رضا بهلولی خیاوی، کارشناس ارشد میکروب شناسی،
شبکه بهداشت و درمان مشگین شهر، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس آئروجینوزا

سودوموناس آئروجینوزا از نظر پایداری در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و ضدعفونی کننده‌ها یک ارگانیسم سر سخت است. استفاده گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌ها در بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک، با پدیده ی فشار انتخابی مایه ی افزایش مقاومت در باکتری شده است. سودوموناس آئروجینوزا سردمدار داشتن مقاومت در برابر درمان آنتی‌بیوتیکی است. اندازه بسیار بزرگ ژنوم باکتری ونارسا بودن دانش روزمره در باره ی بسیاری از ژن‌ها، چالش هایی برای درمان این میکرو ارگانیسم است.

فاکتورهای مقاومت سودوموناس آئروجینوزا به آنتی‌بیوتیک‌ها

- نفوذپذیری پایین دیواره سلولی به آنتی بیوتیک ها به طور ذاتی.
- دارا بودن ظرفیت ژنتیکی لازم برای بیان مجموعه وسیعی از مکانیزم‌های مقاومت.
- کسب مقاومت از طریق موتاسیون در ژن‌های کروموزومی تنظیم‌کننده ژن‌های مقاومت.
- کسب ژن‌های مقاومت مازاد از سایر ارگانیسم‌ها توسط پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و باکتریوفاژها.
- سودوموناس آئروجینوزا یک ارگانیسم بسیار سازگار است و می‌تواند روی انواع وسیعی از مواد رشد کند و در پاسخ به شرایط محیطی ویژگی‌های خود را تغییر دهد.
- سودوموناس آئروجینوزا در مقایسه با سایر ارگانیسم‌ها توانایی ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای را دارا می‌باشد و این امر ماهیت سازگاری این باکتری را توجیه می‌کند که شامل توانایی در پیشرفت مقاومت در هر جایی است که آنتی‌بیوتیک‌ها به طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

مکانیزم‌های مقاومت

سه مکانیسم اصلی مقاومت توسط ارگانیسم‌های مقاوم به فعالیت عوامل ضدمیکروبی وجود دارد:

۱- جذب محدود شده و افلوکس (Efflux)

۲-غیرفعالسازی دارو

۳- تغییر در اهداف.

جذب محدود شده

تمام کلاس‌های اصلی آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده برای درمان عفونت‌های سودوموناس آئروجینوزا باید برای رسیدن به اهدافشان از دیواره سلولی عبور کنند. مقاومت ذاتی باکتری به تمام کلاس‌های آنتی‌بیوتیک در نفوذپذیری پایین دیواره سلولی باکتری خلاصه شده است. کاهش تجمع آنتی‌بیوتیک‌ها در داخل سلول باکتری معلول محدودیت نفوذپذیری غشاء خارجی و حذف مؤثر ملکول‌های آنتی‌بیوتیک از طریق سیستم پمپ‌های افلوکس است.

۱- آلژینات به عنوان یک سد

یک خصوصیت ویژه سویه‌های موجود در مبتلایان به فیبروز کیستیک، تولید یک لایه سست همراه با پوشش باکتری از جنس پلی‌ساکارید آنیونیک بنام آلژینات است که سلول‌های باکتری را احاطه می‌کند و آنها را در تجمعات به هم می‌چسباند. با وجود اینکه آلژینات می‌تواند به آنتی‌بیوتیک‌های کاتیونیک مثل آمینوگلیکوزیدها متصل شده و نفوذپذیری آنها را محدود کند تأثیر کمی روی حساسیت باکتری‌های موکویید به این آنتی‌بیوتیک‌ها دارد و در عمل نشان داده شده که سویه‌های موکویید به آمینوگلیکوزیدها حساسند.

۲- غشای خارجی به عنوان یک سد

غشای خارجی باکتری، یک سد مهم در برابر نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها است که این عمل با محدود ساختن سرعت نفوذ مولکول‌های کوچک آبدوست و مانع شدن از نفوذ مولکول‌های بزرگ است. آنتی‌بیوتیک‌های کوچک آبدوست مثل بتالاکتام‌ها و کینولون‌ها فقط از طریق کانال‌های آب آماده شده بوسیله مولکول‌های پورین عبور می‌کنند. این کانال‌ها مولکول‌های بشکه‌ای شکل هستند که در غشای خارجی می‌چرخند و معمولاً به صورت تریمر هستند.

