مقاله پژوهشی

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم در باکتری های ایزوله شده از دستگاه تنفسی فوقانی بزرگسالان بستری در بیمارستان شهید باهنر کرمان

نویسندگان:

زکیه صیفوری[1]، نادیا کاظمی پور[1]*

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.17, No.4, Winter 2020

چکیده:

مقدمه: عفونت تنفسی فوقانی از شایع ترین عفونت های باکتریایی در انسان و دومین دلیل تجویز بالای آنتی‌بیوتیک‌ها است. روند صعودی مقاومت آنتی بیوتیکی یک چالش جهانی محسوب می شود. این پژوهش با هدف بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های ایزوله شده از دستگاه تنفسی فوقانی بیماران بزرگسال بستری در بیمارستان شهید باهنر کرمان انجام گرفت.

روش کار: در این پژوهش ۷۰ نمونه تنفسی کشت داده شده از آزمایشگاه بیمارستان شهید باهنر کرمان در یک بازه زمانی سه ماهه دریافت شد. سپس بررسی و تشخیص باکتری ها با آزمون های بیوشیمیایی متداول و آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار دیسک انجام شد. با تعیین درصد چسبندگی سطحی ایزوله ها، تشکیل بیوفیلم روی سطوح شیشه ای و پروپیلن در شرایط تکان و ثابت بررسی شد.

یافته ها: تعداد ۵۹ باکتری ایزوله شده به ترتیب شامل: استافیلوکوکوس آرئوس (۳۷/۲۸ درصد)، کلبسیلا پنومونیه (۲۰/۳۳ درصد)، سودوموناس آئروژینوزا (۱۶/۹۴ درصد)، اشرشیا کلی (۶/۷۷ درصد)، استرپتوکوکوس پایوژنز (۵/۰۸ درصد) و سراشیا مارسسنس، پروتئوس میرابیلیس، کورینه باکتریوم دیفتریه و گونه‌های سیتروباکتر (۳/۳۸ درصد) بودند. بیشترین موارد مقاومت آنتی بیوتیکی به تتراسایکلین و بیشترین موارد حساسیت به جنتامایسین مشاهده شد. توان تولید بیوفیلم بر سطح پروپیلن و در حالت متحرک جذب بیشتری نشان داد.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، بین مقاومت آنتی بیوتیکی و توان تولید بیوفیلم در ایزوله‌ها ارتباط مستقیمی مشاهده شد. می‌توان با ارزیابی الگوی حساسیت آنتی بیوتیک‌ها و توسعه روش های درمانی جدید، برنامه ای هدفمند و موثر تدوین کرد.

واژگان کلیدی: عفونت دستگاه تنفسی فوقانی، مقاومت آنتی بیوتیکی، چسبندگی سطحی، بیوفیلم

Pars J Med Sci 2020;17(4):17-25

مقدمه:

عفونت دستگاه تنفسی فوقانی رایج‌ترین عفونت در میان عموم مردم به شمار می‌رود. متوسط سالیانه ابتلا آن در کودکان ۶ تا ۸ بار و در بزرگسالان ۲ تا ۴ بار است [۲،۱]. این نوع عفونت بینی، سینوس‌ها، حلق و حنجره را تحت تأثیر قرار می‌دهد. آنتی‌بیوتیک‌ها می توانند برای درمان سینوزیت و عفونت گوش میانی حاد استفاده شوند. ازجمله باکتری‌های شایع در این عفونت می‌توان به استافیلوکوکوس آرئوس، سودوموناس آئروژینوزا، استرپتوکوکوس پایوژنز و کورینه باکتریوم دیفتریه و برخی اعضای خانواده بزرگ انتروباکتریاسه مانند کلبسیلا پنومونیه، سراشیا مارسنس، اشرشیا کلی، پروتئوس میرابیلیس، گونه‌های سیتروباکتر و ... اشاره کرد [۵،۴،۳]. استافیلوکوکوس اورئوس مهم‌ترین پاتوژن خانواده میکروکوکاسیه محسوب می‌شود که عامل بیش از ۸۰ درصد از موارد بیماری‌های چرکی و دومین عامل عفونت‌های بیمارستانی است. استافیلوکوکوس اورئوس همچنین یکی از عوامل ایجاد کننده عفونت‌های دستگاه تنفسی مانند پنومونی است [۷،۶]. بیش از ۱۵درصد موارد التهاب

* نویسنده مسئول، نشانی: گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

تلفن تماس:۰۹۱۳۴۴۰۹۱۶۵-۰۳۴۳۱۳۲۱۳۳۴ پست الکترونیک:nadia_kazemi@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۲۴ اصلاح: ۱۳۹۸/۱۲/۰۶ پذیرش:۱۳۹۸/۱۲/۲۵

گلویی حاد باکتریایی، عموماً ناشی از گروه اول استرپتوکوکوس‌ها است. اهمیت استرپتوکوکوس پنومونیه در بیماری های پنومونی، مننژیت، اوتیت و سینوزیت می‌باشد [۱۰،۹،۸].

