

Frequency and antimicrobial susceptibility patterns of bacterial agents isolated from wound infections of inpatients at a university hospital in Tehran

Atena Nemati¹, Ensieh Masoorian², Mohammadreza Rajabpour³, Amir Darb Emamie⁴, Mehdi Jafari⁵, Mohammad Reza Pourmand⁶

1- MSc, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-6861-4824

2- MSc, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-1788-336X

3- MSc, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0003-3395-5965

4- MSc, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-7701-5647

5- BSc, Sina Hospital, Tehran University of Medical sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-8187-8187

6- Professor, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (Corresponding author), Tel: +982142933087, Email: mpourmand@tums.ac.ir, ORCID ID: 0000-0003-1280-5765

ABSTRACT

Background and Aim: Wound infections, as a common nosocomial infection, are contributing factors to mortality. Determining the prevalence of common pathogens causing wound infections and their antibiotic susceptibility patterns plays a key role in the rapid treatment and prevention of such infections. This study aimed to analyze wound infections in hospitalized patients in a university hospital in Tehran and determine the antimicrobial susceptibility patterns of the isolated bacteria.

Materials and Methods: Data about 563 hospitalized patients from different wards of a university hospital, who had participated in the study from March 2017 to June 2019, were collected, and sample collection from the wounds was carried out. For the identification of pathogens, we used standard bacteriological techniques. The disk diffusion method was used to determine the antimicrobial susceptibility patterns of the isolates. Data were analyzed using SPSS 18.

Results: Among five hundred and sixty-three samples, 382 (67.7%) had positive cultures. The most common isolated pathogens were *Staphylococcus aureus* (19.2%), *Escherichia coli* (17.7%), *Acinetobacter* spp. (14%), *Pseudomonas aeruginosa* (13.6%) and *Klebsiella* spp. (12.9%). Fifty percent of the *Staphylococcus aureus* isolates were resistant to cefoxitin. *Escherichia coli* and *Acinetobacter* spp. were resistant to most of the antibiotics.

Conclusion: Our study found that pathogens causing wound infections were highly resistant to commonly prescribed antibiotics. Identifying the etiological agents of wound infection and their antibiotic susceptibility patterns is essential, especially for the treatment of elderly patients and those hospitalized in intensive care. This can assist in designing a therapeutic strategy for these types of infections.

Keywords: Bacterial Agents, Wound Infection, Antimicrobial Susceptibility, Nosocomial Infection

Received: Oct 3, 2019

Accepted: Sep 11, 2020

How to cite the article: Atena Nemati, Ensieh Masoorian, Mohammadreza Rajabpour, Amir Darb Emamie, Mehdi Jafari, Mohammad Reza Pourmand. Frequency and antimicrobial susceptibility patterns of bacterial agents isolated from wound infections of inpatients at a university hospital in Tehran. SJKU. 2021;25(3):71-84.

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 (CCBYNC), 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

بررسی شیوع و تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی عوامل باکتریایی عفونت های زخم

جدا شده از بیماران بستری یک بیمارستان دانشگاهی در شهر تهران

آتنا نعمتی^۱، انسیه ماسوریان^۲، محمدرضا رجب پور^۳، امیر درب امامیه^۴، مهدی جعفری^۵، محمدرضا پورمند^۶

۱. کارشناس ارشد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۶۸۶۱-۴۸۲۴

۲. کارشناس ارشد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۱۷۸۸-۳۳۶۸

۳. کارشناس ارشد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۳۳۹۵-۵۹۶۵

۴. کارشناس ارشد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۷۷۰۱-۵۶۴۷

۵. کارشناس ارشد، بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۸۱۸۷-۸۱۸۷

۶. استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. پست الکترونیک: mpourmand@tums.ac.ir، تلفن: ۰۲۱-۴۲۹۳۳۰۸۷، کد

ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۱۲۸۰-۵۷۶۵

چکیده

زمینه و هدف: عفونت زخم به عنوان یک عفونت بیمارستانی شایع، عامل مهمی در مرگ و میر بیماران محسوب می شود. تعیین فراوانی پاتوژن های شایع ایجاد کننده عفونت و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی آنها نقش مهمی در پیشگیری و درمان سریع این عفونت ها دارد. این مطالعه به منظور بررسی عفونت های زخم در بیماران بستری در بیمارستان دانشگاهی شهر تهران و تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری های جدا شده اجرا گردید.

مواد و روش ها: جمع آوری اطلاعات و نمونه گیری از ۵۶۳ بیمار بستری در بخش های مختلف یکی از بیمارستان های تهران در بازه ی زمانی فروردین ۱۳۹۶ تا خرداد ۱۳۹۸ انجام شد. شناسایی پاتوژن ها با استفاده از روش های رایج باکتری شناسی صورت گرفت. تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن انجام شد. اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS18 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: از ۵۳۶ نمونه، ۳۸۲ مورد (۶۷/۸٪) دارای کشت مثبت بودند. شایع ترین باکتری های جدا شده به ترتیب *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۹/۲٪)، *شریشیا کلی* (۱۷/۷٪)، گونه های *آسینتوباکتر* (۱۴٪)، *پسودوموناس آئروژینوزا* (۱۳/۶٪) و *کلبسیلا* (۱۲/۹٪) بودند. همچنین در نیمی از ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاومت به سفوکسیتین مشاهده شد. ایزوله های *آسینتوباکتر* و *شریشیا کلی* به اغلب آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند.

نتیجه گیری: پاتوژن های عامل عفونت زخم به اغلب آنتی بیوتیک های رایج تجویزی مقاومت قابل توجهی نشان می دهند. تعیین عامل عفونت زخم و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی آن در بیماران سالمند و بستری در I.C.U. حائز اهمیت می باشد. این رویکرد در تدوین راهبرد درمانی این نوع از عفونت ها بسیار مهم است.