سودوموناس آئروجینوزا پورین‌های متنوع متعددی تولید می‌کند:

- **OprF**

پورین بزرگی است که در تمام سویه‌ها دیده شده است. با وجود اینکه موتانت‌های بدون این پورین گزارش شده‌اند، از دست دادن این پورین عامل بزرگ مقاومت آنتی‌بیوتیکی به حساب نمی‌آید؛ احتمالاً به این دلیل چنین سویه‌هایی توانایی محدودی در جذب مواد غذایی آبدوست داشته‌اند.

- **OprD**

یک پورین تخصص‌یافته است که یک نقش اختصاصی در جذب اسیدهای آمینه دارای بار مثبت مثل لیزین دارد. از دست دادن این پورین همراه با مقاومت به ایمی‌پنم است زیرا این آنتی‌بیوتیک برای عبور از غشاء به این پورین نیاز دارد. به طور شگفت‌آوری مروپنم تحت‌تأثیر از دست دادن oprD قرار نمی‌گیرد و این امر نشانگر این است که کارباپنم‌ها از غشاء خارجی توسط کانال‌های مختلف عبور می کنند. آمینوگلیکوزیدها و کولیستین از طریق کانال‌های پورین از غشاء خارجی عبور نمی‌کنند و جذب آنها از طریق اتصال به LPS در قسمت خارجی (Outer Membrane) OM انجام می‌گیرد. این امر سد نفوذپذیری OM را بهم می‌ریزد و به این آنتی‌بیوتیک‌ها اجازه می‌دهد تا از طریق سل‌وال به غشاء پلاسمایی نفوذ کنند، لذا آمینوگلیکوزیدها فعالانه به داخل سلول حمل می‌شوند. مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و کولیستین در سویه‌های آزمایشگاهی در نتیجه بیان بیش از حد پروتئین غشاء خارجی omp H مشاهده شده است که LPS را از اتصال به این آنتی‌بیوتیک‌ها محافظت می‌کند.

۳- نقش پمپ‌های افلوکس در مقاومت

سیستم‌های افلوکس چندداروییی از سه ترکیب پروتئینی تشکیل شده‌اند:

۱- یک پمپ وابسته به انرژی که در غشاء پلاسمایی واقع شده است.

۲- یک پورین غشاء خارجی

۳-یک پروتئین اتصال‌دهنده که دو ترکیب غشایی مذکور را بهم متصل می‌کند.

این ترکیب سه قسمتی برای مولکول‌های سمی موجود در سیتوپلاسم، غشاء پلاسمایی و پریپلاسم یک سیستم خارج‌سازی ایجاد می‌کنند، پس اساساً در پاسخ به مواد شیمیایی ضدمیکروبی پدید نیامده‌اند.ترانسپورترهای پمپ افلوکس مواد را از عرض غشاء پلاسمایی به داخل فضای پریپلاسم پمپ می‌کنند. یک پروتئین لنگرمانند این فضا را دور می‌زند و ماده را به کانال غشایی خارجی‌تر پرتاب می‌کند، در نهایت سوبسترا به خارج از سلول پمپ می‌شود.

چهار سیستم افلوکس آنتی‌بیوتیکی مختلف برای سودوموناس آئروجینوزا توصیف شده‌اند.تمام کلاس‌های آنتی‌بیوتیک به جز پلی‌میکسین‌ها به خارج‌سازی توسط یک یا چند تا از این سیستم‌های افلوکس حساسند.

- **MexAB-oprM**

مسئول خارج‌ساختن بتالاکتام‌ها، کینولون‌ها و دامنه وسیعی از ضدعفونی کننده‌هاست.

- **Mex XY-oprM**

مسئول خارج‌ساختن آمینوگلیکوزیدها است.

- **mex EF-opr N**[۱۰]

مسئول خارج ساختن کارباپنم‌ها و کینولون‌ها است.