کلبسیلا، به ویژه کلبسیلا پنومونیه به عنوان یک هم سفره طبیعی در دهان و دستگاه تنفسی فوقانی زندگی می‌کند. با این حال، زمانی که کلبسیلا به جاهای دیگر منتقل می‌شود، باعث بیماری زایی می شود و معمولاً با زخم‌ها و عفونت‌های تنفسی مرتبط است. کلبسیلا پنومونیه باعث ایجاد ذات الریه شدید به ویژه در بیماران با استفاده از تهویه مکانیکی می‌شود [۱۲،۱۱]. سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند باعث عفونت‌های جدی مانند سپتی سمی، پنومونی، اندوکاردیت، اوتیت و کراتیت شود. درمان سودوموناس آئروژینوزا زمانی که در راه‌های هوایی بیماران تشکیل بیوفیلم می‌دهد بسیار مشکل است. عفونت های تنفسی که توسط این باکتری ایجاد می‌شود بیشتر در افراد با سیستم ایمنی تضعیف شده و یا افراد با مجاری تنفسی دارای مشکل رخ می‌دهد. پنومونی ابتدایی در بیماران با بیماری مزمن ریوی رخ می‌دهد. پنومونی باکتریایی در بیماران مبتلا به سرطان نوتروپنیک و تحت شیمی درمانی وجود دارد. کلونیزاسیون ضعیف مجاری تنفسی در بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک توسط سویه‌های موکوئیدی سودوموناس آئروژینوزا رایج و درمان آن به سختی امکان‌پذیر است [۱۳]. کورینه باکتریوم دیفتریه باسیل گرم مثبتی است که می‌تواند روی غشاهای مخاطی دستگاه تنفس فوقانی و در زخم‌های پوستی رشد کرده و شامل دو گروه بیماری‌زا و غیربیماری‌زا است. گروه غیربیماری‌زا را تحت عنوان دیفتروئیدها می‌شناسند که به صورت فلور طبیعی در بینی، گلو، دستگاه تنفسی وجود دارند [۱۵،۱۴].

باکتری‌های گرم منفی روده‌ای مانند اشریشیا کلی و سراشیا مارسنس، پروتئوس میرابیلیس و سیتروباکتر ساکنین طبیعی مجرای تنفس نبوده و افزایش تعداد آن‌ها در افراد بستری در بیمارستان و افراد با ضعف سیستم ایمنی دیده می‌شود. از لحاظ اتیولوژی، پنومونی بیمارستانی می‌تواند چند میکروبی باشد و از بین آن‌ها باسیل های گرم منفی شایع‌ترین مورد هستند که تا ۶۰ درصد موارد پنومونی را باعث می‌شوند [۱۷،۱۶].

آنتی‌بیوتیک‌ها ابزارهای قدرتمندی در دست بشر هستند که پزشکی مدرن با کمک آن‌ها ممکن شده است. از سوی دیگر، استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌ها موجب انباشته شدن ژن‌های مقاومتی و همچنین شناسایی راه‌های جدید مقابله با آن‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها شده است [۱۸،۱۶] . مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پاتوژن‌های باکتریایی یک چالش محسوب می‌شود که با عوارض و مرگ و میر بالا همراه است. بین مقاومت آنتی میکروبی در عفونت‌های بیمارستانی و مصرف آنتی‌بیوتیک ارتباط مستقیمی وجود دارد و با افزایش مصرف سالیانه آنتی بیوتیک‌ها، میزان مقاومت نیز افزایش می یابد [۲۰،۱۹،۱۸،۱۶]. گزارش‌های متعدد حاکی از آن است که روند مقاومت آنتی بیوتیکی در نقاط مختلف دنیا به صورت جدی بررسی می‌شود و متاسفانه در بین باکتری‌های بیماری‌زا رو به افزایش است. در مطالعات مختلف انجام شده در شهرهای مختلف کشور مشخص شده که الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های عامل عفونت دستگاه تنفسی در مکان‌ها و زمان‌های مختلف متفاوت بوده و در هر منطقه جغرافیایی و زمان‌های مختلف نیازمند بررسی است [۹،۸،۶،۳،۲،۱]. بیوفیلم باکتریایی تجمع پیچیده باکتری‌ها هستندکه در یک پوشش گلیکوکالیکس محصورشده و به سطوح مختلف از جمله مخاط می‌چسبند. تشکیل بیوفیلم در گونه های مختلف باکتری‌ها مشاهده شده است. مهمترین خاصیت متمایز بیوفیلم‌ها تفاوت در میزان تولید و توسعه آن‌ها است که سبب افزایش مقاومت داروئی می‌شود [۱]. بیوفیلم به دلیل طبیعت مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌ها و بیماری‌های مرتبط با دستگاه‌های پزشکی یک مشکل بزرگ برای سلامت عمومی محسوب می‌شود [۲۱]. طبق گفته مؤسسه ملی بهداشت، حدود ۶۵ درصد از همه عفونت های میکروبی و ۸۰ درصد از تمام عفونت‌های مزمن با بیوفیلم همراه است. از آن جایی که مقاومت آنتی بیوتیکی به بیوفیلم وابسته است، بیوفیلم‌ها در مقاومت دارویی نیز دخیل هستند و می‌توانند مشکلاتی را برای کنترل عفونت ایجاد کنند [۲۰،۲،۱].

به دلیل اهمیت عفونت های دستگاه تنفسی و همچنین تجویز و مصرف بی‌رویه و نامناسب آنتی‌بیوتیک‌ها و ارتباط آن با فزایش توان تولید بیوفیلم، این پژوهش با هدف تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های ایزوله شده از دستگاه تنفسی فوقانی در بیماران بزرگسال بستری در بیمارستان شهید باهنر کرمان از بهمن ماه ۱۳۹۷ به مدت سه ماه انجام شد.

