

Prevalence rate of resistance to ciprofloxacin among clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Kurdistan province, west of Iran

Safoura Derakhshan¹, Aslan Hosseinzadeh², Manouchehr Ahmadi Hedayati³, Daem Roshani⁴

1. Assistant Professor, Liver and Digestive Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, (Corresponding Author), Tel: +98-87-33664651. Email: s.derakhshan@muk.ac.ir. ORCID ID: 0000-0003-3978-014X

2. MSc, Student Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-9629-751X

3. Assistant Professor, Liver and Digestive Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0003-0654-8918

4. Associate Professor, Social Determinants of Health Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0003-4746-1114

ABSTRACT

Background and Aim: Infection by drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* causes important therapeutic problems. The present study was performed to investigate the antibiotic susceptibility and prevalence of antimicrobial resistance genes in *P. aeruginosa*.

Materials and Methods: In this cross sectional study, 61 clinical *P. aeruginosa* isolates were collected in Sanandaj between April and September 2017. Isolates were examined by disk diffusion method to determine susceptibility to 8 antibiotics and by polymerase chain reaction to detect the presence of extended-spectrum beta lactamase *bla*_{CTX-M} gene and plasmid-mediated quinolone resistance determinants, *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS*. We also evaluated the effect of resistance to quinolones on cross resistance to other antibiotics. We used descriptive statistics for data analysis.

Results: Meropenem showed the highest susceptibility rate (88.5%), followed by piperacillin (85.2%), ceftazidime and amikacin (80.3%, each), imipenem (77%), cefepime (73.8%), ciprofloxacin (49.2%), and gentamicin (39.3%). Among 61 isolates, 32.8% showed multidrug resistance. Ciprofloxacin-resistant isolates had cross resistance to gentamicin (93.5%), cefepime (45.2%), ceftazidime and imipenem (38.7%, each), amikacin (35.5%), piperacillin (29%), and meropenem (22.6%). We detected *qnrS* in three isolates (4.9%). *bla*_{CTX-M}, *qnrB* and *qnrA* were not identified.

Conclusion: Our results suggested that ciprofloxacin may not be effective against *P. aeruginosa*. According to our knowledge, this is the first report of presence of *qnr* in *P. aeruginosa* from Kurdistan which highlights the need for continuous monitoring for prevention of the transmission of *qnr*.

Keywords: Antibiotic resistance, Beta- lactamase, *Pseudomonas aeruginosa*, Quinolone

Received: June 30, 2019

Accepted: Sep 2, 2019

How to cite the article: Safoura Derakhshan, Aslan Hosseinzadeh, Manouchehr Ahmadi Hedayati, Daem Roshani. Prevalence rate of resistance to ciprofloxacin among clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Kurdistan Province, west of Iran. SJKU 2020; 24 (6): 56-67

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CC BY-NC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

میزان شیوع مقاومت به سپرروفلوکسازین در میان ایزووله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده در استان کردستان، غرب ایران

صفورا در خشان^۱، اصلاح حسین زاده^۲، منوچهر احمدی هدایتی^۳، دائم روشی^۴

چکیدہ

زمینه و اهداف: عفونت توسط سودوموناس آنروژینوزای مقاوم به دارو، مشکلات درمانی مهمی ایجاد می کند. مطالعه حاضر برای پرسی حساسیت آنتی بیوتیکی و شووع زن های مقاومت ضد میکروبی در سودوموناس آنروژینوزا انجام شد.

روش برسی: در این مطالعه توصیفی، ۶۱ ایزوله سودوموناس آنروژنیوزای بالینی در سنتدج بین فروردین تا شهریور ماه ۱۳۹۶ جمع آوری شد. ایزوله ها توسط روش انتشار از دیسک برای تعیین حساسیت به ۸ آنتی بیوتیک و توسط واکنش زنجیره ای پلیمر از برای تعیین حضور ژن بتالاکتاماز وسیع الطیف bla_{CTX-M} و عوامل پلاسمیدی مقاومت به کینولون $qnrS$ و $qnrB$ و $qnra$ بررسی شدند. ما همچنین اثر مقاومت به کینولون ها بر مقاومت متقاطع به سایر آنتی بیوتیک ها را ارزیابی کردیم. برای تحلیل داده ها از آمار توصیفی استفاده کردیم.

نتیجه‌گیری: نتایج ما پیشنهاد می‌کند که سپروفلوکسایسین ممکن است مقابله سودوموناس آنروژینوزا مؤثر نباشد. مطابق دانش ما، این اولین گزارش حضور *qnr* در سودوموناس آنروژینوزا از کردستان است که نیاز به نظارت مستمر برای جلوگیری از انتقال *qnr* است.

کلمات کلیدی: مقاهی مت آنچه به تک، بتا لاكتاماز، سده و مهناس آگوئنهز، کنه له (ن)

۹۸/۴/۱۱: ندیش: اصلاحه نهاد: ۹۸/۴/۹ مقاله: وصولا

گزارش شده‌اند. باکتری‌های تولید کننده ESBL به علت مقاومت به بیشتر داروهای موجود یک مشکل جهانی در بهداشت عمومی هستند(۸).

