مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۱ شماره ۳ پاییز ۱۳۸۸ صفحات ۳۰-۲۷

اثر ترکیب نوسکاپین و افلوکساسین بر روی استافیلوکوک اورئوس

شبنم رضوی: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
عبدالعزیز رستگارلاری: گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات مقاومتهای میکروبی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران- نویسنده رابط
E-mail: lari@iums.ac.ir
کاظم موسوی‌زاده: گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
مسعود محمودیان: گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

دریافت: ۸۷/۱/۲۸، پذیرش: ۸۷/۴/۱۰

چکیده

زمینه و اهداف: پمپ NorA در ایجاد مقاومت استافیلوکوک اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک های فلوروکینولون از جمله افلوکساسین به واسطه‌ی خروج دارو از سلول، مشارکت می‌کند. در سالهای اخیر استفاده از آلکالوئیدهای گیاهی برای افزایش فعالیت ضد میکروبی آنتی بیوتیکها مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته اند. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر ترکیب نوسکاپین و افلوکساسین بر روی سویه های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به چند دارو و جدا شده از بیماران بود.

روش بررسی: پس از تشخیص جنس و گونه ۹۵ نمونه استافیلوکوک اورئوس جدا شده از بیماران بستری و سرپایی سه بیمارستان شهر تهران و تعیین حساسیت این سویه ها به روش آنتی بیوگرام انتشار در آگار مطابق استاندارد CLSI، ۴۹ سویه که بالاترین مقاومت را به مجموعه ای از آنتی بیوتیکها از جمله افلوکساسین داشتند، انتخاب شدند و با استفاده از روش رقت سریال میزان MIC (حداقل غلظت باز دارنده از رشد) افلوکساسین برای هر یک از سوشها به تنهایی و در ترکیب با نوسکاپین تعیین گردید.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده نشان داد که حداقل غلظت باز دارنده از رشد افلوکساسین برای ۴۹ سوش مورد مطالعه از ۳۲ تا ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. همچنین حداقل غلظت باز دارنده از رشد نوسکاپین روی این سویه‌ها ۰/۵ و ۱/۰ میکرومول در میلی‌لیتر بود. کاربرد ترکیب افلوکساسین و نوسکاپین موجب افزایش حداقل غلظت باز دارنده از رشد افلوکساسین شد.

نتیجه‌گیری: نوسکاپین اثر ضد باکتریایی افلوکساسین روی استافیلوکک اورئوس را کاهش می دهد.

کلید واژه ها: استافیلوکوک اورئوس، نوسکاپین، افلوکساسین، مقاومت چند دارویی.

مقدمه

استافیلوکوک اورئوس یک پاتوژن مهم عامل عفونتهای بیمارستانی است که می‌تواند به بسیاری از عوامل ضد باکتریایی مقاوم شود. این امر سبب انتخابهای محدود درمانی در بیماران مبتلا می گردد. کشف آنتی بیوتیکهای فلوروکینولون امکان درمان موثر بیماریهای خطرناک حاصل از استافیلوکوک اورئوس را حتی بصورت خوراکی امکان پذیر ساخت. اما متاسفانه کمی بعد از معرفی این دسته از داروها برای درمان عفونتهای حاد ناشی از این باکتری، استافیلوکوک اورئوس خصوصا" سویه های مقاوم به متی‌سیلین، به سرعت به این دسته از آنتی بیوتیکها نیز مقاوم شدند (۳-۱).

تحقیقات گسترده‌ای بر روی مکانیسم این مقاومت آغاز شد و محققین در نهایت به سه روش ایجاد مقاومت پی بردند. اولین راه مقاومت، ایجاد موتاسیون در آنزیم DNA ژیراز، که یک آنزیم مهم در تکثیر و ترمیم DNA است، می باشد (۴). دومین روش مقاومت

Archive of SID
www.SID.ir

به فلوروکینولونها مربوط به لوکوس cfx-ofx است که وجود این لوکوس سبب مقاومت خفیف‌تری نسبت به موتاسیون در آنزیم DNA ژیراز می‌گردد (۵). سومین روش مقاومت بدلیل خروج فلوروکینولونها از سلول با مکانیسم Efflux است و قسمتی از ژنوم که باعث این پدیده می‌شود norA نام دارد (۶). پدیده Efflux موجب خارج شدن میزان زیادی دارو از باکتری می‌گردد. در مطالعه‌ای بر روی استافیلوکوک اورئوس نشان داده شده است که ترکیبات حاوی باربرین که ماده '5– متوکسی هیدوکارپین –D -5') (MHC-D و فئوفوربراید a را تولید می‌کنند، علیرغم اینکه اثر ضد میکروبی ندارند، اما بیان پمپهای Efflux عامل مقاومت چند دارویی(MDR) Multi Drug Resistance را مهار می‌کنند (۷). نوسکاپین یک آلکالوئید محلول در آب با سمیت کم است و از گیاه خشخاش تهیه می‌شود. نشان داده شده است که افلوکساسین و نوسکاپین روی انتروباکتریاسه های مقاوم به فلوروکینولونها، اثر سینرژیک داشته و نوسکاپین میزان MIC[1] افلوکساسین را برای این سوشها به میزان ۲ تا ۸ برابر کاهش می‌دهد (۸). هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر ترکیب نوسکاپین و افلوکساسین بر روی سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به چند دارو جدا شده از بیماران بود.

