

مطالعه سویه های سودومونا آئروژینوزا جدا شده از عفونتهای بیمارستانی با مقاومت چندگانه

دکتر روحا کسری کرمانشاهی^{۱*}، محمد کاظمی^۲

۱- استاد گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی

سابقه و هدف: مصرف بی رویه و نامناسب آنتی بیوتیک از عوامل احتمالی تأثیرگذار بر انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی می باشد. از آنجائیکه سودومونایی آئروژینوزا از جدی ترین باکتریهای بیمارها در محیط های بیمارستانی و مقاوم به آنتی بیوتیک می باشد که در درمان مشکل ایجاد می کند. این مطالعه به منظور تعیین مقاومت های چندگانه سودوموناس به آنتی بیوتیک ها، آرسنات و فلزات انجام شده است.

مواد و روشها: در این مطالعه، ۲۳ سویه از سودوموناس آئروژینوزا از نمونه های کلینیکی جداسازی شد. جهت بررسی مقاومت این باکتریها نسبت به آنتی بیوتیک های گروه پنی سیلین از روش کربی _ بائر استفاده شد. میزان حداقل غلظت بازدارنده (M.I.C) و حداقل غلظت کشنده (M.B.C) آنتی بیوتیک ها و فلزات سنگین (کادمیوم، جیوه) و آرسنات به ترتیب به روش های سری رقت لوله ای، آگار و رشد در پلیت آگاردار انجام شد.

یافته ها: در این مطالعه بیشترین و کمترین مقدار MIC به دست آمده در سودومونا آئروژینوزا برای فلزات به ترتیب کادمیوم (۰/۶ و ۴/۹ میکروگرم در میلی لیتر)، جیوه (۰/۱۲ و ۴ میکروگرم در میلی لیتر) و آرسنات (۱۰^{-۲} و ۱۰^{-۲} × ۲۵۶ میکروگرم در میلی لیتر) بودند. از ۲۳ سویه ۸۴٪ به آنتی بیوتیک کاربنی سیلین، ۶۳٪ پیپراسیلین و ۱۰۰٪ به آرسنیک و کادمیوم مقاوم بودند. همچنین ۸۲/۶٪ سویه ها نسبت به جیوه مقاوم بودند.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که سویه های سودومونا آئروژینوزا دارای مقاومت چندگانه به آرسنات، فلزات و آنتی بیوتیک های کاربنی سیلین و پیپراسیلین می باشند.

واژه های کلیدی: مقاومت چندگانه، آنتی بیوتیک، فلزات سنگین، سودومونا آئروژینوزا، حداقل غلظت بازدارنده، حداقل غلظت کشنده.

مقدمه

داشت، اما علیرغم موفقیت های چشمگیری که در درمان بیماریهای عفونی حاصل شد به زودی مشکل جدیدی پا به عرصه وجود گذاشت و آن بروز مقاومت به پنی سیلین بود. این مقاومت باعث انتخاب سویه های مقاوم در میان گونه های حساس و یا ظهور سویه های جدید گونه های مقاوم گردیده است. در واقع بروز

با وجود آنکه بیش از ۵۰ سال از تهیه و عرضه پنی سیلین می گذرد، هنوز این دارو یکی از مهمترین و پر مصرف ترین آنتی بیوتیکهای موجود است و هر ساله مشتقات جدیدی از هسته پنی سیلین تهیه و ارائه می شود. زمانی که پنی سیلین کشف شد خوش بینی زیادی در ارتباط با ریشه کنی بیماریهای عفونی وجود

مقاومت می تواند به دلیل استفاده زیاد و نادرست از مواد ضد میکروبی در بسیاری از واحدهای کلینیکی باشد. با وجود اینکه استفاده صحیح از عوامل ضد میکروبی اثرات کامل مثبت در بهداشت داشته است، مقاومت به این عوامل که در نتیجه استفاده غیر صحیح از آنها بوده، یک هزینه اضافی ایجاد کرده است. عفونت با بیماریهای مقاوم میزان بالاتری از مرگ و میر را نسبت به بیماریهای حساس ایجاد می کند. تخمین زده می شود که در ایالات متحده سالانه مقاومت به عوامل دارویی بین ۱۰۰ میلیون تا ۳۰ میلیارد دلار هزینه داشته باشد.

