●مجلة دانشگاه علوم پزشكي بابل، دوره هشتم، شمارة ۴، مرداد - شهريور۱۳۸۵، صفحه ۳۱-۲۶
دريافت: ۸۴/۱/۲۴، پذيرش: ۸۴/۱۰/۷

بررسی اثر حرارت بر مقاومت باکتریهای استافیلوکوکوس و اشریشیاکلی نسبت به آنتی بیوتیکها

زهرا مولانا[۱*]، زهرا شاهنده[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 دگرگونی مقاومت در باکتریهای 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 $43/5^{\circ}c$ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند ودر مرحله بعد باکتری در محیط برین هارت اینفیوژن آگار در حرارت $^{\circ}c$ ۳۵ به مدت ۲۴ ساعت اتو گذاری شد ودر 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 ($p<0/0001$). در مورد ریفامپیسین هیچ تغییری مشاهده نگردید. در میان اشریشیا کلی بیشترین تغییرات مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها مربوط به آمپی سیلین(۷٪) بود($p<0/0001$)، اما نسبت به آنتی بیوتیکهای سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین 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: ***اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس، حرارت، مقاومت آنتی بیوتیکی.***

مجلة دانشگاه علوم پزشكي بابل، دوره هشتم، شماره ۴، مرداد - شهريور ۱۳۸۵، صفحه ۳۱-۲۶

مقدمه

يكي از مسائل مهم دردرمان بيماريهاي عفوني، مقاومت باكتريهاي پاتوژن نسبت به آنتي بيوتيكها مي باشد. باكتريها به طرق مختلف نسبت به آنتي بيوتيكها مقاوم مي شوند و عمده ترين راههاي كسب مقاومت، به طريقه

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.4.4]

ژنتیکي است که خود به دو دسته مقاومت کروموزومي و مقاومت پلاسميدي تقسيم مي گردد(۱). استافيلوکوکها و اشريشياکلی عامل تعدادی از بيماريهای انسانی و

همچنين عفونت بيمارستانی بوده و از نظر ژنتيکی هتروژن می باشند. ژنوم باکتريها کاملا تغيير پذير بوده و علاوه بر اضافه شدن و حذف ژنهای موجود در کروموزوم، فنوتيپ باکتريها با از دست دادن يا کسب پلاسميد تغيير می يابد برای مثال مقاومت آنتی بيوتيکی در بين باکتريها از طريق پلاسميدهای R منتقل و معمولا اين نوع مقاومت پايا گرديده و درمان را با شکست مواجه مي نمايند(۳و۲) و از آنجا که پلاسميدها از يك باکتري (به طور مثال فلورطبيعی) به باکتريهاي ديگر در بدن بيمار، قابل انتقال هستند، اين موضوع حائز اهميت مي باشد(۵و۴).

امروره تحقيقات وسيعی در مورد نشان دادن ژنهای مربوط به مقاومت آنتی بيوتيکی با منشاءپلاسميدی انجام شده است(۷و۶). در تحقيق Al-Masaudi و همکاران عوامل متعددی را در انتقال پلاسميد عامل مقاومت آنتی بيوتيکی به روش کانژوگيشن ذکر نموده اندکه از جمله می توان تغييرات حرارت و pH را نام برد(۸). همچنين در بررسی Murdouch و همکاران ارتباطی بين وجود پلاسميدهای بزرگ و مقاومت نسبت به آنتی بيوتيك آموکسی سيلين در سويه های E.coli جدا شده از بيماران مشاهده شد(۹). لذا هدف از اين تحقيق تعيين تاثير حرارت بر مقاومت نسبت به آنتي بيوتيکها در دو باکتري فوق الذکر می باشد.

مواد و روشها

اين مطالعه بصورت تجربی (مداخله ای) ونمونه گيری غير احتمالی (آسان) انجام گرفت. نمونه هاي ميکروبی از مراکز درماني و بيمارستاني وابسته به دانشگاه علوم پزشکي بابل به آزمايشگاه ميکروبيولوژي دانشکده پيراپزشکي بابل ارجاع گرديد. ابتدا با انجام آزمايشاتي تا نوع باکتري (استافيلوکوك ويا E.Coli) مشخص گرديد. در مجموع ۹۱ استافيلوکوکوس و ۱۰۰ نمونه اشريشياکلی وارد مرحله دوم آزمايش شد که شامل:

۱- آزمايش آنتي بيوگرام اوليه به روش Agar-Diffusion و ثبت نتايج.

