مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توانایی تشکیل بیوفیلم در ایزوله های سودموناس آئروژینوزا جداشده از بیماران با عفونت دستگاه ادراری

محسن طبسی[۱]، شیما جوادی نیا[۲]، حسین معصومی اصل[۳]، امیرحسام نعمتی[۴]، رضا عزیزیان[۵]، مهری علیپور[۶]، آذر دخت طباطبایی[۷]*

۱-دانشجوی دکتری تخصصی پژوهشی، دپارتمان بیولوژی مولکولی، انستیتوپاستورایران، تهران، ایران.
۲-فوق تخصص ریه، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی کودکان، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۳-فوق تخصص بیماری های عفونی کودکان، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی کودکان، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۴-کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، دپارتمان باکتری شناسی، انستیتوپاستورایران، تهران، ایران
۵-کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، آزمایشگاه تشخیص طبی مسعود، تهران، ایران
۶-کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی کودکان، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۷-کارشناس ارشد قارچشناسی، هیات علمی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی کودکان، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

***نشانی برای مکاتبه:** تهران، خیابان ستارخان، خیابان نیایش، مجتمع آموزشی درمانی حضرت رسول اکرم (ص)، مرکز تحقیقات بیماریها عفونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تلفن ۰۲۱۶۶۵۱۶۰۴۹، azardokht.tabatabaei@yahoo.com ، cpidir@gmail.com

دریافت مقاله: اردیبهشت نود و شش پذیرش برای چاپ: تیر نود و شش

چکیده

سابقه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یکی از باکتری های بیمارستانی مهم و حائز اهمیت است. این باکتری گرم منفی باعث ایجاد بیماری های مختلفی شامل عفونت زخم، ریه (بخصوص در بیماران سیستیک فیبروزیس)، ادراری، خون، اندوکاردیت و یا عفونت در سوختگی های شدید است. یکی از خصوصیات جالب این باکتری حساسیت کم آن به آنتی بیوتیک ها می باشد. علاوه بر این، سودوموناس آئروژینوزا توانایی ذاتی برای تشکیل بیوفیلم دارد و به راحتی روی سطوح، بیوفیلم تشکیل می‌دهد که به سختی از بین می رود. تشکیل بیوفیلم یک مکانیسم حیاتی برای باکتری در انسان است. بیوفیلم در انسان مسئول آسیب های فراوان ناشی از استفاده از وسایل پزشکی و مقاومت آنتی بیوتیکی می باشد. در این مطالعه علاوه بر سنجش مقاومت دارویی سعی شد تا توانایی تشکیل بیوفیلم را در بین ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران با عفونت دستگاه ادراری بسنجیم.*

روش کار: *نمونه های بالینی ادراری روی محیط OF حاوی گلوکز، SIM و TSI به منظور تشخیص باکتری کشت داده شدند همچنین تست اکسیداز برای همه آن ها انجام شد. تست حساسیت آنتی بیوتیکی با روش کربی- بایر و مطابق استاندارد جهانی CLSI انجام شد. تست توانایی تشکیل بیوفیلم با روش میکروپلیت انجام گردید و نهایتاً در طول‌موج 495nm خوانده شد. در نهایت با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی 19 و به روش t-student مطالعه آماری صورت گرفت .*

یافته ها: *۸۱ سویه‌ی سودوموناس آئروژینوزا از عفونت ادراری جدا شد. الگوی مقاومت برای توبرامایسین (Tob)، ایمی‌پنم (Imp)، جنتامایسین (GM)، پیپراسیلین (Pip)، سفتازیدیم (Caz)، سفوکسیتین (CF) ، سیپروفلوکساسین (Cip) به ترتیب۲۳/۴۵٪، ۶/۱۷٪، ۲۴/۶۹٪، ۱۱/۱۱٪، ۲۱٪، ۷۵/۳٪ و ۲۳,۴۵٪ بود. ۲۵/۹۳٪ سویه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند و ۵۱/۸۵٪، ۶/۱۷٪ و ۱۶/۰۶٪ سویه ها به ترتیب بیوفیلم ضعیف (۱+)، متوسط (۲+) و قوی (۳+) تشکیل دادند.*