کلمات کلیدی: عوامل باکتریایی، عفونت زخم، حساسیت آنتی بیوتیکی، عفونت بیمارستانی

وصول مقاله: ۹۸/۷/۱۱ اصلاحیه نهایی: ۹۹/۶/۵ پذیرش: ۹۹/۶/۲۱

مقدمه

عفونت زخم یکی از شایع‌ترین عفونت بیمارستانی است که با وجود کوشش‌های فراوان در جهت جلوگیری از بروز آن‌ها، هنوز هم به عنوان یکی از مهمترین مشکلات بعد از عمل جراحی و همچنین در بیمارانی که به مدت طولانی در بیمارستان بستری می‌شوند، می‌باشد (۱، ۲). این عفونت‌ها در آمریکا هر ساله حدود یک میلیون نفر را گرفتار می‌کند (۳) و حدود ۱۵ درصد از عفونت‌های بیمارستانی را در کشورهای در حال توسعه به خود اختصاص می‌دهد که منجر به افزایش طول اقامت در بیمارستان، افزایش هزینه‌ها و به خطر افتادن سلامت بیماران می‌شود. زخم‌ها را معمولاً به سه گروه زخم‌های تمیز، نیمه آلوده و آلوده تقسیم بندی می‌کنند. برخی منابع نیز گروه دیگری به نام زخم‌های عفونی را به این دسته بندی اضافه می‌کنند. عفونت زخم‌ها در حال حاضر از شایع‌ترین عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان‌ها هستند. میزان عفونت بر حسب میزان آلودگی محل عمل و نوع بیماری متفاوت است. تجویز آنتی بیوتیک پیش از عمل جراحی معمول می‌باشد که بر این اساس میزان عفونت برای زخم‌های تمیز، نیمه آلوده و آلوده به ترتیب: ۰/۸، ۱/۳ و ۱۰/۲ در هر یکصد بیمار گزارش شده است (۴). برای تشخیص عفونت زخم بر طبق تعریف National Nosocomial Surveillance (۵) حداقل یکی از شاخصه‌های زیر باید وجود داشته باشد: الف) ترشح چرکی (کشت مثبت ضروری نیست)، ب) کشت مثبت از ترشحات زخم، ج) وجود حداقل یکی از علائم التهاب شامل درد یا حساسیت، اریتم و گرمی موضعی زخم و د) جراح یا پزشک مسئول، عفونت را تشخیص دهد. در واقع تشخیص زخم بر اساس یافته‌های کلینیکی است و معمولاً علائم بین روز هفتم تا دهم پس از عمل ظاهر می‌شوند اگرچه ممکن است این زمان بین ۲۴ ساعت تا دو هفته متغیر باشد (۶، ۷). عفونت زخم مشکلی پیچیده می‌باشد که همواره از اهمیت زیادی برخوردار بوده است. عفونت محل عمل، خطر بالقوه‌ای است که تمام بیمارانی را که به هر دلیلی تحت

عمل جراحی قرار می‌گیرند را تهدید می‌کند. این نوع عفونت‌ها، پس از عفونت ادراری به عنوان شایع‌ترین عفونت بیمارستانی مطرح بوده و می‌تواند مشکلات زیادی را نظیر افزایش زمان بستری، افزایش هزینه‌ها برای بیمار و بیمارستان و حتی نتیجه درمان را تحت تاثیر قرار دهند (۸). تنوع وضعیت بهداشتی و الگوهای کنترل عفونت‌های بیمارستانی در کشورهای مختلف سبب غالب شدن سویه‌های مقاوم به درمان‌های آنتی بیوتیکی در بیمارستان‌های مختلف شده است. زخم‌های مزمن به دلیل آلودگی چند میکروبی، وجود قارچ‌ها و تشکیل بیوفیلم در محل زخم به آنتی بیوتیک‌های رایج پاسخ نمی‌دهند (۱۰). مطالعات نشان می‌دهند که در ۷۸/۲٪ از زخم‌های مزمن، بیوفیلم باکتریایی تشکیل می‌شود (۱۱). بنابراین درمان این عفونت‌ها مشکل است و زخم‌های درمان نشده می‌توانند به شکل عفونت‌های مزمن و حتی تهدید کننده حیات تبدیل شوند (۱۱، ۱۲). پاتوژن‌های مختلفی در عفونت‌های زخم دخیل هستند. در اغلب مطالعات *استافیلوکوکوس اورئوس*، خصوصاً *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) به عنوان شایع‌ترین عامل عفونت‌های زخم شناخته می‌شوند (۱۲). در میان باکتری‌های گرم منفی، *پسودوموناس آئروژینوزا* به عنوان شایع‌ترین عامل شناخته می‌شود ولی این مورد در مطالعات مختلف انجام شده در سطح جهان، متفاوت است. به عنوان مثال در مطالعه انجام شده در سنگاپور باکتری آسینتوباکتر شیوع بالاتری نسبت به سایر میکروارگانیسم‌های گرم منفی داشت (۱۳). به دلیل تجویز بی‌رویه و غیرضروری آنتی بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های بیمارستانی، اغلب پاتوژن‌های دخیل در این گونه عفونت‌ها، در مقابل آنتی بیوتیک‌ها و عوامل ضد میکروبی، مقاومت قابل توجهی پیدا کرده‌اند (۱۴) به طوری که ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به سفوکسیتین مقاومت نشان می‌دهند. در مورد باکتری دیگری مانند آسینتوباکتر نیز مقاومت نسبت به جنتامایسین، ای‌می‌پنم و

مروپنم گزارش شده است (۱۵). مطالعات در کشور ما نشان داده است که عامل اغلب عفونت های زخم، سویه های با مقاومت چند دارویی است. در ایران بیش از ۸۰ درصد جدایه های بدست آمده از عفونت های زخم دارای فنوتیپ مقاومت چنددارویی بودند. درصد قابل توجهی از جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس MRSA می باشند و سطح بالایی از مقاومت به ایمی پنم در باکتری *آسیتوباکتر بومانی* و *پسودوموناس آئروژینوزا* دیده می شود. همچنین انتروکوکوس مقاوم به ونکومايسين نیز در زخم ها شیوع چشمگیری دارد (۱۵).