۲- قرار دادن باکتري هاي کشت شده در محيط BHI براث در حرارت $^{\circ}c$ ۴۳/۵ به مدت ۲۴ ساعت(تست اصلي

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.4.4]

یا Treat کردن باکتري) و سپس کشت باکتري Treat شده در محیط BHI آگارو انکوباسیون در حرارت °c ۳۵ به مدت ۲۴ ساعت

۳ - آنتي 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 کلي نتایج بدست آمده از این بررسی نشان داد که همه استافیلوکوکهاي مورد مطالعه نسبت به وانکومایسین حساس بوده و از این نظر تفاوتي مابین استافیلوکوکهاي کوآگولاز مثبت و منفي 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 °c ۴۳/۵ نیز بیشترین تغییر را نسبت به آنتی بیوتیک اگزاسیلین (۱۱%) نشان دادند(جدول ۱). تنها در مورد آنتي بیوتیك ریفامپیسین هیچ تغییري 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 اشریشیاکلي های مورد مطالعه در این بررسی، بیشترین مقاومت نسبت به آنتي بیوتیك آمپي سیلین مشاهده شد(جدول ۲).

برخی از اشریشیاکلی مقاوم و نیمه حساس نسبت به آنتی بیوتیک، بعد از قرار گرفتن در حرارت °c ۴۳/۵، نسبت به آنتی بیوتیکهای مورد آزمایش، تغییر نشان دادند. بیشترین تغییرات نیز نسبت به آنتي بیوتیك آمپي سیلین بود(جدول ۲) ولی نسبت به آنتی بیوتیکهای سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین هیچ تغییري دیده نشد.

بحث و نتیجه گیری

همه استافیلوکوکهاي مورد مطالعه در این تحقیق نسبت به وانکومایسین حساسیت نشان دادند و هیچگونه مقاومتي نسبت به این آنتي بیوتیك مشاهده نگردید. این

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.4.4]

مسئله مشابه مشاهدات Nishijim و همکاران (۱۰) و مغایر مطالعه انجام شده توسط بهزادیان نژاد و همکاران بر روي ۲۰۰ سویه استافیلوکوکوس آرئوس جدا شده از نمونه هاي بالیني است که میزان مقاومت به وانکومایسین را ۷/۹۴% گزارش نموده اند (۱۱).

جدول ۱. میزان فراوانی حساسیت و یا مقاومت ا ستافیلوکوکها نسبت به آنتی بیوتیک قبل و بعدازحرارت

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

در تمامی موارد اختلاف معنی دار بود ($p<0/0001$)

جدول۲. میزان فراوانی حساسیت و مقاومت اشریشیاکلی نسبت به آنتی بیوتیک قبل و بعد از حرارت

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

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.4.4]

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 زل	۵۱ (۵۱)	۶ (۶)	۴۳ (۴۳)	۴۹ (۴۹)	۷ (۷)	۴۴ (۴۴)	%۷۱

در تمامی موارد اختلاف معنی دار بود ($p<0/0001$)

