



ارزیابی فنوتیپی پمپ افلاکس و مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های سودوموناس

آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس در بین بیماران سوختگی

تینا دادگر^{۱*}، حمیدرضا پردلی^۱، فاطمه فهامی^۲

۱- گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

۲- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

چکیده

نوع مقاله

مقدمه: شایع ترین میکروارگانیسم هایی که باعث بروز عفونت بیمارستانی در بیماران سوختگی می شوند، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس می باشند. پمپ های افلاکس نقش بسیار مهمی در ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا دارد. این مطالعه با هدف بررسی مقاومت میکروبی و بررسی فنوتیپی پمپ افلاکس در سویه های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران سوختگی است.

مواد و روش: این مطالعه توصیفی و مقطعی، ۴۵ نمونه سوپ از زخم بیماران سوختگی سطح ۲ و ۳ در مرکز آموزشی و پژوهشی درمانی امام علی (ع) بخش سوختگی در شهرستان بجنورد طی مدت ۶ ماه در سال ۱۴۰۰ جمع آوری شد. ایزوله ها با آزمون های بیوشیمیایی بررسی گردیدند. الگوی حساسیت دارویی با روش انتشار دیسک (، تست های فنوتیپی و تست اسید سنجی برای تشخیص تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف، بررسی فنوتیپی فعالیت پمپ های افلاکس با روش کارت ویل انجام شد.

نتایج: (در مطالعه حاضر، از ۴۵ نمونه سوپ، ۲۰ نمونه زخم بیماران سوختگی آلوده به سودوموناس آئروژینوزا و ۱۰ نمونه آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس، بودند. استافیلوکوکوس اورئوس به آمپی سیلین، پنی سیلین و سفازولین ۱۰۰٪ و سفوتاکسیم، لووفلوکساسین، سیپروفلوکساسین، به ترتیب ۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰٪ مقاوم بودند و سودوموناس آئروژینوزا به ایمپنم، سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، سفتازیدیم، به ترتیب ۸۵٪، ۶۵٪، ۵۵٪، ۸۵٪ مقاوم بودند. ۶۰٪ سودوموناس آئروژینوزا مولد ESBL بودند، ۷۰٪ استافیلوکوکوس اورئوس بتالاکتاماز تولید کردند. به ترتیب ۷۵٪ و ۷۰٪ ایزوله های MDR سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس دارای پمپ افلاکس بودند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد در روش فنوتیپی بیش از ۷۰٪ ایزوله های MDR سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس دارای پمپ افلاکس هستند. لذا بررسی حضور این پمپ در پیشنهاد الگوی درمانی مناسب بیماران آلوده به این باکتری ها حائز اهمیت است.

واژگان کلیدی: مقاومت آنتی بیوتیکی، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، افلاکس پمپ

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۵/۹

*نویسنده مسئول: تینا دادگر. گروه

زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه

آزاد اسلامی، گرگان، ایران

تلفن: 09152560043

پست الکترونیک:

dadgar_teena@yahoo.com



مقدمه

مقاومت آنتی بیوتیکی به عنوان یکی از مهم ترین چالش ها در درمان بیماریهای میکروبی شناخته شده است، که منجر به ناکارآمدی آنتی بیوتیک های موجود و چالش برانگیز شدن درمان شده است [۱]. یکی از خطرهایی که همواره جان انسان را تهدید می کند و ناتوانی های زیادی بر جای می گذارد، سوختگی می باشد [۲]. شایع ترین میکروارگانیسم هایی که باعث بروز عفونت بیمارستانی می شوند. استافیلوکوک ها کوکسی های فرصت طلب گرم مثبتی هستند که موجب بروز عفونت های شدید در بیماران دچار سوختگی های درجه ۳، زخم های ترومائی، آتروفی، جراحی، عفونت های ویروسی می گردد [۳]. اصلی ترین مکانیسم مقاومت داروهای بتالاکتام در استافیلوکوک ها تغییر پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین (PBPs) می باشد که میل اتصال کمیتری به دارو دارند. همچنین مقاومت می تواند وابسته به تولید آنزیم های بتالاکتاماز باشد که منجر به مقاومت وسیعی به پنی سیلین های نیمه سنتزی، سفالسپورین ها و کارباپنم ها می شوند. بتالاکتامازها داروهای مناسبی جهت درمان بودند اما بعد از مدتی برخی از باکتری ها با تولید بتالاکتاماز به این آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان دادند. بتالاکتامازها طیف گسترده گروهی از آنزیم های ناشی از پلاسمید هستند که قادر به تخریب سفالوسپورین های با طیف اثر وسیع مانند سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفتازیدیم هستند و عمدتاً توسط مهارکننده های بتالاکتاماز از جمله کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می شوند [۴]. مقاومت به آمینوگلیکوزیدها به واسطه آنزیم های تخریب کننده ی این آنتی بیوتیک ها مانند استیل ترانسفراز، آدنیل ترانسفراز و فسفو ترانسفراز است. عوامل متعددی از جمله پروتئین ها و آنزیم های ویروالانس، توکسین ها، بیوفیلیم و پمپ افلاکس

فاکتورهای بیماریزای این باکتری هستند. استافیلوکوکوس اورئوس با تغییر کردن شرایط محیطی و شرایط ناپایدار، ژن های وابسته به کد شدن پمپ های افلاکس را فعال کرده و مقاومت هایی در سطح گسترده را سبب می شود. افلاکس پمپ ها نقش بسیار مهمی در ظهور سویه های استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت چندگانه دارند [۵]. بیش از ۳۰ ژن پمپ افلاکس به تنهایی در استافیلوکوکوس اورئوس شناخته شده است [۶]. NorA و پس از آن MepA، اولین خانواده اکستروژن چند دارویی و سموم استافیلوکوکوس اورئوس است [۷، ۸]. پمپ افلاکسی NorA نقش مهمی در مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس دارد زیرا می تواند مجموعه ای از ترکیبات شیمیایی و ساختاری متفاوت را از جمله نورفلوکساسین، CIP رنگ هایی مانند اتیدیدوم بروماید و زیست کش هایی مانند آمونیوم چهارتایی از سلول خارج کند. [۹].