با توجه به مطالب ذکر شده، عفونت زخم از مهم ترین و شایع ترین عفونت های بیمارستانی است و بررسی عوامل ایجاد کننده عفونت و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی آن ها نقش بسزایی در درمان مناسب و جلوگیری از گسترش اینگونه عفونت ها دارد. از آنجایی که شناسایی عوامل باکتریایی نقش بسزایی در کنترل عفونت و تعیین راهکارهای مناسب درمانی در بخش های مختلف بیمارستان و کمک به متخصصین در تجویز آنتی بیوتیک و کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی دارد، بر آن شدیم که مطالعه ای در زمینه شناسایی باکتری های عامل عفونت های زخم در یک بیمارستان دانشگاهی شهر تهران انجام دهیم. ضمناً الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی این باکتری ها تعیین گردید.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها:

مطالعه ای حاضر از نوع مقطعی- توصیفی بود. در بازه ی زمانی فروردین ۱۳۹۶ تا خرداد ۱۳۹۸ از ۵۶۳ بیمار بستری در بخش های مختلف بیمارستان دانشگاهی واقع در مرکز تهران نمونه گیری انجام شد. این مطالعه با تاییدیه ی کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران (IR.TUMS.SPH.REC.1396.3203) صورت پذیرفت. به دلیل محدودیت های مطرح شده توسط کمیته اخلاق امکان ذکر نام بیمارستان در متن این مطالعه امکان

پذیر نیست. براساس تعریف کلونیزاسیون که به معنای رشد و تکثیر عامل عفونی (میکروارگانسم) در میزبان بدون ایجاد عفونت می باشد. برای جلوگیری از کلونیزه شدن باکتری ها در محل زخم، تمامی این بیماران با تشخیص پزشک معالج مشکوک به عفونت زخم بودند و نمونه گیری از زخم یا ترشحات عمقی انجام شد. قبل از نمونه گیری، شست و شو محل زخم با استفاده از آب و صابون صورت گرفت. پس از دریدمان ناحیه مورد نظر، شست و شو با نرمالین سالین ۰/۹٪ انجام شد. نمونه گیری از مرکز زخم، به وسیله سواب استریل با چرخاندن و با فشار کافی انجام گردید. برای کاهش احتمال آلودگی، از هر زخم همزمان دو سواب گرفته شد و سواب ها بلافاصله در داخل سرم فیزیولوژی استریل به آزمایشگاه میکروب شناسی بیمارستان انتقال و کشت داده شد. همچنین اطلاعات دموگرافیک بیماران نیز ثبت گردید. تمامی نمونه ها پس از انتقال به آزمایشگاه تشخیص طبی بیمارستان، کشت در محیط کشت پایه بلاد آگار و محیط کشت انتخابی- افتراقی Eosin Methylene Blue (EMB) و مک کانکی (Merck, Germany) تلقیح شدند و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد، از نظر وجود کلنی مورد بررسی قرار گرفتند (۱۶).

تعیین هویت باکتری ها:

از تمامی پلیت های دارای کلنی مشکوک، اسمیر تهیه و به روش گرم رنگ آمیزی گردید. ایزوله ها با استفاده از مورفولوژی کلنی ها، تولید رنگدانه در *پسودوموناس آئروژینوزا*، رنگ آمیزی گرم و تست های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. برای شناسایی گونه های استافیلوکوکوس از تست های کاتالاز، کوآگولاز، مانیتول سالت آگار، DNAase و همچنین حساسیت به باسیتراسین و نوویوسین استفاده شد. در شناسایی انتروکوک ها از روش های بررسی همولیز و لیز گلوبول قرمز در اطراف کلنی باکتری، تحمل NaCl ۶/۵٪، بایل اسکولین، پیرولیدونیل آریل آمیداز و کاتالاز استفاده شد. برای افتراق در خانواده انتروباکتریاسیه تست های مصرف گلوکز، لاکتوز و لایزین، سیمون

(Clinical Laboratory Standards Institute-2019)

انجام شد (۱۸).

بررسی آماری:

در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (IBM, USA) نسخه ۱۸ و همچنین نرم افزار اکسل ۲۰۱۶ (Microsoft Office Excel, 2016) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. میانگین داده‌ها، درصد فراوانی و رسم نمودارها با استفاده از این دو نرم افزار انجام شد.

یافته‌ها

از آن جایی که تمایز بین کلونیزاسیون و عفونت در نمونه های بدست آمده از بیماران بستری اهمیت فراوانی دارد، خصوصیات بالینی بیماران با مشورت با متخصص عفونی و روش استاندارد نمونه گیری از زخم مورد توجه قرار گرفت. در واقع تنها بیمارانی که بنابر تشخیص پزشک متخصص دارای عفونت زخم تشخیص داده می شدند و نتایج آزمایش از کشت زخم آنها بعد از تکرار بیانگر وجود عفونت زخم باکتریایی بود وارد مطالعه شدند. در این مطالعه در مجموع تعداد ۵۶۳ نمونه زخم در آزمایشگاه بیمارستان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران مورد بررسی قرار گرفت. از این بین تعداد ۳۸۱ نمونه (۶۷/۷٪) از نظر کشت نمونه‌ها بر روی محیط های انتخابی مثبت بودند. تعداد ۳۸۲ (۶۷/۸٪) نمونه از مردان و ۱۸۱ (۳۲/۲٪) نمونه از زنان جمع آوری شد. بیشترین تعداد نمونه مربوط به نمونه های زخم بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه (I.C.U) با فراوانی ۱۴/۸٪ می باشد. در این مطالعه، تعداد ۳۵ (۶/۳٪) نمونه‌ها از اندام‌های سر و گردن، ۲۰۷ (۳۶/۷٪) از اندام‌های فوقانی و همچنین ۳۲۱ (۵۷٪) از نمونه‌ها از اندام‌های تحتانی بیماران جمع آوری گردید. در میان باکتری‌های جدا شده از کشت زخم، استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین فراوانی را داشت (۱۹/۲٪). فراوانی باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های کشت زخم در شکل ۱ نشان داده شده است. همچنین جدول ۱

