تعیین میزان حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد(MIC) تلوریت پتاسیم در نمونه های اشریشیا کلی جدا شده از کشت ادرار و مدفوع در انسان

شهلا منصوری* [۱]، سید محمد نایب آقایی **

چکیده

هدف: مقاومت به یون فلزات سنگین در بسیاری از باکتریها دیده شده و از آنجا که هر تغییری در عمل کرد باکتری می‌تواند از نظر علمی و کلینیکی اهمیت داشته باشد؛ هدف از این بررسی تعیین میزان مقاومت نسبت به یون فلزی تلوریت پتاسیم در نمونه‌های بالینی اشریشیا کلی می‌باشد.

روش بررسی: حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد (MIC)[۱] تلوریت پتاسیم برای ۴۴۹ نمونه اشریشیا کلی جدا شده از عفونت ادراری و فلور طبیعی مدفوع با روش استاندارد رقت در آگار تعیین شد.

یافته‌ها: برای حدود یک دوم ایزوله ها (۴۸/۷درصد) MIC برابر و یا کمتر ازیک میکروگرم در میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت اینکوباسیون در ° ۳۵C بود . بسیاری از باکتریها که در مجاورت غلظت کم پتاسیم تلوریت قادر به رشد نبودند (MIC کمتر و یا مساوی با ۵ میکروگرم در میلی لیتر) ، در طول ۲۴ ساعت اینکوباسیون مجدد شروع به رشد نمودند و میزان MIC برای این جدایه ها افزایش یافت ، و تفاوت میان MIC در فاصله زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت از نظر آماری معنی دار گردید (۰/۰۰۰۶ ≥ P). در محیط حاوی غلظت های معادل و یا بیشتر از ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر تلوریت پتاسیم ، باکتری ها کلنی سیاه رنگ تولید نمودند. تفاوت آماری معنی داری میان MIC در باکتریهای جدا شده از نمونه های مدفوع و ادرار انسان با یکدیگر دیده نشد.

نتیجه‌گیری : نتایج نشان دهنده مقاومت بالا در بیش از نیمی از سویه های کلینیکی اشریشیا کلی نسبت به فلز تلوریت می باشد. به دلیل امکان مقاومت همزمان بین آنتی بیوتیک ها و یون فلزات سنگین ادامه این بررسی با هدف تعیین مقاومت همزمان با آنتی بیوتیک ها و سایر فلزات سنگین در این باکتری و سایر جنس های باکتریایی در این منطقه لازم است.

کلید واژه‌گان: تلوریت پتاسیم ، اشریشیا کلی، عفونت ادراری، فلور طبیعی مدفوع

مقدمه

فلزات سنگین در صنایع مختلف کاربرد داشته و از عوامل عمده آلودگی های محیطی می باشند(۱). اگر چه یون بسیاری از فلزات سنگین در غلظت کم از اجزاء ضروری رشد سلولی می باشند؛ در غلظت های بالاتر که معمولاً در محیط های آلوده وجود دارد، این یون ها می توانند دارای اثرات سمی باشند (۲). تلوریت پتاسیم از املاح فلزی است که سبب مهار رشد طیف وسیعی از باکتریها می گردد(۱). بر اساس برخی گزارشات مقاومت خود به خود نسبت به به عنوان نشانگر ژنتیکی در کارهای تحقیقاتی استفاده کرد.(۳). در حالیکه محققین دیگر را در

1-Minimum Inhibitory Concentration

* استاد گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

**عضو هیئت علمی دانشگاه لرستان

۱- نویسنده مسؤل

دریافت مقاله: ۱۳۸۲/۱۰/۲۳ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۴/۵/۱ اعلام قبولی: ۱۳۸۵/۱/۲۸