سودوموناس آئروژینوزا نیز یک باکتری فرصت طلب باسیل گرم منفی و در طبیعت در محیط های مرطوب (حتی در آب مقطر) زندگی می کند [۴]. این باکتری پاتوژن شایع بیمارستانی است که سویه های مقاوم به چند دارو (MDR) آن با عوارض مرگ و میر بالا همراه هستند. این ارگانیسم باعث تعداد زیادی عفونت ها از جمله عفونت دستگاه ادراری، باکتری، عفونت زخم می شود [۹، ۱۰]. بیماران در معرض خطر ابتلا به عفونت های گسترده سودوموناسی شامل بیماران نوتروپنی و یا نقص ایمنی، بیماران فیبروز کیستیک (CF)، بیماران دچار سوختگی و افراد دریافت کننده آنتی بیوتیک های وسیع الطیف می باشند. بیماران سوختگی اغلب از عفونت های اولیه استافیلوکوکی جان سالم به در می برند اما به عفونت های سودوموناس آئروژینوزا مبتلا می شوند که



پمپ افلاکس در مقاومت عفونت های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوک اورئوس در شهرستان بجنورد به صورت فنوتیپی مطالعه ای صورت گرفته است و با توجه به اهمیت پمپ افلاکس در روند مقاومت آنتی بیوتیکی و بیماری زایی این باکتری ها این مطالعه می تواند در انتخاب داروها در روند درمان تاثیر گذار باشد و نتایج آن می تواند در حوزه پزشکی بالینی و موارد درمانی برای محققان و پزشکان کاربرد داشته باشد.

مواد و روش ها

نمونه گیری از بیماران بستری در بخش سوختگی: در این مطالعه توصیفی و مقطعی، با استفاده از روش نمونه گیری احتمالی ۴۵ نمونه سواب از زخم بیماران سوختگی سطح ۲ و ۳ در مرکز آموزشی و پژوهشی درمانی امام علی (ع) بخش سوختگی در شهرستان بجنورد در سال ۱۴۰۰ طی مدت ۶ ماه با رضایت نامه ی آگاهانه از کلیه ی افراد شرکت کننده در طرح و یا اولیای آنان جمع آوری شد (تعیین حجم نمونه بر اساس نظر پژوهشگر که از روش های مورد استفاده خصوصا در مورد نمونه هایی است که در شرایط خاص انجام می شود با توجه به عواملی مانند بودجه، زمان، نیروی انسانی ماهر، شرایط خاص بیمار و امکانات صورت پذیرفت). بیماران شامل ۳۱ مرد و ۱۴ زن که سن آنها بین ۱۰ تا ۶۰ بود. نمونه های زخم بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفتند. به منظور شناسایی ایزوله ها از آزمون های بیوشیمیایی استاندارد مانند: تخمیر مانیتول، کاتالاز، Dnase، کوآگولاز برای شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس و TSI، اکسیداز، کشت روی محیط سیتريمايدآگار، رشد در ۴۲ درجه سانتی گراد، سیمون سترات برای شناسایی سودوموناس آئروژینوزا استفاده گردید.

سریعا می تواند کشنده باشد. قرار گرفتن در معرض برخی آنتی بیوتیک های بتالاکتام (به عنوان مثال سفتازیدیم) باعث بیان ژن Camp در سودوموناس شده که منجر به غیرفعال شدن بسیاری از آنتی بیوتیک های بتالاکتام می شود. مکانیسم های مقاومت ذاتی در بین ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا عبارتند از: AmpC، سفالوسپوریناز القایی، کاهش OprD پورین خاص و بیان بیش از حد پمپ افلاکسی RND [۱۱]. سیستم افلاکس باکتری عامل اصلی مقاومت چند دارویی است و بنابراین شناسایی مهارکننده های موثر پمپ افلاکسی که از دفع داروها از سلول ها توسط باکتری ها جلوگیری می کند، یک روش معتبر برای هدف قرار دادن MDR باکتریایی است [۸]. RND یکی از پنج خانواده بزرگ سیستم های افلاکس باکتری هستند که قادر به صادرات بستر های متنوع از سلول های باکتریایی، از جمله کلاس های چندگانه آنتی بیوتیک ها هستند. بنابراین افلاکس با واسطه RND کمک قابل توجهی به مقاومت چند دارویی بالینی، به ویژه در پاتوژن های گرم منفی دارد [۱۲]. سودوموناس آئروژینوزا پتانسیل بیان ۱۲ نوع پمپ تراوشی چند دارویی تحت عنوان Mex را دارد از این میان ۵ پمپ به نام های MexEF-MexAB-OprM، MexCD-OprJ، MexGH-OpmD، MexXY-OprM، OprN مهم ترین عوامل مقاومت به آنتی بیوتیک ها به شمار می روند. [۱۳] پمپ های افلاکسی به عنوان یکی از مهم ترین خطوط ایجاد مقاومت باکتری در مقابل گروه های مختلف آنتی بیوتیکی در عصر جدید شناخته شده اند که هدف گیری آن ها می تواند روشی درمانی بالقوه برای مقابله با عفونت های بیمارستانی MDR باشد. از آنجا که تا کنون در مورد نقش



تعیین حساسیت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها (آنتی بیوگرام): برای بررسی میزان مقاومت ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا به کلاس های مختلف آنتی بیوتیک ها از روش کربی بایر استفاده شد. در این روش دیسک حاوی آنتی بیوتیک روی سطح آگاری که میکروارگانیسم روی آن کشت داده شده قرار گرفت و بعد از نگهداری در اتوکلاو، باتوجه به نوع باکتری، قطر هاله عدم رشد را با جدول استاندارد CLSI 2019 مقایسه و نتایج به صورت حساس (susceptible)، متوسط (Intermediate)، مقاوم (Resistant) گزارش شد. میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سولفامتوکسازول، ایمپنم، سفپیم، آمپی سیلین، پنی سیلین، سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، آمیکاسین، تتراسایکلین، جنتامیسین، ونکومایسین، کلستین، سفازولین، سفوکسیتین در استافیلوکوکوس اورئوس و پلازومیسین، لووفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامیسین، سفپیم، کلستین، سیپروفلوکساسین، ایمپنم، آمپی سیلین، سفنازیدیم، سفنازیدیم کلاولانیک اسید در سودوموناس آئروژینوزا سنجیده شد.