تفاوت در میزان شیوع مقاومت در مناطق مختلف، احتمالاً مي تواند ناشي از اختصاصات با کتريهاي بومي هر منطقه، تفاوت ماده اوليه و شرايط نگهداري آنتي بيوتيکها، متدولوژي بکار گرفته شده و ... باشد. در ميان استافيلوکوکهاي مورد بررسي بيشترين مقاومت نسبت به آنتي بيوتيك اگزاسيلين (۷۵/۸%) وجود داشت و پس از آن سفالوتين، کوتريموکسازول، سفتياکسون، جنتامايسين به ترتيب مقاومت نشان داده اند. در مطالعه انجام شده توسط خدامي و همکاران در بابل نيز ۷۲% مقاومت با اگزاسيلين را گزارش نمودند (۱۲). در مطالعات متعدد مشخص گرديد که ژن mec A عامل مقاومت به متي سيلين و اگزاسيلين بوده و هر باکتري داراي اين ژن، به اگزاسيلين مقاومت نشان ميدهد. ترانسپوزون Tn ۴۲۹۱ در استافيلوکوکها ژن mec A را مي تواند حمل کند(۱۳) و از آنجا که ترانسپوزون بخوبي قابل انتقال بين باکتريها است و مي تواند هم درون کروموزوم و هم پلاسميد جايگزين شود، و با توجه به يافته های اين تحقيق که درصد با ارزشي از باکتريهاي مقاوم، بر اثر حرارت به باکتري حساس به اين آنتي بيوتيك تبديل شده اند، مي توان نتيجه گرفت که ژن عامل مقاومت (mec A) بر اثر حرارت $^{\circ}$ ۴۳/۵ از باکتري حذف شده است(۱۴و۴). همچنين باکتريهايی که تحت تاثير حرارت فوق الذکر، همچنان مقاوم باقي ماندند، مقاومتشان احتمالاً به دليل وجود پلاسميد از نوع پايدار (stable) به حرارت است که از باکتري خارج نشده (۱۵) و يا بدليل مقاومت کروموزومی در اين باکتريها بوده است. در مورد آنتي بيوتيکهای خانواده پني سيلين و سفالوسپورينها (سفالوتين و سفتياکسون) و سولفونا ميدها

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.4.4]

(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، تراسیکلین 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 اثرحرارت 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 ازمقاوم به حساس نسبت به آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین، آمیکاسین، جنتامایسین در E.coli مورد آزمایش، قابل توجیه بوده و به نظر می رسدکه 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 برروی 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 تراسیکلین و بیشترین حساسیت را نسبت به

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.4.4]

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، تغییرات کمتری را نشان میدهند، بنظر می رسد. DNA پلاسمید قبل و بعد از حرارت اطلاعات مفیدی را ارائه خواهدکرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشي، کتابخانه دانشکده پیراپزشکي و کلیه عزیزاني که در اجراي این مطالعه ما را یاري نموده اند، صمیمانه تشکر و قدرداني مي گردد.

References

۱. ستوده نیا ع. میکروبشناسی پزشکی جاوتز، 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, l1th ed, Mosby 2002; pp:285-92.

3. Foxman B, Riley L. Molcular epidemiology, Focus on infection. Am J Epidemiol 2001; 153(12): 1135-41.

4. Bennett PM, Howe TG. Bacterial and bacteriophage geneties, in: Coller 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 staphyiLococcus 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 Hospitial. J Trop Med Hyg 1995; 98(1): 25-8.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.4.4]

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 منشاء احتمالی پلاسمیدی در ۲۰۰ سویه استافیلوکوکوس جدا شده از نمونه های بالینی. فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سمنان ۱۳۷۹؛ ۲(۲):۷۲-۶۷.

۱۲ . خدامی ا، جمشیدی اع. بررسی استافیلوکوک آرئوس مقاوم به اگزاسیلین جدا شده از بیماران وحاملین در بیمارستانهای بابل (۱۳۷۹). مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل ۱۳۸۰؛ ۳(۴):۶-۴۳.

13 . Lim VK. Staphylococcal infection in Malaysion 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 وپروئینA در استافیلوکوکوس آرئوس ، مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل ۱۳۷۹؛ ۲(۲): ۲۲-۱۶.

۱۷. کیادربند سری ب، فتاحی ع، رهبر م و همکاران. جداسازی وتعیین الگوی مقاومت دارویی انتروپاتوژنهای شایع باکتریایی مجله گشتگ ۱۳۸۲؛ ۱۱(۳۹و۴۰):۴-۳۰.

۱۸. امیدی م ن، توکلی ا، قاسمیان ح و همکاران. جداسازی وتعیین الگوی پلاسمیدها وارتباط آن با مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری اشریشیاکلی جدا شده از عفونت های ادراری . ششمین کنگره سراسری میکروبشناسی ایران ۱۳۸۲؛ ص: ۷۰.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.4.4]

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

moulana@mubabol.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.4.4]