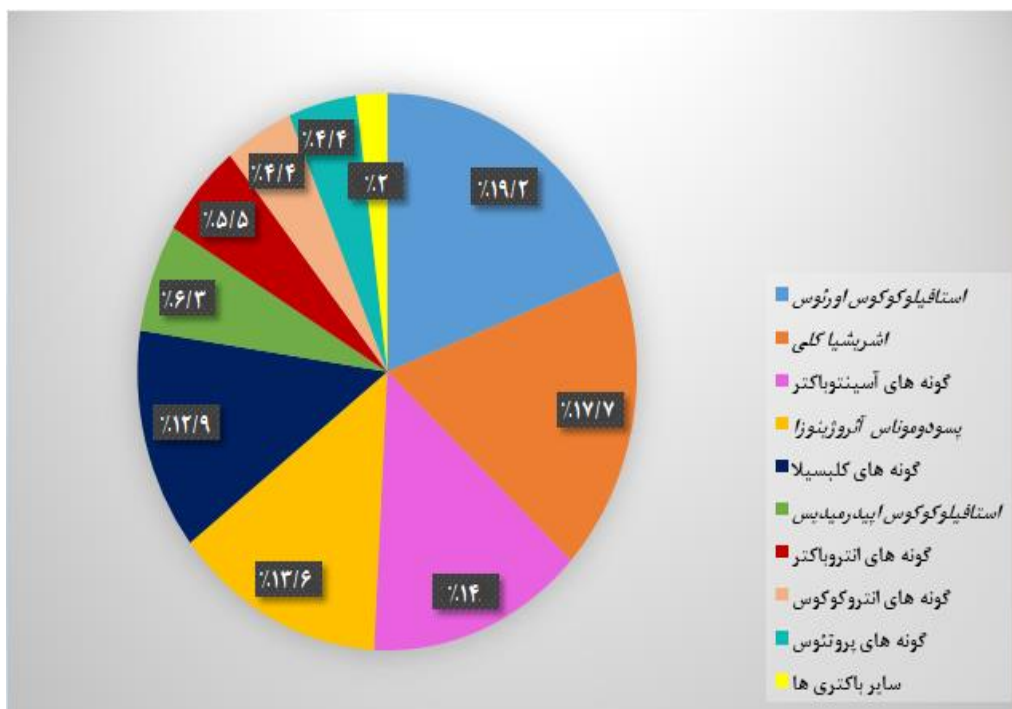
سیترات، وجود حرکت، تجزیه اوره، تولید اندول، تولید H_2S ، متیل رد و وژ پروسکوئر مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی باکتری‌های غیر تخمیری نیز با کمک تست های مصرف لاکتوز و گلوکز در محیط Triple Sugar Iron Agar (Merck, Germany)، اکسیداز، حرکت، تولید رنگدانه و DNAase صورت گرفت. تمامی موارد فوق الذکر بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه مورد بررسی قرار گرفتند (۱۷).

تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی:

برای بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها از روش کربی بائر (Kirby-Bauer) استفاده شد. در این روش ابتدا سوسپانسیونی با غلظت نیم مک فارلند تهیه و سپس با سواب از سوسپانسیون بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت متراکم داده شد. در مرحله‌ی بعد دیسک‌های مورد نظر روی پلیت قرار داده شد و پس از زمان انکوباسیون کافی در ۳۷ درجه سانتی گراد قطر هاله‌ی عدم رشد قرائت گردید. بمنظور انجام آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های گرم مثبت از دیسک‌های آنتی بیوتیکی (واحد در هر دیسک) استفاده شد: تری متوپریم-سولفامتوکسازول ($1.25-23.75 \mu g$)، کلیندامایسین ($2 \mu g$)، داکسی سایکلین ($30 \mu g$)، سفازولین ($30 \mu g$)، سفوکسیتین ($30 \mu g$)، اریترومایسین ($15 \mu g$) و آمپی سیلین ($10 \mu g$). همچنین دیسک‌های آنتی بیوتیکی مورد استفاده در باکتری‌های گرم منفی عبارتند از: تری متوپریم-سولفامتوکسازول ($1.25-23.75 \mu g$)، جنتامایسین ($10 \mu g$)، پیراسیلین ($100 \mu g$)، آمیکاسین ($30 \mu g$)، سیپروفلوکساسین ($5 \mu g$)، سفتریاکسون ($30 \mu g$)، سفتازیدیم ($30 \mu g$) و ایمپنم ($10 \mu g$). دیسک‌های آنتی بیوتیکی مورد استفاده از شرکت روسکو (Rosco Laboratories Inc, USA) تهیه شدند. انتخاب دیسک‌ها و تفسیر نتایج حاصل متناسب با هر باکتری و براساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاه و بالین-۲۰۱۹

میزان فراوانی باکتری‌ها بر اساس سن، جنس و بخشی که بیشترین آلودگی را داشته، نشان داده است. میانگین سنی

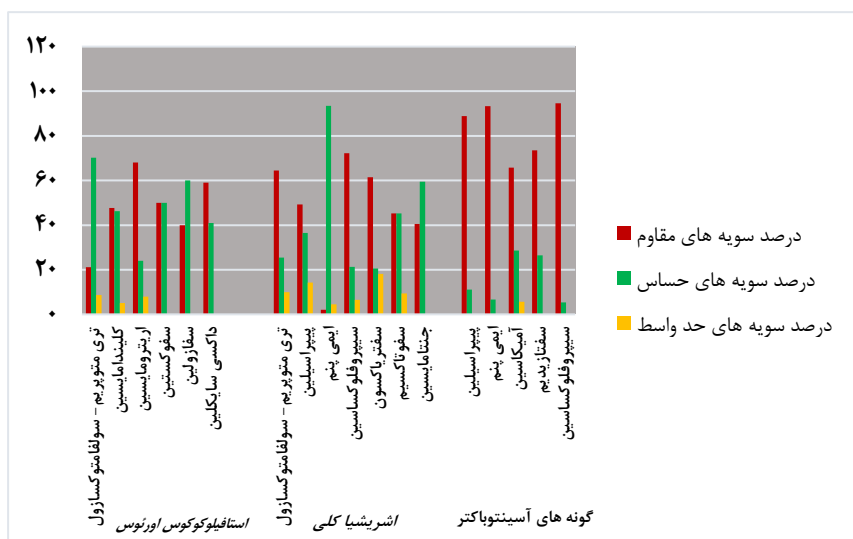
افراد مورد مطالعه $16 \pm 52/2$ با محدوده ۸۹-۱۵ سال بود.



