

و اشریشیا کلی نسبت به آنتی بیوتیکها

زہرا مولانا^{۱*}، زہرا شاہندہ^۱، محمود حاجی احمدی^۳

۱- عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- استادیار گروه پزشکی اجتماعی دانشگاه علوم پزشکی بابل

سابقه و هدف: یکی از مسائل مهم در درمان بیماریهای عفونی، مقاومت باکتریهای پاتوژن نسبت به آنتی بیوتیکها است. یکی از راههای ایجاد مقاومت منشاء پلاسمیدی است و از آنجائیکه بعضی پلاسمید ها سیستم رپلیکاسیون حساس به حرارت دارند و به وسیله رشد در حرارت غیر مجاز حذف می شوند، در این تحقیق تلاش گردیده که امکان دیگر گونه، مقاومت در باکترهای عامل عفونت با استفاده از حرارت، مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها: این مطالعه بصورت تجربی (مداخله ای) و نمونه گیری آسان انجام گرفت. پس از جمع آوری نمونه های میکروبی، تستهای مختلف جهت شناسایی کامل باکتریها انجام و برای هر نمونه ابتدا یک تست آنتی بیوگرام به طریقه دیسک دیفیوژن صورت گرفت و سپس باکتریها در محیط مایع برین هارت اینفیوژن (BHI) در حرارت ۴۳/۵° به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند و در مرحله بعد باکتری در محیط برین هارت اینفیوژن آگار در حرارت ۳۵ به مدت ۲۴ ساعت اتو گذاری شد و در انتها آنتی بیوگرام ثانویه به روش دیسک دیفیوژن انجام و با نتایج اولیه مقایسه گردید و $p < 0.05$ معنی دار تلقی گردید.

یافته ها: در میان استافیلوکوکها، بیشترین تغییرات مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها مربوط به اگزاسیلین (۱۱٪) بود

($p < 0.001$). در مورد ریفامپیسین هیچ تغییری مشاهده نگردید. در میان اشریشیا کلی بیشترین تغییرات مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها مربوط به آمپی سیلین (۷٪) بود ($p < 0.001$), اما نسبت به آنتی بیوتیکهای سفتر باکسون و سبیر و فلوکساسون هیچ تغییری مشاهده نشده است.

نتیجه گیری: حرارت می تواند باعث تغییرباکتریهای مورد مطالعه از حالت مقاوم به حساس یا نیمه حساس، نسبت به آنتی بیوتیک گردد.

واژه های کلیدی: اشريشياکلي، استافيلوکوکوس، حرارت، مقاومت آنتي بيوتيکي.

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره هشتم، شماره ۴، مرداد - شهریور ۱۳۸۵، صفحه ۲۶-۳۱

مقدمه

بیوتیکها می باشد. باکتریها به طرق مختلف نسبت به آنتی بیوتیکها مقاوم می شوند و عمده ترین راههای کسب مقاومت، به طریق

یکی از مسائل مهم در درمان بیماریهای عفونی، مقاومت باکتریهای پاتوژن نسبت به آنتی

ژنتیکی است که خود به دو دسته مقاومت کروموزومی و مقاومت پلاسمیدی تقسیم می گردد (۱). استافیلوکوکوها و اشریشیاکلی عامل تعدادی از بیماریهای انسانی و

همچنین عفونت بیمارستانی بوده و از نظر ژنتیکی هتروژن می باشند. ژنوم باکتریها کاملاً تغییر پذیر بوده و علاوه بر اضافه شدن و حذف ژنهای موجود در کروموزوم، فنوتیپ باکتریها با از دست دادن یا کسب پلاسمید تغییر می یابد برای مثال مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتریها از طریق پلاسمیدهای R منتقل و معمولاً این نوع مقاومت پایا گردیده و درمان را با شکست مواجه می نمایند (۲ و ۳) و از آنجا که پلاسمیدها از یک باکتری (به طور مثال فلور طبیعی) به باکتریهای دیگر در بدن بیمار، قابل انتقال هستند، این موضوع حائز اهمیت می باشد (۴ و ۵).

امروزه تحقیقات وسیعی در مورد نشان دادن ژنهای مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی با منشاء پلاسمیدی انجام شده است (۶ و ۷). در تحقیق Al-Masaudi و همکاران عوامل متعددی را در انتقال پلاسمید عامل مقاومت آنتی بیوتیکی به روش کانژوگیشن ذکر نموده اند که از جمله می توان

تغییرات حرارت و pH را نام برد (۸). همچنین در بررسی Murdouch و همکاران ارتباطی بین وجود پلاسمیدهای بزرگ و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک آموکسی سیلین در سویه های E.coli جدا شده از بیماران مشاهده شد (۹). لذا هدف از این تحقیق تعیین تاثیر حرارت بر مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها در دو باکتری فوق الذکر می باشد.

