مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۸-۱

تعیین الگوی مقاومت دارویی و شناسایی ژن متالو بتالاکتاماز bla-VIM در سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران بستری دربیمارستان سوانح وسوختگی امام موسی کاظم (ع) اصفهان (۸۸-۱۳۷۸)

حسین فاضلی[۱]، زهرا مصلحی تکانتپه[۲]، غلامرضا ایراجیان *[۲]، منصور صالحی[۳]

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۲)گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
۳) گروه ژنتیک دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
نویسنده رابط: دکتر غلامرضا ایراجیان، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
دورنگار: ۸۸۰۵۸۶۴۹ – ۰۲۱ girajian @ yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۶/۱ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۲/۱۹

چکیده:

زمینه و اهداف: *پسودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) عامل اصلی عفونت زخم‌های سوختگی است. با توجه به مقاومت روز افزون این باکتری به داروهای ضد باکتریائی و به‌خصوص نسبت به ترکیبات بتالاکتام اهمیت مقاومت آن دو چندان می‌شود. به‌علاوه، سویه‌های تولید کننده آنزیم متالوبتالاکتامازها در جهان رو به افزایش است. هدف از این مطالعه تعیین الگوی حساسیت دارویی و میزان شیوع سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* تولید کننده متالوبتالاکتاماز دربیمارستان سوانح وسوختگی امام موسی کاظم (ع) اصفهان بود(۸۸-۱۳۷۸).

روش بررسی: از ۱۱۱ بیمار دچار سوختگی و بستری در بیمارستان امام موسی کاظم(ع) اصفهان در طی سال‌های۸۸-۱۳۷۸، ۷۹ سویه *پسودوموناس آئروژینوزا* جدا شد. تست حساسیت دارویی با روش کربی- بائر انجام شد. در سویه‌های مقاوم به ایمیپنم تولید متالوبتالاکتاماز به روش فنوتیپی (IPM-EDTA) تشخیص داده شد. با استفاده از فناوری PCR وجود ژن VIM بررسی گردید.

یافته ها: درصد مقاومت به داروهای ضد باکتریائی به شرح ذیل بود:ایمیپنم ۹۴/۹٪، پیپراسیلین ۹۷/۴٪، سیپروفلوکساسین ۹۸/۷٪، توبرامایسین ۹۵٪، سفتازیدیم و تیکارسیلین هر یک ۱۰۰ ٪. با روش IPM-EDTA، ۴۱ (۵۵/۸٪) سویه مقاوم به ایمیپنم، تولید کننده متالو بتالاکتاماز بودند. ۳۴ سویه (۴۳٪) حاوی ژن VIM بودند.

نتیجه گیری : نتایج نشان داد سویه‌های *P. aeruginosa* به سفتازیدیم وتیکارسیلین کاملا مقاوم و بیش از ۹۴٪ آنها به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند. شیوع تولید متالو بتالاکتاماز در سویه‌های جدا شده بیش از انتظار است. بنابراین، تشخیص الگوی مقاومت دارویی این باکتری به‌خصوص تشخیص سویه‌های تولید کننده متالو بتالاکتاماز در پیشگیری و کنترل عفونت‌های ناشی ار آن اهمیت زیادی دارد.

کلید واژه ها: متالو بتالاکتاماز، *P. aeruginosa*، آزمایش حساسیت دارویی ، ژن VIM، زخم سوختگی

مقدمه:

یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی و درمانی در بسیاری از نقاط دنیا ضایعات سوختگی می‌باشد. بیماران مبتلا به این ضایعات در معرض خطر عفونت‌های بیمارستانی هستند. زیرا، زخم‌های سوختگی مکان استقرار باکتری‌های فرصت طلب از جمله *Pseudomonas aeruginosa* می‌باشد. استفاده از روش‌های مراقبتی جدید موارد عفونت زخم‌های سوختگی را کاهش داده است. اما، هنوز امکان بروز عفونت های مرگبار در سوختگی‌های شدید به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه وجود دارد که عموماً باعث افزایش بیماری و مرگ و میر در سراسر دنیا می‌گردد(۱). به‌عنوان مثال، در ایالات متحده آمریکا سالیانه حدود ۱۰۰،۰۰۰ مورد ضایعه سوختگی شدید اتفاق می‌افتد که منجر به مرگ حدود ۵،۰۰۰ نفر می‌گردد (۲).