مواد و روشها

تعداد ۹۵ نمونه استافیلوکوک اورئوس از بیماران بستری و سرپایی سه بیمارستان شهر تهران به صورت تصادفی جمع آوری و در محیط مولر هینتون آگار حاوی NaCl (۲٪) کشت داده شد. به کمک دیسک‌های آنتی بیوتیک (شرکت MAST) به طریقه‌ی انتشار در آگار مطابق استاندارد CLSI، مقاومت سوشها به آنتی بیوتیکهای اریترومایسین، ریفامپین، افلوکساسین، نوبیوسین، جنتامیسین، کوتریموکسازول، کلرامفنیکل، تتراسایکلین، سفالکسین، سیپروفلوکساسین، آموکسی سیلین، فسفومایسین، اگزاسیلین، فوزیدیک اسید و وانکومایسین تعیین گردید. برای هر سری تست از سوش استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC 25923 بعنوان کنترل استفاده گردید. میزان مقاومت در مورد افلوکساسین قطر هاله کوچکتر از ۱۶ میلی‌متر و حساسیت با قطر هاله مساوی یا بزرگتر از ۲ میلی متر در نظر گرفته شد.

از مجموع سوشهای مورد مطالعه، تعداد ۴۹ عدد استافیلوکوک اورئوس که مقاومت آنها به روش انتشار در آگار نسبت به افلوکساسین تایید شد، و نسبت به همه آنتی‌بیوتیکها نیز میزان مقاومت بالاتری را نشان می دادند، انتخاب و مورد مطالعه‌ی بعدی قرار گرفتند.

با استفاده از محیط مولر هینتون براث یک سری لوله حاوی یک میلی‌لیتر از محلول آنتی‌بیوتیکی افلوکساسین با رقتهای مختلف ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱، و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد، سپس از کشت ۲۴ ساعته ۴۹ سوش مقاوم، رقتی معادل ۰/۰۱ لوله نیم مک فارلند تهیه شد تا غلظت نهایی باکتریها cfu/ml ۱×۱۰^{۶} گردد(۸). برای هر سری تست، از سوش استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC 25923 بعنوان کنترل استفاده شد. سپس ۱۸تا۲۴ ساعت بعد میزان MIC آنتی بیوتیک افلوکساسین تعیین گردید. در مورد افلوکساسین MIC کمتر و مساوی ۱μM حساس و بیشتر از ۴ μM بعنوان مقاوم در نظر گرفته شد.

برای تعیین MIC نوسکاپین (شرکت تماد) ۰/۲ گرم از پودر این دارو در ۱۵میلی لیتر محیط مولر هینتون براث حاوی اسید استیک گلاسیال حل شد و غلظتهای ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵و ۰/۱۲۵ میکرومول در میلی لیتر حاصل شد. به هر کدام از لوله‌ها یک میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی معادل cfu /ml ۱×۱۰^{۶} از کشت ۲۴ ساعته هر کدام از باکتریها افزوده گردید و بعد از ۱۸– ۲۴ ساعت MIC نوسکاپین تعیین گردید (۸).

بدلیل اثر مهاری غلظتهای μM ۰/۵ و μM ۱ نوسکاپین به تنهایی بر روی رشد باکتری، به رقتهای سریال افلوکساسین میزان ۰/۲۵ میکرومول در میلی لیتر نوسکاپین به تمام لوله ها افزوده شد. میزان MIC ترکیب افلوکساسین با نوسکاپین مورد بررسی قرار گرفت.

تمام مراحل بر روی ۱۰ نمونه انتروباکتریاسه‌ی مقاوم به فلوروکینولون و سوش استاندارد ATCC 27929 Ecoli نیز انجام گردید.

در این بررسی تمام آزمایشات حداقل ۲ بار تکرار شد و تکرار پذیری و صحت کار تایید گردید.

یافته ها

تعداد ۹۵ سوش استافیلوکوک اورئوس مقاوم به افلوکساسین از نمونه های جدا شده از بیماران انتخاب شد. از مجموع نمونه‌های مذکور ۲۹ نمونه از تراشه، ۲۲ نمونه از زخم، ۲۰ نمونه از چشم، ۵ نمونه از ادرار، ۵ نمونه از خون، ۴ نمونه از کاتتر و ۱۰ نمونه از سایر نمونه‌های بالینی بودند. از بیماران مورد مطالعه ۵۳ نفر زن و ۴۲ نفر مرد بودند.