مواد و روشها

این مطالعه بصورت تجربی (مداخله ای) و نمونه گیری غیر احتمالی (آسان) انجام گرفت. نمونه های میکروبی از مراکز درمانی و بیمارستانی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی بابل به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پیراپزشکی بابل ارجاع گردید. ابتدا با انجام آزمایشاتی تا نوع باکتری (استافیلوکوک ویا E.Coli) مشخص گردید. در مجموع ۹۱ استافیلوکوکوس و ۱۰۰ نمونه اشریشیاکلی وارد مرحله دوم آزمایش شد که شامل:

۱- آزمایش آنتی بیوگرام اولیه به روش Agar-Diffusion و ثبت نتایج.

۲- قرار دادن باکتری های کشت شده در محیط BHI براث در حرارت °C ۴۳/۵ به مدت ۲۴ ساعت (تست اصلی

یا Treat کردن باکتری) و سپس کشت باکتری Treat شده در محیط BHI آگار و انکوباسیون در حرارت 35°C به مدت ۲۴ ساعت

۳ - آنتی بیوگرام ثانویه به همان روش فوق و ثبت نتایج انجام شد (۱).

یافته های بدست آمده با جدول استاندارد و سپس با یافته آنتی بیوگرام اولیه مقایسه گردید. برای ارائه یافته از نرم افزار SPSS و آزمون مجذور کای جهت تعیین ضریب توافق و در صورت لزوم از تست دقیق فیشر استفاده گردید و برای هر یک از آنتی بیوتیکها $p < 0.05$ معنی دار اعلام گردید.

یافته ها

به طور کلی نتایج بدست آمده از این بررسی نشان داد که همه استافیلوکوکهای مورد مطالعه نسبت به وانکومایسین حساس بوده و از این نظر تفاوتی مابین استافیلوکوکهای کوآگولاز مثبت و منفی وجود نداشته است. بنابراین در مرحله دوم آزمایش و انکومایسین حذف شد. همچنین استافیلوکوکهای مقاوم ونیمه حساس نسبت به آنتی بیوتیک، بعد از قرار گرفتن در حرارت $43/5^{\circ}\text{C}$ نیز بیشترین تغییر را نسبت به آنتی

بیوتیک اگزاسیلین (۱۱٪) نشان دادند (جدول ۱). تنها در مورد آنتی بیوتیک ریفامپیسین هیچ تغییری مشاهده نشده است.

البته قابل ذکر است که در مورد آنتی بیوتیک ریفامپیسین نیز تطابق آزمایشات در دو مرحله قبل و بعد از حرارت وجود داشته ولی تغییر در برابر عامل حرارت معنی دار نبوده است. در میان اشریشیاکلی های مورد مطالعه در این بررسی، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین مشاهده شد (جدول ۲).

برخی از اشریشیاکلی مقاوم و نیمه حساس نسبت به آنتی بیوتیک، بعد از قرار گرفتن در حرارت $43/5^{\circ}\text{C}$ ، نسبت به آنتی بیوتیکهای مورد آزمایش، تغییر نشان دادند. بیشترین تغییرات نیز نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین بود (جدول ۲) ولی نسبت به آنتی بیوتیکهای سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین هیچ تغییری دیده نشد.

بحث و نتیجه گیری

همه استافیلوکوکهای مورد مطالعه در این تحقیق نسبت به وانکومایسین حساسیت نشان دادند و هیچگونه مقاومتی نسبت به این آنتی بیوتیک مشاهده نگردید. این

مسئله مشابه مشاهدات Nishijim و همکاران (۱۰) و مغایر مطالعه انجام شده توسط بهزادیان نژاد و همکاران بر روی ۲۰۰ سویه استافیلوکوکوس آئرئوس جدا شده از نمونه های بالینی است که میزان مقاومت به وانکومايسين را ۷/۹۴٪ گزارش نموده اند (۱۱).