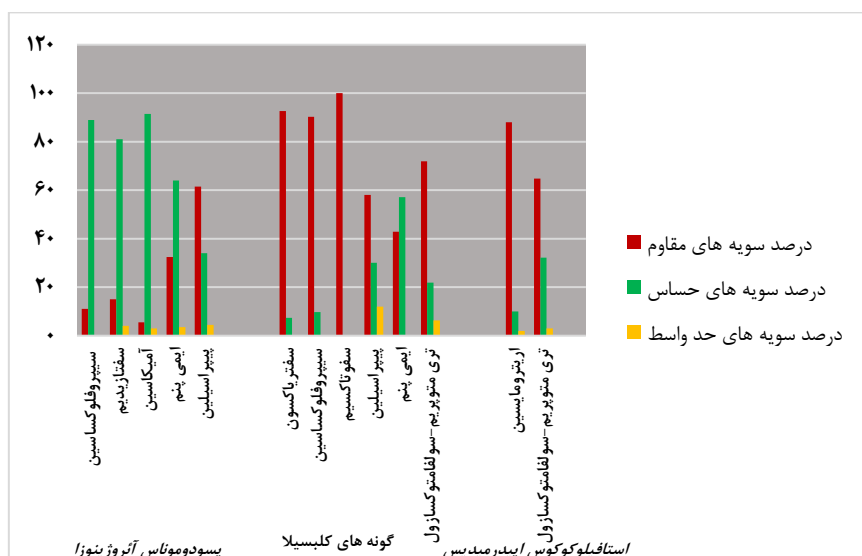
شکل ۱: درصد و توزیع فراوانی باکتری‌های جدا شده از کشت زخم

در این مطالعه، ۵۰٪ از ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس به سفوکستین مقاوم بودند. بیشتر ایزوله‌های جنس آسینتوباکتر به آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی مقاوم بوده است. بیش از ۹۰٪ از ایزوله‌های اشریشیا کلی به ایمی‌پنم حساس و بیش از ۷۰٪ از آنها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (شکل ۲). ۶۱/۵٪ از ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا نسبت به پیراسیلین مقاوم و ۶۴٪ از آنها به ایمی‌پنم حساس بودند.

ایزوله‌های کلبسیلا مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون (۹۲/۶٪) و سیپروفلوکساسین (۹۰/۳٪) نشان دادند (شکل ۳). انتروباکتر به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی مانند ایمی‌پنم (۹۲/۳٪) حساس بود. میزان حساسیت ایزوله‌های جنس انتروکوکوس نسبت به آمپی‌سیلین ۱۰۰٪ بوده و جنس پروتئوس نسبت به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی حساسیت قابل توجهی از خود نشان داد (شکل ۴).



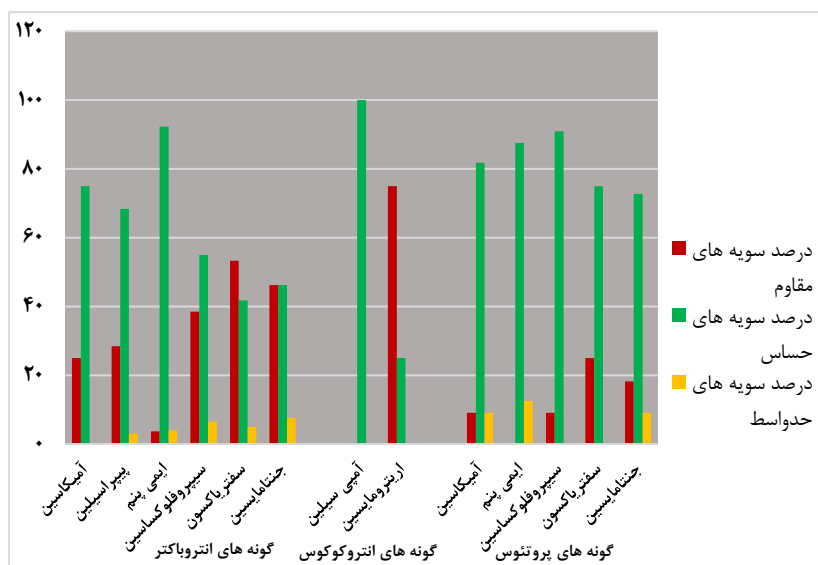
شکل ۲: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس، اشیریشیا کلی و گونه های آسیتو باکتر



شکل ۳: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های پسودوموناس آنروژینوزا، گونه های کلبسیلا و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

جدول ۱: توزیع فراوانی ۳۲۴ باکتری جدا شده از کشت زخم بر اساس جنسیت، سن و بیشترین میزان جداسازی بر حسب بخش بیمارستان

نوع باکتری و میزان جداسازی (%)	توزیع فراوانی بر حسب جنسیت		توزیع فراوانی باکتری بر اساس گروه بندی سنی			بیشترین میزان جداسازی باکتری بر حسب بخش بیمارستان (%)
	مرد (%)	زن (%)	<۲۰ (%)	۲۰-۵۰ (%)	>۵۰ (%)	
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> (۱۹/۲)	۶۵/۴	۳۴/۶	۰	۴۶/۲	۵۳/۸	اورژانس (۱۷/۳)
<i>اشریشیا کلی</i> (۱۷/۷)	۶۰/۴	۳۹/۶	۰	۳۱/۳	۶۸/۸	داخلی مردان (۲۷/۱)
گونه های آسیتوباکتر (۱۴)	۶۸/۴	۳۱/۶	۲/۶	۴۴/۷	۵۲/۶	مراقبت های ویژه (۲۱/۱)
<i>پسودوموناس آئروژینوزا</i> (۱۳/۶)	۶۲/۲	۳۷/۸	۰	۵۴/۱	۴۵/۹	مراقبت های ویژه (۱۸/۹)
گونه های کلبسیلا (۱۲/۹)	۷۴/۳	۲۵/۷	۲/۹	۳۷/۱	۶۰	اورژانس (۲۰)
<i>استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس</i> (۶/۳)	۷۰/۶	۲۹/۴	۵/۹	۳۵/۳	۵۸/۸	داخلی زنان (۱۷/۶)
گونه های انتروباکتر (۵/۵)	۸۰	۲۰	۱۳/۳	۳۳/۳	۵۳/۳	قلب و عروق (۲۰)
گونه های انتروکوکوس (۴/۴)	۷۵	۲۵	۰	۲۵	۷۵	جراحی عمومی (۲۵)
گونه های پروتئوس (۴/۴)	۶۶/۷	۳۳/۳	۰	۴۱/۷	۵۸/۳	مراقبت های ویژه (۲۵)



شکل ۴: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های گونه های انتروباکتر، انتروکوکوس و پروتئوس