تست های فنوتیپی برای تشخیص تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف: بررسی فنوتیپی شیوع آنزیمهای بتالاکتاماز طیف گسترده در سویه های جدا شده استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا با روش Combination Disk و با استفاده از دیسک های سفوتاکسیم، سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید و سفنازیدیم، سفنازیدیم-کلاولانیک اسید انجام شد. سوسپانسیونی باکتریایی با سوآپ استریل در محیط مولر-هینتون آگار تلقیح شد و دیسک های سفوتاکسیم و سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید و سفنازیدیم، سفنازیدیم-کلاولانیک در محیط قرار داده شد. نتایج بعد از ۱۸ الی ۲۴

ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه قرائت شد. به این ترتیب که مواردی که قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک سفنازیدیم-کلاولانیک و یا سفوتاکسیم-کلاولانیک بیش از پنج میلی متر نسبت به سفنازیدیم و سفوتاکسیم افزایش داشت، به عنوان سویه تولیدکننده ESBL در نظر گرفته شد. [۱۴]

تست اسید سنجی برای تشخیص تولید بتالاکتاماز در استافیلوکوکوس اورئوس: این تست جهت بررسی سریع حضور آنزیم بتالاکتاماز به صورت فنوتیپی در استافیلوکوکوس اورئوس است. بدین منظور ابتدا معرف فیل رد با حل کردن پودر خشک فیل رد به میزان ۰/۵ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه شد. سپس مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول فیل به ویال پنی سیلین جی ۵ میلیون واحدی منتقل شد. سپس ۴/۵ میلیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و شیک داده شد. سپس با کاغذ تورنسل pH اندازه گیری شد (pH مورد نظر برابر ۸/۵). [۱۳]

بررسی فنوتیپی پمپ افلاکس با روش کارت ویل: به منظور بررسی فعالیت پمپ افلاکس به صورت فنوتیپی تمام ایزوله ها با تکنیک آگار حاوی اتیدیوم بروماید با روش کارت ویل مورد بررسی قرار گرفتند. در ابتدا سویه های مقاوم به چند دارو بر روی پلیت های نوترینت آگار حاوی غلظت متفاوت (۰/۵ تا ۲ میلی گرم بر لیتر) اتیدیوم بروماید به صورت یک خط از مرکز محیط به سمت کنار محیط کشت داده شد. غلظت ها وابسته به نوع باکتری است و قابل تغییر است. کمترین غلظت ممانعت کننده رشد نیز ۲ میلی گرم در لیتر در نظر گرفته شد. پلیت ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شد. هر پلیت نوترینت آگار حاوی اتیدیوم بروماید می تواند شامل ۱۲ ایزوله باکتری باشد. میزان فلورسنت هر



ایزوله با دستگاه ژل داک اندازه گیری شد تا کمترین غلظت اتیدیوم بروماید موثر بر باکتری مشخص گردد. سویه هایی که خاصیت فلوروسنتی کمتری داشتند، دارای فعالیت افلاکس انتخاب شدند. [۱۵]

نتایج

۱- جداسازی سویه ها و تست مقاومت آنتی بیوتیکی

با توجه به تعداد نمونه مورد بررسی در این مطالعه جهت ارایه نتایج بدست آمده از جدول توزیع فراوانی و نجریه داده ها استفاده گردید. در این مطالعه از مجموع ۴۵ نمونه زخم بیماران سوختگی، ۲۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا و ۱۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی گردید. از مجموع ۲۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا بدست آمده از لحاظ جنسیت بیشترین ایزوله ها مربوط به مردان با تعداد ۱۴ (۷۰٪) ایزوله مشاهده شد. همچنین برا ساس رنج سنی بیشترین فراوانی مربوط به رنج سنی ۱۰-۲۵ سال ۹ (۴۵٪) ایزوله گزارش شد. همچنین از مجموع ۱۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس بدست آمده از لحاظ جنسیت بیشترین ایزوله ها مربوط به مردان با تعداد ۷ (۷۰٪) ایزوله مشاهده شد. همچنین برا ساس رنج سنی بیشترین فراوانی

مربوط به رنج سنی ۱۰-۲۵ سال ۷ ایزوله (۷۰٪) گزارش شد. تمامی نمونه ها مربوط به بخش سوختگی بودند

ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، پنی سیلین، سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، سفوتاکسیم، سفپیم و تتراسایکلین، سفازولین به ترتیب ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۹۰٪، ۸۰٪، ۷۰٪، ۷۰٪، ۶۰٪، ۱۰۰٪ مشاهده شد. این درحالی است که بیشترین حساسیت را این ایزوله نسبت به جنتامایسین، سولفامتوکسازول، کلیستین با ۷۰٪، ۷۰٪، ۶۰٪ داشتند. همچنین، بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک های سفنازیدیم، کلیستین و ایمی پنم، سیپروفلوکساسین، آمپی سیلین، سفپیم، آمیکاسین به ترتیب ۸۵٪، ۷۵٪، ۸۵٪، ۶۵٪، ۶۰٪، ۶۵٪، ۶۵٪ مشاهده شد. این درحالی است که بیشترین حساسیت را این ایزوله ها نسبت به سفنازیدیم کلانولانیک اسید مشاهده شد (۹۰ درصد مقاومت آنتی بیوتیکی) (جدول ۱ و جدول ۲).