جدول ۱. میزان فراوانی حساسیت و یا مقاومت استافیلوکوکها نسبت به آنتی بیوتیک قبل و بعد از حرارت

مرحله	قبل از حرارت			بعد از حرارت			ضریب توافق
	n=۹۱			n=۹۱			
	مقاوم	حدوسط	حساس	مقاوم	حدوسط	حساس	
	تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)	
آنتی بیوتیک	(	(	(	(	(	(	
سفالوتین	۴۲ (۴۶/۲)	۲۴ (۲۶/۴)	۲۵ (۲۷/۴)	۴۰ (۹/۹)	۲۴ (۴/۲)	۲۷ (۷/۷)	۶۹ %
	(	(	(	(۴۳	(۲۶	(۲۹	
کوتریموکسازول	۴۰ (۴۴)	۳ (۳/۳)	۴۸ (۵۲/۷)	۳۳ (۳/۳)	۲ (۲/۲)	۵۶ (۵/۵)	۶۴ %
	(	(	(	(۳۶	(۶۱	(	
اگزاسیلین	۶۹ (۷۵/۸)	۸ (۸/۸)	۱۴ (۱۵/۴)	۵۹ (۸/۸)	۱۰ (۹/۹)	۲۲ (۱/۱)	۶۱ %
	(	(	(	(۶۴	(۱۰	(۲۴	
جنتامایسین	۲۸ (۳۰/۸)	۱۲ (۱۳/۲)	۵۱ (۵۶/۴)	۲۵ (۵/۵)	۱۱ (۱/۱)	۵۵ (۴/۴)	۶۶ %
	(	(	(	(۲۷	(۱۲	(۶۰	
سفتریاکسون	۳۳ (۳۶/۳)	۳۹ (۴۲/۹)	۱۹ (۲۰/۸)	۳۲ (۲/۲)	۳۷ (۷/۷)	۲۲ (۲/۲)	۷۰ %
	(	(	(	(۳۵	(۴۰	(۲۴	

در تمامی موارد اختلاف معنی دار بود ($p < ۰/۰۰۰۱$)

جدول ۲. میزان فراوانی حساسیت و مقاومت اشریشیاکلی نسبت به آنتی بیوتیک قبل و بعد از حرارت

مرحله	قبل از حرارت			بعد از حرارت			ضریب توافق
	n=۱۰۰			n=۱۰۰			
	مقاوم	حدوسط	حساس	مقاوم	حدوسط	حساس	
	تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)	
	(	(	(	(	(	(	
آنتی بیوتیک	(	(	(	(	(	(	
آمپی سیلین	۹۶ (۹۶)	۳ (۳)	۱ (۱)	۹۱ (۹۱)	۹ (۹)	۱ (۱)	۵۷ %

سفالوتین	۶۸ (۶۸)	۱۰ (۱۰)	۲۲ (۲۲)	۶۷ (۶۷)	۱۰ (۱۰)	۲۳ (۲۳)	۶۶ %
آمیکاسین	۱۶ (۱۶)	۱۶ (۱۶)	۶۸ (۶۸)	۱۶ (۱۶)	۱۳ (۱۳)	۷۱ (۷۱)	۷۱ %
جنتامایسین	۲۷ (۲۷)	۳۰ (۳۰)	۴۳ (۴۳)	۲۵ (۲۵)	۳۰ (۳۰)	۴۵ (۴۵)	۷۱ %
کوتریموکساو	۵۱ (۵۱)	۶ (۶)	۴۳ (۴۳)	۴۹ (۴۹)	۷ (۷)	۴۴ (۴۴)	۷۱ %

زل

در تمامی موارد اختلاف معنی دار بود ($p < 0.001$)

ترانسپوزون ۴۲۹۱ Tn در استافیلوکوکها ژن *mec A* را می تواند حمل کند (۱۳) و از آنجا که ترانسپوزون بخوبی قابل انتقال بین باکتریها است و می تواند هم درون کروموزوم و هم پلاسمید جایگزین شود، و با توجه به یافته های این تحقیق که درصد با ارزشی از باکتریهای مقاوم، بر اثر حرارت به باکتری حساس به آنتی بیوتیک تبدیل شده اند، می توان نتیجه گرفت که ژن عامل مقاومت (*mec A*) بر اثر حرارت °C ۴۳/۵ از باکتری حذف شده است (۱۴ و ۴). همچنین باکتریهایی که تحت تاثیر حرارت فوق الذکر، همچنان مقاوم باقی ماندند، مقاومتشان احتمالاً به دلیل وجود پلاسمید از نوع پایدار (*stable*) به حرارت است که از باکتری خارج نشده (۱۵) و یا بدلیل مقاومت کروموزومی در این باکتریها بوده است. در مورد آنتی بیوتیکهای خانواده پنی سیلین و سفالوسپورینها (سفالوتین و سفتریاکسون) و سولفونامیدها