بحث

مرگ و میر ناشی از عفونت های زخم چالشی مهم در زمینه ی سلامت است. همچنین افزایش مقاومت آنتی-بیوتیکی، افزایش هزینه های درمانی و افزایش مدت بستری در بیمارستان، لزوم مطالعات مستمر در این زمینه را در هر جامعه نشان می دهد. در این مطالعه میانگین سن بیماران ۵۲ سال بود و به جز در مورد عفونت با *پسودوموناس آئروژینوزا* در سایر موارد اکثریت بیماران را افراد بالای ۵۰ سال تشکیل می دادند. این مسئله قابل پیش بینی بود زیرا با افزایش سن بیماران و تضعیف سیستم ایمنی شانس ابتلا به بیماری های زمینه ایی بیشتر می شود که این موضوع می تواند در ایجاد عفونت نقش داشته باشد. در مطالعه Sherafat و همکاران میانگین سن بیماران بستری دچار عفونت بیمارستانی ۵۲ سال بود (۱۹). در مطالعات انجام شده در سایر کشورهای جهان نیز افراد بالای ۵۰ سال به عفونت زخم مستعدتر بودند. در مطالعه ی Wong و همکاران که سال ۲۰۱۴ در مالزی انجام شد میانگین سن مبتلایان ۵۱ سال

بود (۲۰). از بین بخشهای مختلف بیمارستان، بخش مراقبت های ویژه (۱۴/۸٪) بالاترین میزان عفونت زخم را دارا بود. در این بیماران به علت نوع بیماری که با سرکوب سیستم ایمنی همراه است شانس ابتلا به عفونت های بیمارستانی به مراتب بالاتر می رود. مطالعه-ی Ebrahimzadeh و همکاران که به بررسی عفونت های بیمارستانی در بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه می پردازد نشان می دهد که بعد از عفونت های تنفسی که رتبه ی اول را دارا است، عفونت های زخم در رتبه ی دوم، بیش از ۴۰٪ عفونت های بیمارستانی را در بخش مراقبت-های ویژه تشکیل می دهند (۲۱). از آنجایی که میزان مصرف آنتی بیوتیک های وسیع الطیف در بخش های مراقبت های ویژه بالا است، امکان ظهور سویه های مقاوم نیز افزایش می یابد و این سویه ها می توانند در این بخش در گردش شوند، لذا رعایت دقیق موازین بهداشتی در محیط بویژه شست و شوی دست ها در پرسنل در کاهش این

عفونت‌ها نقش بسزایی دارد (۲۲). باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* با فراوانی ۱۹/۲٪ بیشترین شیوع را داشت و *اشریشیا کلی*، *آسینتوباکتر* و *پسودوموناس آئروژینوزا* در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. Ahmadi و همکاران در سال ۱۳۹۵ در بیمارستان بقیه الله تهران به بررسی عوامل عفونت‌های زخم پرداخت و مشابه مطالعه حاضر شایع‌ترین باکتری جدا شده *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. در این مطالعه *انتروکوکوس* با شیوع بسیار چشمگیری در رتبه دوم قرار گرفت که فراوانی باکتری اخیر با یافته‌های مطالعه ما تفاوت داشت (۲۳). در بررسی عفونت‌های بیماران بستری در بخش I.C.U که در بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد، *پسودوموناس آئروژینوزا* و *آسینتوباکتر* به عنوان شایع‌ترین باکتری‌ها گزارش شدند (۱۹). در مطالعه مشابهی که در کشور ایتالیا صورت گرفت نیز *استافیلوکوکوس اورئوس* شایع‌ترین باکتری جدا شده بود (۲۴) ولی در مطالعه Omoyibo و همکاران که در سال ۲۰۱۸ در کشور آفریقایی نیجریه انجام گرفت، *پسودوموناس آئروژینوزا* به عنوان شایع‌ترین باکتری شناسایی شد (۲۴، ۲۵). تفاوت در نوع میکروارگانیسم و درصد شیوع در مطالعات مختلف به این علت است که ارگانیسم‌های هر منطقه جغرافیایی و هر بیمارستان مختص به همان مکان بوده و به عوامل محیطی مانند سطح بهداشت منطقه و در هر بیمارستان به بخش‌های بیمارستان، تعداد پذیرش بیمار، تعداد کارکنان درمانی و غیره بستگی دارد. دیگر نکته مهم در این زمینه محل و نوع زخم‌های مورد بررسی می‌باشد. به عنوان مثال در مطالعه Jafari و همکاران که در سال ۱۳۹۱ در اصفهان انجام شده است، در میان ایزوله‌های جدا شده از زخم‌های سوختگی، همان‌طور که پیش‌بینی می‌شد *پسودوموناس آئروژینوزا* فراوانی بالاتری نسبت به سایر باکتری‌ها داشت (۱۵). در بررسی عفونت زخم پای دیابتی که در بیمارستان نمازی شیراز صورت گرفت نیز گونه‌های جنس‌های *استافیلوکوکوس* و *انتروکوکوس* بالاترین فراوانی را دارا بودند (۲۶). در این مطالعه نیمی از سویه‌های

استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی مقاومت به سفوکسیتین را نشان دادند، به این معنا که ۵۰٪ ایزوله‌ها MRSA بودند (۲۶). گزارش‌های ارائه شده از فراوانی MRSA در مطالعات مختلف ایران تفاوت چشمگیری را نشان می‌دهد. در مطالعه‌ی Goudarzi و همکاران که در سال ۲۰۱۹ به بررسی این باکتری در عفونت‌های بیمارستانی می‌پردازد شیوع ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین ۷۰/۸٪ اعلام شده است (۲۷). در بررسی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در بخش I.C.U بیمارستان لقمان، مشابه با مطالعه حاضر در حدود ۵۰ درصد از ایزوله‌ها مقاومت به متی‌سیلین را نشان دادند (۳۹). Dormanesh و همکاران در سال ۲۰۱۵ در یک بررسی جامع عفونت‌های بیمارستانی در اطفال را مورد بررسی قرار دادند که در این میان، ۲۹٪ از تمامی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، MRSA بودند (۲۹). حساسیت ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به ونکومايسين در این مطالعه سنجیده نشد. اصولاً مقاومت به ونکومايسين در اغلب نقاط جهان از جمله کشور ما بسیار نادر است در مطالعه Shekarabi و همکاران که به بررسی ۱۷۸۹ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* پرداختند تنها ۴ ایزوله مقاوم به ونکومايسين شناسایی شد (۳۰). مقاومت به کینولون‌ها از مسائل نگران‌کننده در مورد عفونت‌های اشریشیا کلی است. در مطالعه حاضر نیز ۷۲٪ از جدایه‌ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و ۶/۵٪ نیز مقاومت حد واسط را نشان دادند. میزان مقاومت به کینولون‌ها بستگی به جمعیت مورد مطالعه دارد برای مثال عفونت‌های بیمارستانی معمولاً مقاومت بالاتری به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دهند. در مطالعه Esfahani و همکاران که در زمینه عفونت‌های بیمارستانی انجام گردیده است بیش از ۵۰٪ از جدایه‌ها به کینولون‌ها مقاوم بودند ولی در مطالعه دیگری که به بررسی عفونت‌های ادراری ناشی از *اشریشیا کلی* پرداخته است در حدود ۷۸٪ از ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین حساس بودند (۳۱، ۳۲). در مطالعه حاضر سطح پایینی از مقاومت به ای‌می‌پنم در اشریشیا کلی مشاهده شد در حالی که گزارش مقاومت به کارباپنم‌ها در این باکتری بسیار متنوع بوده و در