امروزه بیش از ۳۰ نوع پنی سیلین طبیعی و نیمه سنتزی تهیه شده است. پنی سیلین ها را براساس طیف ضد میکروبی و خواص فیزیکی و شیمیایی به ۵ گروه تقسیم بندی می کنند. از بین این گروهها دو گروه کربوکسی پنی سیلینها و یوروئید و پنی سیلینها در درمان عفونتهای ناشی از سودومونا آئروژینوزا کاربرد دارند (۱و۲).

از آنجا که شاخص های مقاومت نسبت به پنی سیلین ها و فلزات از جمله جیوه، کادمیوم و آرسنیک در بعضی از موارد مشترک می باشد و اکثراً ژنهای آنها در روی یک پلاسمید قرار دارد، بنابراین ارزیابی مقاومت همزمان نسبت به این عوامل ضد میکروبی از نظر انتشار مقاومت چندانکه در سویه های مختلف باکتریها دارای اهمیت خاصی می باشد.

مشقات جیوه نظیر فنیل مرکوریک نیترات، استات فنیل مرکوریک و تیومرسال به طور گسترده ای به عنوان مواد محافظ در زمینه های دارویی و آرایشی استفاده می شوند (۱). هدف از انجام این مطالعه تعیین مقاومت سویه های سودومونا آئروژینوزا به آرسنات، فلزات سنگین و آنتی بیوتیکهای کاربونی سیلین و پیپراسیلین می باشد، تا با مشخص شدن آن بتوان راهی برای مبارزه و پیشگیری از انتشار آنها یافته و به نجات و سلامت بیماران کمک نمود.

مواد و روشها

در این مطالعه ۲۳ سویه از سودومونا آئروژینوزا از نمونه های بالینی جداسازی شد و برای تعیین حساسیت یا مقاومت سودومونا اقدام به انجام تست آنتی بیوگرام به روش کربی - بائر گردید. برای

جداسازی باکتریهای مقاوم به گروه پنی سیلین از دیسک های استاندارد آنتی بیوگرام شامل کاربونی سیلین و پیپراسیلین استفاده گردید. برای این منظور ابتدا چند کلنی از باکتری بر روی محیط کشت مایع TSB تلقیح شد و لوله های تلقیح شده در دمای 35°C قرار داده شد تا لوله ها به کدورت لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند برسند.

با استفاده از سواب استریل و فرو بردن آن در سوسپانسیون میکروبی و آغشته شدن سواب به سوسپانسیون، تلقیح سوسپانسیون میکروبی در سه جهت مختلف در سطح پلیت حاوی محیط کشت صورت گرفته تا یک تلقیح یکنواخت انجام پذیرد (۳). پلیت به مدت ۳-۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شده تا مایع میکروبی جذب محیط کشت شود.

پس از طی زمان فوق دیسک های آنتی بیوتیک مورد نظر مانند کاربونی سیلین و پیپراسیلین با فواصل مشخص توسط پنس استریل بر روی سطح محیط قرار داده شد. پلیت ها به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای 35°C درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پس از طی زمان فوق به بررسی پلیت ها پرداخته و قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک ها با خط کش میلی متری اندازه گیری گردید.

نمونه های مقاوم به آنتی بیوتیک های گروه پنی سیلین ها طبق جداول استاندارد مشخص شدند (۴و۵). غلظت های مورد استفاده در محلول استوک هر فلز به صورت زیر می باشد. علت انتخاب غلظت بالاتر در محلول های استوک، جهت تهیه غلظت های گوناگون برای هر ماده می باشد. (۹-۴۰۶) (mg/l) ۴/۹۳- ۴۶-۲۴/۲۳-۱/۶۲-۰/۳۱-۰/۱۵-۰/۰۷۵-۰/۰۳۷-۰/۰۰۱ نیترات کادمیوم، (۴-۱-۲-۵-۰/۵-۰/۲۵-۰/۱۲-۰/۰۰۱) (mg/l) نیترات جیوه، ۳۲-۱۶-۸-۴-۲ آرسنات سدیم.

نیترات کادمیوم از شرکت Fluka، آرسنات سدیم و نیترات جیوه و محیط های کشت میکروبی مواد شیمیایی از شرکت Merck و آنتی بیوتیک ها از شرکت داروسازی فارابی اصفهان تهیه گردید. سویه های استاندارد میکروبی از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی تهران تهیه گردید. برای تعیین MIC فلزات پس از تهیه محیط PHG-II آگار استریل (پپتون ۴ گرم، عصاره مخمر ۱ گرم، گلوکز ۲ گرم و آگار ۱۵ گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر)، هنگامی که

بررسی آماری نتایج توسط نرم افزار SAS صورت پذیرفته است. بدین منظور جهت بررسی وجود اختلاف معنی داری بین نتایج حاصل، از روش General linear models perocedure و برای بررسی وجود همبستگی بین داده ها از روش های آنالیز همبستگی استفاده شد و $p < 0.05$ معنی دار تلقی شد.