جدول ۱- نتایج تست آنتی بیوگرام استافیلوکوکوس اورئوس

نام آنتی بیوتیک	مقاوم (R)	حدواسط (I)	حساس (S)
SXT	۲ (۲۰٪)	۱ (۱۰٪)	۷ (۷۰٪)
IMI	۵ (۵۰٪)	۳ (۳۰٪)	۲ (۲۰٪)
CTX	۷ (۷۰٪)	۲ (۲۰٪)	۱ (۱۰٪)



—	۳(۰.۳۰)/	۷(۰.۷۰)/	FEP
—	—	۱۰(۰.۱۰۰)/	AM
—	—	۱۰(۰.۱۰۰)/	P
—	۱(۰.۱۰)/	۹(۰.۹۰)/	CP
۱(۰.۱۰)/	۱(۰.۱۰)/	۸(۰.۸۰)/	LEV
۴(۰.۴۰)/	۲(۰.۲۰)/	۴(۰.۴۰)/	AN
۴(۰.۴۰)/	—	۶(۰.۶۰)/	TE
۷(۰.۷۰)/	—	۳(۰.۳۰)/	GEN
۴(۰.۴۰)/	۴(۰.۴۰)/	۲(۰.۲۰)/	VAN
۶(۰.۶۰)/	—	۴(۰.۴۰)/	CL
—	—	۱۰(۰.۱۰۰)/	CZ
۵(۰.۵۰)/	—	۵(۰.۵۰)/	FOX

جدول ۲- نتایج تست آنتی بیوگرام سودوموناس آئروژینوزا

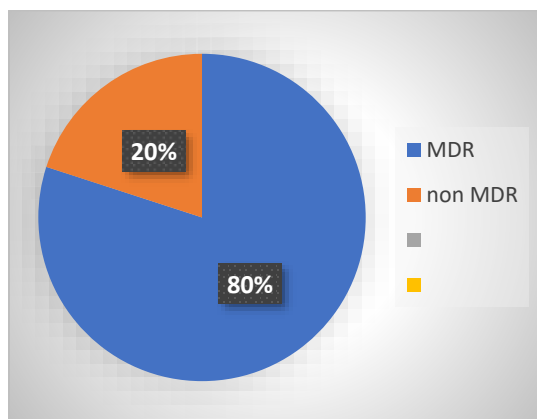
نام آنتی بیوتیک	مقاوم (R)	حدواسط (I)	حساس (S)
PIP	۹(۰.۴۵)/	۴(۰.۲۰)/	۷(۰.۳۵)/
LEV	۱۱(۰.۵۵)/	۳(۰.۱۵)/	۶(۰.۳۰)/
AN	۱۳(۰.۶۵)/	۲(۰.۱۰)/	۵(۰.۲۵)/
GEN	۱۰(۰.۵۰)/	۳(۰.۱۵)/	۷(۰.۳۵)/
FEP	۱۳(۰.۶۵)/	۴(۰.۲۰)/	۳(۰.۱۵)/
CL	۱۵(۰.۷۵)/	—	۵(۰.۲۵)/



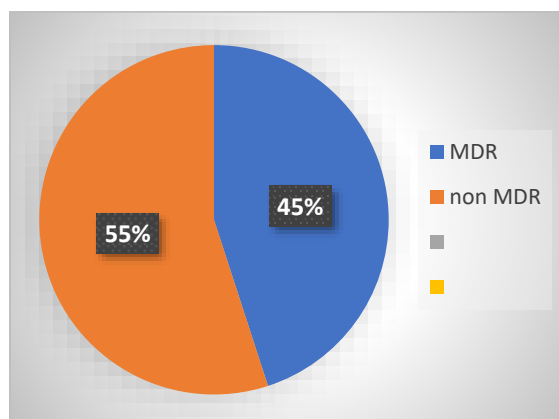
CP	۱۳ (۶۵٪)	۳ (۱۵٪)	۴ (۲۰٪)
IMI	۱۷ (۸۵٪)	۲ (۱۰٪)	۱ (۵٪)
AM	۱۲ (۶۰٪)	۴ (۲۰٪)	۴ (۲۰٪)
CAZ	۱۷ (۸۵٪)	—	۳ (۱۵٪)
CZA	۲ (۱۰٪)	—	۱۸ (۹۰٪)

۲- نتایج حاصل از شناسایی ایزوله های MDR

از مجموع ۱۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس ۸ (۸۰٪) ایزوله MDR و تعداد ۲ (۲۰٪) ایزوله مقاومت ۳ گانه یا بیشتر نسبت به انتی بیوتیک ها نداشتند. از طرفی، از مجموع ۲۰ ایزوله سودوموناس اثرزینوزا ۹ (۴۵٪) ایزوله MDR و تعداد ۱۱ (۵۵٪) ایزوله مقاومت ۳ گانه یا بیشتر نسبت به انتی بیوتیک ها نداشتند (نمودار ۱-۲).



نمودار ۱- درصد سویه های MDR و غیر MDR استافیلوکوکوس اورئوس



نمودار ۲- درصد سویه های MDR و غیر MDR سودوموناس آئروژینوزا

۳- تشخیص فنوتیپی برای ایزوله های تولید کننده بتالاکتاماز سودوموناس آئروژینوزا:

برای شناسایی ایزوله های تولیدکننده بتالاکتاماز سودوموناس آئروژینوزا از روش دیسک ترکیبی استفاده شد. دیسک های سفتازیدیم و دیسک سفتازیدیم کلوانتیک اسید در فاصله مشخص کنار هم قرار داده شد و میزان قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شد (جدول ۳). مطابق با جدول ۳، از ۲۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا، ۱۲ سویه (۶۰٪) مولد ESBL شناسایی شد (شکل ۱).