در بیماران با ضایعات سوختگی شدید عوامل اصلی دخیل در عفونت، تخریب پوست و همراه شدن آن با کاهش سطح دفاعی (سلولی و هومورال) به‌صورت موضعی و سیستمیک می‌باشد (۸-۳). محل سوختگی (سطحی یا عمقی)، به‌علت نکروز بافتی، محیط غنی از پروتئین است که جایگاه ویژه‌ای برای استقرار و تکثیر باکتری‌ها فراهم می‌کند(۱۳-۹). نکروز بافتی و تخریب عروق خونی محل، از حضور عوامل دفاعی و ترکیبات ضد میکروبی ممانعت به‌عمل می‌آورد (۱۰ و ۱۴).

P. aeruginosa و *Staphylococcus. aureus* مهم‌ترین و شایع‌ترین عواملی هستند که از عفونت زخم‌های سوختگی جدا می‌شوند. در مطالعه سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۵ در هلند مشخص گردید که این دو باکتری به ترتیب ۳۷- ۲۷ درصد و ۳۰-۲۷ درصد عامل عفونت زخم بوده‌اند (۳) منبع *P.aeruginosa* عامل عفونت زخم‌های سوختگی ممکن است منشاء داخلی (دستگاه گوارش) یا محیطی داشته باشد (۱۵). در محیط بیمارستان سویه‌هایی از *P. aeruginosa* وجود دارند که دارای مقاومت چند گانه (Multi. Drug- resistant) هستند. این سویه‌ها از محیط و دست پرسنل جدا شده‌اند.

در مطالعات انجام شده در ایران مشخص شده که مقاومت چندگانه سویه‌های *P. aeruginosa* جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی به مرحله نگران کننده‌ای رسیده است. در مطالعاتی که در مرکز سوختگی توحید انجام شد مشخص گردید که فراوانی *P. aeruginosa* ، ۷۳/۹ ٪ می‌باشد. بیش از ۹۵ ٪ این سویه‌ها به جنتامایسین، کاربنی سیلین، تری متوپریم سولفامتوکسازول، سفتی زوکسیم و تتراسیکلین و بیش از ۹۰٪ به آمیکایسین و ۸۲ ٪ به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (۱۶) در مطالعه دیگر در ایران ۸۶/۶ ٪ سویه‌های *P. aeruginosa* جدا شده از بیماران سوختگی به سفتی زوکسیم، ۸۶ ٪ به آزترونام، ۷۹/۸٪ به کاناماسین و ۱۵/۵ ٪ به ایمی پنم مقاوم بودند. به‌علاوه، از ۱۲۷ سویه مورد بررسی، ۲۴ سویه جدا شده از بیماران و یک سویه جدا شده از محیط MDR بودند (۱۷).

در بسیاری از کشورها مقاومت سویه‌های *P. aeruginosa* به ترکیبات بتالاکتام رو به افزایش است (۲ و ۱۸). برای درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم به ترکیبات بتالاکتام، از کرباپنم‌ها (ایمیپنم – مروپنم) که نسبت به اثر اکثر بتالاکتامازها مقاوم می‌باشند، استفاده می‌شود(۱۹). اما، در سال‌های اخیر مقاومت به کرباپنم‌ها به‌ویژه در سویه‌های جدا شده از موارد بالینی گزارش شده است. این مقاومت به‌علت کاهش نفوذ دارو و تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده کرباپنم‌ها مثل متالو بتالاکتامازها (MBL) است (۲۰). متالوبتاکتامازها از جمله آنزیم‌های بتالاکتاماز هستند که در گروه ۳ از طبقه بندی Bush و کلاس B از طبقه بندی Ambler قرار دارند. اعضاء کلاس B به سه زیر کلاس BI و BII و BIII تقسیم می‌شوند. در زیر کلاس BI ، بر اساس ساختمان مولکولی، چهار گروه IMP وSPM و VIM و GIM وجود دارد. متالو بتالاکتامازها در جایگاه فعال خود دارای روی (zn) می‌باشند و توسط شلاته کننده‌های فلزی از قبیل دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) مهار می‌شوند. ولی توسط مهار کننده‌های بتالاکتاماز مثل سولباکتام، تازوباکتام و یا کلاولانیک اسید مهار نمی‌شوند.