یافته‌ها

سویه های سودومونا آئروژینوزا از نمونه های بالینی ادرار، زخم، ترشحات گوش و برونش جداسازی و آزمایش گردید که بیشترین سویه های سودومونا آئروژینوزا در نمونه های جداسازی شده از زخم دیده شد (جدول ۱).

جدول ۱. توزیع سویه های سودومونا آئروژینوز براساس نمونه بالینی جداسازی شده از آن

نوع نمونه بالینی	تعداد سویه ها	شماره سویه ها
ادرار	۳	(۱۱ و ۱۰ و ۲)
زخم	۱۸	(۲۳-۱۴ و ۱۳ و ۱۲ و ۸-۳)
ترشحات گوش	۱	(۹)
برونش	۱	(۴)

از ۲۳ سویه سودومونا آئروژینوزا ۸۴٪ به آنتی بیوتیک های کارپنی سیلین و ۶۳٪ به پیپراسیلین مقاوم بودند. در مجموع ۱۹ سویه (۸۲/۶٪) نسبت به هر سه فلز مقاوم بودند (مقاومت سه گانه) و در مورد مقاومت دوگانه نیز تمامی سویه ها به کادمیوم و آرسنات مقاوم بودند (جدول ۲).

حداقل غلظت بازدارند (MIC) رشد سویه های سودومونا آئروژینوزا در حالت عادی و سازگاری نیز تعیین گردید و از سویه استاندارد (PTCC 1074) نیز بعنوان شاهد استفاده گردید و نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین مقدار MIC بدست آمده در سودومونا آئروژینوزا برای فلزات به ترتیب، کادمیوم (۶۲٪ و ۴/۹۳ میکروگرم در میلی لیتر) جیوه (۱۲/۰ و ۴ میکروگرم در میلی لیتر) و آرسنات (۱۰۳*۸ و ۱۰۳*۲۵۶ میکروگرم در میلی لیتر) بود (جدول ۲).

حرارت محیط کشت به حدود ۵۵°C رسید، محلول فلزی با غلظت مشخص را به محیط کشت افزوده و سپس pH تنظیم می شود. محیط های کشت را در داخل پلیت ها ریخته و اجازه داده شد تا سرد شود. برای اینکه سطح پلیت ها عاری از رطوبت شود، پلیت ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار داده شد. برای کشت باکتریهای مورد نظر بر روی محیط کشت می توان کلنی باکتری را به صورت شعاعی بر روی سطح محیط، کشت داد و یا ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی در حال رشد در فاز لگاریتمی را به سطح محیط کشت اضافه نمود و توسط میله شیشه ای سرکج، آنرا در سطح محیط پخش کرد.

در طی کار از تعدادی پلیت هم بعنوان کنترل استریلیتی استفاده می شود. پلیت ها به مدت ۲۲-۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پس از طی مدت زمان فوق، پلیت ها بررسی شده و با توجه به غلظت های مختلف استفاده شده هر فلز، میزان MIC بر اساس حداقل غلظتی از آن فلز که از رشد باکتری ممانعت کرده، تعیین گردید.

برای تعیین MIC فلزات سنگین در حالت سازگاری، تعدادی از باکتریهای مقاوم نسبت به فلز مورد نظر را که دارای MIC بالا بوده اند، انتخاب نموده و از کلنی باکتری بر روی محیط کشت PHG-II دارای غلظت پایین فلز کشت می شود. در مرحله بعد، از کلنی رشد یافته در محیط قبلی به محیط PHG-II بعدی که دارای غلظت بالاتری از فلز مورد نظر می باشد کشت می شود. این عمل را تکرار کرده و مرتباً غلظت فلز در محیط افزایش می یابد تا زمانی که باکتری مورد نظر قادر به رشد در آن غلظت از فلز نباشد (۴۶).