جدول ۳: نتایج ESBL سودوموناس آئروژینوزا

درصد	تعداد	سودوموناس آئروژینوزا ESBL
۶۰٪	۱۲	دارای آنزیم
۴۰٪	۸	فاقد آنزیم

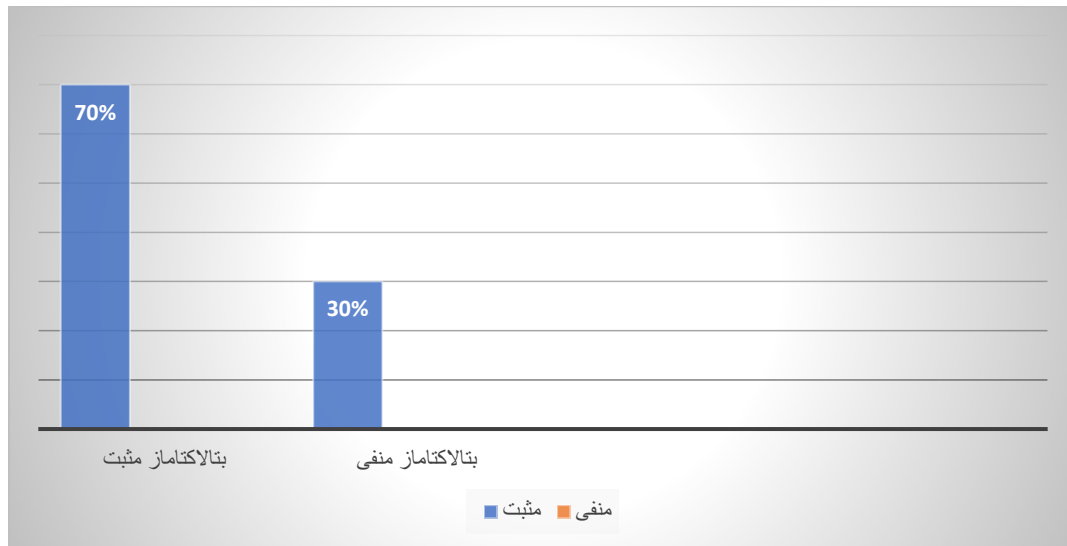


شکل ۱: بررسی قطر هاله در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده بتالاکتاماز با استفاده از تست دیسک گذاری.



۴- فراوانی فنوتیپی برای ایزوله های تولید کننده بتالاکتاماز استافیلوکوکوس اورئوس

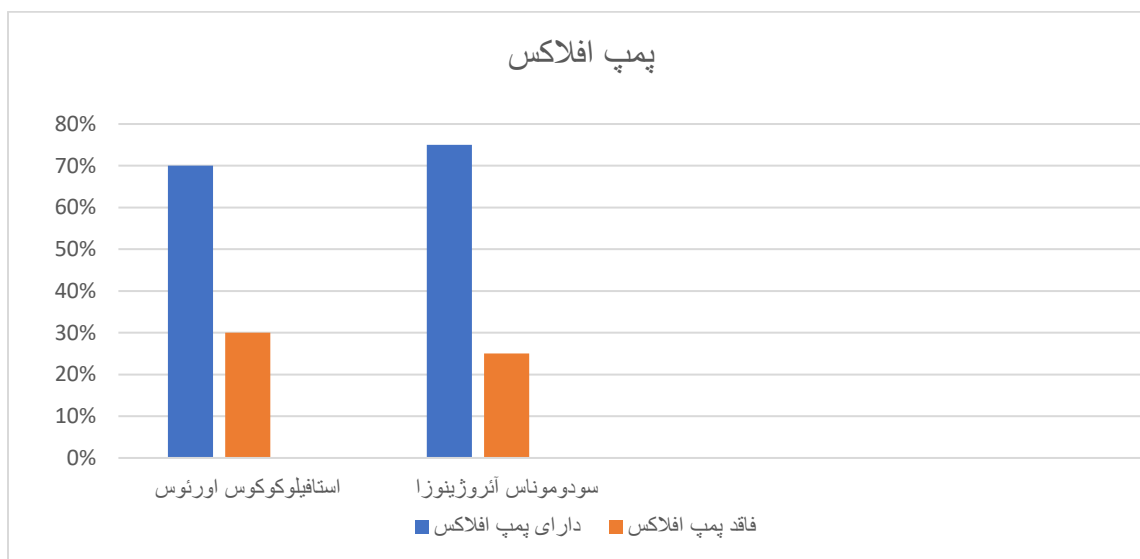
فراوانی فنوتیپی برای ایزوله های تولید کننده بتالاکتاماز استافیلوکوکوس اورئوس به روش روش اسیدسنجی انجام شد. بدین منظور تعیین حضور آنزیم بتالاکتاماز در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با تغییر رنگ از صورتی به زرد تشخیص داده شد. از ۱۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس، ۷ ایزوله (۷۰٪) مولد بتالاکتاماز و ۳ ایزوله (۳۰٪) بدون آنزیم بتالاکتاماز شناسایی شد (نمودار ۳).



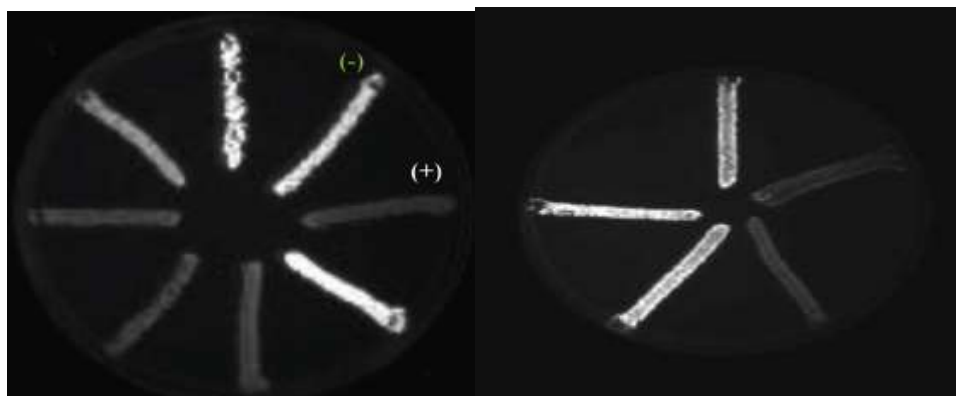
نمودار ۳: تست اسیدسنجی برای بررسی فراوانی فنوتیپی برای ایزوله های تولید کننده بتالاکتاماز استافیلوکوکوس اورئوس