عوامل ضد میکروبی با فعالیت قابل اطمینان در برابر عفونت‌های سودوموناس آنروژنیوزا، به تنها چند آنتی‌بیوتیک در سه طبقه دارویی محدود می‌شوند که شامل بتالاکتام‌ها، فلوروکینولون‌ها و آمینوگلیکوزید‌ها می‌شود. در میان این آنتی‌بیوتیک‌ها، فلوروکینولون‌ها یک طبقه مهم هستند، زیرا آن‌ها دارای خواص مطلوب دارویی و قابلیت جذب خوراکی بالا هستند(۴). با این حال، استفاده گسترده از این کلاس در سال‌های اخیر، مقاومت به فلوروکینولون‌ها را افزایش داده است، که این امر موجب چالش جدی در درمان عفونت‌های سودوموناس آنروژنیوزا شده است. مهم‌تر از همه، مقاومت به فلوروکینولون‌ها ممکن است با میزان بالای مقاومت به سایر کلاس‌های دارویی ضد سودوموناسی، یعنی بتالاکتام‌ها و آمینوگلیکوزید‌ها همراه باشد و سویه‌ها می‌توانند علاوه بر فلوروکینولون‌ها به سایر گروه‌های آنتی‌بیوتیکی نیز مقاومت متقاطع نشان دهند که به MDR این سویه‌ها، سویه‌های مقاوم به چند دارو یا (Multidrug resistant) می‌گویند(۴). بررسی‌های نشان داده است که یکی از فاکتورهای خطر مستقل برای کسب فوئیپ MDR، مقاومت به سپرروفلوکساسین است که با توجه به تعداد محدود داروهای ضد سودوموناسی، نشان‌دهنده اهمیت از دست رفتن تاثیر فلوروکینولون‌ها است(۱). به عنوان مثال در مورد آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتا لاكتام، ۶۷٪ و ۳۷٪ سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون می‌توانند به سفتازیدیم و ایمی‌پنم، به ترتیب مقاومت متقاطع نشان داده و همچنین در مطالعات مختلف، ۰.۶۶٪ تا ۰.۵۸٪ سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون، مقاومت متقاطع را به آنتی‌بیوتیک گروه آمینوگلیکوزیدی جتاتمیسین نشان داده‌اند(۴-۶).

اگر چه در ابتدا مقاومت به کینولون‌ها تنها کروموزومی در نظر گرفته شد؛ اما اولین عامل پلاسمیدی مقاومت به (Plasmid-mediated quinolone کینولون

مقدمه

سودوموناس آنروژنیوزا یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین بیماری‌زاها فرست طلب گرم منفی است که طیف گسترده‌ای از عفونت‌ها مانند عفونت خون، ریه و عفونت‌های دستگاه ادراری، استخوان و مفصل یا بافت نرم را ایجاد می‌کند(۱). درمان عفونت‌های این باکتری به علت مقاومت ذاتی آن به طیف وسیعی از عوامل ضد میکروبی و همچنین توانایی بالا برای کسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی به یک چالش بالینی تبدیل شده است(۲). سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization, WHO) به تازگی سودوموناس آنروژنیوزا را در میان بیماری‌زاها با بالاترین اولویت برای توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید گروه‌بندی کرده است(۳). این شیوع بالای مقاومت، مشکلات درمانی مهمی ایجاد کرده که با میزان بالای بیماری و مرگ و میر همراه است(۴).

مکانیسم‌های مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی در سودوموناس آنروژنیوزا شامل عواملی مانند بتالاکتامازها و دیگر آنزیم‌های تغییردهنده آنتی‌بیوتیک، اینتگرون‌ها، پمپ‌های دفعی یا افلوکس و پورین‌های غشای خارجی است(۲). بتالاکتامازهای وسیع الطیف-آنزیم‌های (Extended-spectrum beta-lactamases, ESBLs) عمدها پلاسمیدی هستند که به استثنای سفامایسین و کرباپن-ها باعث مقاومت به بتالاکتام‌ها می‌شوند. ESBL‌ها گروه متنوعی از بتالاکتامازها هستند که در میان آن‌ها گروه CTX-M در حال حاضر شایع‌ترین ESBL در بیشتر نقاط جهان است. آنزیم‌های CTX-M به طور عمده با خانواده انتروباکتریاسه مرتبط هستند، اما در حال حاضر در میان گونه‌های گرم منفی غیر انتروباکتریاسه (سودوموناس آنروژنیوزا، اسینتوپاکتر بائومانی و غیره) شناسایی شده‌اند. از زمان شناسایی اولین ایزوله سودوموناس آنروژنیوزا دارای bla_{CTX-M} در جهان در سال ۲۰۰۶(۵)، ایزوله‌های CTX-M مثبت سودوموناس آنروژنیوزا در مناطق مختلف ایران با میزان شیوع صفر در زاهدان(۶) تا ۸۴٪ در تهران(۷)

ایزوله‌های به دست آمده از بیمارستان توحید ۳۳ ایزوله؛ بنابراین از بیمارستان بعثت ۲۸ ایزوله جمع‌آوری شد. همراه با جمع‌آوری ایزوله‌ها، اطلاعات دموگرافی بیماران شامل سن، جنس، نوع نمونه، سرپایی یا بستری بودن و همچنین بخش بستری بیماران تهیه شد.

ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا توسط ویژگی‌های بیوشیمیایی و میکروب شناسی مانند رنگ گرم منفی، تولید رنگ‌دانه، بوی شیه انگور، تحرک، اندول منفی، اکسیداز مثبت، عدم تخمیر کربوهیدرات‌ها، آزمایش اکسیداسیون مثبت و تخمیر منفی در محیط اکسیداسیون/تخمیر (Oxidation/Fermentation, O/F) (ساخت شرکت Merck, آلمان)، جذب سیترات در محیط سیمون سیترات آگار (ساخت شرکت Merck, آلمان)، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، اوره آز منفی، متیل رد و وژبروسکوئر، MR/VP منفی در محیط کشت متیل رد/وژبروسکوئر (Methyl Red/Voges Proskauer) (ساخت شرکت Merck, آلمان) شناسایی شدند(۱۲). ایزوله‌ها به صورت خالص در محیط تریپتیکیز سوی براث (ساخت شرکت Q-lab, آمریکا) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول (برای کاهش اثرات مخرب کریستال‌های یخ روی باکتری‌ها) در دمای ۷۰°C تا زمان انجام آزمایش ذخیره شدند.