نتیجه‌گیری: *مطالعه ما نشان داد که ۷۴/۰۸٪ سویه ها توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند، همچنین ۱۶/۰۶٪ ایزوله ها توانایی تشکیل بیوفیلم قوی را داشتند و بیشترین مقاومت به سفوکسیتین و جنتامیسین مشاهده شد. علاوه بر عناصر ژنتیکی، تشکیل بیوفیلم را می توان یکی از دلایل اصلی برای مقاومت در برابر آنتی بیوتیک دانست.*

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بیوفیلم، عفونت دستگاه ادراری

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یکی از باکتری های بیمارستانی حائز اهمیت است. این باکتری به‌صورت ساپروفیت باعث ایجاد بیماری‌های مختلفی از عفونت ریه بخصوص در بیماران سیستیک فیبروزیس گرفته تا عفونت ادراری، عفونت سوختگی، اندوکاردیت و عفونت‌های دیگر می‌شود. با توجه به وجود این باکتری در خاک و انتقال آسان آن ، نقش آن در عفونت های بیمارستانی حائز اهمیت است(۱).

این باکتری نسبت به اکثر عوامل مختلف فیزیکی و شیمیایی مقاوم بوده و نسبت به بسیاری از مواد ضدعفونی‌کننده دارای مقاومت می‌باشد(۱). سودوموناس آئروژینوزا در صورت وجود رطوبت مناسب در محل‌های مختلف (مانند دستگاه تنفس مصنوعی، بیهوشی، دستگاه آسپیراسیون، لوازم جراحی، ملافه، کف اتاق، حمام و آب شیر) می‌تواند مدت‌ها زنده بماند(۲).

سودوموناس آئروژینوزا به طور ذاتی به برخی از بتالاکتام ها (β-lactam)، ماکرولیدها، تتراسیکلین ها، کوتریموکسازول و فلوروکینولون ها مقاوم است. اما در مواجهه با کربوکسی پنی‌سیلین‌ها، یوریدوپنی سیلین ها، سفالوسپورین های نسل چهارم، برخی از سفالوسپورین های نسل سوم (سفپیم، سفتازیدیم و سفوپرازون)، آمینوگلیکوزیدها (جنتامیسین، توبراماسین و آمیکاسین)، برخی از فلوروکینولون‌ها (سیپروفلوکساسین و لوفلوکساسین) و کارباپنم ها دارای مقاومت ذاتی نیست ولی قادر است هنگام مواجهه با این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم گردد. مکانیسم های عمومی مقاومت به آنتی بیوتیک ها شامل ممانعت از ورود دارو به داخل سلول (تغییرات غشای خارجی)، بازگشت دارو به خارج (پمپ‌های افلاکس)، تخریب آنزیمی دارو (تولید بتالاکتامازها) و تغییر محل هدف دارو هست(۳, ۴). ژن‌های مقاومت نه‌تنها روی کروموزوم‌ها بلکه توسط عناصر خارج کروموزومی (پلاسمیدها) نیز حمل می‌گردند. نفوذپذیری غشای خارجی این باکتری حتی در مقایسه با سایر باکتری‌های گرم منفی مانند اشریشیاکلی (*E. coli*) بسیار کمتر است و این محدودیت در کنار پمپ‌های تراوشی (efflux pumps) مهم‌ترین دلیل مقاومت ذاتی این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها هست. مقاومت بالا به داروهای متعدد، معمولاً نتیجه ترکیبی از مکانیسم‌های متفاوت در یک سویه یا عملکرد یک مکانیسم خاص هست(۵).

سویه های سودوموناس توانایی بالایی برای تشکیل بیوفیلم دارند و به راحتی بر روی سطوح بیوفیلم تشکیل می‌دهند. تشکیل بیوفیلم مقاومت به آنتی‌بیوتیک ها را افزایش می‌دهد. بیوفیلم عامل ۶۵٪ عفونت های انسانی می باشد و ساختاری است متشکل از گیلکوکالیکس، DNA، لیپوساکارید و اجزای باکتری‌های مرده که اطراف باکتری‌های دیگر را می‌گیرد. پلی‌ساکارید در بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا از جنس آلژینات هست. بیوفیلم تحت تأثیر کروم سنسینگ بوده و در سودوموناس آئروژینوزا ژن *lasB* به‌عنوان یکی از ژن‌های اصلی کروم سنسینگ با تشکیل بیوفیلم بی‌ارتباط نیست(۳, ۶, ۷).