۵- بررسی حضور یا عدم حضور پمپ افلاکس با روش کارت ویل

مطالعه فنوتیپی بیان سیستم افلاکسی با استفاده از اتیدیوم بروماید در سویه های بالینی مقاوم به چند دارو نشان دهنده حضور پمپ های افلاکس در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس بودند. از مجموع ۹ (۴۵٪) ایزوله MDR و ۱۲ (۶۰٪) ایزوله ESBL در سودوموناس آئروژینوزا ۷۵٪ ایزوله ها، دارای پمپ افلاکس بوده اند، این در حالی است که از مجموع ۸ (۸۰٪) ایزوله MDR و ۷ (۷۰٪) ایزوله های مولد بتالاکتاماز در استافیلوکوکوس اورئوس ۷۰٪ ایزوله ها دارای پمپ افلاکس بودند (نمودار ۴ و شکل ۲).



نمودار ۴: مطالعه فنوتیپی بیان سیستم افلاکسی با استفاده از اتیدیوم بروماید در سویه های بالینی مقاوم به چند دارو و تولید کننده بتالاکتاماز سودوموناس آنروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس.



شکل ۲: نتایج بررسی فنوتیپی فعالیت پمپ افلاکس. هر خط رشد متعلق به یک ایزوله می باشد. خطوط کشت روشن بیانگر عدم وجود فعالیت پمپ افلاکس و خطوط کشت تیره بیانگر فعال بودن سیستم افلاکس پمپ می باشد.



بحث

پاتوژن های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به چند دارو (MDR) با عوارض مرگ و میر بالا در مبتلایان به سوختگی های شدید بیمارستانی همراه هستند. از این رو بررسی فراوانی آن ها، میزان مقاومت آنتی بیوتیکی، توانایی تولید آنزیم بتالاکتاماز و فعالیت پمپ افلاکسی آن ها از اهمیت بسزایی در مدیریت عفونت ناشی از این باکتری ها در بیماران مبتلا به سوختگی شدید دارد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک های سفنازیدیم، کلیستین و ایمی پنم، سیپروفلوکساسین، آمپی سیلین، سفپیم، آمیکاسین، لووفلوکساسین به ترتیب ۸۵٪، ۷۵٪، ۸۵٪، ۶۵٪، ۶۰٪، ۶۵٪، ۶۵٪، ۵۵٪ مشاهده شد. ۶۰٪ سوپیه ها به فلوروکینولون ها مقاوم بودند. در این مطالعه ۴۵٪ ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا MDR تشخیص داده شدند. در راستای نتایج حاضر، در مطالعه نور امیرمظفری و همکاران از ۱۸۰ نمونه زخم و سوختگی، ۱۵۹ ایزوله گرم منفی و اکسیداز مثبت سودوموناس آئروژینوزا با کلنی هایی با رنگدانه های سبز شناسایی شد. بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی نیز در مقابل سفوتاکسیم (۶۲٪) از گروه سفالوسپورین ها و آزترئونام (۶۰٪) از گروه منوباکتام ها و کمترین مقاومت در مقابل ایمی پنم (۴۸٪) از گروه کرباپنم ها مشاهده شد. ۷۰٪ سوپیه ها مقاومت چندگانه (MDR) از خود نشان دادند. [۱۶]. این نتایج با یافته های ما همخوانی نداشت.

در این مطالعه بیشترین مقاومت آنتی بیوتیک ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک های

آمپی سیلین، پنی سیلین، سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، سفوتاکسیم، سفپیم و تتراسایکلین، سفازولین به ترتیب ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۹۰٪، ۸۰٪، ۷۰٪، ۷۰٪، ۶۰٪، ۱۰۰٪ مشاهده شد. ۸۵٪ سوپیه ها به فلوروکینولون ها مقاوم بودند. در این مطالعه ۸۰٪ ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس MDR تشخیص داده شدند. در مطالعه موقرنژاد و همکاران از مجموع ۱۳۴ نمونه که به صورت فنوتیپی استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شده. تمام نمونه ها به پنی میکسین و پنی سیلین مقاوم بودند و فقط یک مورد حساس به پنی سیلین گزارش شد. تمام نمونه ها به آنتی بیوتیک نوویوسین حساس بودند. نمونه های متعددی از مقاومت حدواسط نسبت به اریتروماکسیم گزارش شد. مقاومت به متی سیلین شیوع ۵۱ درصدی را نشان داد. همچنین در مطالعه صورت گرفته توسط منیری و همکارانش در سال ۱۳۹۴ از مجموع ۲۰۵ سوپیه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران تعداد ۱۱۶ (۵۶/۶) MDR بودند درصد سوپیه های تشخیص داده شده در این مطالعه کمتر از مطالعه حاضر بود. در مطالعه دیگری نشان داده شد ۸۷/۵ درصد از سوپیه های استافیلوکوکوس اورئوس MDR بودند و درصد بیشتر آن ها از مردان جدا سازی شدند. همچنین مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داد بیشترین مقاومت در این سوپیه ها مربوط به تری متوپریم سولفامتوکسازول (۸۱،۸٪)، پس از آن کلیندامایسین (۷۲،۷٪) و پنی سیلین (۷۲،۷٪) بود، در حالی که کمترین مقاومت به جنتامایسین (۴۵،۴٪) بود [۱۷]. این



مطالعه برخی از پارامترهای مطالعه حاضر از جمله جنسیت و تعداد سویه های MDR را تایید کرد.