آنزیم‌های متالو بتالاکتاماز اولین بار در سال ۱۹۸۸ از ژاپن گزارش شد. در حال حاضر سویه‌های *P. aeruginosa* تولید کننده متالو بتالاکتاماز از سراسر دنیا گزارش می‌شوند. این آنزیم‌ها طیف سوبسترائی وسیعی دارند و قادر به هیدرولیز تمام بتا لاکتام‌ها به جز مونوباکتام (آزترونام) هستند. این آنزیم‌ها داخل اینتگرون‌ها قرار گرفته و می‌توانند در پلاسمید یا کروموزوم ادغام شوند. لذا قابلیت انتقال به سایر سویه‌های پسودوموناس و باکتری‌ها دیگر از جمله انتروباکتریاسه را دارند (۲۱ و ۲۲و ۲۴)

P. aeruginosa یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی از جمله زخم‌های سوختگی است. از سوی دیگر تا کنون

ممانعت‌کننده‌ای برای این آنزیم شناخته نشده است و میزان شیوع سویه‌های *P. aeruginosa* حاوی ژن متالو بتالاکتامازها هم در حال افزایش است. لذا، تعیین الگوی مقاومت داروئی *P. aeruginosa* جدا شده از بیماران و تعیین تولید متالو بتالاکتامازها جهت کنترل و درمان عفونت‌های بیمارستانی ضروری به‌نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر علاوه بر تعیین الگوی حساسیت داروئی سویه‌های *P. aeruginosa* جدا شده از بیماران دچار سوختگی، تولید آنزیم متالو بتالاکتاماز و حضور ژن VIM هم با روش فنوتیپی و ژنوتیپی بررسی شد.

مواد و روش‌ها:

سویه‌های باکتری: ۱۱۱ نمونه از زخم بیماران مبتلا به عفونت‌های سوختگی، بستری در بیمارستان سوانح وسوختگی امام موسی‌کاظم (ع) اصفهان، طی سال‌های ۸۸-۱۳۸۷ جمع آوری شد. نمونه‌ها روی محیط-های آگار خوندار و EMB (Merck) کشت داده شد و با استفاده از روش‌های استاندارد میکروب‌شناسی، سویه *پسودوموناس آئروژینوزا* تعیین هویت گردید. سویه‌ها جهت آزمایشات بعدی در محیط مایع (Merck) Luria-Bertani حاوی ۳۰٪ گلیسرول در 80°- نگاهداری شد.

آزمایش حساسیت داروئی: برای تعیین الگوی مقاومت دارویی از روش دیسک دیفیوژن (Kirby-baure) بر روی محیط مولر هینتون آگاراستفاده شد. آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده عبارت بودند از:ایمیپنم (I) (هایمدیا- هند) سفتازیدیم (CAZ) ، پیپراسیلین (PIP), سیپروفلوکساسین(CIP)، تیکارسیلین (TIC) وتوبرامایسین (NN)(پادتن طب- ایران). از سویه *پسودوموناس آئروژینوزای* ATCC:27853 به عنوان شاهد استفاده شد.

تولید متالوبتالاکتاماز: سویه‌های مقاوم به ایمیپنم (منطقه ممانعت <۱۶mm) جهت بررسی تولید متالو بتالاکتاماز (MBL) انتخاب شدند.

روش فنوتیپی **IPM-EDTA**: در این روش محلول نیم مولار EDTA (۱۸۶/۱گرم $disodiumEDTA.2H_2O$ در ۱۰۰۰میلی لیترآب مقطر) تهیه و pH محلول به‌وسیله NaOH در ۸ تنظیم گردید. محلول به وسیله اتوکلاو (در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱۵ پاومد براینچ مربع و به‌مدت ۱۵ دقیقه)استریل شد. µl ۷۵۰ از محلول EDTA روی دیسک ایمیپنم µg ۱۰ تلقیح شد تا دیسک IPM –EDTA به دست آمد(۲۳) .