در برخی از باکتریهای مقاوم یکی از خصوصیات مهم این است که از نظر فیزیولوژیکی بعد از مدتی که در محیط حاوی آنتی بیوتیک ها یا فلزات قرار گرفته و رشد نمودند، قادر خواهند شد که خود را نسبت به غلظت های بالاتر آن مواد سازگار نمایند. در این مطالعه سعی شد که اکثر سویه هایی که دارای MIC بالاتری نسبت به سایر سویه ها بودند، جهت حالت سازگاری انتخاب شوند تا بیشترین قدرت سازگاری آنها نسبت به غلظت های بالاتر مشخص شود. لذا آزمایش سازگاری برای سویه هایی که دارای MIC کمتری بوده اند، انجام نشد.

جدول ۲. الگوی کلی مقاومت به فلزات در سویه های سودومونا

آنتروژینوزا جدا شده از نمونه های بالینی

فلزات	سویه	
	تعداد (%)	فراوانی
کادمیوم	۲۳ (۱۰۰)	
جیوه	۱۹ (۸۲/۶)	
آرسنات	۲۳ (۱۰۰)	
کادمیوم و جیوه	۱۹ (۸۳/۶)	
کادمیوم و آرسنات	۲۳ (۱۰۰)	
جیوه و آرسنات	۱۹ (۸۲/۶)	
کادمیوم، جیوه و آرسنات	۱۹ (۸۲/۶)	

بحث

در نتایج حاصل از انجام تست آنتی بیوگرام برای جداسازی باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک های گروه پنی سیلین مشخص گردید که اکثر باکتریهای مورد مطالعه نسبت به آنتی بیوتیک های مورد نظر مقاوم می باشند. به گونه ای که درصد مقاومت به کاربنی سیلین و پیپراسیلین در سویه های سودومونا آنتروژینوزا به ترتیب برابر با ۸۴٪ و ۶۳٪ می باشد.

در بررسی مشابهی که توسط مالک نژاد بر روی سویه های کلینیکی سودومونا آنتروژینوزا انجام شد، میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های کاربنی سیلین، پیپراسیلین، مزلوسیلین و تیکارسیلین به ترتیب برابر با ۸۹، ۵۵، ۸۹ و ۸۹/۵ درصد گزارش گردیده است (۱۰). Langaee و همکارانش درمورد منشاء این مقاومت نشان دادند که بر اثر بیان (expression) بیش از حد آنزیم بتا-لاکتاماز می باشد (۱۱). در این مطالعه در مورد مقاومت به کادمیوم از ۲۳ سویه سودومونا آنتروژینوزا همگی دارای MIC مساوی و یا بزرگتر از ۰/۶۲ میکروگرم در میلی لیتر می باشند. در اکثر سویه ها تفاوت میزان MIC، ناچیز می باشد به گونه ای که ۱۴ سویه دارای MIC برابر ۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر و ۶ سویه دارای MIC برابر با ۴/۹ میکروگرم در میلی لیتر می باشند. در مورد مقاومت به جیوه ۸۲/۶٪ سویه ها نسبت به جیوه مقاوم می باشند (MIC بزرگتر و یا مساوی

با ۱ میکروگرم در میلی لیتر).

همه سویه ها به آرسنات مقاوم بوده اند (MIC بزرگتر و یا مساوی ۴۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر). براساس نتایج بدست آمده مشخص گردید که در اکثر موارد، سویه های مورد نظر قادر به رشد در غلظت های بالاتری از فلز مورد نظر می باشند به گونه ای که MIC آنها در حالت سازگاری تفاوت زیادی با MIC در شرایط عادی دارد. Silver در سال ۱۹۹۶ سازگاری را یک تغییر در یک ارگانسیم یا جمعیتی از ارگانسیم ها گزارش نموده که توسط آن با شرایط محیطی موجود بیشتر سازگار می شوند. موقعیت های سازگاری بیشتر به منظور زنده ماندن ارگانسیم ها در شرایط نامناسب رشد می باشند و تغییر در بیان ژن ممکن است سیستم های جدیدی ایجاد کرده و سبب افزایش میزان بقا در باکتریها در غلظت های بیشتر شود (۱۲). در این مطالعه نیز باکتریها قادر شدند با غلظت های بالاتری از فلزات بکار رفته سازگار شده و رشد نمودند که یافته های سایر محققین را تایید می نماید.