تفاوت در میزان شیوع مقاومت در مناطق مختلف، احتمالاً می تواند ناشی از اختصاصات باکتریهای بومی هر منطقه، تفاوت ماده اولیه و شرایط نگهداری آنتی بیوتیکها، متدولوژی بکار گرفته شده و ... باشد. در میان استافیلوکوکهای مورد بررسی بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک اگزاسیلین (۸/۷۵%) وجود داشت پس از آن سفالوتین، کوتریموکسازول، سفتریاکسون، جنتامایسین به ترتیب مقاومت نشان داده اند. در مطالعه انجام شده توسط خدای و همکاران در بابل نیز ۷۲% مقاومت با اگزاسیلین را گزارش نمودند (۱۲). در مطالعات متعدد مشخص گردید که ژن *mec A* عامل مقاومت به متی سیلین و اگزاسیلین بوده و هر باکتری دارای این ژن، به اگزاسیلین مقاومت نشان میدهد.

(کوتریموکسازول) مقاومت می تواند وابسته به پلاسمید و ترانسپوزون باشد و تغییر مقاومت در بررسی حاضر به دلیل تاثیر حرارت در باکتری مذکور بوده است. در آنتی بیوتیک گروه آمینوگلیکوزید (جنتامایسین) نیز مقاومت در باکتری وابسته به آنزیمی است که توسط پلاسمید کد می شود (۱۶). E.Coli نیز بعنوان یکی از عوامل مهم عفونتهای بیمارستانی، غالباً حاوی ژنهای مقاوم به چند آنتی بیوتیک می باشد. در بررسی که توسط Murdoch و همکاران انجام شده است مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای قابل دسترس مثل آمپی سیلین، کلرامفنیکل، تتراسیکلین و کوتریموکسازول بسیار شایع بوده در حالیکه مقاومت نسبت به عواملی که تنها در بیمارستانها بکار برده می شوند مثل جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و نسل سوم سفالوسپورینها بسیار کمتر می باشد. همچنین ارتباطی بین وجود پلاسمیدهای بزرگ و مقاومت نسبت به آموکسی سیلین در سویه های جدا شده از بیماران مشاهده شد (۹).

در بررسی حاضر، بیشترین میزان حساسیت آنتی بیوتیکی در اشریشیاکلی مربوط به سفتریاکسون ۹۲٪ و سیپروفلوکساسین ۷۷٪ بوده و بالاترین میزان مقاومت نسبت به آمپی سیلین ۹۶٪ مشاهده شده است.

در مطالعه انجام شده توسط کیادربندسری و همکاران نیز میزان حساسیت به سیپروفلوکساسین را ۷۰٪ و میزان مقاومت نسبت به آمپی سیلین را صددرصد گزارش نموده اند (۱۷). تغییرات مقاومت در اثر حرارت در E.Coli، نسبت به آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین، سفالوتین، آمیکاسین، جنتامایسین و کوتریموکسازول مشاهده شد که با $p < 0.001$ معنی دار می باشد ولی در سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین هیچ تغییری مشاهده نشد. تغییر حالت از مقاوم به حساس نسبت به آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین، آمیکاسین، جنتامایسین در E.coli مورد آزمایش، قابل توجه بوده و به نظر می رسد که ژنهای عامل مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیکها بر روی پلاسمید حساس به حرارت بوده است. پایدار ماندن مقاومت نسبت به سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین نیز می تواند به دو دلیل ۱- مقاومت با منشاء کروموزومی و ۲- عامل مقاومت بر روی پلاسمیدهای پایدار به حرارت باشد که تحت تاثیر حرارت فوق الذکر تغییری نیافته است.

در مطالعه امیدی و همکاران، بیشترین میزان مقاومت در اشریشیاکلی را مربوط به آمپی سیلین و تتراسیکلین و بیشترین حساسیت را نسبت به

تغییرات کمتری را نشان می‌دهند، بنظر می‌رسد. DNA پلاسمید قبل و بعد از حرارت اطلاعات مفیدی را ارائه خواهد کرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی، کتابخانه دانشکده پیراپزشکی و کلیه عزیزانی که در اجرای این مطالعه ما را یاری نموده اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

سیپروفلوکساسین و سفالوسپورینهای نسل سوم یافتند و با تعیین وزن مولکولی پلاسمیدهای استخراج شده و دسته بندی آنها، معلوم شد که پلاسمیدهایی با وزن مولکولی سبک تر و متوسط باعث افزایش مقاومت به آمپی سیلین و جنتامایسین شدند (۱۸).

