

سنجش مقاومت آنتی بیوتیکی ویبریوکلراهای جدا شده از نمونه های مدفوع

در تابستان ۱۳۷۷ در تهران

دکتر محمدرضا پورشفیع^۱ - دکتر پرویز وحدانی^۲ - دکتر مهناز سیفی^۳ - معصومه نخست لطفی^۴ - منیژه صداقت^۵.

چکیده

۳۵۰ نمونه مدفوع از بیماران مشکوک به وبا در طی شیوع و با در برخی از نقاط تهران، مورد آزمایش قرار گرفتند که از این تعداد ۱۴۰ نمونه از نظر داشتن باکتری مولد وبا مثبت بودند. سروگروپ، بیوتیپ و سروتیپ این تعداد طبق آزمایشات بیوشیمیایی (متیل رد، وژپراسکوئر، اوره آز، بتا-همولیز، سیرات و اثر بر KIA، کلیگر آبیرون آگار) و سرولوژی مشخص شدند که ۱ مورد NAG و ۱۳۹ مورد سروتیپ آگاوا بودند که از این تعداد ۱۳۶ مورد بیوتیپ التور بودند. همچنین برای نمونه های مثبت سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی انجام شد که بهترین دارو سیپروفلوکساسین و بعد از آن جنتامایسین، دکسی سایکلین، اریترومایسین و کلرامفنیکل شناخته شدند که به ترتیب میزان مقاومت باکتریها نسبت به این داروها ۰٪، ۲/۹٪، ۲/۲٪، ۸/۶٪ می باشد و مقاومت باکتریها نسبت به کوتریموکسازول (۹۸/۶٪)، اکسی تراسایکلین (۸۷/۶٪) تراسایکلین (۶۱/۹٪) بود. سویه های ویبریوکلرا التور از نظر واکنش بتا-همولیز مورد بررسی قرار گرفتند که معلوم شد همه سویه های ویبریوکلرا التور همیشه واکنش بتاهمولیز را ندارند، بلکه گاهی غیر همولیتیک می باشند. نتایج بطور کامل نشان می دهد که بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری و با در ایران از اهمیت خاصی برخوردار است.

واژه های کلیدی: مقاومت آنتی بیوتیکی - ویبریوکلرا - تهران

مقدمه

وبا یک بیماری حاد عفونی است که عامل ایجاد کننده آن باکتری ویبریوکلرا است. این باکتری گرم منفی، خمیده و بی هوازی اختیاری است و pH مناسب جهت رشد آن ۷ می باشد ولی تحمل شرایط قلیایی تا pH=۹ را دارد.

وبای اپیدمیک کلاسیک توسط میکروارگانیزم هائیکه با آنتی سرم ضد آنتی ژن O1 آگلوتینه می شوند و آنتروتوکسین تولید می کنند، بوجود می آید. این میکروارگانیزم ها از نظر خواص

بیوشیمیایی به دو تیپ کلرا و التور تقسیم می شوند. گروه دیگری از این باکتریها توسط آنتی سرم O1 آگلوتینه نمی شوند اما از نظر خواص بیوشیمیایی همانند گروه قبل است. به این گروه NAG (ویبریوهای غیر آگلوتینه شونده) می گویند. دو بیوتیپ التور کلاسیک به سروتیپ های آگاوا ایناباوهیکوجیما تقسیم می شوند^(۱).

وبا بیماری خاص انسان است و اغلب در ماههای گرم سال رخ می دهد و در کشور ما نیز این بیماری اغلب در اواخر مرداد، شهریور و مهرماه و در اغلب استانها رخ داده است، کشور ما کانون آندمی وبا بحساب نمی آید و این بیماری بیشتر از مرزهای شرقی وارد ایران شده است^(۲،۳). وبا خاص قاره آسیا نمی باشد و از نقاط مختلف دنیا به کرات گزارش شده است. در سال ۱۹۹۶ ویبریوکلراتیپ التور در تمام نواحی دنیا وجود