در مجموع در سویه های سودومونا آنتروژینوزا ۱۹ سویه (۸۲/۶٪) نسبت به هر سه فلز مقاوم می باشند (مقاومت سه گانه). در مورد مقاومت های دوگانه تمامی سویه ها همزمان به کادمیوم و آرسنیک مقاوم بوده و ۱۹ نمونه (۸۲/۶٪) مقاومت همزمان نسبت به کادمیوم و جیوه و یا جیوه و آرسنیک داشته اند. در تحقیق توکلی و همکاران میزان MIC به کادمیوم و آرسنیک به ترتیب ۷/۵ میلی مول در لیتر و ۶۰ میلی مول در لیتر برای سودوموناس آنتروژینوزا گزارش شده است (۱).

به طور کلی مقاومت بالای سودوموناس آنتروژینوزا به فلزات می تواند ناشی از ماهیت پوشش سلولی این باکتری باشد. باکتری سودوموناس آنتروژینوزا یکی از مقاومترین باکتریهای فاقد اسپور در برابر مواد ضد میکروبی می باشد. علت عمده این مقاومت حضور پورینهای متفاوت با دیگر باکتریها و همچنین استحکام لایه لیپوپلی ساکاید این باکتری می باشد. به طوری که این باکتری دارای مقاومت ذاتی بالایی نسبت به اکثر مواد ضد میکروبی است. مقاومت زیاد نسبت به آرسنیک احتمالاً به دلیل سیستم های انتشاری قوی بوده که با مصرف انرژی این فلز را از سلول خارج کرده و از تجمع آن در سلول جلوگیری می کند (۱۳ و ۲).

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری انرژی اتمی اصفهان آقای دکتر
شرکت داروسازی فارابی اصفهان آقای دکتر محمدرضا زرگرزاده و
فریدون پیامی و آقای دکتر ابراهیم حشمت دهکردی و همچنین از
سایر کارکنان این دو شرکت تشکر می شود.

منابع

۱. توکلی آ. جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم های مقاوم به برخی از کاتیونها، آنیونها و آنتی بیوتیکها، پایان نامه دوره کارشناسی ارشد میکروبیولوژی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم ۱۳۷۸؛ ص: ۱۰۳-۱۰۵.
۲. راسل آ، کپرا آ. ترجمه کسری کرمانشاهی ر، بهشتی مآل ک، عباسی م. عوامل ضد باکتریایی و مقاومت در برابر آنها. اصفهان، انتشارات دانشگاه اصفهان ۱۳۷۵؛ ص: ۶۳-۲۴۲.
3. Baron E, Finegold S. Diagnostic microbiology. CV Mosby Company. Washington D. C. 1990; pp: 400-2.
4. Broer S, Ji G, Broer A, Silver S. Arsenic efflux governed by the arsenic resistance determinants of Staphylococcus aureus plasmid pI258. J Bacteriol 1993; 175: 3480-5.
5. Balows A, Hausler WJ, Herrman KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology, 5th ed ,Washington D. C 1991; pp: 114-23.
6. Brynhildsen LB, Lundgren LV, Allard B, Rosswall T. Effect of glucose concentrations on cadmium, copper, mercury and zinc toxicity to a klebsilla sp. Appl and Environ. Microbiol 1988; 54: 1689-93.
7. Burke E, Wing K, Pfister RM. Cadmium sorption by bacteria and fresh water sediment. J Indust Microbiol 1991; 8: 201-8.
8. Pumpels T, Pernfub B, Pigher B, Diels L, Schinner F. A rapid screening method for the isolation of metal-accumulating microorganisms. J Industrial Microbiol 1995; 14: 213-17.
9. Sabry SA, Ghozlan HA, Abou-Zeid DM. Metal tolerance and antibiotic resistance pattern of a bacterial population isolated from sea water. J Appl Microbiol 1997; 82: 245-52.
۱۰. مالک نژاد م، علی قلی موسوی س. بررسی مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و آمینوگلیکوزیدها. مجله دانشکده پزشکی ۱۳۷۷؛ ۵۶(۴): ۵-۲۳.
11. Langaee TY, Gagnon L, Huletsky A. Inactivation of the Amp D gene in pseudomonas aeruginosa leads to moderate. Basal level and hyperinducible Amp C β -lactamase expression. Anitimicrob Agent and Chemother 2000; 583-9.
12. Silver S. Bacterial heavy metal resistance new surprison. Annu Rev Microbiol 1996; 50: 753-89.
13. Foster TJ. Plasmid determined resistance to antimicrobiol drugs and toxic metal ions in bacteria. Microbiol Rev 1983; 361-409.

* آدرس نویسنده مسئول: اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی، گروه زیست شناسی، بخش میکروب، تلفن: ۷۹۳۲۴۵۶-۳۱۱.