ارزیابی حساسیت ضد میکروبی: آزمایش حساسیت به آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش انتشار از دیسک در محیط مولر هینتون آگار (ساخت شرکت Q-lab, آمریکا) انجام شد و حساسیت سویه‌ها بر اساس دستورالعمل‌های موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) تعیین شد(۱۳). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (ساخت شرکت Rosco, دانمارک) از سه کلاس دارویی ضدسودوموناسی مورد بررسی قرار گرفت: بتالاکتان‌ها [ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپن (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم) و پیراسیلین (۱۰۰ میکروگرم)]؛ آمینو گلیکوزیدها [آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)

resistance, PMQR) به نام *qnr*، در سال ۱۹۹۸ در یک ایزوله کلیسیلا پنومونیه گزارش شد(۱۰). سه گروه اصلی ژن‌های *qnr* شامل *qnrS* و *qnrB*, *qnrA* شناسایی شده اند. *Qnr* پروتئین‌های با تکرار پنتاپتیدی هستند که به آنژیم‌های DNA ژیراز و توبووازومراز IV متصل شده و بدین وسیله این آنژیم‌ها را از مهار با کینولون‌ها محافظت می‌کنند. از دیدگاه بالینی، اگرچه *Qnr* مقاومت سطح پایین را نسبت به کینولون ایجاد می‌کند؛ اما ممکن است باعث تسهیل ایجاد مقاومت سطح بالا در هنگام یا بعد از درمان با *qnr* فلوروکینولون‌ها شود. بنابراین، ژن‌های پلاسمیدی می‌توانند موجب گسترش و افزایش شیوع سویه‌های مقاوم در برابر کینولون شوند(۱۱).

با توجه به اینکه با دانش‌ما، تاکنون گزارشی در توصیف شیوع آنژیم *CTX-M* نوع *ESBL* و پروتئین‌های *Qnr* در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از شهر سنتنچ در کردستان وجود ندارد؛ هدف این بررسی، تعیین خصوصیات ایزوله‌های بیماری‌زای بالینی سودوموناس آئروژینوزا در کردستان، از جمله حساسیت ضد میکروبی و حضور ژن‌های *bla_{CTX-M}* و *qnr* و ارزیابی تأثیر مقاومت به فلوروکینولون‌ها روی مقاومت مقاطعه به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها است.

روش بررسی

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها: در این مطالعه توصیفی، از ماه فروردین تا شهریور ماه ۱۳۹۶، مجموع ۶۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های مختلف بالینی بیماران بستری و سرپایی که به دو بیمارستان آموزشی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی کردستان با نام‌های بیمارستان توحید (۵۱۸ تخت خوابی) و بیمارستان بعثت (۴۰۰ تخت خوابی) در سنتنچ، ایران مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شد. سنتنچ، مرکز استان کردستان در غرب ایران است. ایزوله‌ها از عفونت مجاری ادراری (n=۴۴)، تراشه (n=۱۰)، خون (n=۵)، مدفع (n=۱) و خلط (n=۱) به دست آمدند. تعداد

جذب نوری ۲۸۰/۲۶۰ برای تعیین خلوص، به عنوان DNA الگو برای انجام آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. نسبت جذب نوری ۲۸۰/۲۶۰ در طیف ۱/۸ تا ۲ نشان‌دهنده خلوص DNA است. بالای این طیف نشان دهنده آلدگی با پروتئین و پایین این طیف نشان دهنده آلدگی با RNA است.^(۱۵)

تکثیر ژن‌های *bla_{CTX-M}*, *qnrB*, *qnrA* و *qnrS* در حجم کلی ۲۵ میکرو لیتر حاوی بافر ۱X PCR، ۱/۵ میلی مولار از هر ۱U *MgCl₂*, ۰/۲ میلی مولار از هر ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، Taq پلی مراز dNTP (ساخت شرکت SinaClon، ایران) و ۳ میکرو لیتر DNA الگو انجام شد. تکثیر در دستگاه چرخاننده حرارتی (ساخت شرکت Eppendorf، آلمان) به صورت زیر انجام شد: واسرت اولیه (۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه)، به دنبال آن یک الگوی سه مرحله‌ای از واسرت (۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه)، اتصال (۱ دقیقه در ۷ دقیقه انجام شد. فهرست پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر Tris-borates اتیلن دی آمین تراستیک اسید (Tris-borate ethylenediaminetetraacetic acid, DNA safe) (TBE stain) (ساخت شرکت SinaClon، ایران) رنگ آمیزی شدن. یک لدر ۱۰۰ bp Plus (ساخت شرکت SinaClon، ایران) نیز استفاده شد.

تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS Inc. (SPSS 16، آمریکا) انجام شد. برای ارزیابی داده‌ها از آمار توصیفی استفاده شد.