چند کلنی خالص *پسودوموناس آئروژینوزا* به لوله حاوی محیط TSB (Trypticase Soy Broth) تلقیح شد و به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس کدورت محیط معادل استاندارد نیم مک فارلند (1×10^{8}) تنظیم شد. این محلول توسط سوآب استریل در سطح محیط مولر هینتون آگارکشت داده شد و دیسک‌های IPM-EDTA و IPM در سطح آگار قرار داده شد. افزایش منطقه ممانعت از رشد دیسک IPM-EDTA به مقدار ۷ mm≤ نسبت به دیسک ایمیپنم به تنهایی به عنوان متالوبتالاکتاماز مثبت در نظر گرفته شد(۲۳).

تعیین ژن متالوبتالاکتاماز: جهت استخراج DNA باکتری از روش جوشاندن (Boiling)استفاده شد .به این منظور چندین کلنی خالص باکتری در۵ml محیط TSB تلقیح و به مدت ۲۰ ساعت در انکوباتور شیکر دار۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. ۱/۵ml از محیط TSBدر لوله‌های اپندورف ریخته شد و در دور ۱۸۰۰۰ ×g به مدت ۵ دقیقه میکروفیوژ شد. مایع رویی کاملا" تخلیه و رسوب با حدود ۵۰۰µl آب مقطر دیونیزه به خوبی ورتکس گردید. محلول حاصل حدود ۱۰ دقیقه در بن ماری جوش قرارگرفت. در پایان ۱۰ دقیقه دردور ۱۸۰۰۰ ×g میکروفیوژ شد. محلول رویی جهت انجام واکنش PCR به لوله‌های اپندورف جدید منتقل شد(۲۲).

PCR: واکنش PCR به منظور تکثیر DNA استخراج شده در حجم نهایی۲۵ µl به ترتیب زیرانجام شد: بافر PCR ۲/۵ µl ،کلرید منیزیوم ۲/۵mM ،مخلوط الیگونوکلئوتیدها ۰/۲mM، ۲۵mM /۰ ازهر پرایمر، ۱۰۰ng DNA الگو ، آنزیم Taq polymerase 2U وتا حجم نهایی (۲۵ µl) آب مقطر.

برنامه PCRدر ۳۰ سیکل تکثیر در دستگاه ترموسایکلر به قرار ذیل انجام شد:

مرحله اولیه جدا سازی دو رشته در 94° سانتی‌گراد به مدت ۵دقیقه، مرحله باز شدن دو رشته(Denaturing Step) در 94° سانتی‌گراد به مدت ۱دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها (Annealing Step)در $56/5^{\circ}$ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل شدن رشته هدف (Extension Step) در72° سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و مرحله طویل شدن نهایی(Final Extension Step) در دمای 72° سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه .

از آب مقطر به عنوان شاهد منفی و از سویه پسودوموناس *آئروژینوزا* VIMمثبت(*P. aeruginosa* PO510 producing bla_{VIM-1}) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. (سویه شاهد از بخش میکروب‌شناسی انستیتوپاستور ایران دریافت گردید).

در این روش از یک جفت پرایمر اختصاصی مربوط به ژن blaVIM که محصول آن باندی به طول ۳۸۲bp می‌باشد (Metabion آلمان) استفاده گردید.(۲۳)

1) 5′-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3′
2) 5′-AAT GCG CAG CAC CAG GAT AG -3′

محصولات PCR توسط ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید در بافر TBE الکتروفورز شد و سپس محصولات توسط نور UV مشاهده گردید .(۲۲)

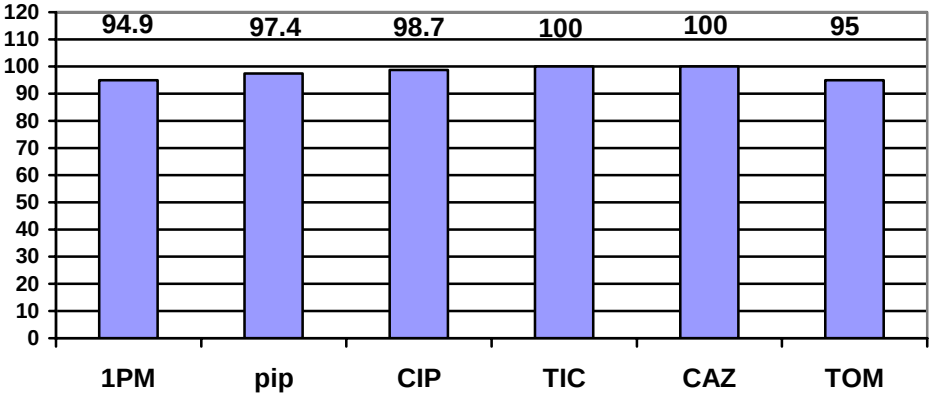
جهت پردازش اطلاعات از نرم افزار spss10 استفاده شد .