غیرفعالسازی و تغییر آنتی‌بیوتیک‌ها

۱- غیر فعالسازی بتالاکتام ها

تمام سویه‌های باکتری دارای ژن amp C برای بتالاکتاماز القایی کرموزومی هستند با این حال این القاء شاید برای ایجاد مقاومت در سویه‌های CF کافی نباشد. به جای آن بیان بیش از حد آنزیم از موتاسیون خودبخودی در ژن تنظیمیampR ناشی می‌شود. تولید بالای بتالاکتاماز فوق یک تهدید جدی بر علیه سفالوسپورین‌ها است. سایر بتالاکتامازهای تولید شده توسط باکتری مثل ESBLها (Extended-spectrum plasmid – mediated enzymes) بر علیه پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها است.

۲- غیرفعالسازی آمینوگلیکوزیدها

غیرفعالسازی آمینوگلیکوزیدها از طریق تولید آنزیم‌هایی روی می‌دهد که گروه‌های استیل، فسفات و آدنیلیل را به گروه آمینو و استخلاف‌های هیدروکسیل در آنتی‌بیوتیک‌ها انتقال می‌دهند. این آنزیم‌های تغییردهنده از فاکتورهای سیتوپلاسمی مثل استیل کوآنزیمA یاATP برای حمل استخلاف‌های اضافه شده به آمینوگلیکوزیدها استفاده می‌کنند طوری که این پروژه تغییر در داخل سیتوپلاسم روی می‌دهد. این آنزیم‌های تغییردهنده توسط پلاسمیدها کد می‌شوند.

تغییر در اهداف داروها

این نوع از مکانیسم مقاومت از تغییرات موتاسیونی در آنزیم‌های هدف داروها روی می‌دهد. این تغییرات موتاسیونی تأثیری بر اعمال حیاتی این آنزیم‌ها نداشته ولی به مهار انتخابی آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر روی باکتری می‌انجامد. در سودوموناس آئروجینوزا از طریق موتاسیون در ژنgyrA که زیرواحد A آنزیم هدف را کد می‌کند فعالیت کینولون‌ها مهار می‌شود یا تغییرات در ساختمان ریبوزم۳۰S فقط حساسیت به استرپتومایسین از گروه آمینوگلیکوزیدها را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد، یا تغییر در PBPها که در مقاومت به بتالاکتام‌ها دیده شده است ولی مشکل عمده‌ای در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری ایجاد نمی‌کند.

بیوفیلم‌ها و مقاومت

در عفونت‌های ریوی در مبتلایان به CF سودوموناس آئروجینوزا به صورت تجمعاتی از سلول‌ها که میکروکولونی نامیده می‌شوند رشد می‌کند که با پلی‌ساکارید آلژینات احاطه شده‌اند. این شکل از رشد باکتری در سطوح نیز رخ می‌دهد که بیوفیلم نامیده می‌شود. خاصیت ویژه تمام بیوفیلم‌ها مقاومت قابل‌ملاحظه آنها در برابر ریشه‌کنی با درمان‌های فیزیکی و شیمیایی مثل آنتی‌بیوتیک‌ها است، با وجود اینکه این نوع مقاومت مدت زیادی است که شناسایی شده است ولی ماهیت زیست‌شناختی آن هنوز به طور کامل روشن نشده است. عواملی که ممکن است به طور عمده این نوع از فنوتیپ مقاومت را توضیح دهند شامل تراکم بالای جمعیت باکتریایی و محدودسازی فیزیکی نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها است. بیوفیلم‌ها دربرگیرنده یک پاسخ استرس معمول در پروژه‌های متابولیکی کلیدی است که خاموش می‌شوند و مکانیزم‌های محافظت‌کننده را القا می‌کنند. واضح است که سلول‌ها در بیوفیلم‌ها شبیه سلول‌های پلانکتون آزادزی می‌توانند حضور سایر سلول‌ها را حس کنند (Quroum Sensing) و ویژگی‌های خود را مطابق با آن تغییر می‌دهند. جمعیت سلول‌های داخل یک بیوفیلم هتروژن هستند که شامل سلول‌های سریع‌الرشد و کندرشد می‌باشند. تعدادی از آنها از طریق بیان آنزیم‌های غیرفعالسازی و سیستم افلوکس به داروها مقاوم می‌باشند. سایر سلول‌ها به طور آشکار چنین سیستم‌هایی را بیان نمی‌کنند، بنابراین در کل مقاومت به یک میانکنش بین جمعیت کلی سلول‌ها بستگی دارد و درمان آنتی‌بیوتیکی باید علیه یک جمعیت چندسلولی صورت پذیرد.