و جنتامیسین (۱۰ میکرو گرم) و فلورو کینولون‌ها (سپروفلو کسازین ۵ میکرو گرم). ایزوله‌ها از محیط ذخیره، Q-lab آمریکا) کشت شده و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرمخانه-گذاری شدند. سپس یک کدورت استاندارد (نیم مک فارلند) در سرم فیزیولوژی از هر یک از ایزوله‌ها تهیه شد و پلیت‌های مولر هینتون آگار با کدورت استاندارد ایزوله‌ها توسط سواب‌های استریل تلقيق شدند. سپس دیسک‌های ضد میکروبی با فواصل حدوداً ۲۰ میلی متر روی محیط قرار داده شده و پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت گرمخانه-گذاری شدند. قطر هاله‌های عدم رشد در اطراف دیسک‌ها بر حسب میلی متر اندازه گیری شده و بر اساس استانداردهای ۲۰۱۷ CLSI به عنوان مقاوم، حساس و یا حد واسط طبقه‌بندی شدند.^(۱۳) کترول کیفی با استفاده از سودوموناس آنروزینوزا/سویه ATCC27853 انجام شد. سویه‌های MDR به عنوان سویه‌های غیر حساس به حداقل یک عامل در سه یا بیشتر از سه طبقه ضد میکروبی تعریف شدند.^(۱۴)

استخراج DNA و شناسایی ژن‌های مقاومت توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction، PCR) ژنومی از هر ایزوله سودوموناس آنروزینوزا توسط روش جوشاندن استخراج شد. به طور خلاصه، کشت‌های خالص شبانه از ایزوله‌ها در محیط تریپتیکیز سوی براث سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، بافر تریس-اتیلن دی آمین تراستیک اسید (Tris-ethylenediaminetetraacetic acid, TE) به رسوب اضافه شد. سوسپانسیون به دست آمده در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شده و سپس سانتریفیوژ شد. مایع رویی، جمع آوری شده و پس از ارزیابی کیفی روی ژل آگارز ۱٪ (ساخت شرکت SinaClon، ایران) و ارزیابی کمی توسط اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر و محاسبه نسبت

جدول ۱. پرایمرها و اندازه پیش بینی شده محصولات PCR

منع	دماي اتصال (درجه سانتي گراد)	اندازه محصول (جفت باز)	توالي پرایمر (۳'-۵' °)	ژن هدف
(۱۶)	۵۶	۵۹۳	ATGTGCAGYACCACTAARGT/ TGGGTRAARTARGTSACCAG	<i>bla_{CTX-M}</i>
(۱۷)	۵۶	۵۱۶	ATTCTCAGCCAGGATTG/ GATCGCAAAGGTTAGGTCA	<i>qnrA</i>
(۱۷)	۵۸	۴۶۹	GATCGTAAAGCCAGAAAGG/ ACGATGCCCTGGTAGTTGTCC	<i>qnrB</i>
(۱۷)	۵۶	۴۱۷	ACGACATTCTGTCAACTGCAA/ TAAATTGGCACCCGTAGGC	<i>qnrS</i>

* R: G/A, S: G/C, Y: C/T

یافته ها

از ۶۱ ایزوله، ۴۰ ایزوله (۶۵/۶٪) مقاوم به حداقل یک آنتی بیوتیک و ۲۰ ایزوله (۳۲/۸٪)، MDR بودند؛ همچنین ۲۱ ایزوله (۳۴/۴٪) به تمام آنتی بیوتیک ها حساس بودند. تعداد ۲۳ الگوی مقاومتی در ۶۱ ایزوله شناسایی شد (جدول ۲) که این الگوها از مقاومت به تنها یک آنتی بیوتیک تا مقاومت در برابر تمام آنتی بیوتیک ها متغیر بودند. از ۶۱ ایزوله، ۸ ایزوله به یک آنتی بیوتیک (۱۳/۱٪)، ۱۱ ایزوله به دو آنتی بیوتیک (۱۸٪)، ۳ ایزوله به ۳ آنتی بیوتیک (۴/۹٪)، ۵ ایزوله به ۴ آنتی بیوتیک (۱۱/۵٪)، ۳ ایزوله به ۵ آنتی بیوتیک (۴/۹٪)، ۲ ایزوله به ۶ آنتی بیوتیک (۳/۳٪)، ۴ ایزوله به ۷ آنتی بیوتیک (۶/۵٪) و ۲ ایزوله به ۸ آنتی بیوتیک (۳/۳٪) مقاوم بودند.

از آنجا که بسیاری از سویه های مقاوم به فلورو کینولون همچنین مقاومت به عوامل دیگر را نشان می دهند (۴٪)، فوتیپ MDR در ایزوله های مقاوم به سیپروفلوكسازین تعیین شد. از ۳۱ ایزوله مقاوم به سیپروفلوكسازین، ۱۹ ایزوله (۶۱/۳٪) MDR بودند، در حالی که در گروه ۳۰ ایزوله MDR حساس به سیپروفلوكسازین تنها یک ایزوله (۳٪) بود. فراوان ترین الگوی شناسایی شده در دو گروه، مقاومت به جنتامیسین تعیین شد (جدول ۲). مقاومت هم زمان به سه کلاس دارویی ضد سودوموناسی (بتالاکتام، آمینوگلیکوزید و فلورو کینولون) در ۱۸ (۵۸/۱٪) از ۳۱ ایزوله مقاوم به سیپروفلوكسازین یافت شد و ۲۱ (۷۰٪) از ۳۰ ایزوله حساس به سیپروفلوكسازین، به همه آنتی بیوتیک ها حساس بودند.