با توجه به مطالب فوق از آنجائیکه خصوصیات فنوتیپی مانند الگوی حساسیت به آنتی بیوتیکها و عوامل ضد میکروبی تحت شرایط وضعیت رشد، تمایل زیادی به تغییر داشته ولی خصوصیات ژنتیک،

References

۱. ستوده نیاع. میکروبیشناسی پزشکی جاووز، ویرایش ۲۲، تهران انتشارات ارجمند ۱۳۸۲؛ ص: ۱۱-۲۰۸.
2. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Staphylococcus, micrococcus and similar organisms, in: Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 11th ed, Mosby 2002; pp:285-92.
3. Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology, Focus on infection. Am J Epidemiol 2001; 153(12): 1135-41.
4. Bennett PM, Howe TG. Bacterial and bacteriophage genetics, in: Collier L, Balows A, Sussman M, Topley and Wilson's microbiology and microbial infection, 9th ed, New York, ARNOLD 1998; pp: 231-65.
5. Schwarz S, Gregory PD, Werckenrthin C, Curnock S, Dyke KG. A Novel plasmid from staphylococcus epidermidis specifying resistance to kanamycin, neomycin and tetracycline. J Med Microbiol 1996; 45(1): 57-63.
6. Aertsen A, anoirbeek K, De Spiegeleer P, et al. Heat shock protein- mediated resistance to high hydrostatic pressure in Escherichia coli. Appl Microbiol 2004;70(5): 2660-6.
7. O' Neill AJ, Bostock JM, Moita AM. Antimicrobial activity and mechanisms of resistance to cephalosporin P1, an antibiotic related to fusidic acid. J Antimicrob Chemother 2002; 50(6): 839- 48.
8. AL Masaudi SB, Russel AD, Day MJ. Factors affecting conjugative transfer of plasmid PWG613, determining gentamicin resistance in staphylococcus aureus. J Med Microbiol 1991; 34(2): 103-7.
9. Murdoch D, Spillman I, Kabare P. Antibiotic availability and multiresistant Coliforms in a rural Ugandan Hospital. J Trop Med Hyg 1995; 98(1): 25-8.

10. Nishijim S, Ohshima S, Higashida T, Nakaya H, Kurokawa I. Antimicrobial resistance of staphylococcus aureus isolated from impetigo patients between 1994 and 2000. *Int J Dermatol* 2004; 43(3): 235-6.
۱۱. بهزادیان نژاد ق، انوری م. مقاومت آنتی بیوتیکی با منشأ احتمالی پلاسمیدی در ۲۰۰ سویه استافیلوکوکوس جدا شده از نمونه های بالینی. فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سمنان ۱۳۷۹؛ ۲(۲): ۶۷-۷۲.
۱۲. خدای ا، جمشیدی اع. بررسی استافیلوکوک آرنوس مقاوم به اکزاسیلین جدا شده از بیماران حاملین در بیمارستانهای بابل (۱۳۷۹). *مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل* ۱۳۸۰؛ ۳(۴): ۴۳-۶۰.
13. Lim VK. Staphylococcal infection in Malaysia hospitals. *J Hosp Infect* 1988; 11 (Suppl A): 103 –8.
14. Mandell GL, Petri WA. Antimicrobial agents [continued] penicillins, cephalosporins and other beta-lactom antibiotics in: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of threapeutics , 9th ed, USA, Mac Graw Hill 1996; p: 1076.
15. Coleman DC, Pomeroy H, Estridge JK, Keane CT, Cafferkey MT, Hone R, Foster TJ. Susceptibility to antimicrobiol agents and analysis of plasmids in Gentamicin- and methicillin- resistant staphylococcus aureus from Dublin hospitals. *J Med Microbiol* 1985; 20(2): 157- 67.
۱۶. کرمانشاهی ر، کیوانی امینه ح، گلعلی پور م. ارتباط بین بتالاکتاماز و پروئین A در استافیلوکوکوس آرنوس ، *مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل* ۱۳۷۹؛ ۲(۲): ۱۶-۲۲.
۱۷. کیادربند سری ب، فتاحی ع، رهبر م و همکاران. جداسازی و تعیین الگوی مقاومت دارویی انتروپاتوژنهای شایع باکتریایی *مجله گشتک* ۱۳۸۲؛ ۱۱(۳۹ و ۴۰): ۳۰-۴۰.
۱۸. امید م ن، توکلی ا، قاسمیان ح و همکاران. جداسازی و تعیین الگوی پلاسمیدها و ارتباط آن با مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری اشريشياکلی جدا شده از عفونت های ادراری . *ششمین کنگره سراسری میکروشناسی ایران* ۱۳۸۲؛ ص: ۷۰.

*آدرس نویسنده مسئول: بابل، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پیراپزشکی،
تلفن: ۵-۲۲۲۹۵۹۱-۰۱۱۱.

moulana@mubabol.ac.ir