیط های بیمارستانی مطرح می باشد باید این نوع ایزوله ها در آزمایشگا های بالینی تشخیص داده شوند تا درمان مناسب جهت عفونت های حاصل از آنها صورت گیرد تا از شیوع هرچه بیشتر آنها جلوگیری شود.

REFERENCES

1.Paterson LD. Resistance in Gram-negative Bacteria : Enterobacteriaceae. Am J Med. 2006; 119(6A): 20-8.

2.Jacoby AG, Munoz-Price LS. Mechanisms of disease the new β-lactamase. N Engl J Med; 2005; 325: 380-91.

3. Poole K . Resistance to β-lactam antibiotics. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 2004; 61: 2200–2223.

4.Cornaglia G, Akova M , Amicosante G, Cant´on R, Cauda R, Docquier JD. Metallo-β- lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. Int J Antimicrob Agents. 2007; 29: 380-388.

5. Helfand MS , Bonomo RA. Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of Extended-Spectrum β-lactamases and metallo-β-lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens. Curr Opin Pharmacol. 2005; 5:452–458.

6. Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V. Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo-β- lactamase production in clinical isolates. Indian J Med Res. 2005; 121: 780-783.

7.Wayne PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourteenth informational suspplement. Document M100-S14. NCCLS, 2004.

8. Bradford PA. Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001; 933–951.

9. Joon PY, Young PS, Oh JE, Park JJ, Lee YK, Woo JG, Lee K. Occurrence of Extended-Specterum β-lactamase among chromosomal AmpC-producing Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii, and Serratia marcescens in korea and investigation of screening criteria. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005; 51: 265-69.

10. Chacko B, Varaiya A, Dedhia B. Imipenem resistant Metallo β Lactamse producing Pseudomonas aeruginosa. Indian J Med Microbiol. 2008; 26(4): 398-407.

11. Papaparaskevas J, Pantazatou A, Stefanou I, Mela V, Galatidis N, Avlamis A. Differences in the evolution of imipenem susceptibility among Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli isolates during a 6-year period in a tertiary care hospital. Int J Antimicrob Agents. 2007; 29: 197–200.

12. Luzzaro F, Endimiani A, Docquier JD, Mugnaioli C, Bonsignori M, Amicosante G, et al. Prevalence and characterization of Metallo-β-lactamases in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa. Diagn Microbiol Infct Dis. 2004; 48:131-5.

13. Shakibaie M R, Shahcheraghi F, Hashemi A, Adeli N S. Detection of TEM, SHV and PER type Extended-Spectrum β-Lactamase Genes among Clinical Strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from burnt patients at Shafa-Hospital, Kerman, Iran. Iranian J Med Sci. 2008; 11(2): 49-54.

14. Kalantar D, Mansouri S, Razavi M. Emergence of imipenem resistance and presence of metallo-β-lactamases enzymes in multi drug resistance gram negative bacilli with multi drug- resistance isolated from clinical samples in Kerman, 2007-2008.(In press).

15. Mihani F, Khosravi A. Isolation of Pseudomonas aeruginosa strains produsing metallo beta lactamases from infection in burned patients and identification of bla_{IMP} and bla_{VIM} genes by PCR. Iranian J Med Microbiol. 2007; 1(1): 31-33.

16. Altoparlak U, Aktas F, Celebi D, Ozkurt Z, Akcay N M. Prevalence of metallo-β-lactamases among Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. Burns 2007; 31:707-710.

17. Varaiya A, Kulkarni N, Kulkarni M, Bhalekar P, Dogra J. Incidence of metallo beta lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in ICU patients. Indian J Med Res. 2008; 127(4):398-402.

18. Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, et al. Clinical and Bacteriological characteristics of IMP-type metallo-β-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa. Clin Infect Dis. 2003; 37:26-32.