یافته‌ها:

از ۱۱۰ بیمارسوختگی ۴۸ نفر (۴۴٪) مرد و ۶۲ نفر (۵۶ ٪) زن بودند، که در بیمارستان بستری و درجه سوختگی آنها دو یا سه بود. دامنه سنی بیماران از یک تا ۶۰ سال متغیر بود. بیشترین بیماران در گروه سنی ۴۰- ۲۱سال (۵۸/۵٪) و کمترین آنها در گروه ۱۰-۱ سال (۱۰٪) قرار داشتند.

۱۱۱ نمونه زخم برداشت شد. از ۷۹(۷۱/۱ ٪) نمونه پسودوموناس *آئروژینوزا* جدا شد که شایع‌ترین ارگانیسم جدا شده از بیماران با عفونت سوختگی بود. از ۳۲ (۳۸/۹٪) نمونه دیگر، باکتری‌های دیگر جدا شدند.

درصد مقاومت داروئی سویه‌های پسودوموناس *آئروژینوزا* در نمودار ۱ نمایش داده شده است; بالاترین میزان مقاومت مربوط به سفتازیدیم وتیکارسیلین (۱۰۰٪)وکمترین آن مربوط به ایمیپنم(۹۴/۹٪) بود.



نمودار ۱: درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های پسودوموناس *آئروژینوزا*

TIC: تیکارسیلین IPM: ایمیپنم
CAZ: سفتازیدیم PIP: پیپراسیلین
TOM: توبرامایسین CIP: سیپروفلوکساسین

از ۷۴ سویه پسودوموناس *آئروژینوزای* مقاوم به ایمیپنم، ۴۱ سویه(۵۵/۴٪) به روش IPM– EDTA،متالوبتالاکتاماز مثبت بودند.

تمام سویه‌های پسودوموناس *آئروژینوزا* (بدون در نظر گرفتن مقاومت به ایمیپنم)به منظور شناسایی ژن blaVim، PCR شدند. ۳۴ سویه (۴۳/۳٪) از نظر ژن VIMمثبت بود.

بحث:

در مطالعه حاضر ۷۱/۱ درصد نمونه‌ها واجد *P. aeruginosa* هستند. تمام سویه‌ها به سفتازیدیم وتیکارسیلین و بیش از ۹۴ درصد به ایمیپنم، پیپراسیلین و سیپروفلوکساسین مقاوم می‌باشند، که ۵۵/۴ درصد از آنها تولیدکننده متالو بتالاکتاماز هستند. در روش PCR ، ۴۳ درصد از تمام سویه‌ها حاوی ژن VIM می‌باشند.

سویه‌های *P. aeruginosa* تولید کننده متالوبتالاکتاماز (معمولا" دارای مقاومت چندگانه) عامل عفونت‌هایی می‌باشند که درمان آنها مشکل‌زا است و منجر به افزایش مرگ و میر می‌گردد. افزایش در طیف و تنوع متالو بتالاکتامازها در سویه‌های *P. aeruginosa* باعث محدودیت درمانی، حداقل در سه قاره (آسیا، اروپا و آمریکای جنوبی) گردیده است. این امر منجر به استفاده از رژیم‌های داروئی ترکیبی (استفاده از چند ترکیب ضد میکروبی) شده است. با توجه به اینکه سویه‌های تولیدکننده متالو بتالاکتاماز به بسیاری از ترکیبات ضد میکروبی مورد استفاده مقاوم می‌باشند. لذا یا باید به فکر سنتز ترکیبات ضدمیکروبی قوی‌تر با مکانیسم عمل جدید بود و یا از داروهای قدیمی با سمیت زیاد مثل Polymyxin B یا Colistine استفاده نمود (۲۴) سویه‌های تولید کننده متالو بتالاکتاماز مسئول بروز عفونت‌های بیمارستانی طولانی مدت و شدید می‌باشند(۲۵). در یک مطالعه مورد – شاهدی در ژاپن(۲۰۰۳)، مشخص شد میزان مرگ و میر در بیمارانی که با سویه‌های *P. aeruginosa* تولید کننده متالو بتالاکتاماز عفونی شده‌اند، نسبت به بیمارانی که با سویه‌های متالو بتالاکتاماز منفی عفونی شده‌اند، بیشتر است (۲۶)