Archive of SID

www.SID.ir

اشریشیاکلی‌های جدا شده از منابع کلینیکی یافته اند که ایجاد مقاومت نسبت به تلوریت در این باکتریها نموده و به سبب فراوانی این پلاسمیدها در میان باکتریهای انتریک ، مقاومت نسبت به تلوریت پتاسیم در میان این باکتریها معمول گزارش شده است(۴). نظر می رسد که تلوریت از طریق فعالیت اکسیداتیو سبب جلوگیری از رشد باکتریها نموده و به همین دلیل فعالیت گسترده ای بر علیه طیف وسیعی از میکروارگانیزم ها دارد (۴، ۵). از مکانیزم های ممکن برای سم زدایی تلوریت ، احیاء آن به فرم فلزی (Tellurium) است و به همین دلیل باکتری های رشد کرده در محیط های حاوی تلوریت کلنی های سیاه رنگ تولید میکنند (۱،،۶، ۷). در بسیاری از محیط های آلوده به املاح فلزی باکتریها مقاومت بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک ها دارند(۸،۹).به علت گستردگی استفاده از فلزات سنگین؛ بسیاری از محیط ها آلوده به این املاح می باشند. باکتریهایی که قادر به رشد در مجاورت فلزات سنگین هستند نقش مهمی در چرخه بیولوژیکی و شیمیایی این فلزات در طبیعت دارند از طرفی این باکتریها مفید بوده و قادرند یون فلزات سنگین را از حالت اکسیده که در ارتباط با سمیت و حلالیت این فلزات است خارج کرده و آنها را به حالت احیا شده ، غیر محلول و بدون سمیت در آوردند (۲،۶،۷).از طرف دیگر ارتباطی بین مقاومت به یون فلزات سنگین و آنتی بیوتیک ها وجود داشته و بسیاری از محققین معتقدند که ژنهای مقاومت به فلزات سنگین و برخی آنتی بیوتیک ها در فواصل نزدیک و بر روی یک پلاسمید مشترک حمل میگردند و بنا بر این احتمال مقاومت همزمان بین آنها وجود دارد (۴،۵،۸). وجود چنین پلاسمیدهایی به نفع باکتری و بقاء این باکتری در یک محیط اکولوژیک مشترک با باکتریهای فاقد این پلاسمیدها میگردد (۵). باید در نظر گرفت که باکتریها به خصوص اشریشیاکلی ، که به فراوانی در محیط یافت می شود به حدی با آلودگی های محیطی و فلزات سنگین در تماس است که الزاماً برای بقاء لازم است تا مکانیزم هایی ژنتیکی را جهت مقابله با این سمیت به کار گیرد. (۷و۶). در نتیجه محیط های آلوده به املاح فلزی می توانند نقش بسیار مهمی در بروز؛ بقاء و انتقال مقاومت به آنتی بیوتیک ها در باکتریها داشته باشند (۹). از املاح تلوریت مانند پتاسیم تلوریت بیش از ۸۰ سال است که در باکتری شناسی برای جدا سازی برخی باکتری های بیماریزا نظیر استافیلوکوک ارئوس ، کورینوباکتریوم دیفتریه و شیگلاها استفاده میشود (۱۰) . افزودن تلوریت پتاسیم به محیط های کشتی مانند سوربیتول مگانگی آگار سبب جداسازی بهتر سروتایپ O157 ، که از انواع اشریشیا کلی های انتروهموراژیک می باشد،میگردد و علت آن مقاومت بهتر سویه های O157 در مقایسه با سایر انواع اشریشیاکلی نسبت به تلوریت می باشد (۱۱). بیشتر کارهایی که اخیراً در مورد حساسیت نسبت به تلوریت انجام شده روی باکتریهای استاندارد بوده است در این مطالعه ما میزان MIC را برای ۴۴۹ جدایه اشریشیاکلی که از عفونت ادرار و یا فلور روده (کشت مدفوع) در انسان جداسازی شده اند، مورد بررسی قرار دادیم.

روش بررسی

جدایه های اشریشیاکلی شامل ۲۶۵ نمونه جدا شده از عفونت ادرار و ۱۸۴ نمونه جدا شده از کشت مدفوع در انسان بودند. تمام باکتریهای جداسازی شده توسط تستهای بیوشیمیایی استاندارد شناسایی گردیدند (۱۲) .

حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد (MIC) تلوریت پتاسیم با روش استاندارد رقت در آگار مورد بررسی قرار گرفت (۱۳) . برای انجام آزمایش از محیط مولر- هینتون آگار (Oxoid) که به آن غلظت های مختلف تلوریت پتاسیم (استریل شده توسط فیلتر میلی پور) اضافه شده بود ، استفاده گردید.سوسپانسیون میکروبی. استاندارد شده با نیم مک فارلند، به نسبت ۱:۲۰۰ رقیق گردید به طوری که در ۱۰ میکرولیتر آن که برای تلقیح به محیط کشت استفاده شد، حدوداً 10^4 ارگانیزم وجود داشته باشد. آخرین رقتی از تلوریت پتاسیم در محیط که رشد میکروبی در آن صورت

Archive of SID
www.SID.ir

نگرفته و یا کمتر از ۵ کلنی میکروبی رشد داشت ، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. جهت مقایسه داده ها و تعیین هر مجذور کای(X^2) استفاده شد ومیزان ۰/۰۵ ≥ به عنوان تفاوت آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد، تجزیه و تحلیل‌های آماری توسط نرم افزار E PI6 صورت گرفت.

یافته‌ها

گونه اختلاف معنی دار از آزمون آماری T-Test و

پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت اینکوباسیون در ۳۵ C° محیط های کشت مورد بررسی قرار گرفته؛ رشد و عدم رشد در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت یادداشت شد. میزان MIC برای ۲۱۹ (۴۷/۸درصد) جدایه پس از ۲۴ ساعت اینکوباسیون میکروگرم / میلی متر ۱ بود (جدول ۱).

جدول۱ :حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد تلوریت پتاسیم برای ۴۴۹ جدایه اشریشیاکلی× پس از ۲۴ ساعت اینکوباسیون در ۳۵° c

	حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد برحسب میکروگرم بر میلی لیتر تعداد (درصد)							
زمان اینکوباسیون (ساعت)	۱	۲/۵	۵	۱۰	۲۰	۴۰	۸۰	≤۱۶۰
۲۴	۲۱۹ (۴۸/۸)	۲۸ (۶/۲)	۱۶ (۳/۶)	۴۲ (۹/۳۵)	۶۲ (۱۳/۸)	۶۳ (۱۴)	۱۲ (۲/۷)	۷ (۱/۶)
۴۸	۱۶۷ (۳۷/۲)	۴۷ (۱۰/۵)	۴۵ (۱۰)	۵۲ (۱۱/۶)	۵۷ (۱۲/۷)	۵۳ (۱۱/۸)	۱۶ (۳/۶)	۱۲ (۲/۷)
P	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۱	۰/۲۷	۰/۶۲	۰/۳۲	۰/۴۴	۰/۲۴

- اشریشیا کلی ها ی جدا شده شامل ۲۶۵ نمونه جدا شده از عفونت ادراری و ۱۸۴ نمونه از کشت فلور طبیعی مدفوع می باشند.

بسیاری از باکتری ها که در غلظت کم تلوریت پتاسیم (۵ ≥µg/ml) در ۲۴ ساعت اولیه رشد نکرده بودند درمدت اینکوباسیون مجدد به مدت ۲۴ ساعت شروع به رشد نمودند،به طوری که اختلاف میان MIC در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت برای این سویه‌ها معنی‌دار گردید(P<۰/۰۰۰۶).

تمامی باکتری هایی که در محیط های حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر (یا بیشتر) از تلوریت رشد کرده بودند در این محیط کلنی سیاه رنگ ایجاد نمودند. میزان MIC در سویه های ادراری و مدفوعی مشابه بوده و اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

جدول۲: مقایسه میزان MIC تلوریت پتاسیم در باکتریهای جدا شده از عفونت ادراری و کشت مدفوع پس از ۲۴ ساعت اینکوباسیون در ۳۵° c.