در مجموع، ۶۱ ایزوله سودوموناس آنروژنیوزا بین فروردین تا شهریور ۱۳۹۶ از نمونه های بالینی مختلف بیماران مراجعه کننده به دو بیمارستان توحید و بعثت در شهر ستندج در ایران جمع آوری شد. از ۶۱ ایزوله، ۱۴۵ ایزوله (۷۳/۸٪) از مردان و ۱۶ ایزوله (۲۶/۲٪) از زنان جمع آوری شدند. سه ایزوله از بیماران ۴/۹٪ از بیماران سرپایی جدا شده و بنابراین ۵۸ ایزوله از بیماران بستری در بخش های مختلف شامل بخش های مردان (n=۲۷)، زنان (n=۱۰)، اورژانس (n=۱۰)، Intensive Care Unit، واحدمراقبت ویژه (n=۷)، واحد مراقبت قلبی (n=۵)، واحد مراقبت (ICU) (n=۴)، سرطان (n=۱) و مغز و اعصاب (n=۱) جمع آوری شد. میانگین سن بیماران تقریباً ۵۵ سال بود و بیشترین تعداد بیماران در گروه سنی ۴۰ تا ۴۹ سال قرار داشتند (۱۶ از ۶۱ بیمار (۲۶٪)).

نتایج آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که از ۵۴ ایزوله (۸۸/۵٪) به مروپن حساس بودند. از ۶۱ ایزوله، ۵۲ ایزوله (۸۵/۲٪) به پیراسیلین، ۴۹ ایزوله به سفتازیدیم و آمیکاسین (۸۰/۳٪، هر کدام)، ۴۷ ایزوله به ایمی پنم (۷۷٪) و ۴۵ ایزوله به سفپیم (۷۳/۸٪) حساسیت نشان دادند. اثربخشی کمتر برای جنتامیسین و سیپروفلوكسازین با میزان حساسیت ۲۴٪ (۲۲ از ۶۱ ایزوله) و ۴۹٪ (۲۰ از ۳۰ ایزوله) به ترتیب مشاهده شد.

جدول ۲. الگوی مقاومت ضد میکروبی در ۶۱ ایزوله بالینی سودوموناس آنروژنیوزا

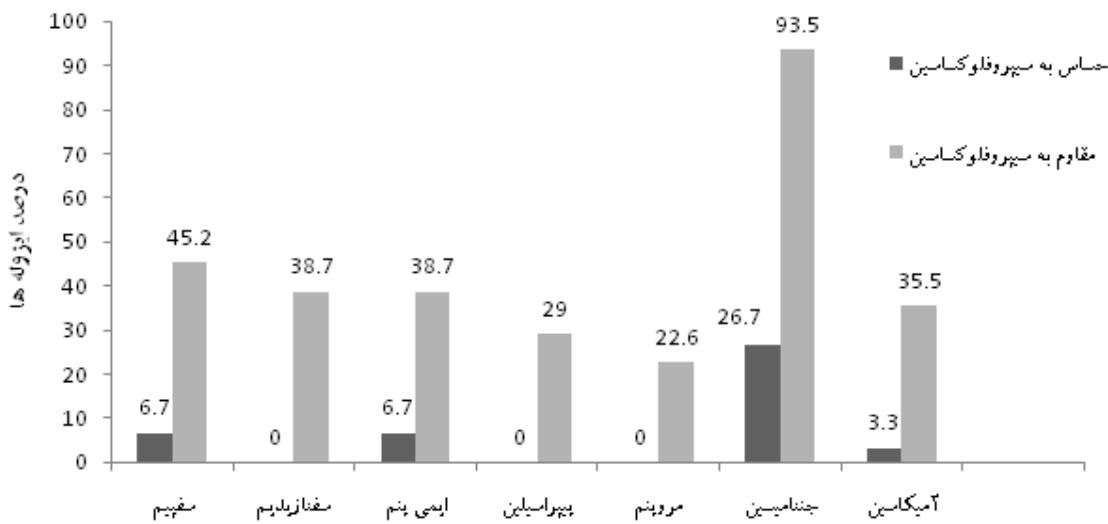
مقاومت به ^۱	در ایزوله های مقاوم به در تمام ایزوله ها (n=۶۱)	در ایزوله های حساس به فلورو کینولون سپرروفلو کساسین (n=۳۱)		در ایزوله های حساس به فلورو کینولون سپرروفلو کساسین (n=۳۰)
		فلورو کینولون	سپرروفلو کساسین	
PM	۱	.	.	۱
GM	۶	.	.	۶
CI	۱	۱	.	.
GM- CI	۱۰	۱۰	.	.
IP-GM	۱	.	.	۱
AN-GM- CI	۱	۱	.	.
GM-PI- CI (MDR) ^۲	۱	۱	.	.
PM-GM-CI (MDR)	۱	۱	.	.
AN- GM- PI-CI (MDR)	۱	۱	.	.
TZ- PM- GM- CI (MDR)	۲	۲	.	.
AN- IP- GM- CI (MDR)	۱	۱	.	.
TZ- PM- GM- CI (MDR)	۱	۱	.	.
PM- IP- MP- CI (MDR)	۱	۱	.	.
AN- PM- IP- GM (MDR)	۱	.	.	۱
AN-IP- MP- GM- CI (MDR)	۱	۱	.	.
TZ- PM- IP- GM- CI (MDR)	۱	۱	.	.
TZ- AN- PM- GM- CI (MDR)	۱	۱	.	.
TZ- AN- IP- GM- PI- CI (MDR)	۱	۱	.	.
TZ- AN- PM- IP- GM- CI (MDR)	۱	۱	.	.
TZ- PM- IP- MP- GM- PI- CI (MDR)	۲	۲	.	.
AN- PM- IP- MP- GM- PI- CI (MDR)	۱	۱	.	.
TZ- AN- PM- IP- GM- PI- CI (MDR)	۱	۱	.	.
TZ- AN- PM- IP- MP- GM- PI- CI (MDR)	۲	۲	.	.
حساس به همه	۲۱	.	.	۲۱

AN-۱: آمیکاسین؛ PM: سفیم؛ TZ: سفتازیدیم؛ CI: سپرروفلو کساسین؛ GM: جنتامیسین؛ IP: ایمی پنم؛ MP: مرپن؛ PI: پیراسیلین

MDR-۲: عدم حساسیت به حداقل یک عامل در سه یا بیش ترازه طبقه ضد میکروبی

فلورو کینولون سپرروفلو کساسین رخ داد (نمونه ۱). برای آمینو گلیکوزیدها، سویههای مقاوم به سپرروفلو کساسین، بیشترین مقاومت را به جنتامیسین (۹۳/۵٪) نشان دادند، در حالی که ۷/۲۶٪ از سویههای حساس به سپرروفلو کساسین، مقاوم به جنتامیسین بودند.