در مطالعه حاضر تمام سویه‌ها به سفتازیدیم و تیکارسیلین و بیش از ۹۴ درصد به ایمیپنم، پیپراسیلین و سیپروفلوکساسین مقاوم می‌باشند. الگوی مقاومت سویه‌های *P. aeruginosa* در مطالعه حاضر و مطالعات دیگر در ایران در جدول ۱ خلاصه شده‌است.

جدول ۱ :مقایسه مقاومت سویه‌های *P. aeruginosa* به آنتی‌بیوتیک‌ها در مطالعه حاضر و مطالعات انجام شده در ایران از سال ۱۳۸۲ تا ۱۳۸۸ (۲۰۰۹-۲۰۰۳)

محققین	سال تحقیق	ایمیپنم	پیپراسیلین	سیپروفلوکساسین	سفتازیدیم	سفتی زوکسیم
عزیز ژاپنی و همکاران (۲۲)	۲۰۰۳	۶۷/۱	۱۴/۳	۲۷/۱	۱۵/۷	
خسروی و همکاران (۲۸)	۲۰۰۶	۴۱	۶۸		۸۳	
صادری و همکاران (۲۵)	۲۰۰۷	۳۸/۲		۴۹/۲۲	۷۴/۲	۸۵/۱۶
شاهچراغی و همکاران (در دست چاپ)	۲۰۰۷-۲۰۰۵	۱۲/۴				
میر صالحیان و همکاران (۲۸)	۲۰۰۸	۶۳	۷۰	۸۳	۸۵	
سلیمی و همکاران (۱۷)	۲۰۰۸	۳۰/۲	۳۴/۱		۷۵/۲	۸۶/۸
مطالعه حاضر	۲۰۰۹	۹۴/۹	۹۷/۴	۹۸/۷	۱۰۰	

روند این مطالعات در کل افزایش میزان مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد. ولی این افزایش دارای نوساناتی، از جمله در مورد ایمیپنم است. با توجه به اینکه در همه مطالعات از روش انتشار دیسک استفاده شده است. علت این نوسانات می‌تواند؛ تفاوت مقاومت در مناطق مختلف، نوع عفونت، و یا نوع دیسک‌های مورد استفاده باشد. اما در کل این موضوع تأمل برانگیز است و بیشتر باید مورد بررسی و تعمق قرار گیرد.

در مطالعه حاضر میزان مقاومت افزایش چشمگیری را نشان می‌دهد که علت آن می‌تواند؛ بستری شدن بیماران در مرکز سوختگی در یک منطقه خاص (اصفهان) باشد که بیماران از سایر شهرهای استان نیز به آن ارجاع شوند و نیز می‌تواند نشان دهنده شیوع مقاومت در میان سویه‌های *P. aeruginosa* بیمارستانی باشد.

در مطالعه حاضر جهت غربالگری سویه‌های تولیدکننده متالو بتالاکتاماز از روش IPM-EDTA استفاده شد. مشخص گردید که ۵۵/۴ درصد سویه‌های مقاوم به ایمیپنم، تولید کننده متالو بتالاکتاماز می‌باشند. در مطالعه خسروی و همکاران با روش E-test در سال ۲۰۰۷ این میزان ۱۹/۵۱ درصد (۲۹) و در مطالعه صادری و همکاران که با روش CAZ-EDTA انجام شد ۶۳/۳ درصد می‌باشد(۲۵). در مطالعه شاهچراغی و همکاران(۳۱) این میزان ۷۲ درصد است. در فرانسه (۲۰۰۴) با روش IPM-EDTA میزان ۴۶ درصد (۳۰) و در کشور کره ۳۱ درصد گزارش گردیده است (۳۰). نتایج مطالعه حاضر با مطالعه صادری و همکاران در تهران (۲۵) تقریبا" مشابه می‌باشد، ولی با مطالعه شاهچراغی (۳۱) متفاوت است. علت آن می‌تواند استفاده از روش E-test یا Micro dilution باشد. نتایج این مطالعه با کشورهای دیگر نیز متفاوت است که علت آن می‌تواند استفاده از روش‌های متفاوت و تفاوت در میزان مقاومت در سایر نقاط جهان باشد.