مشخصه تمام بیوفیلم ها مقاومت قابل توجه و طولانی مدت به روش های حذف فیزیکی و بیوشیمیایی همچون آنتی بیوتیک هاست که دلیل آن تراکم بالای سلول های باکتری در این ساختار و ممانعت از عدم ورود آنتی‌بیوتیک به مرکز بیوفیلم و همچنین بیرون راندن آنتی بیوتیک ها از بیوفیلم است. بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا با عفونت تنفسی در بیماران سیستیک فیبروزیس مرتبط است(۳, ۶, ۷).

با توجه به افزایش مقاومت دارویی سودوموناس آئروژینوزا و همچنین ارتباط مقاومت دارویی با تشکیل بیوفیلم در این مطالعه علاوه بر سنجش مقاومت دارویی ایزوله های جدا شده از عفونت ادراری سعی شد تا توانایی تشکیل بیوفیلم را در بین این ایزوله ها بسنجیم.

روش کار

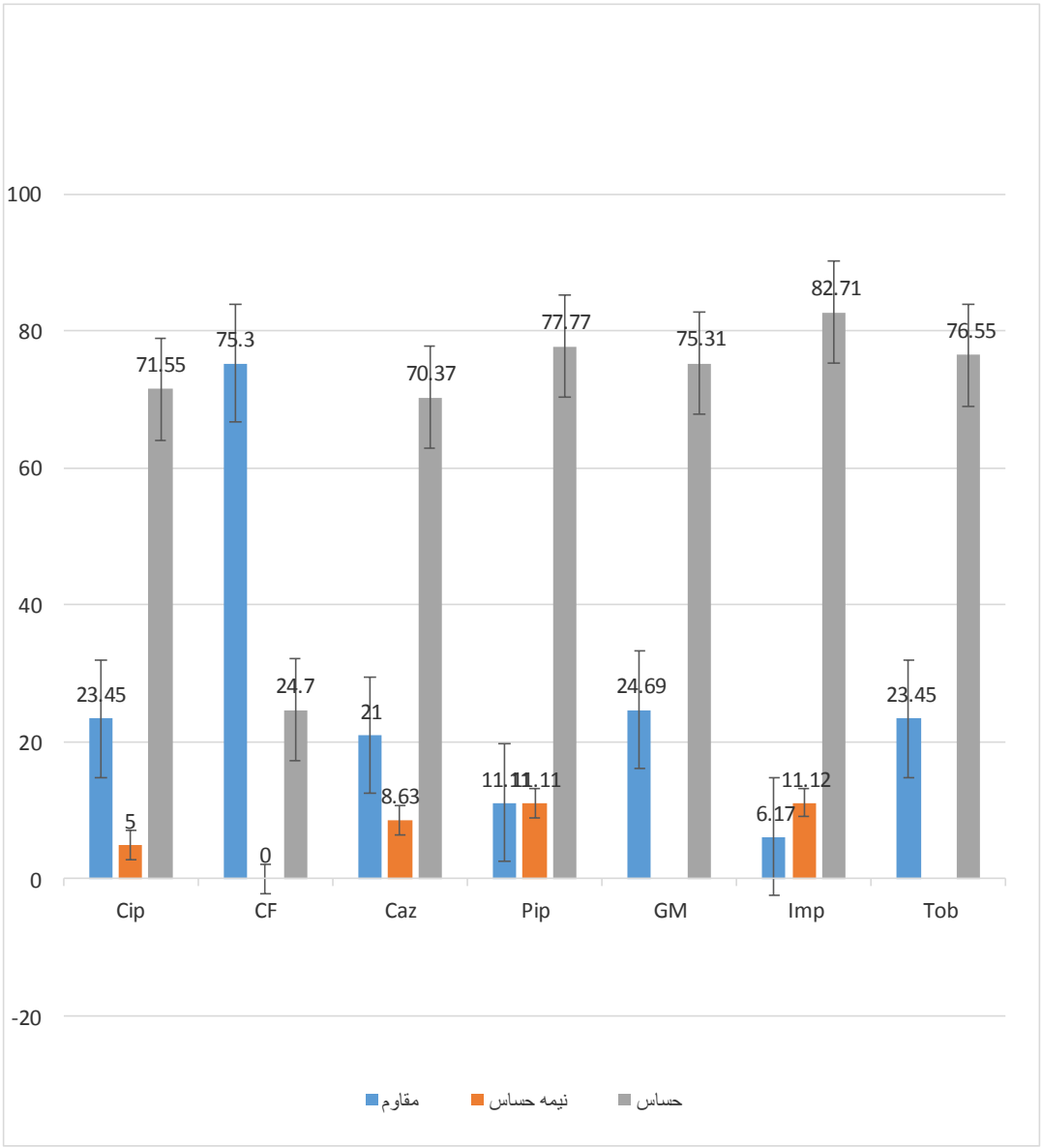
ایزوله های جمع آوری شده از نمونه‌های بالینی ادراری توسط آزمایش های تشخیصی _ فنوتیپی شامل سیتوکروم اکسیداز، رشد در محیط OF حاوی گلوکز، TSI، SIM (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) به عنوان سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شدند(۸). آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک های انتخابی شامل توبرامایسین (Tob)، ایمی پنم (Ipm)، جنتامیسین (Gen)، پیپراسیلین (Pip)، سفتازیدیم (Caz)، سفوکسیتین (Fox) و سیپروفلوکساسین (Cip) (Mast, Co., Merseyside, UK) با روش Kirby-Bauer و مطابق استاندارد جهانی CLSI انجام شد(۹).