در میان عوامل بتلاکتم، سویههای مقاوم به فلورو کینولون سپرروفلو کساسین، بیشترین مقاومت متقاطع را به سفیم (۴۵/۲٪) نشان دادند که به دنبال آن سفتازیدیم و ایمی پنم (۳۸/۷٪، هر کدام) قرار گرفتند. در مقابل، مقاومت به یک عامل بتلاکتم میان ۷/۶٪ یا کمتر در سویههای حساس به



نمودار ۱. مقاومت ضد میکروبی در میان ایزولهای بالینی حساس و مقاوم به فلوروکینولون سپروفلوكسازین سودوموناس آنروژینوزا

عفونت‌های این باکتری شده است (۱). بر اساس نتایج ما، ایزولهای بررسی شده به طور کلی به بتالاکتام‌ها و آمینوگلیکوزیدها حساس بودند. نتایج مشابهی نیز در بررسی Badamchi و همکاران (سال ۲۰۱۷) بر روی ۸۴ ایزوله سودوموناس آنروژینوزای جدا شده از کودکان با عفونت ادراری در تهران به دست آمد (۱۸)، در حالی که در بررسی Kashfi و همکاران (سال ۲۰۱۷) که بر روی ۶۰ ایزوله سودوموناس آنروژینوزای جدا شده از زخم سوختگی در تهران انجام شد، بیش از ۷۰٪ ایزولهای به بتالاکتام و آمینوگلیکوزیدها مقاومت نشان دادند (۱۹). علی‌رغم حساسیت بالا به بتالاکتام‌ها و آمینوگلیکوزیدها، درصد نسبتاً بالایی از ایزولهای ما (۵۱٪) به فلوروکینولون سپروفلوكسازین مقاوم بودند. نتایج متفاوتی در مورد میزان مقاومت سویه‌های سودوموناس آنروژینوزا به سپروفلوكسازین در ایران گزارش شده است که این وضعیت می‌تواند به علت مصرف متفاوت منطقه‌ای فلوروکینولون‌ها باشد. در مطالعه Badamchi و همکاران (سال ۲۰۱۷) در تهران بر روی ایزولهای جدا شده از عفونت ادراری، میزان مقاومت ۲۷٪ به

آزمایش PCR نشان داد که سه ایزوله از ۶۱ ایزوله (۴٪) دارای عامل پلاسمیدی مقاومت به کینولون از نوع *qnrS* بودند و هر سه ایزوله از مردان بستری در بیمارستان بعثت به دست آمدند. یکی از ۳ سویه دارای *qnrS* از نمونه تراشه یک بیمار ۴۳ ساله بستری در بخش ICU جدا شد و در برابر تمام آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی مقاوم بود. دو ایزوله دیگر دارای *qnrS* از ادرار دو بیمار ۴۶ و ۶۵ ساله جدا شدند که هر دو در بخش مردان بستری بودند. یکی از ایزولهای فقط به آنتی بیوتیک‌های مروپن و پیپراسیلین حساس بود و دیگری به ایمی‌پن، مروپن، پیپراسیلین و آمیکاسین حساسیت نشان داد و به سایر آنتی بیوتیک‌ها مقاوم بود. ژن *bla_{CTX-M}* و دیگر ژن‌های PMQR بررسی شده یعنی *qnrA* و *qnrB* در هیچ ایزوله‌ای یافت نشدند.

بحث

سودوموناس آنروژینوزا یکی از شایع‌ترین بیماری‌ Zahāhāی گرم منفی است. از طرف دیگر، افزایش مقاومت ضد میکروبی باعث ایجاد نگرانی‌های جدی در درمان

تعداد ۱۱ ایزوله (۸/۴۵٪) دارای ژن *bla_{CTX-M}* بودند(۷). در بررسی ما، *CTX-M* در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از سنتدج شناسایی نشد که این امر دلیل بر این است که ممکن است، مقاومت از طریق سایر راهها به غیر از حضور *CTX-M* باشد. علاوه بر بتالاکتامها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولونها مؤثرترین عوامل بر علیه عفونت‌های سودوموناسی هستند. جذب خوراکی بالا و ویژگی‌های دارویی و اینمی مطلوب، فلوروکینولونها را یک عامل مناسب ضد سودوموناسی می‌کنند(۴)؛ اما با استفاده گستردۀ از این کلاس، مقاومت در برابر فلوروکینولون‌ها در سال‌های اخیر به فراوانی گزارش شده است(۱). مقاومت به فلوروکینولون‌ها ممکن است توسط ژن‌های پلاسمیدی از نوع *qnr* ایجاد شود. تاکنون، تعداد کمی از مطالعات، حضور *qnr* را در سودوموناس آئروژینوزا گزارش کرده‌اند. در مطالعه Molapour و همکاران (سال ۲۰۱۹)، بر روی ۱۴۹ سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از زخم سوختگی در تهران، هیچ ژن *qnr* یافت نشد(۲۳). در مطالعه Rajaei و همکاران (سال ۲۰۱۷)، از ۶۰ سویه سودوموناس *qnrA* آئروژینوزرا جدا شده از نمونه‌های بالینی در کرمان، در ۱۱/۷٪ ایزوله‌ها، *qnrB* در ۱۳/۳٪ و ژن *qnrS* در ۱۶/۷٪ ایزوله‌ها یافت شدند(۲۴). در کشور مصر Ali و همکاران (سال ۲۰۱۸)، *qnrA* را در ۳ ایزوله و *qnrS* را در ۴ ایزوله از ۹۲ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا شناسایی کردند(۲۵). در بررسی ما، اگرچه تنها ۳ ایزوله از ۶۱ ایزوله دارای *qnrS* بودند؛ اما شناسایی و وجود ژن‌های پلاسمیدی PMQR یک ویژگی مهم است، زیرا آن‌ها باعث تسهیل انتخاب مکانیسم‌های مقاومت سطح بالا شده و باعث می‌شوند که باکتری‌ها به تدریج کاملاً به فلوروکینولون‌ها مقاوم شوند(۱۱). با داشش ما، این اولین توصیف از حضور ژن‌های PMQR در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از کرستان است.