۳۰۱- استاد یار بخش باکتریولوژی - انستیتو پاستور ایران

۲- دانشیار گروه عفونی - بیمارستان لقمان

۴- کارشناس آزمایشگاه بخش باکتریولوژی - انستیتو پاستور ایران - تهران

(Difco/U.S.A) 30MCG ، اکسی تتراسایکلین (BBL/U.S.A) ، سولفامتو کسازول و تری متوپریم (کو تریمو کسازول) 30MCG ، سولفامتو کسازول 23.75MCG ، تری متوپریم (BBL/U.S.A) ، پلی میکزین U.K 300UI B (Oxoid) در محیط مولر هینتون آگار برای هر باکتری انجام شد . آنالیز نهایی اطلاعات با استفاده از برنامه کامپیوتری EPI5 (CDC Epidemiology Program office Atlanta Georgia) صورت گرفت .

نتایج

طبق بررسی ما از ۳۵۰ نمونه ارسالی ۱۴۰ نمونه از نظر وجود ویبریوکلرا مثبت بود که ۱۳۹ نمونه سروتایپ اوگاوا و یک نمونه NAG بود و توزیع جنسی نمونه های مثبت ۴۳٪ زن و ۵۷٪ مرد می باشند . نتیجه واکنشهای بیوشیمیایی تفکیکی بر روی باکتریهای بدست آمده در نمودار (۱) آمده است که : اکسیداز ، اندول ، حرکت و سیترات در ۱۰۰٪ موارد مثبت ، متیل رد در ۲۳٪ ، وژپراسکوئر در ۴۵٪ ، اوره در ۹٪ و بتاهمولیز در ۹۴٪ موارد مثبت می باشند .

نمودار ۱: درصد واکنشهای مثبت بیوشیمیایی

ویبریوکلراهای جدا شده

داشت ، اما طبق گزارش WHO کاهش در تعداد موارد از سال ۱۹۹۴ الی ۱۹۹۶ دیده شده است (۴) .

اپیدمی ها در نقاط مختلف جهان نشان می دهد که وبا یک بیماری مطرح در تمام دنیا می باشد و الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی متفاوتی در مورد این بیماری گزارش شده است ، لذا پیشنهاد می گردد با توجه به تنوع الگوهای مختلف آنتی بیوتیکی بلافاصله پس از جداسازی باکتری تست سنجش مقاومت آنتی بیوتیکی انجام می گیرد تا درمان بنحو مطلوب انجام شود (۱۳۸) .

روش بررسی

این تحقیق بررسی ۳۵۰ نمونه مدفوع بیماران مشکوک به وبا از تاریخ ۷۷/۶/۲ الی ۷۷/۷/۱۵ جهت جداسازی ویبریوکلرا می باشد . این بیماران دچار اسهال شدید ، استفراغ ، سرگیجه و ضعف بوده اند . نمونه مدفوع این بیماران در محیط انتقالی کاری بلر به بخش باکتری شناسی انستیتو پاستور ایران داده می شد .

محیط انتخابی برای ویبریوکلرا TCBS (تیوسولفات سترات بایل ساکاروز آگار) و آب پپتونه قلیایی pH=8 می باشد . بعد از ۶ ساعت از روی آب پپتونه قلیایی بر روی TCBS دیگری کشت داده می شد و محیط های TCBS بعد از ۲۴ ساعت که در گرمخانه °C ۳۷ نگهداری می شد ، مورد بررسی قرار می گرفت ، کلنی های زرد مشکوک به ویبریوکلرا می باشند که برای تستهای تکمیلی بر روی محیط KIA (کلیگر آیرون آگار) برده می شد که بعد از ۲۴ ساعت گرما گذاری چنانچه نتیجه به قرار باز/اسید بود ، تست های تأییدی اندول ، سترات ، متیل رد ، وژپراسکوئر ، حرکت ، اوره و اکسیداز بر روی آن انجام شده ، سپس تحت آزمایشات سرولوژی و همولیز (بر روی بلاد آگار گوسفندی) قرار می گرفتند . در نهایت آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفوزیون و با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی ، سیروفلوکساسین 5MCG (Difco/U.S.A) ، جنتامایسین 10MCG (Sanofi) France ، کلرامفنیکل (BBL/U.S.A) 30MCG ، دکسی سایکلین 30UI (Sanofi) France ، اریترومایسین 15MCG (BBL/U.S.A) ، تتراسایکلین