مقایسه میزان مقاومت آنتی بیوتیکی این دو باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های مصرفی در این مطالعه و سایر مطالعه های مورد بررسی نشان می دهد آنتی بیوتیک های جنتامایسین/سولفامتوکسازول و سفتازیدیم کلاولانیک اسید به ترتیب به عنوان بهترین آنتی بیوتیک در جهت درمان عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس اثرورزینوزا مطرح است. در مجموع الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس اثرورزینوزا جهت درمان عفونت های به وجود آمده توسط این دو آنتی بیوتیک در مطالعه حاضر به نسبت سایر مطالعات انجام گرفته عنوان شده مطابقت نداشته است که می تواند با عواملی همچون منطقه جغرافیایی، نوع بیماری، رژیم درمانی خاص که در مراکز برای درمان عفونت های سودوموناس اثرورزینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شده مرتبط باشد.

در نگاه کلی به نتایج ارائه شده در این تحقیق می توان دریافت که آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفتازیدیم به دلیل وجود مقاومت بالای آنتی بیوتیکی دیگر به عنوان داروی ضد میکروبی مناسب نمی تواند مطرح باشد. همچنین با ظهور کردن استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین، مقاومت به متی سیلین مطرح است. نتایج بدست آمده از این مطالعه همچنین نشان داد ۱۲ سویه (۶۰٪) از ایزوله های سودوموناس اثرورزینوزا و در استافیلوکوکوس اورئوس، ۷ سویه (۷۰٪) مولد انزیم بتالاکتاماز بودند. در مطالعه صورت گرفته توسط ترابی و همکارانش در سال ۱۳۹۵، ۲۰٪ ایزوله های سودوموناس اثرورزینوزا مولد انزیم ESBL بودند. این بررسی با مطالعه ما همخوانی ندارد. عدم وجود شباهت در نتایج بدست آمده در این تحقیق با مطالعات دیگران را می توان تغییر سویه های

متناسب با موقعیت جغرافیایی نسبت داد، بطوری که حتی در برخی موارد ممکن است گزارش های ارائه شده از بیمارستان های مختلف یک شهر نیز کاملاً با هم متفاوت باشد. که این موضوع اهمیت وجود مطالعات مداوم و گسترده را نشان میدهد. هر چند عوامل دیگری نظیر تفاوت های زمانی و حتی روش انجام آزمایشات در این مورد دخیل هستند.

علت انتخاب اینگونه تحقیقات آن است که افزایش ایزوله های سودوموناس اثرورزینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس تولید کننده بتالاکتاماز در کشور و همچنین مقاومت چند گانه در بیمارستان ها دور از انتظار نیست، شناسایی سریع و ردیابی سویه های مولد بتالاکتاماز ضروری به نظر می رسد و می تواند گام مهم و ضروری در درمان و کنترل عفونت های ناشی از این سویه به شمار می رود. یکی دیگر از مهم ترین مکانیسم های مقاومت باکتریایی بیان سیستم های افلاکس پمپ است. استافیلوکوک ها به سرعت نسبت به اغلب آنتی بیوتیک ها مقاومت پیدا میکنند و مشکلات درمانی متعددی پدید می آورند. از این میان، پمپ های افلاکس مهمترین علت ایجاد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری می باشد می باشند. در این مطالعه از مجموع ایزوله های MDR و تولید کننده بتالاکتاماز سودوموناس اثرورزینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۷۵٪ و ۷۰٪ ایزوله های سودوموناس و استافیلوکوکوس دارای پمپ افلاکس بودند. در یک مطالعه که روی فعالیت پمپ افلاکس در ایزوله سودوموناس اثرورزینوزا در نیجریه انجام شد، ۵۹٪ از ایزوله ها به طور فنوتیپی فعالیت پمپ افلاکس را نشان دادند در حالی که ۴۱٪ فعالیت پمپ افلاکس را نداشتند. نتایج این بررسی با مطالعه ما همخوانی ندارد. در مطالعه قادرخانی و همکارانش در سال ۱۳۹۶، حضور پمپ های افلاکسی در ۹۷/۹٪ سویه ها مشاهده شد. نتایج این بررسی بیشتر از مطالعه ما می باشد. [۱۸].



نتیجه گیری

یافته ها حاکی از آن است که بیشتر ایزوله های جمع آوری شده از بیماران دچار سوختگی شدید شامل سویه های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا می باشد و اکثر ایزوله های های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس مقاومت چند دارویی را نشان دادند و تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز بودند. همچنین نشان داده شد اکثر جمعیت باکتریایی جداسازی شده با قابلیت مقاومت چند دارویی و تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز، دارای پمپ افلاکس هستند لذا بررسی حضور این پمپ در پیشنهاد الگوی درمانی مناسب بیماران آلوده به این باکتری ها حائز اهمیت است. با توجه به عواملی مانند بودجه، زمان، نیروی انسانی ماهر، شرایط خاص بیماران جهت نمونه گیری محدودیت در تعداد نمونه های مورد بررسی در این مطالعه بود که می توان با افزایش بازه زمانی مورد مطالعه تعداد بیشتری از بیماران را وارد مطالعه کرد و انواع گسترده تری از باکتری ها را از لحاظ

مقاومت آنتی بیوتیکی و پمپ افلاکس بررسی نمود . همچنین با توجه به حضور پمپ افلاکس در سویه های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس، بررسی حضور این ژن ها در پیشنهاد الگوی درمانی مناسب بیماران الوده در مراکز درمانی به این باکتری ها حائز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش دارای کد اخلاق از کارگروه/کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی- واحد چالوس به شماره IR.IAU.CHALUS.REC.1401.020 می باشد. بدینوسیله از حمایت دانشگاه آزاد گرگان و اساتید محترم تشکر و قدردانی می گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اظهار می دارند هیچ گونه تعارض منافی در مورد این مقاله با سایر همکاران وجود ندارد.