سپرروفلوکسازین(۱۸) و در مطالعه Khosravi و همکاران (سال ۲۰۱۷) در اهواز که در آن تقریباً ۷۰ درصد ایزوله‌ها از زخم جدا شده بود، ۹۳٪ ایزوله‌ها به سپرروفلوکسازین مقاوم بودند(۲۰). افزایش استفاده از فلوروکینولون‌ها هم در پژوهشی و هم در دامپزشکی ممکن است مسئول افزایش مقاومت در برابر این عوامل باشد. همچنین با توجه به تاثیر مقاومت به فلوروکینولون‌ها بر مقاومت به سایر داروهای ضد میکروبی، روند افزایش مقاومت به فلوروکینولون‌ها ممکن است منجر به وضعیت خطرناکی شود که در آن سویه‌های MDR انتخاب شده و افزایش یابند. در مطالعه ما، ۳۲/۸٪ ایزوله‌ها MDR بودند، در حالی که ۶۱/۳٪ ایزوله‌های مقاوم به سپرروفلوکسازین، MDR تعیین شدند. عفونت با ایزوله‌های MDR منجر به افزایش شدت بیماری و هزینه بیمارستان و محدود کردن انتخاب‌های درمانی شده که در نهایت می‌تواند درمان عفونت‌ها را پیچیده‌تر کند(۱). یکی از مکانیسم‌های ایجاد مقاومت ضد میکروبی در سودوموناس آئروژینوزا تولید ESBL ها است(۲). آنزیم‌های *CTX-M* در حال حاضر شایع‌ترین نوع ESBL در بسیاری از نقاط جهان می‌باشند(۸). ایزوله‌های *CTX-M* مثبت سودوموناس آئروژینوزا در مناطق مختلف ایران با میزان شیوع متفاوت گزارش شده‌اند. *bla_{CTX-M}* و همکاران (سال ۲۰۱۷) حضور ژن-*Peymani* را در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیمارستان-*M* را در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیمارستان-های تهران و قزوین بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که از ۲۶۶ ایزوله، ۱۳ ایزوله (۴/۹٪) دارای ژن *bla_{CTX-M}* بودند(۲۱). Farshadzadeh و همکاران (سال ۲۰۱۴) در اهواز، شیوع ژن *bla_{CTX-M}* را در سودوموناس آئروژینوزا بررسی کردند و از ۱۸۵ ایزوله جدا شده از زخم بیماران سوختگی، فقط یک ایزوله (۰/۵٪) دارای ژن *bla_{CTX-M}* بود(۲۲). در مطالعه دیگری از ایران که توسط Alan و همکاران (سال ۲۰۱۶) انجام شد، از ۲۴ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی در تهران،

آوری شدند، این مطالعه یافته‌های مهمی برای پزشکان دارد، زیرا موفقیت درمان تجربی عفونت سودوموناس آنروژینوزا بر پایه دانش و آگاهی از الگوهای منطقه‌ای حساسیت ضد میکروبی عامل بیماری‌زا است. از سوی دیگر، مقاومت به فلوروکینولون، نقش مهمی در ایجاد مقاومت به سمت دیگر عوامل ضد سودوموناسی دارد. این مشکل به دلیل تعداد محدود عوامل مؤثر بر ضد سودوموناس آنروژینوزا، پیچیده تر می‌شود. علاوه بر این، ما ظهور سودوموناس آنروژینوزایی را در کردستان توصیف کردیم. اگر چه میزان شیوع PMQR در مطالعه ما کم بود، با این حال درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط ایزوله‌های دارای ژن PMQR، به دلیل توانایی بالای آن‌ها برای انتقال ژنهای مقاومت بین گونه‌های مختلف پیچیده‌تر می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته میکروب‌شناسی بوده و با حمایت مالی شماره [IR.MUK.REC.1395.292] از دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنتندج، ایران انجام شده است. بدین‌وسیله از بخش میکروب‌شناسی آزمایشگاه بیمارستان‌های بعثت و توحید سپاگزاری به عمل می‌آید. کد اخلاق: این طرح توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کردستان با شماره IR.MUK.REC.1395.292 تصویب شده است.