نمونه	حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد برحسب میکروگرم/میلی لیتر؛ تعداد (درصد)							
	۱	۲/۵	۵	۱۰	۲۰	۴۰	۸۰	≤۱۶۰
ادرار	۹۴(۵۱/۱)	۹(۴/۹)	۷(۳/۸)	۱۷(۹/۲)	۲۱(۱۱/۴)	۲۷(۱۴/۵)	۶(۳/۳)	۳(۱/۶)
مدفوع	۱۲۵(۴۷/۲)	۱۹(۲/۳)	۹(۳/۴)	۲۵(۹/۴)	۴۱(۱۵/۵)	۳۶(۱۳/۶)	۶(۲/۳)	۴(۱/۵)
P	۰/۴	۰/۳۲	۰/۸	۰/۹	۰/۲	۰/۷	۰/۵	۰/۹

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

میکروارگانیزم ها نقش مهمی در تجزیه و از میان برداشتن یون های فلزی در محیط داشته و مطالعه مقاومت آنها نسبت به فلزات سنگین در شناخت پدیده های محیطی و فرایندهای حیاتی نقش عمده ای دارد. کاهش نگران کننده حساسیت باکتریها به داروهای ضد میکروبی در چند سال گذشته بعلت واکنش این باکتریها به شرایط محیطی نا مناسب و در جهت بقاء آنها سبب مشکل شدن درمان عفونتهای میکروبی گردیده است.(۱۴). بسیاری از ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک ها خارج کروموزومی بوده واز طریق عوامل جایگزینی[1] پلاسمیدها و یا اینترگرون‌ها[2] حمل میگردند.بسیاری از این عوامل به آسانی در بین گروه های مختلف باکتریها جا به جا شده و اکثریت مقاومت همزمان به چندین آنتی بیوتیک،فلزات سنگین وسایر مواد سمی راحمل میکنند (۸) . در اصفهان دکتر کرباسی زاده و همکاران، در باکتریهای جدا شده از عفونتهای بیمارستانی پلاسمیدهای کونژوگاتیوی را شناسایی نموده اند که علاوه بر مقاومت به فلزات سنگین، مقاومت به برخی از آنتی بیوتیک ها را نیز انتقال میدهند(۱۵). در مورد مقاومت به تلوریت در ایران اطلاعات مکتوبی در دست نیست.به طور کلی مقاومت به تلوریت در باکتری اشریشیا کلی بیشتر از سایر باکتریها مورد بررسی قرار گرفته است لیکن در مورد میزان مقاومت و حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد در این باکتری اطلاعات ضد و نقیضی در دست است . برای مثال در بررسیهای انجام شده توسط توماس و همکاران و همجنین تایلور و همکاران تلوریت بشدت برای اشریشیا کلی سمی گزارش شده و میزان متوسط MIC برای این سلول ها حدود ۱ میکروگرم در میلی لیتر بوده است (۱۶ و ۱۰) . در حالیکه به عقیده گروه دیگر پلاسمیدهایی که مقاومت به تلوریت را حمل می کنند به فراوانی در طبیعت و در میان باکتریهای انتریک گسترده بوده و علاوه بر مقاومت به تلوریت مقاومت به کلی سین‌ها، آنتی سپتیک‌ها و فاژها را حمل می کنند (۱۱،۱۷). همچنین میزان مقاومت در سویه های انتروهموراژیک از سروتایپ های O157 به فراوانی بیشتری گزارش شده و میزان MIC برای این باکتری ها بین ۲۵ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر گزارش شده است (۱۱،۱۷). در مطالعه حاضر حدود نیمی از جدایه ها دارای MIC معادل و یا کمتر از ۱ میکروگرم در میلی لیتر بودند.؛ در حالیکه MIC معادل ۸۰،۴۰،۲۰ و ۱۶۰میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب در ۲۰درصد،، ۳۸/۱درصد،۵/۶درصد و ۳/۱درصد جدایه ها مشاهده شد. همچنین در این بررسیMIC برای ۵ سویه اشریشیا کلی که با روش کشت سلولی با سلول های vero و اگلوتیناسیون با آنتی سرم O157 مثبت گزارش شده بودند (۱۸)، و دو سویه مولد توکسین ورو (VT1,VT2) تهیه شده از انسیتو پاستور ایران ۲۰- ۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر بود. در این تحقیق ما از روش استاندارد رقت در آگار استفاده نموده و تعداد باکتریها را پس از استاندارد کردن با ۰/۵ مک فارلند ۲۰۰: ۱ رقیق نمودیم (10^4 باکتری برای تلقیح). نکته جالب توجه اینکه کوچکترین تغییری در رقت باکتری اثر بسیار زیادی بر روی میزان MIC داشت. خنثی شدن و یا کاهش اثرات سمی تلوریت در غلظت کم می تواند در این امر موثر باشد.که معنی دار شدن تفاوت MIC نسبت به تلوریت در این باکتریها در فاصله زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت نیز تایید کننده کاهش اثر ضد میکروبی تلوریت در غلظت کم می باشد. مشاهدات مشابهی در مورد فلز وانادیوم و مخمر ساکورمیس دیده شده است ، که علت آن ، احیاء وانادیوم در غلظت کم و خروج آن از سلول فرض شده است . در حالیکه در غلظت بالا میزان فلز وارد شده به سلول بیشتر از حدی بوده که تمامی آن احیاء گردد ، در نتیجه حجم زیادی از وانادیوم در سلول جمع شده و مانع رشد