ویژگی خاص تمام نمونه‌های میکروبی مقاومت آنها به آنتی بیوتیکهای افلوکساسین، اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، کوآموکسی‌کلاو، جنتامیسین، تتراسایکلین، سفالکسین، آموکسی سیلین و اگزاسیلین به میزان ۱۰۰٪ بود. میزان مقاومت به ریفامپین ۴۷٪ و کوتریموکسازول۲۹٪ می‌باشد. همه باکتریهای مورد نظر به وانکومایسین و سایر آنتی بیوتیکها حساس بودند.

میزان MIC بدست آمده در روش رقتهای سریال افلوکساسین در ۲۰ مورد μM ۱۶ و در ۲۱ مورد μM ۳۲ و ۸ مورد μM ۶۴ بود که نشان دهنده‌ی مقاومت آنها به افلوکساسین می‌باشد (نمودار شماره ۱).

MIC نوسکاپین در ۲۳ نمونه از سوشهای مورد بررسی μM ۰/۵ و در ۲۵ نمونه μM ۱ و فقط در یک نمونه μM ۲ بود و در هیچکدام از نمونه ها، غلظت های۰/۲۵ μM مانع از رشد باکتریها نگردید.

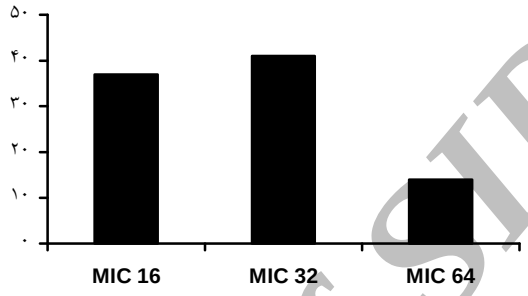
1. Minimum inhibitory concentration, MIC

Archive of SID

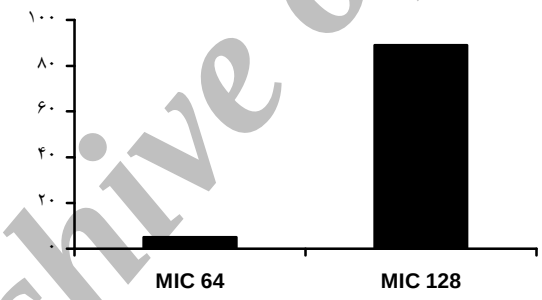
www.SID.ir

با استفاده از غلظت ۰/۲۵ µM نوسکاپین که به رقتهای مختلف افلوکساسین اضافه گردید، MIC افلوکساسین بر روی سوشهای مورد مطالعه در حضور نوسکاپین در ۲ مورد ۶۴ µM ودر ۴۷ مورد ۱۲۸ µM بود (نمودار شماره ۲).

قابل ذکر است که MIC افلوکساسین برای سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس شماره ATCC 25923 به تنهایی معادل ۱ µM بوده که نشان دهندهی حساسیت این سویه به افلوکساسین است و نتیجهی حاصل از آنتی بیوگرام با دیسک افلوکساسین (منطقهی ممانعت از رشد = ۳۸ mm) مبنی بر حساس بودن را تایید مینماید. اما MIC افلوکساسین در ترکیب با ۰/۲۵ µM نوسکاپین به ۴ برابر افزایش پیدا کرد.



نمودار ۱: میزان MIC افلوکساسین



نمودار۲: میزان MIC افلوکساسین و نوسکاپین

بحث

استافیلوکوک اورئوس یکی از مهمترین عوامل بیماریزا در عفونتهای بیمارستانی است که مکرراً سبب اپیدمی های بیمارستانی میگردد. مقاومت استافیلوکوکها به چند عامل ضد میکروبی به طور همزمان ممکن است عاملی برای بقاء آنها در محیط بیمارستان و پخش در بین بیماران گردد که این امر خصوصاً در بین استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متیسیلین (MRSA) بیشتر مشاهده میشود (۹).

عفونتهای حاصل از پاتوژنهای مقاوم عامل مهمی در مرگ و میر و افزایش هزینههای درمان هستند و سالانه بسیاری از عفونتهای بیمارستانی بدلیل پاتوژنهای مقاوم به آنتی بیوتیک رخ میدهند که این موارد در ICU بسیار بیشتر از سایر بخشها هستند (۱۰-۱۴) بنابراین، برای مبارزه با سوشهای مقاوم به چند دارو باید استراتژی درمان ترکیبی را در نظر گرفت.