در حال حاضر، با توجه به تعداد محدود داروهای ضد سودوموناسی، از دست رفتن تأثیر فلوروکینولون‌ها یک نگرانی مهم است. مهم‌تر از همه، سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون می‌توانند مقاومت متقطع را به دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دهند^(۱). از ۳۱ ایزوله مقاوم به سپروفلوكساسین در مطالعه ما، ۵/۹۳٪ دارای مقاومت متقطع به جنتامیسین، ۲/۴۵٪ به سفپیم، و ۷/۳۸٪ به سفتازیدیم و ایمی‌پنم (هر کدام) بودند. برخی محققان نیز مقاومت بالا نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها را در میان سودوموناس آنروژینوزای مقاوم به فلوروکینولون گزارش کرده‌اند^(۴۹). در مطالعه Hsu و همکاران (سال ۲۰۰۵)، سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون غالب به سفتازیدیم (٪۶۷)، سفپیم (٪۶۲)، جنتامیسین (٪۵۸) و ایمی‌پنم (٪۳۵) مقاومت متقطع نشان دادند^(۴). در مطالعه Neuhauser و همکاران (سال ۲۰۰۳)، سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون، بیشترین مقاومت متقطع را نسبت به جنتامیسین (٪۶۶)، سفتازیدیم (٪۳۹/۸) و ایمی‌پنم (٪۳۷) نشان دادند^(۹).

نتیجه‌گیری

مطالعه ما اطلاعات جدیدی را در مورد اپیدمیولوژی مولکولی مقاومت ضد میکروبی در میان ایزوله‌های بالینی سودوموناس آنروژینوزای جدا شده از کردستان در غرب ایران ارائه می‌کند. حدود نیمی از ایزوله‌های سودوموناس آنروژینوزا به سپروفلوكساسین مقاومت نشان دادند. با وجود اینکه ایزوله‌های بررسی شده، تنها از مناطق محدودی جمع

References

- Gasink LB, Fishman NO, Weiner MG, Nachamkin I, Bilker WB, Lautenbach E. Fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk factors and clinical impact. Am J Med. 2006;119:e19-e25.
- Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, Fusté E, Vinuesa T, Martínez J, Viñas M. Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents. 2011;38:398-402.
- World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017;27. Available from:

- <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
- 4.Hsu DI, Okamoto MP, Murthy R, Wong-Beringer A. Fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors for acquisition and impact on outcomes. J Antimicrob Chemother. 2005;55:535-41.
 - 5.Al Naiemi N, Duim B, Bart A. A CTX-M extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. J Med Microbiol. 2006;55:1607-8.
 - 6.Bokaeian M, Zahedani SS, Bajgiran MS, Moghaddam AA. Frequency of PER, VEB, SHV, TEM and CTX-M genes in resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* producing extended spectrum β -lactamases. Jundishapur J Microbiol. 2015;8: e13783.
 - 7.Alan TF, Goudarzi H, Fallah F, Hashemi A, Doustdar F, Bostan H. Detection of *bla*_{NDM}, *bla*_{DIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} and *bla*_{CTX-M-15} beta-lactamase genes among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains isolated from two hospitals of Tehran, Iran. Novel Biomed. 2016;4:153-8.
 - 8.Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rúbio FG, Nogueira ML, de Almeida MT, et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-5}, *bla*_{IMP-1} and *bla*_{SPM-1} causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. BMC Infect Dis. 2012;12:176.
 - 9.Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, Quinn JP. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. Jama. 2003;289:885-8.
 - 10.Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. The Lancet. 1998;351(9105):797-9.
 - 11.Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac* (6')-Ib-cr in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. J Antimicrob Chemother. 2008;61:1003-6.
 - 12.Tille P. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. 13nd ed. New York: Elsevier, 2015:336-43.
 13. Patel JB, Weinstein MP, Eliopoulos GM, Jenkins SG, Lewis JS, Limbago B, et al. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 27th edition (M100). Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017: 42-4.
 - 14.Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18:268-81.
 - 15.Khare P, Raj V, Chandra S, Agarwal S. Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. J Forensic Dent Sci. 2014;6:81-5.
 - 16.Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, et al. Multiple CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. J Clin Microbiol. 2003;41:4264-9.
 - 17.Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm D, Jacoby G, Hooper D. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:2872-4.
 - 18.Badamchi A, Masoumi H, Javadinia S, Asgarian R, Tabatabaei A. Molecular detection of six virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in children with urinary tract infection. Microb Pathog. 2017;107:44-7.

- 19.Kashfi M, Hashemi A, Eslami G, Amin MS, Tarashi S, Taki E. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. Arch Clin Infect Dis. 2017;12:e40896.
- 20.Khosravi AD, Motahar M, Montazeri EA. The frequency of class1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in a burn center of Ahvaz, Iran. PloS one. 2017;12:e0183061.
- 21.Peymani A, Naserpour-Farivar T, Zare E, Azarhoosh K. Distribution of *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, and *bla_{CTX-M}* genes among ESBL-producing *P. aeruginosa* isolated from Qazvin and Tehran hospitals, Iran. J Prev Med Hyg. 2017;58:E155-E160.
- 22.Farshadzadeh Z, Khosravi AD, Alavi SM, Parhizgari N, Hoveizavi H. Spread of extended-spectrum β-lactamase genes of *bla_{OXA-10}*, *bla_{PER-1}* and *bla_{CTX-M}* in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. Burns. 2014;40:1575-80.
- 23.Molapour A, Peymani A, Saffarin P, Habibollah-Pourzereshki N, Rashvand P. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Tehran, Iran. Infect Disord Drug Targets. 2019.
- 24.Rajaei S, Kazemi-Pour N, Rokhbakhsh-Zamin F. Frequency of plasmid-mediated quinolone resistance genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Kerman, Iran. Iran J Med Microbiol. 2017;11:10-18.
- 25.Ali SA, Hassan RM, Khairat SM, Salama AM. Plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* and *aac (6')-Ib* in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Microbiol Res J Int. 2018;1-12.