References

1. Mehla, J., et al., Predictive rules of efflux inhibition and avoidance in *Pseudomonas aeruginosa*. 2021. 12(1): p. e02785-20.
2. Servatyari, K., H. Hamzehpour, and M.J.J.o.R.U.o.M.S. Rasouli, The prevalence and types of burn wound infection in the burn Ward of Tohid Hospital in Sanandaj in 2015: a short report. 2018. 16(9): p. 883-890.
3. Farzadfar, F., et al., Health system performance in Iran: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. 2022. 399(10335): p. 1625-1645.
4. Imani Fuladi, A., and Rostami, Z., and Shapouri, R, Antibiotic resistance and abundance of broad-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples by phenotypic and genotypic methods. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences and Health Services*, (1389). 3(37): p. 189-198.
5. Movagharneshad, M.J.I.J.o.M.M., Identification and Characterization of *Staphylococcus aureus* Methicillin and Vancomycin Resistance from Patients in Sari and Ghaemshahr Injuries and Burn Hospitals in 2015. 2018. 12(3): p. 160-168.
6. Luan, W., et al., Inhibition of drug resistance of *Staphylococcus aureus* by efflux pump inhibitor and autolysis inducer to strengthen the antibacterial activity of β -lactam drugs. 2019. 68(4): p. 477.
7. Wang, D., et al., Inhibitory effects of silybin on the efflux pump of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 2018. 18(1): p. 827-833.
8. Frempong-Manso, E., et al., Inability of a reserpine-based screen to identify strains overexpressing efflux pump genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. 2009. 33(4): p. 360-363.
9. Siriyong, T., et al., Conessine as a novel inhibitor of multidrug efflux pump systems in *Pseudomonas aeruginosa*. 2017. 17: p. 1-7.
10. Ugwuanyi, F.C., et al., Evaluation of efflux pump activity and biofilm formation in multidrug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Federal Medical Center in Nigeria. 2021. 20: p. 1-7.
11. Tafti, F.A., et al., Mutations in *nalc* gene of Mex AB-OprM efflux pump in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds in Yazd, Iran. 2020. 12(1): p. 32.
12. Dey, D., et al., Antibiotic substrate selectivity of *Pseudomonas aeruginosa* MexY and MexB efflux systems is determined by a Goldilocks affinity. 2020. 64(8): p. e00496-20.
13. Ebrahimi Sadabadi, Mahsa. Investigation of beta-lactamase production in coagulase-negative staphylococci isolated from patients in comparison with strains isolated from healthy carriers in Gorgan city. Graduate college of Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran -Summer 2016.
14. Evari Ehsan - Evaluation of phenotypic prevalence of efflux pumps and antibiotic resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in Gorgan city. Graduate college of Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran -Winter 2018.
15. Yahya Dashtizadeh, Ali Akbar Gerzin, Afaq Moatari, (2013). Evaluation of phenotypic and genetic prevalence of efflux pumps and antibiotic resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* among burn patients of Qutbuddin Shirazi Hospital, *World of Microbs Quarterly*, 7(2), 118-127
16. Aghayan, S.S., et al., The effects of berberine and palmatine on efflux pumps inhibition with different gene patterns in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn infections. 2017. 9(1): p. 2.
17. Hosseini, M., et al., Prevalence and Antibiotic Resistance Pattern of Gram-Positive Isolates from Burn Patients in Velayat Burn Center in Rasht, North of Iran. 2021. 15(6): p. 52-57.
18. Baiomy, A.A., G.H. Shaker, and H.A.J.A.H.S. Abbas, Sensitizing multi drug resistant *Staphylococcus aureus* isolated from surgical site infections to antimicrobials by efflux pump inhibitors. 2020. 20(4): p. 1632.

Phenotypic Evaluation of the Prevalence of Efflux Pumps and Antibiotic Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus* among Burned Patients

Teena Dadgar^{1*}, Hamidreza Pordeli¹, Fateme Fahami²

1-Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

2-M.Sc in Microbiology, Department of Biology, Gorgan Branch , Islamic Azad University, Gorgan, Iran

Type of Article:
Original article

Received: 2023/09/17

Accepted: 2024/07/30

*Corresponding Author:

Teena Dadgar. Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

TEL: 09152560043

Email: :

dadgar_teena@yahoo.com

Abstract

Introduction: The most common microorganisms that cause hospital infections in patients with burns are *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Efflux pumps play a very important role in creating antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. This study aimed to investigate microbial resistance and phenotypic investigation of the efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with burns.

Materials and methods: In this descriptive and cross-sectional study, 45 swab samples were collected from the wounds of 2nd and 3rd degree burn patients at the Imam Ali (A.S.) Medical Center, burn department in Bojnord city over a period of 6 months. Biochemical tests were performed. The drug sensitivity pattern was done by the disk diffusion method, phenotypic tests, and acid test to detect the production of broad-spectrum beta-lactamase. Phenotypic investigation of efflux pump activity was done using the Cardwell method. **Results:** In the present study, 20 wound samples of burn patients were infected with *Pseudomonas aeruginosa* and 10 samples were infected with *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* was resistant to ampicillin, penicillin and cefazolin 100% and cefotaxime, levofloxacin, and ciprofloxacin, 70%, 80%, 90%, respectively, and *Pseudomonas aeruginosa* was resistant to imipenem, ciprofloxacin, levofloxacin, and ceftazidime, 85%, respectively. 65%, 55%, 85% were resistant. 60% *Pseudomonas aeruginosa* produced ESBL, 70% *Staphylococcus aureus* produced beta-lactamase. 75% and 70%. MDR isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* had efflux pumps.

Conclusion: The results showed that in the phenotypic more than 70% of MDR isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* have an efflux pump, so it is important to check the presence of this pump in proposing a suitable treatment model for patients infected with these bacteria.

Keywords: Antibiotic resistance, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, Efflux pump

Please cite this article as: Dadgar T, Pordeli H, Fahami F. Phenotypic Evaluation of the Prevalence of Efflux Pumps and Antibiotic Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus* among Burned Patients. J Neyshabur Univ Med Sci 2022;10(3):39-53.