در بررسی این مطالعه، نیاز است تا به محدودیت های موجود در آن نیز اشاره شود. برای تشخیص باکتری ها در این مطالعه از روش های رایج آزمایشگاهی استفاده شده است. استفاده از روش های خاص کشت میکروبی برای ارگانیزم های سخت رشد و دیر رشد، می تواند به شناسایی باکتری های متنوع کمک شایانی کند. همچنین استفاده از روش های ملکولی نیز در این موارد کمک کننده است (۳۷). علاوه بر این، تعیین حداقل غلظت مهاری در مورد میکروارگانیزم های مقاوم می تواند به درک بهتری از سطح مقاومت بیانجامد.

نتیجه گیری

پاتوژن های عامل عفونت زخم به آنتی بیوتیک های رایج مقاومت قابل توجهی نشان می دهند. تعیین عامل عفونت زخم و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی آن در بیماران سالمند و بستری در بخش های مراقبت های ویژه، کمک زیادی به تدوین راهبرد درمانی این نوع عفونت ها می نماید.

تشکر و قدرانی

بودجه این مطالعه از محل بودجه طرح های تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی تهران تامین شده است. همچنین این مطالعه با کد اخلاق IR.TUMS.SPH.REC.1396.3203 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران مصوب گردیده است. در نهایت نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدرانی خود را از پرسنل آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه و همچنین عوامل گروه پاتوبیولوژی در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران ابراز می نمایند.

مطالعات سطح مقاومتی از صفر درصد تا حتی ۵۰ درصد نیز گزارش شده است (۲۳ و ۳۳). در مورد کلبسیلا مقاومت چشمگیری نسبت به سفالوسپورین ها و کینولون ها وجود داشت و همچنین بیش از ۵۰٪ جدایه ها به ایمی پنم مقاوم بودند. مقاومت سطح بالا به سفالوسپورین ها در بسیاری از مطالعات انجام شده در شهر تهران به چشم می خورد (۳۴). همچنین در مطالعه ای که به بررسی عفونت های بیمارستانی در بخش I.C.U بیمارستانی در شهر تهران می پردازد، میزان مقاومت نسبت به کینولون ها و کارباپنم ها با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲).

در باکتری آسینتوباکتر مقاومت به آنتی بیوتیک ها، معضلی بسیار جدی و چالشی مهم محسوب می شود. در مطالعه حاضر در مورد آنتی بیوتیک ها بررسی شده مقاومت بالایی مشاهده شد، به طوریکه ۹۳٪ از جدایه های آسینتوباکتر نسبت به ایمی پنم مقاوم بودند. در مطالعه ای که اخیرا در تهران به بررسی عفونت های بیمارستانی ناشی از آسینتوباکتر پرداخته است نیز مشابه با مطالعه ما، سطح بالایی از مقاومت به اکثر آنتی بیوتیک ها مشاهده گردید (۳۵). همچنین در این مطالعه بسیاری از باکتری های با مقاومت چند دارویی از نمونه های محیطی بیمارستان جداسازی شده است (۳۵). در مورد باکتری غیر تخمیری شایع دیگری یعنی *پسودوموناس آئروژینوزا* مطالعه ما نشان داد که همچنان بیش از ۶۰٪ جدایه ها به کارباپنم ها حساس هستند که این میزان حساسیت در مطالعه مشابهی که در بیمارستان بقیه الله انجام گرفته نیز به چشم می خورد (۲۳). البته در مطالعه ای که در سال ۱۳۹۶ بر روی عفونت های خون در یک بیمارستان دانشگاهی صورت گرفته است حساسیت بالاتری نسبت به کارباپنم ها مشاهده شد که این موضوع می تواند به عنوان زنگ خطری در زمینه پاتوژن های در گردش در این بیمارستان محسوب شود (۳۶).

منابع

1. Horan TC, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Edwards JR, Reid CR, et al. Nosocomial infections in surgical patients in the United States, January 1986-June 1992. *Epidemiology*. 1993;14(2):73-80.