آزمایش توانایی تشکیل بیوفیلم با روش میکروپلیت تیتر بر اساس روش O'Toole and Kolter انجام شد (۱۰). ۱۰ µl از سوسپانسیون باکتری یک شب انکوبه شده در دمای ċ ۳۷ به ۱۹۰µl محیط LB براث اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ċ۳۷ انکوبه شد. روز بعد میکروپلیت ها با سرم فیزیولوژی استریل شسته شده و مازاد آن دور ریخته شد. سپس با کریستال ویوله ۰/۳٪ رنگ شده و بعد از ۱۵ دقیقه رنگ دور ریخته شد و پس از ۳ بار شستو شو با اسید استیک رنگ باقیمانده فیکس شد. نهایتا نتایج در طول‌موج ۴۹۵nm با دستگاه الایزا خوانده شد. آنالیز تولید بیوفیلم با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۹ انجام شد که مطالعه آن از روش t-student انجام گرفت.

یافته ها

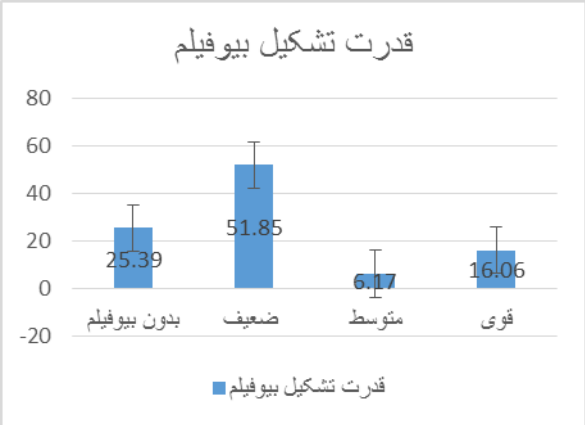
هشتاد و یک سویه‌ی سودوموناس آئروژینوزا از نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری جدا شدند و تست مقاومت آنتی بیوتکی آنها بررسی شد.

بیشترین مقاومت به سفوکسیتین (۷۵/۳٪) و کمترین قاومت به ایمی پنم (۶/۱۷٪) مشاهده شد (نمودار ۱).



نمودار ۱: میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا جداشده از ادرار

تست ارزیابی تشکیل بیوفیلم نیز نشان داد که ۲۵/۳۹٪ سویه‌ها در شرایط آزمایشگاهی قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند. ۵۱/۸۵٪ آن‌ها بیوفیلم ضعیف (+۱)، ۶/۱۷٪ بیوفیلم متوسط (+۲) و ۱۶/۰۶٪ سویه ها بیوفیلم قوی (+۳) تشکیل دادند (نمودار ۲).



جدول ۲: درصد و شدت سویه‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم

اختلاف معنی‌دار(P <۰/۰۵) بین جذب نوری (OD) در تست بیوفیلم و مقاومت در سویه‌ها سودوموناس آئروژینوزا دیده شد که نشان‌دهنده نقش بیوفیلم در افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک ها بود.