1-Transposons
2-Intergrons

Archive of SID
www.SID.ir

باکتریها میگردد (۱۹). در مورد فلز کادیوم در اشریشیا کلی سویه K12 نیز در ساعتهای اولیه آسیب وارد شده پس از یک دوره کوتاه ترمیم یافته و سلول در مجاورت غلظت کم کادمیوم به رشد ادامه خواهد داد (۲۰). در مورد مکانیزم این تغییر MIC در مورد تلوریت گزارشی در منابع دیده نشده و نیاز به بررسی بیشتر دارد. در بررسی تایلور در سال ۲۰۰۲ میزان MIC برای سویه های O157 بالاتر از تحقیق حاضر گزارش شده است که علت آن می تواند با غلظت سوسپانسیون میکروبی در ارتباط باشد، این پژوهشگران از غلظت سلولی بیشتری(۵×۱۰^{۴} سسسلول میکروبی) برای تعیین میزان MIC استفاده کرده اند(۱۰). در این بررسی با انجام تست MIC بر روی تعداد زیادی جدایه میکروبی نشان دادیم که مقاومت به تلوریت در بین اشریشیاکلی ها پدیده ای نادر نبوده بلکه به فراوانی در بین جدایه های کلینیکی نیز دیده می شود و تفاوتی از نظر میزان MIC بین انواع O157 وسایر اشریشیاکلی‌ها وجود ندارد. با بررسی سویه های مقاوم بدست آمده در این تحقیق میتوان بسیاری تحقیقات دیگر نظیر بررسی ژن های مسئول در ایجاد مقاومت و فاکتورهای فیزیولوژیک در ارتباط با مقاومت و ارتباط مقاومت همزمان به سایر فلزات یا داروهای ضد میکروبی را مورد بررسی قرار داده و به نتایج مهم تری در آینده دست یافت.

تقدیر وتشکر

هزینه انجام این طرح از طریق حوزه معاونت پژوهشی پرداخت گردیده و خانم ها ثریا شریفی سراسیابی؛ افسانه امینی و فاطمه محمدی در انجام آن با ما همکاری داشته و شایسته تقدیر می باشند.

منابع

1-Avazer C, Turner RJ, Pommier J, Weiner J H, Gioredano G, Vermeglio A. Tellurite reductase activity of nitrate reductase is responsible for the basal resistance of Escherichia coli to tellurite. Microbiol 1997;143:1181-9.

2-Romero CM, Gatt ME, Bruno E. Effects of heavy metals on microbial activity and sediment communities. World J Microbiol Biotechnol 1999;15:179-84.