روش کار:

در این پژوهش در یک بازه زمانی سه ماهه از ابتدای بهمن ۱۳۹۷ تا پایان فروردین ۱۳۹۸ به صورت تصادفی نمونه های دستگاه تنفسی فوقانی بیماران بزرگسال (۵۵ تا ۷۵ سال) بستری شده در بیمارستان شهید باهنر کرمان که روی پلیت کشت داده شده بودند، از آزمایشگاه بیمارستان دریافت و به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه منتقل شدند [۲۲]. لازم به ذکر است که نویسندگان پژوهش حاضر به طور مستقیم با هیچ یک از بیماران در تماس نبوده و به اطلاعات آن‌ها دستیابی نداشته اند. نمونه ها روی محیط‌های بلاد آگار، مک کانکی آگار، ائوزین متیلن بلو و نیز محیط‌های انتخابی– افتراقی (شرکت مرک – آلمان) جهت به

دست آمدن تک کلنی به روش سه شعله کشت داده شدند. سپس شناسایی باکتری‌ها با رنگ‌آمیزی گرم، رنگ آمیزی آلبرت، بررسی میکروسکوپی و آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی (اکسیداز، کاتالاز، کواگولاز، پتاس ۳٪، همولیز، تی اِس آی، سیمون سیترات، اِس آی اِم، دزاکسی ریبونوکلئاز و ...) انجام گرفت. سپس باکتری‌ها به روش گلیسرول استوک در محیط تریپتیک سوی براث (مرک – آلمان) و گلیسرول در ۷۰ – درجه سانتی‌گراد برای انجام مراحل بعدی مطالعه ذخیره شدند [۸،۱۴،۲۱].

آزمون تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار از دیسک منطبق با اصول کمیته بین المللی بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) [۲۹]، برای ۵ دیسک آنتی بیوتیکی، شامل آموکسی سیلین (µg ۱۰)، سیپروفلوکساسین (µg ۵)، جنتامایسین (µg ۱۰)، تتراسایکلین (µg ۳۰) و وانکومایسین (µg ۱۰) (شرکت پادتن طب– ایران) بررسی شد. سویه کنترل به کاررفته در تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار از دیسک، اشریشیاکولی ATCC25922 بود. ابتدا از هر ایزوله کشت ۲۴ ساعته تهیه شد و سپس غلظت معادل استاندارد نیم مک فارلند آماده شد. از سوسپانسیون باکتریایی به دست آمده یک دهم سی سی به پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار (های مدیا– هندوستان) منتقل و توسط سواپ استریل کشت متراکم انجام شد. در ادامه دیسک‌های آنتی بیوتیکی که به دمای اتاق رسیده بودند، با پنس استریل با فواصل منظم و یکنواخت به محیط کشت منتقل شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۸–۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از اتمام مدت انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد در آن‌ها بررسی و نتایج به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش شد [۱،۱۹،۲۰].

تعداد ۱۳ ایزوله با بیشترین مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های مورد بررسی، برای تعیین چسبندگی سطحی باکتریایی انتخاب شدند. پس از کشت ایزوله های مقاوم در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با توان ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت، ۱سی سی از کشت مایع به ۹ سی سی نوترینت براث افزوده و بار دیگر به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرارداده شد. سپس ۲ سی سی از سوسپانسیون میکروبی درون کووت ریخته و جذب نور آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد (نمونه A). در ادامه از کشت های ۲۴ ساعته فوق، بار دیگر ۳ سی سی برداشته و با زایلین مخلوط و ۵ دقیقه ورتکس شدند و سپس ۱۵ دقیقه در حالت ثابت قرار گرفتند. بعد از آن جذب مایع انتهایی لوله توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد (نمونه B). از سویه‌های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا PAO1 و اشریشیا کلی HB101 به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد [۲۲]. در پایان میزان چسبندگی هر نمونه با استفاده از فرمول شاخص هیدروفوبیسیتی (HI:A600nm-B600nm/A600nm×100) در طول موج ۶۰۰ نانومتر محاسبه شد. آزمون t با سطح معنا داری ۰/۰۵ انجام شد [۲۲].

تعداد سه سویه با شاخص هیدروفوبیسیتی بالای۷۰ درصد به عنوان هیدروفوبیک قوی و دو سویه با شاخص هیدروفوبیسیتی کم تر از ۳۰ درصد به عنوان هیدروفوبیک ضعیف برای تعیین توان تولید بیوفیلم روی دو سطح شیشه و پروپیلن در دو حالت متحرک و ثابت در نظر گرفته شدند. مقدار ۱ سی‌سی از سوسپانسیون میکروبی ۲۴ ساعته، به ۹ سی‌سی محیط نوترینت براث یک دوم (یک دوم از مقدار محیط کشت لازم به ازاء ۱۰۰۰ سی‌سی آب) افزوده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. پس از آن شستشو با آب مقطر استریل انجام شد و رنگ آمیزی با کریستال ویوله صورت گرفت. پس از افزودن اتانول ۹۵ درصد، جذب نور آن ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد [۲۱،۲۲]. بررسی تشکیل بیوفیلم روی سطح شیشه‌ای و پروپیلن با میکروسکوپ نوری انجام شد [۲۲].

یافته‌ها:

در این پژوهش از تعداد ۷۰ نمونه کشت داده شده از بیماران مبتلا به عفونت های تنفسی در طی یک دوره ۳ ماهه، ۵۹ ایزوله باکتریایی جدا سازی شد. بیشترین فراوانی ایزوله های شناسایی شده مربوط به استافیلوکوکوس آرئوس با ۲۲ مورد و پس از آن کلبسیلا نمونیه با ۱۲ مورد، سودوموناس آئروژینوزا با ۱۰ مورد، اشریشیاکلی با ۴ مورد، استرپتوکوکوس پنومونیه با ۳ مورد و سراشیا مارسنس، پروتئوس میرابیلیس، کورینه باکتریوم دیفتریه و سیتروباکتر هر کدام با ۲ مورد بود. ترتیب و درصد شیوع میکروارگانیسم ها در جدول ۱ آورده شده است.