از ۱۳۹ نمونه دارای ویبریوکلرا، ۱۳۱ نمونه بتاهمولیز مثبت و ۸ نمونه بتاهمولیز منفی هستند که از این ۸ نمونه، ۶ نمونه وژیراسکوئر مثبت می باشد که ۵ نمونه از آنها نسبت به پلی میگزین B مقاومند.

از ۱۴۰ نمونه ۵۰ نمونه تکراری بود که زمانهای تحویل نمونه های اول و دوم متفاوت بود (نمونه اول در زمان رجوع به آزمایشگاه و نمونه دوم بعد از درمان) که ۴۰ نمونه از نظر میکروب وبا در زمان رجوع به آزمایشگاه مثبت و بعد از درمان منفی شدند و ۷ نمونه دیگر در هر دو مراجعه مثبت و ۳ نمونه از نظر این باکتری منفی و در مراجعه دوم مثبت بودند.

در مورد ۷ نمونه که هر دو نوبت آن از نظر وجود ویبریوکلرا مثبت بودند مقایسه الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی در دو زمان نشان می دهند که میزان مقاومت آنها نسبت به ۴ آنتی بیوتیک در زمان دوم نسبت به زمان اول مراجعه بالاتر رفته است (مقایسه قطر هاله اطراف دیسک آنتی بیوتیک نسبت به قطر هاله در حالت استاندارد) در ۱ نمونه مقاومت در مورد اکسی تتراسایکلین و تتراسایکلین، در ۱ نمونه مقاومت نسبت به کلرامفنیکل و دکسی سایکلین و تتراسایکلین، ۱ نمونه مقاومت نسبت به تتراسایکلین و ۱ نمونه مقاومت نسبت به اکسی تتراسایکلین و در یک مورد مقاومت نسبت کلرامفنیکل و تتراسایکلین بالاتر رفته است.

بحث

۱۴۰ نمونه مثبت از نظر داشتن ویبریوکلرا، برای تشخیص بیوتیپ و سروتیپ باکتری مورد آزمایش قرار گرفتند، که تست های بیوشیمیایی و سرولوژی نمایانگر وجود ۱۳۹ مورد سروتیپ اوگاوا و یک مورد NAG می باشد. در گزارشات قبلی ما نشان داده ایم که از نظر ژنتیک مولکولی با استفاده از تکنیک ریبوتایپ یک کلون غالب وجود دارد. تکنیک ریبوتایپ قادر است پلی مورفیسم ژنهای rRNA را مورد بررسی قرار دهد. این ژنها از قسمتهای دیگر کروموزوم در طول تکامل ثابت تر مانده و با استفاده از آنزیمهای هضمی مناسب می توان میزان نزدیکی باکتریها و طبقه بندی آنها را مورد بررسی قرار داد. ما در این گزارش وجود الگویی بنام B21 در اپیدمی تهران را

درصد مقاومت آنتی بیوتیکی باکتریهای جدا شده از نمونه های مثبت نمایانگر این است که این باکتریها نسبت به سیپروفلوکساسین و جنتامایسین بالاترین میزان حساسیت (۱۰۰٪) و نسبت کوتریموکسازول بالاترین میزان مقاومت (۹۸/۶٪) را دارند و بعد بیشترین میزان حساسیت نسبت به دکسی سایکلین (۸۹/۱٪)، اریترومایسین (۸۱/۳٪)، کلرامفنیکل (۴۳/۹٪) را دارند و بیشترین مقاومت را بعد از کوتریموکسازول نسبت به اکسی تتراسایکلین (۸۷/۶٪)، تتراسایکلین (۶۱/۹٪) دارا هستند. بالاترین درصد حد واسطی را کلرامفنیکل (۴۷/۵٪) و تتراسایکلین (۲۶/۶٪) دارند (نمودار ۲).