بحث

سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک ایزوله بالقوه بیماری زا نقش مهمی در عفونت های بیمارستانی دارد که با تولید بیوفیلم و افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک ها پایداری خود را در محیط افزایش می دهد(۱). در مطالعه نسترن اصغری مقدم و همکاران بر روی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از عفونت ادراری، ۱۱۶ سویه جداشد که ۱۰/۳ درصد آنها سودوموناس آئروژینوزا بوده و بیشترین مقاومت را نسبت به کاربنی سیلین (۱۰۰٪)، سفوتوکسیم (۷۵٪) و کوتریموکسازول (۶۶/۷٪) نشان دادند (۱۱) که در تطابق با مطالعه ی ما نشان از روند رو به رشد مقاومت آنتی بیوتیکی بین ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا ادراری می باشد.

همچنین در بررسی دیگر بر روی سودوموناس آئروژینوزا دربیمارستان طالقانی شهر اهواز، ۱۱۱ سویه ی سودوموناس آئروژینوزا جدا شد که از این میان ۴۸/۶٪ ایزوله ها از زخم جدا شدند و به ترتیب ۳۷/۸٪ از بیوپسی، ۸/۱٪ از خون و ۵/۴٪ از ادرار جدا شد. بیشترین حساسیت به کلیستین (۷۸/۳٪) مشاهده شد و۱۸٪، ۱۹٪، ۱۴/۵٪، ۸٪، ۱۹/۸٪، ۱۴/۵٪، ۱۱/۷٪ ایزوله ها به ترتیب به سیپروفلوکساسین، جنتامیسین، ایمی پنم، سفوتاکسیم، پیپراسیلین، کوتریموکسازول، آمیکاسین و آمپی سیلین حساس بودند که یافته ها ی ما را در این مطالعه تایید می کنند (۱۲).

در مطالعه روی ۱۰۴ سویه ی بالینی جدا شده از زخم سوختگی، کمترین مقاومت نسبت به ایمی پنم (۴۰/۹۱٪) ، پیپراسیلین (۴۴/۹٪) و تتراسایکلین (۴۸/۰۳٪) بود که در مطالعه حاضر نیز کمترین مقاومت به ایمی پنم (۶/۱۷٪) مشاهده گردید (۷). مشابه این نتایج درمطالعه دیگری به روش *E-test* برای ۷۰ سودوموناس آئروژینوزا، نشان داده شد که بیشترین حساسیت به ترتیب نسبت به ایمی پنم، مروپنم و سیپروفلوکساسین بود. همچنین موارد مقاوم به ایمی پنم و مروپنم در مقابل مابقی آنتی بیوتیک ها نیز مقاومت متقاطع نشان دادند (۱۳).

مطالعه ایمانی فولادی بر روی ۱۱۰ سویه ی سودوموناس آئروژینوزا نشان داد که مقاومت به کوتریموکسازول و آموکسی سیلین ۹۶,۴٪ و ۹۲,۷٪ بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی بود در حالیکه مقاومت به آمیکاسین ۱۷,۳٪ بود (۱۴).

در مطالعه دیگری روی ۱۵ سویه سودوموناس آئروژینوزا عامل عفونت ادراری، بیشترین مقاومت به توبرامایسین و ایمی پنم به میزان ۱۳/۴٪ مشاهده شد و همه ایزوله ها به جنتامیسین، پیپراسیلین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین حساس بودند و از طرفی رابطه مستقیمی بین شدت تولید بیوفیلم و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده شد که یافته های ما را در این ارتباط تایید می کند (۱۵).

در بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم Vanerkova و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۱۷ تعداد۴۶/۶۰٪ ایزوله ها بدون بیوفیلم و ۱۷/۴۷٪، ۶/۷۹٪ و ۲۹/۱۲٪ ایزوله ها به ترتیب بیوفیلم ضعیف، متوسط و قوی داشتند (۱۶) و همچنین در مطالعه سال ۲۰۱۶ هند نیز ۵۶/۶۶٪ ایزوله بیوفیلم ضعیف و ۱۳/۳۳٪ آن ها بیوفیلم قوی تشکیل دادند که هر دو در توافق با نتایج مطالعه حاضر هستند (۱۲). مطالعه ما نشان داد که افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی می تواند در ارتباط با تشکیل بیوفیلم می باشد. مقاومت به آنتی بیوتیک ها و مواد ضدعفونی علاوه بر وجود عناصر ژنتیکی به دلیل تشکیل بیوفیلم نیز تشدید می شود (۱۳). با توجه به اینکه ۷۴/۰۸٪ سویه ها توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند، همچنین ۱۶/۰۶٪ ایزوله ها توانایی تشکیل بیوفیلم باشدت ۳+ به بالا را داشتند می توان این موضوع که بیوفیلم باعث مقاومت آنتی بیوتیکی می شود را تائید کند. اهمیت ارتباط تشکیل بیوفیلم و افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک ها در بیمارستان ها از این لحاظ حائز اهمیت است که با توجه به محیط بسته و نسبتا با ثبات بیمارستان ها در صورتی که سودوموناس آئروژینوزا کلونیزه شود بیوفیلم تشکیل داده و با توجه به ماهیت مقاوم آن پایدار می ماند و براحتی بین بیماران بستری منتقل شده و می تواند موجب بروز طغیان شود. در عین حال این تحقیق در حال ادامه است و سعی شده است بر روی ژن های موثر در بیماریزایی و کروم سنسینگ تحقیق شود، تا مکانیسم های ژنی تشکیل بیوفیلم و افزایش مقاومت نیز سنجیده شود.

REFERENCES

1. Fonseca A, Sousa J. Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes. International journal of antimicrobial agents. 2007;30(3):236-41.
2. Yazdankhah SP, Scheie AA ,Høiby EA, Lunestad B-T, Heir E, Fotland TØ, et al. Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. Microbial drug resistance. 2006;12(2):83-90.
3. Ghotaslou R, Salahi Eshlaghi B. Biofilm of *Pseudomonas Aeruginosa* and New Preventive Measures and Anti- Biofilm Agents. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2012;12(9):747-68.
4. Maleknezhad P, Aligholi M, Moosavi S. Study of *Pseudomonas Aeroginosa* Resistance to Penicillines, Cephalosporins and Aminoglycosides. Tehran Univ Med J. 1998;56(4):23-8.
5. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2006;50(1):43-8.
6. Mah T-FC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in microbiology. 2001;9(1):34-9.
7. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. The lancet. 2001;358(9276):135-8.
8. Kranz R, Weston-Hafer, Kathleen and Richards, Eric, Identifying unknown bacteria using biochemical and molecular methods,Washington University in Saint Louis,2006.
9. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-six information supplement: Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2016.
10. O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol. 1998 May;28(3):449–461.
11. Asghari Moghadam N, Rasoolzadeh R, Hoseini Moghadam SMM, Seifi M, Pour-Shafie MR, Talebi M. Isolation, Antibiotic Resistance Determination and Genotypic Analysis of *Pseudomonas Aeruginosa* Strains Causing Urinary Tract Infection in Catheterized Patients of Shohada and Labafi Nejad Hospitals, Tehran, Iran. J Isfahan Med Sch 2014; 32(244): 1-8
12. Mardaneh J, Ahmadi KH, Jahan Sepas. Determination Antimicrobial Resistance Profile of *Pseudomonas Aeruginosa* Strains Isolated from Hospitalized Patients in Taleghani Hospital (Ahvaz, Iran) from 2011-2012. Journal of Fasa University of Medical Sciences; Autumn 2013: Vol.3: No.3:P 188-193.

13. Jopooni A, Farshad S, Alborzi A, Kalani M, J N. Cross suseptibility and resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeroginosa* isolated from burning patients in south of Iran. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2007;11(35):13-8.
14. Imani Fooladi A, Hosainzadeh M, Mousavi S. Association between Exotoxin A (exo-A) Gene and Antibiotic Resistance Pattern with Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. J Ardabil Univ Med Sci. 2011;11(1):7-13.
15. Saini H, Chhibber S, Harjai K. Azithromycin and ciprofloxacin: a possible synergistic combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-associated urinary tract infections. Int J Antimicrob Agents. 2015 Apr;45(4):359-67.
16. Vaněrková M, Mališová B, Kotásková I, Holá V, Růžička F, Freiberger T. Biofilm formation, antibiotic susceptibility and RAPD genotypes in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from single centre intensive care unit patients. Folia Microbiologica.1-8.
17. Ramakrishnan M, Bai SP, Babu M. Study on biofilm formation in burn wound infection in a pediatric hospital in Chennai, India. Annals of Burns and Fire Disasters. 2016;29(4):276.