میزان مقاومت پاتوژن‌های جداسازی شده از دستگاه تنفسی بیماران نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف به تفکیک جنس باکتری در جدول ۲ آورده شده است. بر اساس یافته های به دست آمده، تمامی ایزوله ها به استثنا سراشیا مارسسنس نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین مقاومت ۱۰۰درصد را نشان دادند و به استثنای استافیلوکوکوس ارئوس، کلبسیلا نمونیه، استرپتوکوکوس نمونیه و سراشیا مارسنس بیشترین میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین مشاهده شد. در این پژوهش سوش‌های استافیلوکوکس آرئوس به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت ۸۰ درصد یا بالاتر نشان دادند. در رابطه با سوش‌های اشریشیا کلی بیشترین میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰۰ درصد) مشاهده شد. در بررسی سوش‌های

استرپتوکوکوس نمونیه، حساسیت‌به آموکسی‌سیلین‌و ونکومایسین ۱۰۰ درصد بود. در این پژوهش از ۱۰ سوش سودوموناس آئروژینوزای مورد بررسی، بالاترین میزان مقاومت را نسبت به آموکسی‌سیلین، تتراسایکلین و ونکومایسین (۱۰۰ درصد) و بالاترین میزان حساسیت را نسبت به جنتامایسین (۱۰۰درصد) نشان دادند. سوش‌های کلبسیلا نمونیه نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت ۱۰۰ درصد نشان دادند. در سوش‌های سراشیا مارسنس، بالاترین حساسیت به سیپروفلوکساسین و تتراسایکلین (۱۰۰ درصد) گزارش شد. در بررسی نتایج، سوش‌های پروتئوس میرابیلیس و کورینه باکتریوم دیفتریه به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و ونکومایسین حساسیت کامل (۱۰۰ درصد) و به آنتی بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، سیپروفلوکساسین و تتراسایکلین مقاومت کامل (۱۰۰درصد) نشان دادند.

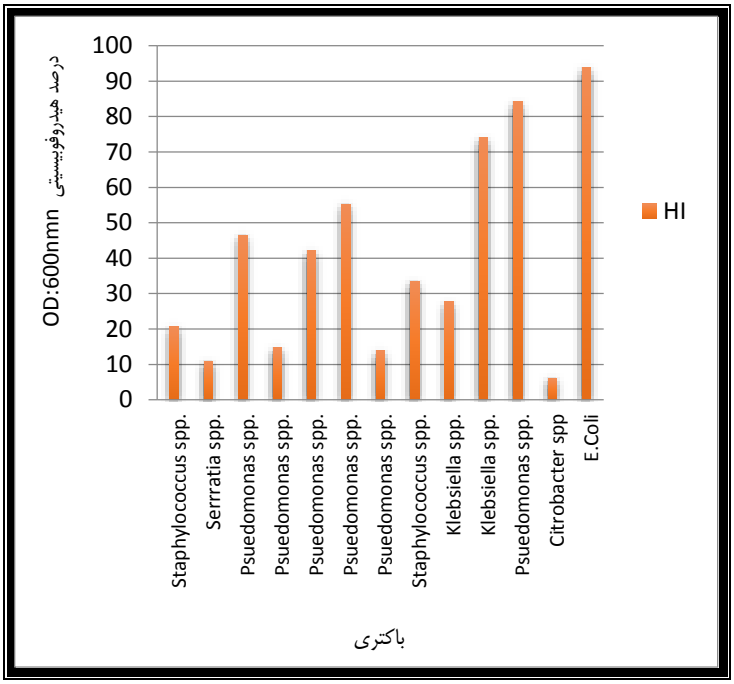
پس از تعیین میزان چسبندگی سطحی برای ۱۳ ایزوله با بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی، ۳ ایزوله (۲۳/۰۷ درصد) باشاخص هیدروفوبیسیتی بالای ۷۰ درصد و ۶ ایزوله (۴۶/۱ درصد) با هیدروفوبیسیتی کمتر از۳۰ درصد و ۴ ایزوله (۳۰/۷ درصد) با قدرت متوسط (حد فاصل۷۰٪-۳۰٪) مشاهده شد (نمودار ۱). در تعیین توان تشکیل بیوفیلم توسط سه ایزوله با هیدروفوبیسیتی بالای۷۰ درصد و دو ایزوله با هیدروفوبیسیتی کمتر از ۳۰ درصد، روی سطوح پروپیلن و شیشه در دو حالت سکون و متحرک بیشترین جذب نور مربوط به ایزوله اشریشیا کلی با شاخص هیدروفوبیسیتی ۹۳/۸ درصد، با میزان ۰/۳۰۳ نانومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر و کمترین میزان جذب نور برای ایزوله سراشیا مارسنس با شاخص هیدروفوبیسیتی ۱۱ درصد، با میزان ۰/۱۱۸ نانومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر بود. در بررسی نهایی، توان تولید بیوفیلم روی سطح پروپیلن در حالت تکان نسبت به سطح شیشه در حالت سکون افزایش داشت (نمودار ۲ و شکل ۱).

جدول ۱: توزیع فراوانی باکتری های جدا شده از کشت نمونه های دستگاه تنفسی فوقانی بزرگسالان بستری در بیمارستان شهید باهنر کرمان