نمودار ۲: درصد مقاومت آنتی بیوتیکی ویبریوکلراهای جدا شده

پنی سیلین، تری متوپریم سولفات متوکسازول گزارش شده است^(۲۲). بین مارس ۱۹۹۴ و دسامبر ۱۹۹۶ در شش کشور آفریقای شرقی شیوع وبا گزارش شده است که ۸۰ تا ۱۰۰ درصد سویه های جدا شده ویبریوکلرا از کنیا و جنوب سودان و ۶۵ تا ۹۰ درصد سویه های جدا شده ویبریوکلرا از سومالی به تتراسایکلین حساس بودند، گرچه سویه های جدا شده از موگادیشو در سال ۱۹۹۵ تنها ۴۴٪ حساسیت نشان دادند^(۲۳). از نتایج حاصل از تحقیق حاضر و مقایسه آن با سایر تحقیقات می توان نتیجه گرفت که الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در مناطق مختلف در مورد بیماری وبا تغییر می کند و باید این الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی در ابتدای شیوع این بیماری سنجیده شود تا نتیجه درمان برای کل جامعه مؤثر باشد، بعنوان مثال نتایج ما نمایانگر این مطلب است که درصد حساسیت سویه های جدا شده در این شیوع وبا (تابستان ۷۷ در تهران) نسبت به کلرامفنیکل ۴۳/۹٪، نسبت به کوتریموکسازول ۱/۴٪، نسبت به اریترومایسین ۸۱/۳٪ است (نمودار ۲) ولی در گزارشی از برخی کشورهای آفریقای شرقی در مورد این آنتی بیوتیکها در مورد سویه های جدا شده ویبریوکلرا در طی شیوع وبا آمده است: در کنیا و سومالی درصد حساسیت سویه های جدا شده به کلرامفنیکل و کوتریموکسازول کاهش قابل توجهی (از ۸۵٪ در سال ۱۹۹۴ تا کمتر از ۱۰٪ در سال ۱۹۹۶) داشت. در حالیکه در جنوب سودان بیشتر از ۷۰ درصد سویه های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک های فوق حساسیت داشتند. بنابراین بهترین راه برای پیشگیری بیماریهای حادی چون وبا رعایت بهداشت همگانی و همینطور راه درمان موفق استفاده بجا از آنتی بیوتیکها است.

معرفی کردیم که در بررسی های بعدی بنظر می رسد الگوی غالب در ایران می باشد^(۲۱). در اپیدمی سال ۱۹۹۴ در ایتالیا از تمام نمونه های سروتیپ اوگاوا بیوتیپ التور جدا شد و همچنین ویبریوکلرا O1 بیوتیپ التور عامل ایجاد کننده ۷ پاندمی بوده است^(۱۴و۱۳). در این شیوع وبا (تابستان سال ۷۷ در تهران) نیز بیشترین عامل ایجاد کننده بیوتیپ التور سروتیپ اوگاوا بوده است. از ۱۳۶ سویه ویبریوکلرا التور ۵ مورد بوده بتاهمولیز منفی است. گزارشات بسیاری در مورد سویه های ویبریوکلرا بیوتیپ التور که فعالیت همولیتیکی ندارند، وجود دارد^(۱۷-۱۴). در مطالعه ای در هند طی سه دهه (۱۹۹۰-۱۹۶۴)، ۴۳ سویه ویبریوکلرا بیوتیپ التور از افراد مبتلا به اسهال جدا شده و ۲۵ مورد از فاضلاب و رودخانه گنگ جدا شد که ۶۸٪ از موارد جدا شده از افراد مبتلا به اسهال و ۵۰٪ از سویه های جدا شده از محیط، غیر همولیتیک بودند. بر طبق این تحقیق بهترین داروها جهت درمان وبا (بدون در نظر گرفتن اثرات جانبی آنها) سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و دکسی سایکلین می باشند. تحقیقات دیگر در این زمینه نیز نتایج ما را تأیید می نمایند^(۱۸، ۲۰). بر خلاف گزارشات سابق (۱) نتایج ما مقاومت باکتری وبا به تتراسایکلین را نشان می دهند. همانطور که در نمودار (۱) مشخص شده است میزان مقاومت باکتریهای بدست آمده از این تحقیق نسبت به تتراسایکلین ۶۱/۹٪ است. گزارشاتی از نقاط دیگر جهان در این زمینه انجام شده از جمله: حساسیت ۱۱۸ سویه ویبریوکلرا به آنتی بیوتیکهای متفاوت در طی شیوع وبا در داغستان در سال ۱۹۹۴، توسط روش (Serial Dilution) سنجیده شده بعد از استفاده از کلرامفنیکل ۲۹/۷٪ و بعد از استفاده از تتراسایکلین ۱۶/۵٪، بعد از استفاده از ترکیب آنها ۱۵٪ عود بیماری گزارش شده است. در حالیکه فورازولیدون ۴/۳٪ و سیپروفلوکساسین ۲/۸٪ عود بیماری را نشان دادند، سیپروفلوکساسین برای درمان وبا و فورازولیدون برای درمان ناقلین این بیماری پیشنهاد می شود^(۲۰). در اپیدمی وبا که در تابستان همین سال در اردو گاههای سربازی اتفاق افتاد مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی ویبریوکلرا نسبت به تتراسایکلین، آمینو