مقاومت به کینولونها منجر به مشکلاتی در درمان شده است. این مقاومت به حدی رسیده که دیگر اطمینانی به درمان با کینولونها به تنهایی در عفونتهای بیمارستانی حاصل از باکتریهای گرم مثبت نیست (۱۵).

در مطالعهای که بر روی سوشهای انتروباکتریاسهی مقاوم به فلوروکینولون در ایران انجام گرفت اثر سینرژیستیک نوسکاپین بر فعالیت ضد باکتریایی افلوکساسین گزارش شد (۸). در پژوهش حاضر هم برای تایید این نتایج، آزمایش بر روی ۱۰ سویهی

Archive of SID

www.SID.ir

انتروباکتریاسه‌ی مقاوم به فلوروکینولون تکرار شد و نتایج مشابهی حاصل گردید.

نتیجه‌گیری

استفاده از ۰/۲۵ میکرومول بر میلی لیتر نوسکاپین همراه با افلوکساسین نه تنها سبب کاهش در میزان MIC افلوکساسین روی استافیلوکوک اورئوسهای مقاوم به چند دارو نشد بلکه سبب افزایش قابل ملاحظه MIC این آنتی‌بیوتیک به میزان ۳ تا۴ برابر روی ۳۹ نمونه و به میزان ۲برابر روی ۱۰ نمونه شد. این افزایش MIC در سوش استاندارد استافیلوکوک اورئوس نیز مشاهده شد.

بنابراین در سوشهای استافیلوکوک اورئوس مقاوم به چند داروکه در مطالعه‌ی حاضر بررسی شده اند، نوسکاپین نه تنها با افلوکساسین اثر سینرژیک ندارد بلکه می‌تواند اثر آنتاگونیستی داشته باشد. شاید بتوان این یافته را این گونه تفسیر کرد که مکانیزمهای ایجاد مقاومت بغیر از Efflux در سوشهای مورد مطالعه ما نقش دیگری هم داشته‌اند. پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی اثر ترکیب نوسکاپین و فلوروکینولونها روی سایر باکتریها ارزیابی شود و مکانیزم اثرات سینرژیستیک یا آنتاگونیستیک آن با جزییات بیشتری بررسی گردد.

References

1. Harnett N, Brown S, Krishnan C. Emergence of quinolone resistance among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**: 1911-1913.
2. Peterson LR, Quick JN, Jensen B, Homann S, Johanson S. Gerding. Emergence of ciprofloxacin resistance in nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Arch Intern Med* 1990; **150**: 2151-2155.
3. Shalit I, Berger SA, Gorea A, Frimerman H. Widespread quinolon resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in a general hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; **33**: 593-594.
4. Wang JC. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 1985; **45**: 665-697.
5. Trucksis M, Wolfson JS, Hooper DC. A novel locus conferring fluoroquinolone resistance in staphylococcus aurous. *J Bacterial* 1991; **173**:5854-5860.
6. Kaatz G, Seo WM. Inducible S. Nor A Mediated MDR in Staphylococcus aurous. *Antimicrob agents Chemother* 1995; **39**(12): 2650-2655.
7. Musumeci R, Special A, Costanzo R, Annino A, Ragusa S, Rapisarda A, et al. Berberis aetnesis C. Presl Extracts: Antimicrobial properties and interaction with ciprofloxacin. *Inter J Antimicrob Agent* 2003; **22**: 48-53.
8. Rastegar Lari A, Mohammadi H, Msjdyan F, Mahmoodian M. Nvskapyn synergistic effect with the Aflvksasyn Antrvbaktryas·h resistant to fluoroquinolones, *Journal of Research and Scientific Research and aromatic plants* of Iran 2008; **24**(1): 94-100.
9. Sierra JM, Marco F, Ruiz J, Jimenez Deanta MT, Vila J. Correlation between the activity of different fluoroquinolones and the presence of mechanisms of quinolone resistance in epidemiologically related & unrelated strains of methicillin – susceptibility & - resistant Staphylococcus aurous. *CMI* 2002; **8** (12): 781-790.
10. Jones RN. Resistance patterns among nosocomial pathogens. Trends over the past few years. *Chest* 2001; **119**: 397-404.
11. Hooper DC. Flouroquinolone resistance among gram positive cocci. *Lancet Infect Dis* 2002; **6**: 530-538.
12. Fridkin SK, Hill HA, Volkova NV. Temporal changes in prevalence of antimicrobial resistance in 23 US hospitals. *Emerg Infect Dis* 2002; **8**: 697-701.
13. Neuhauser MM, Weinstein RA, Raymond R. Antibiotic resistance among gram negative bacilli. *JAMA* 2003; **28**: 885-888.
14. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation & DNA gyres production. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**:1109-1117.
15. Jones RN, Paler MA. Bacterial resistance: A world wide problem. *Diagn Microbial Infect Dis* 1998; **31**: 379-388.

Archive of SID

www.SID.ir