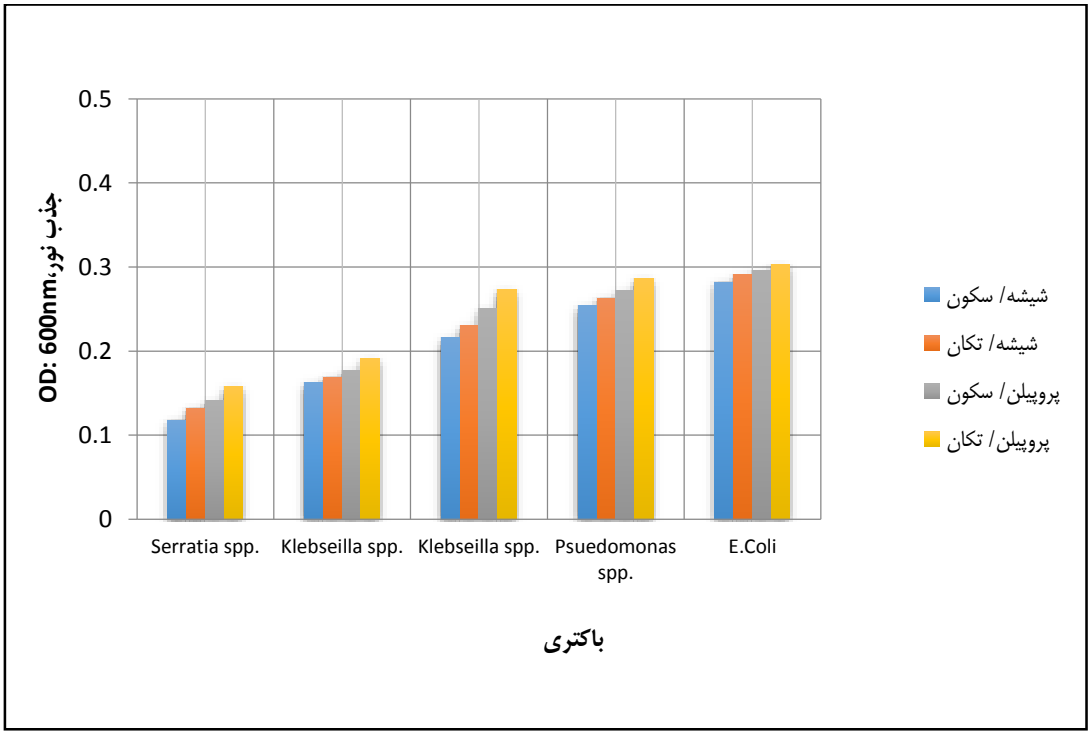
ردیف	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
باکتری	استافیلوکوکوس ارئوس	کلبسیلا پنومونیه	سودوموناس آئروژینوزا	اشریشیا کلی	استرپتوکوکوس نمونیه	سراشیا مارسنس	پروتئوس میرابیلیس	کورینه باکتریوم دیفتریه	سیتروباکتر
فراوانی	۲۲	۱۲	۱۰	۴	۳	۲	۲	۲	۲
درصد	۳۷/۲۸	۲۰/۳۳	۱۶/۹۴	۶/۷۷	۵/۰۸	۳/۳۸	۳/۳۸	۳/۳۸	۳/۳۸

جدول ۲: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های جدا شده از کشت نمونه های دستگاه تنفسی نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف

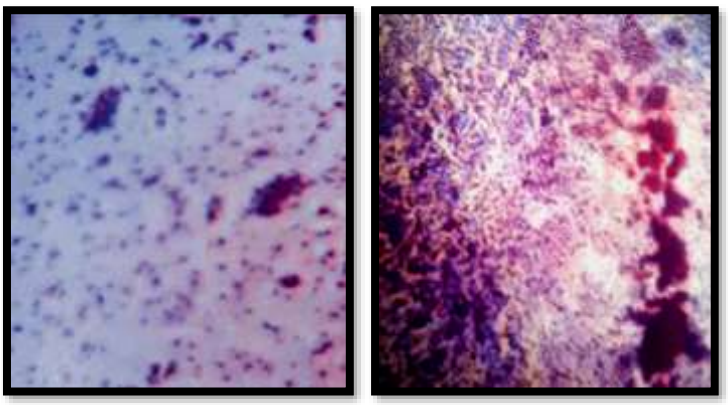
ردیف	باکتری	آنتی بیوتیک				
		آموکسی سیلین (٪)	سیپروفلوکساسین (٪)	جنتامایسین (٪)	تتراسایکلین (٪)	ونکومایسین (٪)
۱	استافیلوکوکوس ارئوس	۸۳	۱۰۰	۸۰	۱۰۰	۸۵
۲	کلبسیلا پنومونیه	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۳	سودوموناس آئروژینوزا	۱۰۰	۱۶	۰	۱۰۰	۱۰۰
۴	اشریشیا کلی	۱۰۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۱۰۰
۵	استرپتوکوکوس پنومونیه	۰	۱۰۰	۶۶	۱۰۰	۰
۶	سراشیا مارسنس	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰
۷	سیتروباکتر	۱۰۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۱۰۰
۸	پروتئوس میرابیلیس	۱۰۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰
۹	کورینه باکتریوم دیفتریه	۱۰۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰



نمودار۱: درصد هیدروفوبیسیتی ایزوله های منتخب در طول موج ۶۰۰ نانومتر



نمودار ۲ : مقایسه جذب نور نمونه ها در لوله های شیشه ای و پروپیلن در شرایط سکون و تکان در ۶۰۰ نانومتر



(ب) (الف)

شکل ۱: نمای میکروسکوپی تشکیل بیوفیلم الف) بر سطح پروپیلن ب) بر سطح شیشه

بحث:

با توجه به پژوهش‌هایی که در سال‌های اخیر در زمینه عفونت‌های تنفسی انجام شده است، باکتری‌های متعددی از گرم مثبت‌ها و گرم منفی‌ها، مسبب ایجاد این نوع عفونت‌ها بوده‌اند. به دلیل شایع بودن این نوع عفونت‌ها و تجویز گسترده آنتی‌بیوتیک‌های نامناسب، افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی نیز شده است. عفونت دستگاه تنفسی فوقانی دومین دلیل افزایش تجویز هر ساله آنتی بیوتیک‌ها است [۱،۵،۲۳].