2. Amini M, Ansari I, Vaseie M, Vahidian M. Pattern of antibiotic resistance in nosocomial infections with Gram-negative bacilli in ICU patients (Tehran, Iran) during the years 2012-2014. *jpcp*. 2018;6(1):23-30.
3. Kirkland KB, Briggs JP, Trivette SL, Wilkinson WE, Sexton DJ. The impact of surgical-site infections in the 1990s: attributable mortality, excess length of hospitalization, and extra costs. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1999;20(11):725-30.
4. Shojaei H, Borjian S, Shoshtari por J, Arti H, Shirani S. Study of clean (Class I) surgical wound infections in Shahrekord and Borujen hospitals, 2000. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2002;4(3):1-7.
5. Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, Jarvis WR, Emori TG. CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992: a modification of CDC definitions of surgical wound infections. *Am J Infect Control*. 1992;20(5):271-4.
6. Schwartz Seymour I. Principles of surgery. 7th edit. Mc Graw-Hill; 1999.
7. Bamberg R, Sullivan P, Conner-Kerr T. Diagnosis of wound infections: current culturing practices of US wound care professionals. *Wounds*. 2002;14(9):314-28.
8. Wilson MA. Skin and soft-tissue infections: impact of resistant gram-positive bacteria. *Am J Surg*. 2003;186(5, Supplement 1):35-41.
9. Mok JM, Guillaume TJ, Talu U, Berven SH, Deviren V, Kroeber M, et al. Clinical Outcome of Deep Wound Infection After Instrumented Posterior Spinal Fusion: A Matched Cohort Analysis. *Spine*. 2009;34(6): 548-83.
10. Malone M, Bjarnsholt T, McBain AJ, James GA, Stoodley P, Leaper D, et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *Journal of wound care*. 2017;26(1):20-5.
11. Wolcott R, Rhoads D, Bennett M, Wolcott B, Gogokhia L, Costerton J, et al. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J Wound Care*. 2010;19(2):45-53.
12. Fallah F, Yousefi M, Pourmand MR, Hashemi A, Nazari Alam A, Afshar D. Phenotypic and genotypic study of biofilm formation in Enterococci isolated from urinary tract infections. *Microb Pathog*. 2017;108:85-90.
13. Chim H, Song C. Aeromonas infection in critically ill burn patients. *Burns*. 2007;33(6):756-9.
14. Shokrzadeh M, Rahbari Jeyd P, Mohammadpour A, Zaboli F, Mohammadnejad FZ, Ghaffari Charati M, et al. Frequency of *exoT* and *exoS* Genes among *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates and Antibiotic Resistance in Burn Patients in Sari Zare Hospital, Iran. *JMUMS*. 2017;27(154):51-9.
15. Jafari R, Karbasizade V. Frequency and Antimicrobial Susceptibility of *Acinetobacter baumannii* in Burn infections in Isfahan, Iran. *Adv. Biores*. 2014;5(2):148-52
16. Rouhi S, Mohammadi B, Ramazanzadeh R, Mohammadi S, Zandi S. Prevalence of isolated bacterial and antibiotic resistant pattern of them in positive blood cultures isolated from patients admitted to different parts of Tohid Hospital of Sanandaj city (2013-2014). *NNJ*. 2016; 18 (60): 34-41. [In Persian]
17. Tille, Patricia M., and Betty A. Forbes. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Fourteenth edition. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2017.
18. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019. Page 32-68.
19. Evaluation of bacterial isolates and their resistance profiles in nosocomial bloodstream and surgical wound infections. *J Res Med Sci*. 2013;37(2):113-9.

20. Wong SY, Manikam R, Muniandy S. Prevalence and antibiotic susceptibility of bacteria from acute and chronic wounds in Malaysian subjects. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(9):936-44.
21. Ebrahimzadeh A, Zare Bidaki M, Karbasi H, Khosravi S, Bijari B. An evaluation of culture-positive infections and risk factors in patients admitted to the ICU of Imam Reza hospital in Birjand in 2015-2016. *Journal of Surgery and Trauma*. 2017;5(3):74-80.
22. Cefalu JE, Barrier KM, Davis AH. Wound Infections in Critical Care. *CRIT CARE NURS CLIN*. 2017;29(1):81-96.
23. Ahmadi A, Soltanpour J, AA IF. Prevalence of polybacterial infection and antimicrobial susceptibility of wound samples from different wards. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2016;18(1):120-7.
24. Bessa LJ, Fazii P, Di Giulio M, Cellini L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *Int Wound J*. 2015;12(1):47-52.
25. Omoyibo EE, Oladele AO, Ibrahim MH, Adekunle OT. Antibiotic susceptibility of wound swab isolates in a tertiary hospital in Southwest Nigeria. *Ann. Afr. Med*. 2018;17(3):110-6.
26. Anvarinejad M, Pouladfar G, Japoni A, Bolandparvaz S, Satiary Z, Abbasi P, et al. Isolation and antibiotic susceptibility of the microorganisms isolated from diabetic foot infections in Nemazee Hospital, Southern Iran. *J. Pathog*. 2015;2015.
27. Goudarzi M, Eslami G, Rezaee R, Heidary M, khoshnood s, Sajadi Nia R. Clonal dissemination of *Staphylococcus aureus* isolates causing nosocomial infections, Tehran, Iran. *Iran J Basic Med Sci*. 2019;22(3):238-45.
28. Salimi A, Kamalbeik S, Mahdavinejad A, Sabeti S, Talaie H. Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* in Ventilator Associated Pneumonia in Toxicological Intensive Care Unit. *ijt*. 2014;7(23):962-6.
29. Dormanesh B, Siroosbakhat S, Khodaverdi Darian E, Afsharkhas L. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated From Various Types of Hospital Infections in Pediatrics: Pantone-Valentine Leukocidin, *Staphylococcal Chromosomal Cassette mec SCCmec* Phenotypes and Antibiotic Resistance Properties. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(11):e11341.
30. Shekarabi M, Hajikhani B, Salimi Chirani A, Fazeli M, Goudarzi M. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples: A three year study in Tehran, Iran. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183607.
31. Esfahani BN, Basiri R, Mirhosseini SMM, Moghim S, Dolatkhan S. Nosocomial Infections in Intensive Care Unit: Pattern of Antibiotic-resistance in Iranian Community. *Adv Biomed Res*. 2017;6:54.
32. Ferdosi-Shahandashti E, Javanian M, Moradian-Kouchaksaraei M, Yeganeh B, Bijani A, Motevaseli E, et al. Resistance patterns of *Escherichia coli* causing urinary tract infection. *Caspian J Intern Med*. 2015;6(3):148-51.
33. Moini AS, Soltani B, Taghavi Ardakani A, Moravveji A, Erami M, Haji Rezaei M, et al. Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Patients in Kashan, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(10):e27517.
34. Heidary M, Nasiri MJ, Dabiri H, Tarashi S. Prevalence of drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Iran: a review article. *Iran J Public Health*. 2018;47(3):3-17
35. Salehi B, Goudarzi H, Nikmanesh B, Houri H, Alavi-Moghaddam M, Ghalavand Z. Emergence and characterization of nosocomial multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Tehran, Iran. *J Infect Chemother*. 2018;24(7):515-23.

36. Vahedi A, Baghani A, Baseri Z, Pourmand MR. Frequency and antibiotic resistance patterns of isolated bacteria from positive blood culture of hospitalized patients. *Tehran Univ Med J.* 2018;75(12):902-12.
37. Afrough P, Pourmand MR, Sarajian AA, Saki M, Saremy S. Molecular investigation of staphylococcus aureus, coa and spa genes in ahvaz hospitals, staff nose compared with patients clinical samples. *Jundishapur J. Microbiol.* 2013;6(4): 5377. doi: 10.5812/jjm.5377.