نتایج چند مطالعه انجام شده در مورد مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس ائروجینوزا

۱–در مطالعه انجام شده توسط Ramana B V و Chaudhury A در هندوستان در سال۲۰۱۲ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های سودوموناس ائروجینوزا طبق جدول شماره۱ است.

Antibiotic	Resistant No.	Percentage (%)
Amikacin	75	26
Gentamycin	116	40
Ceftrioxone	116	40
Cefoperazone sulbactum	63	22
Imipenem	40	14
Piperacillin-tazobactum	46	16
Ciprofloxacin	113	39
PolymyxinB	31	11

جدول ۱- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های سودوموناس ائروجینوزا درهندوستان در سال ۲۰۱۲

۲– در پژوهش انجام شده توسط Paul D. Brown و Anicetus Izundu در کشور جامائیکا درسال ۲۰۰۲ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های سودوموناس ائروجینوزا طبق جدول شماره۲ است.

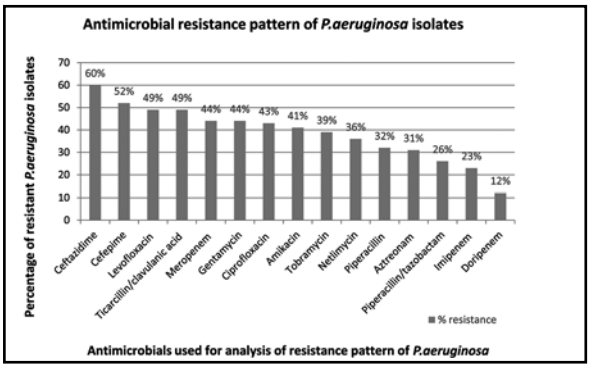
TABLE 3. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates encountered in Jamaica, 2002

Antibiotic	Disk potency (µg)	Number of isolates resistant
Tetracyclines		
• Tetracycline	30	49
Aminoglycosides		
• Amikacin	30	0
• Gentamicin	10	11
• Kanamycin	30	39
• Tobramycin	10	13
β-lactams: Penicillins		
• Amoxicillin/clavulanic acid	20/30	49
• Ampicillin	10	46
• Piperacillin	10	9
β-lactams: Cephalosporins		
• Cefaclor	30	51
• Ceftazidime	30	10
Carbapenems		
• Imipenem	10	5
• Meropenem	10	5
Quinolones		
• Nalidixic acid	30	42
• Ciprofloxacin	5	10
• Norfloxacin	10	10
Antifolates		
• Trimethoprim/sulfamethoxazole	25	29
Other antibiotics		
• Chloramphenicol	30	43
• Polymyxin B	300	11

جدول ۲- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های سودوموناس ائروجینوزا در کشور جامائیکا درسال ۲۰۰۲

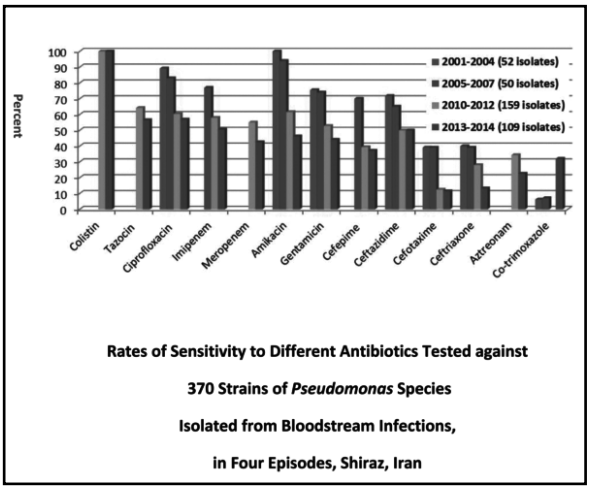
۳– در مطالعه انجام شده توسط Nishi Tiwari و همکاران در سال ۲۰۱۷ در هندوستان الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

سویه های سودوموناس ائروجینوزا طبق نمودار شماره۱ است.



نمودار ۱- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های سودوموناس ائروجینوزا در هندوستان در سال ۲۰۱۷

٤- در مطالعه انجام شده توسط مرکز تحقیقات میکروب شناسی ببالینی دکتر البرزی در ٤ مقطع زمانی در شهر شیراز میزان حساسیت سویه های سودوموناس ائروجینوزا جدا شده از عفونت های جریان خون طبق نمودار شماره ۲ است.