این پژوهش با هدف تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های ایزوله شده از دستگاه تنفسی فوقانی در بیماران بزرگسال بستری در بیمارستان شهید باهنر کرمان انجام شد. نتایج حاکی از شیوع بالای استافیلوکوکوس آرئوس (۴۱/۵۰ درصد) و به دنبال آن کلبسیلا پنومونیه (۲۲/۶۴ درصد)، سودوموناس آئروژینوزا (۱۸/۸۶ درصد)، اشرشیاکلی (۷/۵۴ درصد)، استرپتوکوکوس پایوژنز (۵/۶۶ درصد) و سراشیا مارسنس، پروتئوس میرابیلیس، کورینه باکتریوم دیفتریه و سیتروباکتر هر کدام به میزان (۱/۸۸ درصد) است. این نتایج با نتایج پژوهش اسماعیلی و همکاران [۲۰] و همچنین شور و همکاران [۲۳] و بسیاری دیگر از پژوهش‌ها در داخل و خارج از کشور [۱۵،۱۴،۱۲،۸] هم‌خوانی دارد. در مطالعه رئیسی و همکاران در سال ۲۰۱۴، استافیلوکوکوس آرئوس بالاترین میزان شیوع در عفونت‌های تنفسی را به خود اختصاص داد. در این میان، میزان مقاومت نسبت به جنتامایسین (۶۶/۱۶ درصد)، تتراسایکلین (۳۳/۵۸ درصد)، سیپروفلوکساسین (۲۵ درصد) و ونکومایسین (۵ درصد) گزارش شده که با نتایج پژوهش حاضر از نظر مقاومت آنتی بیوتیکی مغایرت دارد. دلیل این تفاوت می‌تواند با نوع تجویز، میزان آنتی‌بیوتیک‌ها، انتقال ژن‌های مقاوم باکتری‌ها و زمان مطالعه مرتبط باشد [۶]. در بررسی اسلامی و همکاران [۲۴]، یوسفی و همکاران [۲۵]، دیدگر و همکاران [۵] و فیض آبادی و همکاران [۲۶] در تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های کلبسیلا پنومونیه حساسیت به سیپروفلوکساسین (۷۰٪) گزارش شد که مشابه با نتایج پژوهش حاضر حاکی از روند رو به رشد مقاومت به سیپروفلوکساسین در کلبسیلا نومونیه است.

در مطالعه نوری طلب و همکاران [۲۷]، سودوموناس با (۳۲/۶ درصد) در رتبه اول و استافیلوکوک اورئـوس در رتبه بعد از نظر فراوانی قـرار داشـت که با نتیجه پژوهش حاضر مغایرت دارد و این تفاوت مـی‌توانـد ناشی از اختلاف شیوع جغرافیایی باشـد. در مورد دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه نیز نتایج مشابه یا متفاوتی با دیگر پژوهشگران مشاهده شد که می‌تواند ناشی از ویژگی‌های بومی هر منطقه، روش به کار رفته برای تعیین میزان حساسیت و عوامل دخیل در ایجاد مقاومت دارویی باشد. در مجموع تمام ایزوله‌ها مورد بررسی در مطالعه حاضر دارای مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک های مختلف بودند که این خود خطر استفاده بی رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها را در جامعه دو چندان می‌کند. کوسالیا و همکاران در هند [۱۴] با ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های دستگاه تنفسی فوقانی، حساسیت به آنتی بیوتیک جنتامایسین را همچنان بالا گزارش کردند که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد. همچنین در بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی در میان خانواده انتروباکتریاسه مولد عفونت‌های دستگاه تنفسی، مقاومت چند آنتی بیوتیکی مشاهده شد که یک تهدید در حال افزایش برای بیماران بستری در بیمارستان بوده و می‌تواند با افزایش مصرف سالیانه آنتی بیوتیک‌ها در ارتباط باشد. در بررسی های رنک و همکاران [۱۶] و اسماعیلی و همکاران [۲۰] نیز این مطلب تایید شد.

همچنین مطالعه حاضر نشان داد که توان تولید بیوفیلم بر سطح پروپیلن و در حالت هوادهی متحرک نسبت به سطح شیشه و در حالت سکون، افزایش دارد که با نتایج پژوهش های کاظمی پور

و همکاران [۲۲]، پویان و همکاران [۲۱] و اسلام طلب و همکاران [۲۸] مشابه است. در مطالعات مختلفی که در ایران و سایر نقاط جهان انجام شده است بین توان تولید بیوفیلم و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارتباط مستقیمی مشاهده شده است که با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد [۲۳،۱۶،۵،۴]. در این پژوهش همچنین با تعیین درصد هیدروفوبیسیتی، به ترتیب ۲۳/۰۷٪، ۴۶٪/۱ و ۳۰/۰۷٪ از ایزوله ها قادر به تشکیل بیوفیلم به صورت قوی، متوسط و یا ضعیف بودند که موافق با پژوهش پویان و همکاران و کاظمی و همکاران حاکی از توان ایزوله های مولد عفونت دستگاه تنفسی فوقانی در تولید بیوفیلم و به دنبال آن شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی بود.

در مقایسه نتایج این پژوهش با سایر مطالعات، تفاوت هایی در بعضی موارد به چشم می‌خورد که می‌تواند ناشی از خطای آزمایش باشد. به بیان دیگر، در تأثیر صحیح آنتی بیوتیک ها روی باکتری و تعیین فرم‌های حساس و مقاوم باکتری‌ها به صورت‌آزمایشگاهی مواردی همچون نوع دیسک آنتی‌بیوتیک مورد بررسی، عمق و ترکیبات محیط کشت نقش عمده ای داشته و می توانند مقادیر مقاومت را دستخوش تغییرات کاذب کنند. علاوه بر این، توزیع سوش های مقاوم در مناطق جغرافیایی می‌تواند به دلیل شرایط اقلیمی و مصرف بیش از حد آنتی بیوتیک در آن منطقه باشد [۳۱،۳۰،۱۱].

نتیجه‌گیری:

در مجموع، نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مقایسه آن با سایر پژوهش‌های انجام شده در ایران و جهان نشان می‌دهد که اکثر سویه‌های جدا شده از عفونت‌های تنفسی فوقانی در بزرگسالان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های معمول مورد استفاده در درمان عفونت‌های تنفسی مقاوم هستند.