3-Sanchez-Romero J M, Diaz-Orejas R, Lorenzo VD. Resistance to tellurite as a selection marker for genetic manipulations of Pseudomonas strains.App EnvironMicrobiol 1998; 64:4040-6.

4-Alonso G,Gomes C,Gonzalez C, Rodriguez Lemoine V. On the mechanism of resistance to channel-forming colicines (PacB) and tellurite, encoded by plasmid Mip233 (IncH13).FEMS Microbiol Lett 2000;15: 257-61.

5-Whelan KF, Sherburne RK, Taylor DE. Characterization of a region of the Inc HI2 plasmid R478 which protects Escherichia coli from toxic effects specified by components of the tellurite ,phage, and colicin resistance cluster. J Bacteriol 1997;179:63-71.

6-Suzina NE, Duda VI,Anisimova LA, Dimitriev VV, and Boronin AM. Cytological aspects of resistance to potassium tellurite conferred on Pseudomonas cells by plasmids. Arch Microbiol 1995;163: 282-5.

7-Hughes M N, and Poole RK. Metal speciation and microbial growth. The hard (and soft) facts.J Gen Microbiol 1991;137:725-34.

8-McArthur JV, Tuckfield RC. Spatial pattern in antibiotic resistance among stream bacteria:effects of industrial pollution. App Environ Microbiol 2000; 66:3722-6.

9-Pal A, Dutta S, Mukheriee P K, Paul A K. Occurrence of heavy metal-resistance in microflora from serpentine soil of Andaman. J Basic Microbiol 2005;45:207-18.

Archive of SID
www.SID.ir

10-Taylor DE, Rooker M, Keelan M, Martin I, Perna NT , Burland V, et al. Genomic variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7 isolates. J Bacteriol. 2002;184:4690-8.

11-Hiramatsu R, Matsumoto M, Miwa Y, Suzuki Y,Saito M, Miyazaki,Y. Characterization of shiga toxin – producing Escherichia coli O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. J Clin Microbiol 2002; 40: 922-5.

12-MacFaddin J F. Gram –negative enterobacteriaceae and other intestinal bacteria. In: MacFaddin J F, editor. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2000.732-802.

13-Forbes B A, Sahm DF, and Weissfeld A S. Laboratory methods for detection of antibacterial resistance. In Bailley & Scott'S Diagnostic Microbiology. 10th ed. Mosby. 1998:250-273.

14-Hammershmidt S, Hacker J. Threat of infection: Microbes of high pathogenic potential strategies for detection, control and eradication. Int J Med microbiol 2005:295:141-51.

15-Karbasizaed V, Badami N, Emtiazi G. Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. Afr J Biottechnol 2003; 2: 379-83.

16-Tomas J M, Kay W W. Tellurite susceptibility and non-plasmid-mediated resistance in Escherichia coli .Anti Agent Chemother 1986;30:127-31.

17-Fukushima H, Hoshina K0, Gomyoda M. 2000 Selective isolation of eae-positive strains of shiga-toxin producing Escherichia coli. Clinical Microbiol. 38:1684-1687.

۱۸- شریفی سرآسیابی، ثریا. بررسی پاره ای از خصوصیات فیزیولوژیک اشریشیاکلی های جداشده از نمونه های ادرار و مدفوع جهت شناسایی سویه انتروهموراژیک O157:H7، همراه با تعیین الگوی مقاومت میکروبی باکتریهای جداشده. پایان نامه، دانشکده پزشکی کرمان، بهمن ماه ۸۰، با شماره ثبت ۲۲۷۷.

19 Mannazzu I, Guerra E, Strabbioli E, Strabbioli D, Pediconi D, Falichenti F. The vanadate-tolerant yeast Hansenula polymorha undergoes cellular reorganization during growth in, and recovery from the presence of vanadate Microbiol 1999; 144:2589-97.

20 Farewell A, Nyström T. The cadmium-stress stimulon of Escherichia coli K_{12} .Microbiol 1998;144:2589-97.

Archive of SID

www.SID.ir