نمودار ۲- میزان حساسیت سویه های سودوموناس ائروجینوزا جدا شده از عفونت های جریان خون در چهارمقطع زمانی در شیراز

منابع:

1. Lambert PA: Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. Journal Royal Society of Medicine, 95:22-26, 2002.

2. Hancock RE. Resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin Infect Dis 1998;1(suppl): S93–9

3. Pitt TL, Sparrow M. Survey of antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients in the United Kingdom. Abstracts of 24th European Cystic Fibrosis Conference. Vienna: ECFS, 2001

4. Nichols WW, Dorrington SM, Slack MP, Walmsley HL. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. Antimicrob Agents Chemother 1988;32:518–23

5. Ciofu O, Fussing V, Bagge N, Koch C, Hoiby N. Characterization of paired mucoid/non-mucoid Pseudomonas aeruginosa isolates from Danish cystic fibrosis patients: antibiotic resistance, b-lactamase activity and Riboprinting. J Antimicrob Chemother 2001;48:391–6

6. Brinkman FS, Bains M, Hancock RE. The amino terminus of Pseudomonas aeruginosa outer membrane protein OprF forms channels in lipid bilayer membranes: correlation with a three-dimensional model. J Bacteriol 2000;182:5251–5

7. Livermore DM. Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapeanems. J Antimicrob Chemother 2001;47:247–50

8. Gilleland LB, Gilleland HE, Gibson JA, Champlin FR. Adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in Pseudomonas aeruginosa. J Med Microbiol 1989;29:41–50

9. Nikaido H. Multiple antibiotic resistance and efflux. Curr Opin Microbiol 1998;1:516–23

10. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa and related organisms. J Mol Microbiol Biotechnol 2001;3:255–64

11. Ziha-Zarifi I, Llanes C, Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of Pseudomonas aeruginosa overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:287–91

12 . Giwercman B, Lambert PA, Rosdahl VT, Shand GH, Hoiby N. Rapid emergence of resistance in Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed betalactamase producing strains. J Antimicrob Chemother 1990;26:247–59

13. Giwercman B, Meyer C, Lambert PA, Reinert C, Hoiby N. High-level beta-lactamase activity in sputum samples from cystic fibrosis patients during antipseudomonal treatment. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36:71–6

14. Vahaboglu H, Coskunkan F, Tansel O, et al. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing Acinetobacter spp. and Pseudomonas aeruginosa strains. J Med Microbiol 2001;50: 642–5

15. Maiti SN, Phillips OA, Micetich RG, Livermore DM. Beta-lactamase inhibitors: agents to overcome bacterial resistance. Curr Med Chem 1998;5:441–56

16. Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R. Inhibitor-resistant TEM betalactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. J Antimicrob Chemother 1999;43:447–58

17. Woodford N, Palepou MF, Babini GS, Bates J, Livermore DM. Carbapenemase-producing Pseudomonas aeruginosa in UK. Lancet 1998; 352:546–7

18. MacLeod DL, Nelson LE, Shawar RM, et al. Aminoglycosideresistance mechanisms for cystic fibrosis Pseudomonas aeruginosa isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. J Infect Dis 2000;181:1180–4

19. Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of Pseudomonas aeruginosa isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2263–8

20. Srikumar R, Tsang E, Poole K. Contribution of the MexAB-OprM multidrug efflux system to the beta-lactam resistance of penicillin-binding protein and beta-lactamase-derepressed mutants of Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother 1999;44:537–40

21. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 2001;358:135–8

22. Mah T-FC, OToole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol 2001;9:34–9

23. Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O et al. N-Acylhomoserinelactone-mediated communication between Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia in mixed biofilms. Microbiology 2001;147: 3249–62

22. Ramana B V, Chaudhury A. Antibiotic resistance pattern of Pseudomonas aureuginosa isolated from healthcare associated infections at a tertiary care hospital. J .Sci Soc 2012;39:78-80.

23. Paul D. Brown, Anicetus Izundu: Antibiotic resistance in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in Jamaica. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health .16(2), 2004.

24. Nishi Tiwari, Sangita Rajdev, Summaiya Mullan : Resistance Trends among Pseudomonas aeruginosa Isolates in a Tertiary Care Centre in South Gujarat. Advances in .Microbiology, 7:188-194, 2017