عدم مصرف صحیح آنتی بیوتیک‌ها از یک سو و گسترش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی از سوی دیگر باعث ازدیاد گونه های مقاوم به آنتی بیوتیک و افزایش مرگ و میر ناشی از آن‌ها خواهد شد. عفونت‌های دستگاه تنفسی فوقانی از جمله سرماخوردگی به عنوان یک مورد اصلی مصرف آنتی بیوتیک‌ها در درمان‌های سرپایی می تواند با استفاده بی‌رویه از آنتی بیوتیک‌ها همراه بوده و علاوه بر تحمیل هزینه‌های مالی و عوارض دارویی، سبب افزایش هر چه بیشتر موارد مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها نیز شود. ایجاد یک برنامه هدفمند و کاربردی به منظور توسعه ابزارهای تشخیصی و خدمات درمانی و ارزیابی الگوی حساسیت باکتری ها برای تشخیص به موقع بیماری و انجام درمان مناسب، رعایت نکات ایمنی و بهداشتی در محیط های درمانی، افزایش آگاهی مردم در جهت مصرف صحیح و جلوگیری از مصرف خودسرانه و بی رویه آنتی بیوتیک‌ها و همچنین تجویز درست و منطقی آنتی بیوتیک‌ها برای کاستن بار بیماری، پیشگیری از مقاومت آنتی بیوتیکی و جلوگیری از مرگ و میر ناشی از آن، پیشنهادی کار آمد برای حل این معضل است.

نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در انتخاب آنتی بیوتیک مناسب در درمان و جلوگیری از گسترش بیشتر مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها در شهرستان کرمان کمک شایانی کند.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر خود را ازمسئولین و کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان اعلام می دارند.

تعارض منافع :

این مطالعه برای نویسندگان هیچ گونه تضاد منافعی نداشته است.

References:

1. Jalilian S, Rokhbakhsh Zamin F. Evaluating the ability of Biofilm formation in Escherichia coli isolated from clinical samples in Zahedan. Pars Journal of Medical Sciences 2017; 15(1): 36-42.
2. Jamal M, Tasneem U, Hussain T, Andleeb S. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections, Research & Reviews. Journal of Microbiology and Biotechnology 2015; 4(3): 1-14.
3. Wang L, Liang Ai x, Zhai j, Wang x. Isolation of antimicrobial resistant bacteria in upper respiratory tract infections of patients. Biotech 2016; 6(2): 166.
4. Ciofu O, Tolker-Nielsen T, Østrup P, Wang H, Høiby N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. ELSEVIER 2015; 85: 7-23.
5. Didgar F, Sarmadian H, Ghasemikhah R. Antimicrobial resistance pattern of Gram –negative bacilli isolated of Vali-Asr Hospital wards in Arak. ISMJ 2014; 17(5): 938-47.
6. Reisi M, Tajbakhsh E, Momtaz H. Isolation and identification of antibiotic resistance genes in Staphylococcus aureus isolates from respiratory system infections in shahrekord, Iran. Biological Journal of Microorganism 2014; 3(10): 97-106.
7. Safdari H, Sadeghian A, Tahaghogi S. The Antibiotic Resistance Pattern of Staphylococcus aureus Isolated From Patients in Quaem University Hospital During 2009- 2011. Mashhad Med J 2012; 1(1): 39- 41.
8. Jamaati HR, Malekmohamma M, Hashemian MR, Nayebi M. Ventilator-associated pneumonia: evaluation of etiology, microbiology and resistance