فناوری PCR و استفاده از پرایمرای اختصاصی برای تشخیص ژن blaVIM نشان داد صرفنظر از مقاومت سویه‌ها به ایمیپنم، ۴۳ درصد حاوی ژن VIM هستند. از این تعداد ۶ سویه در روش فنوتیپی منفی بودند و ۱۴ سویه که با روش فنوتیپی تولید کننده متالو بتالاکتاماز بودند با روش PCR منفی بودند. در مورد اول شاید روش فنوتیپی بکار گرفته شده حساسیت کافی ندارد و در مورد دوم نیز شاید باکتری‌ها دارای ژنهایی غیر از VIM هستند و یا از مکانیسم‌های مقاومت دیگری استفاده می‌کنند.

در مطالعه شاهچراغی (۳۱) ۱۶ سویه (۲۳/۵درصد) با روش PCR متالو بتالاکتاماز مثبت بودند (حاوی ژن VIM) که ۱۲ سویه با روش فنوتیپی مثبت و ۴ سویه با روش فنوتیپی منفی بودند. این مطالعه بر روی سویه‌های جدا شده از عفونت های مختلف انجام شده است. در مطالعه خسروی۸ سویه (۱۹/۵۱٪) از سویه‌های *P. aeruginosa* جدا شده از زخم‌های سوختگی حاوی ژن VIM هستند. تمام سویه‌ها با E-text نیز تولید کننده متالو بتالاکتاماز می‌باشند(۲۹). در مطالعه حاضر میزان سویه‌های متالو بتالاکتاماز مثبت (فنوتیپی و ژنوتیپی) بیشتر از دو مطالعه فوق می‌باشد، که نشان دهنده افزایش میزان سویه‌های تولید کننده متالو بتالاکتاماز است.

نتیجه‌گیری:

مطالعه نشان داد سویه‌های *P. aeruginosa* مقاومت بالایی به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. تولید متالو بتالاکتاماز در سویه‌های جدا شده از بیماران سوختگی پیش از انتظار شایع است.

به دلیل افزایش شیوع بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف درباکتری‌های گرم منفی به‌ویژه *پسودوموناس آئروژینوزا* در بیمارستان‌ها و باتوجه به اینکه باکتری‌های مقاوم می‌توانند ژن‌های مقاومت را به سایر باسیل‌های گرم منفی، از جمله انتروباکتریاسه، انتقال دهند (۱۸)، طرحی نو جهت مبارزه با گسترش سویه‌های تولید کننده متالوبتالاکتاماز اهمیت فوری دارد. از این بین می‌توان به اقدامات تشخیصی در آزمایشگاه‌های بیمارستان‌ها جهت جداسازی و تشخیص این سویه‌ها اشاره کرد .

تقدیر وتشکر:

از کارکنان محترم گروهای میکروب‌شناسی، ژنتیک و آزمایشگاه بیمارستان سوانح وسوختگی امام موسی کاظم(ع) دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به خصوص آقای دکتر بهرام نصر اصفهانی، آقای دکتر سروش نیا و خانم گیلدا امینی سپاسگذاری می‌گردد. از کارکنان محترم گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران تشکر و قدردانی می‌شود.

فهرست مراجع:

1. Rastegar Lari A, laghehbandan A, Nosocomial infections in a Iranian burn care center. *Burns* 2000; **26**: 737-740.
2. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R, Burn wound infections *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**(2):403-34.
3. Bielecki A, Glik J, kawecki M, Martinsdos santos, VAP. Towards understanding *pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression. *Biotechnol lett* 2008; **30**: 777-790.
4. Alexander JW, Mechanism of immunologic suppression in burn injury. *J Trauma* 1990;**30**(12 Suppl): 70-5.
5. Griswold JA. White blood cell response to burn injury. *Semin Nephrol* 1993;**13**(4):409-15.
6. Hansbrough J. F, Field, Jr. T O, Gadd M A, Soderberg C. Immune response modulation after burn injury: T cells and antibodies. *J. Burn Care Rehabil* 1987; **8**:509–512.
7. Heideman M, Bengtsson A. The immunologic response to thermal injury. *World J Surg* 1992;**16**(1):53-6.
8. Lederer J. A, Rodrick M. L, Mannick J A. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock.* 1999;**11**:153–159.
9. Barret JP, Herndon DN. Effects of burn wound excision on bacterial colonization and invasion. *Plast Reconstr Surg* 2003;**111**(2):744-50.
10. Erol S, Altoparlak U, Akcay MN, Celebi F, Parlak M. Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. *Burns* 2004;**30**(4):357-61.
11. Manson WL, Klasen HJ, Sauer EW, Olieman A. Selective intestinal decontamination for prevention of wound colonization in severely burned patients: a retrospective analysis. *Burns* 1992;**18**(2):98-102.
12. Manson WL, Pernot PC, Fidler V, Sauer EW, Klasen HJ. Colonization of burns and the duration of hospital stay of severely burned patients. *J Hosp Infect*. 1992;**22**(1):55-63.
13. Nasser S, Mabrouk A, Maher A. Colonization of burn wounds in Ain Shams University Burn Unit. *Burns* 2003;**29**(3):229-33.
14. Wysocki AB. Evaluating and managing open skin wounds: colonization versus infection. *AACN Clin Issues* 2002;**13**(3):382-97.
15. Altoparlaku, Erols, Akcay MN, Celebi F, Kadanali A. The time-related changes of antimicrobial ressitancc patterns and predominant bacterial profiles of burn woundsawski, and body flora of burned patients. *Burns* 2004; **30**(7): 660-664.
16. Rastegar LA, Bahrami, H H, and Alaghehbandan, R. Pseudomonas infection in Tohid Burn center, Iran. *Burns*.1998;**24**: 637-641.
17. Salami H, owlia P, Yakhchali B, Rastegar lari A. Drug susceptibility and molecular epidemiology of *pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn unit. J infect Dis 2009;**5**(4): 308-313.
18. Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad SH. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the south of Iran. *Burns* 2006; 32: 343-7.
19. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for Differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. *J Clin Microbiol* 2003;**41**(10):4623-9.
20. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, and et al. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol* 1996;34(12):2909-13.
21. Anne merie Queenan and Karen Bush. carbapenemases: the versatile B-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007; **20**(3): 440 – 458.
22. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005;**43**(7):3129-35.
23. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. *J Clin Microbiol* 2002;**40**(10):3798-3801.
24. Sacha P, Wieczorek P, Hauschild T, Zorawski M, Olszanska D, Tryniszewska E. Metall0- B-Lactamases of *psoudomonas aeruginosa* a novel mechanism resistance to B-lactam antibiotics. *Folia Histochemica et cytobiologica* 2008;**46**(2): 137-142.
25. Saderi H, Karimi Z, Owlia P, Bahar A A, Akhavi Rad S M B. Phenotypic Detection of Metallo- beta- lactamase producing

pseudomonas aeruginosa strain Isolated from Burned patients. *Iran J path*ol 2008;**3**(1): 20-24.

26.Hirajata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, et al. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo- B-lactamase producing *paseudomonas aeruginosa. Clin infect Dis*. 2003;**37**: 26-32.

۲۷. میر صالحیان ا ,فیض آبادی م, اکبری نخجوانی ف, جبل عاملی ف, گلی ح. فراوانی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در ایزوله‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* در بیماران سوختگی . *مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران* .مرداد۱۳۸۷ دوره۶۶ شماره۵:صص ۳۳۳ تا۳۳۷.

28. Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 ;**60**(1):125-8.

29. Aoki S, Hirakata Y, Kondoh A, Gondoh N, Yanagihara K, Miyazaki Y ,*et al*.Virulence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* In vitro.*Antimicrob.Agents Chemothe*r 2004;**48**:1876-1878.

30.Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm*?. Clin Microbiol Rev* 2005;**18**(2):306-25.

31.Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Identification and genetic characterization 0f metallo – beta- lactamase producing strains of *pseudomonas aeruginosa* in Teharan. Iran. *New microbiologyica* (in press).