patterns in a tertiary respiratory center. Tanaffos 2010; 9(1): 21-7.
9. Berwal A, Chawla K, Shetty S, Gupta A. Trend of antibiotic susceptibility of Streptococcus pyogenes isolated from respiratory tract infections in tertiary care hospital in south Karnataka. IRAN. J. MICROBIOL 2019; 11(1): 13-18.
10. Stacevičienė I, Petraitienė S, Vaičiūnienė D, Alasevičius T, Kirslienė J. Antibiotic resistance of Streptococcus pneumoniae, isolated from nasopharynx of preschool children with acute respiratory tract infection in Lithuania. BMC Infectious Diseases 2016; 16: 216.
11. Soltan Dalal M, Miremadi A, Sharify M, Rastegar Lari A, Rajabi Z, Avadis Y. Antimicrobial Resistance Trends Of Klebsiella Spp. Isolated From Patients In Imam Khomeini Hospital. Journal of Payavard Salamat 2012; 6(4): 275-81.
12. Rodrigo A, Sibila O. The respiratory threat posed by multidrug resistant Gram-negative bacteria. Respirology 2017; 22(7): 1288-99.
13. Gao Y, Guan W, Zhu Y, Chen R, Zhang G. Antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa infection in patients with bronchiectasis: prevalence, risk factors and prognostic implications. International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2018; 13(397): 237-46.
14. Kousalya K, Thirumurugu S, Arumainayagam D.C, Manavalan R, Vasantha J, Uma C. Antimicrobial resistance of bacterial agents of the upper respiratory tract in south Indian population. J Adv Pharm Technol Res 2010; 1(2): 207–15.
15. Olender A. Antibiotic Resistance and Detection of the Most Common Mechanism of Resistance (MLSB) of Opportunistic Corynebacterium. Chemotherapy 2013; 59: 294–306.
16. Renk H, Stoll L, Neunhoeffer F, Hölzl F, Kumpf M, Hofbeck M, Hartl D. Suspicion of respiratory tract infection with multidrug-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and risk factors from a Paediatric Intensive Care Unit. BMC Infect Dis 2017; 17:163.
17. Salma A, Sara A, Doua S, Isra O, Modasir O, Eltahir Kh. Etiological Trends and Patterns of Antimicrobial Resistance in Respiratory Infections. Open Microbiol J 2018; 12: 34–40.
18. Xiaoguang H, Mingyu Xie, Siping L, Junqin Y, Peng Q, Qiang M, Xiaomei L, Zhong B. Antimicrobial resistance in bacterial pathogens among hospitalized children with community acquired lower respiratory tract infections in Dongguan, China (2011–2016). BMC Infect Dis. 2017; 17: 614-23.
19. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. Journal of Infection and Public Health 2017; 10(4): 369-378.
20. Esmaeili D, Qorbanalizadehgan M, Ranjbar R, A Mobarez Mohebbi. The Prevalence of Nosocomial Infections In Respiratory Tract Caused By Multi Drug Resistance Bacteria In Patients Submitted In Baqyiatallah Hospital. JAUMS 2007; 5(2): 1185-89.
21. Pooyan S, Kazemipour N, Rokhbakhsh Zamin F. Biofilm formation and antimicrobial resistance of uropathogenic Escherichia coli and Klebsiella pneumonia strains isolated from pregnant women in Kerman, Iran. Pars Journal of Medical Sciences 2019; 17(1): 15-24.
22. Kazemi pour N, Dusan DH, Dhakephalkar PK, Rokhbakhsh Zamin F, Zinjarde SS, Chopade BA. Biofilm formationby Acinetobacter bumannii strains isolated from urinary infection and urinary catheters. FEMS Immunal Med Microbiology 2011; 162: 328 - 38.
23. Shorr AF, Tabak YP, Gupta V, Johannes RS, Liu LZ, Kollef MH. Morbidity and cost burden of methicillin resistant Staphylococcus aureus in early onset ventilator-associated pneumonia. Crit Care 2006; 10(3): 29.
24. Eslami A, Kheirkhah B. Study of antibiotic resistance and identification of TEM and SHV Klebsiella pneumoniae genes isolated from respiratory system of patients in Intensive Care Unit in Kerman. Pejouhandeh 2015; 20(3): 149-153.
25. Yousefi R, Alijani P, Saidijam M, Alikhani M, Rashidi H. Study of Antibiotic Resistance Pattern and Phenotypic Detection of ESBLs in Klebsiella Pneumoniae Strains Isolated from Clinical Samples and Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Imipenem and Ceftazidim Antibiotics. Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences 2014; 20(4): 295-302.
26. Feyzabadi M, Etemadi G, Sadeghian S, Asadi S, Amirkhani A, Shahrabi farahani A, Rahmati M. Drug resistance patterns & prevalence of extended spectrum Beta Lactamase producers among isolates of kelebsiella pneumonia cultured from patient at Tehran hospitals during 2003-2004. TUMJ 2005; 6(3): 543-50.
27. Nooritalab N, Latifnia M, Shams pour N. Talebi M, Mostafavi E, Fattahi M, Frequency of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa in patients with ventilator associated pneumonia. Razi Journal of Medical Sciences 2013; 20(112): 17-23.
28. Eslamtalab E, Kazemipour N. Biofilm formation and antibiotic resistance of Acinetobacter spp. isolated from skin and wound infections. IJBPAS 2015; 4(10): 568-576.
29. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. 2018.
30. Atia A, Elyounsi N, Abired A, Wanis A, Ashour A. Antibiotic Resistance Pattern of Bacteria Isolated from patients with upper respiratory tract infections; a four year study in Tripoli city. Preprints 2018.
31. Abdi A, Mohammadi M, Agha Alaei Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm producing Pseudomonas aeruginosa. Int J Antimicrob Agents 2006; 27(3): 196–200.

Original Article

The study of antibiotic resistance and biofilm formation of isolated bacteria from upper respiratory tract in adult patients in Shahid Bahonar Hospital of Kerman

Zakieh Seifoori[1], Nadia KazemiPour*[1]

Received:2019.10.16 Revised:2020.02.25 Accepted: 2020.03.15

1. Department of Microbiology, Kerman branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.17, No. 4, Winter 2020

Pars J Med Sci 2020;17(4):17-25

Abstract:

Introduction:
Upper respiratory tract infection is one of the most common bacterial infections in humans and the second reason for the high administration of antibiotics. The upward trend of antibiotic resistance in bacterial pathogens is a worldwide challenge. The aim of the present study was to evaluate antibiotic resistance and biofilm formation of isolated bacteria from the upper respiratory tract of adult patients admitted to Shahid Bahonar Hospital in Kerman.

Materials and Methods:
In this study, 70 sub cultured specimens of respiratory were received from laboratory of Shahid Bahonar Hospital in Kerman during three months. Examination and identification was done by routine biochemical tests. The disc diffusion antibiotic susceptibility test was also performed. Next, the percentage of cell surface hydrophobicity was determined. The isolates with highest and lowest hydrophobicity were selected to study biofilm formation on glass and polypropylene surfaces on static and shake conditions.

Results:
59 bacterial strains were isolated, respectively as %37.28 Staphylococcus aureus., %20.33 Klebsiella pneumonia, %16.94 pseudomonas aeruginosa, %6.77 Escherichia coli, %5.08 Streptococcus pneumonia and %3.38 Citrobacter spp., Serratia marcescen, Proteus mirabilis and Corynebacterium diphtheria. Maximum resistance was related to amoxicillin and all the strains were sensitive to gentamicin. The results of biofilm formation on the selected surfaces indicated biofilm formation increasing on propylene surfaces with shake condition.

Conclusion:
According to the results, there is a direct relationship between antibiotic resistance and biofilm formation potential of isolates. An effective program can be developed by evaluating antibiotics susceptibility patterns and new therapeutic methods.

Keywords: Upper Respiratory Tract Infection, Antibiotic Resistance, Cell Surface Hydrophobicity, Biofilm

* Corresponding author Email: nadia_kazemi@yahoo.com