References:

- 1-Zinsser H., *Zinsser Microbiology*, 20th ed., California, Appleton Lange, 1992, PP: 566-70.
- ۲- صائبی الف، بیماریهای عفونی در ایران. چاپ چهارم، تهران، مرکز نشر فرهنگی و تحقیقاتی نینوا، ۱۳۶۹، صص: ۵۳۰-۵۲۸.
- ۳- گزارش بیماریهای واگیر کشور مربوط به ماه نوامبر در سال ۱۳۷۴، و اکتبر سال ۱۹۹۵ میلادی.
- 4- W.H.O, *Cholera in 1996. Wkly. Epidemiol. Rec.*, 1997, Aug, 1: 72(31): PP: 229-35.
- 5- Faruque SM. Ahmed KM., et al. *Emergence of a new clone of toxigenic vibrio cholerae 01 biotype EL Tor displacing V. cholerae 0139 Bengal in Bangladesh*, J. clin. Microbiol., 1997 Mar, 35(3), PP: 624-30.
- 6- W.H.O cholerae., New York.O. 1991, MMWR Morb Mortal Wkly Rep., 1991 Aug, 2; 40(30); PP: 624-30.
- 7- Datta KK., Singh J., *Epidemiological profile of outbreaks of cholera in India during 1975 – 1989*, J. commun. Dis, 1990 sep, 29(3); PP: 151-9.
- 8- Khanna KK., Dhanvijay A., *Cholerae outbreak in dehli 1998*, J. commun dis., 1990 Mar, 22(1): PP: 35-8.
- 9- Waldor Mk., Tschape H., Mekalanos JJ., *A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfametoxazole, trimetoprim, and streptomycin in vibrio cholerae 0139*, J. Bacteriol. 1995 Jul, 178 (14); PP: 4157-65.
- 10- Geffray L., cholerae. Rev. Part., 1996 Jan 15, 46(2); PP: 197-205.
- 11- Vijayalakshmi N., Rao Rs., *Minimmun inhibitory concentration (MIC) of some antibiotics against vibrio cholerae 0139 isolates from pondicherry*, *Epidemiol. Infect.*, 1997 Aug: 119(1); PP: 25-8.
- 12- Urassa W., Lymuya E., Mhalu F., *Recent trends on bacterial resistance to antibiotics*, East. Afr. Med., 1997, Mar, 74(3): PP: 129-33.
- 13- Maggi P., Carbonara S., Fico C., et al., *Epidemiological, clinical and theraputic evaluation of the Italian epidemic in 1994*, Eur. J. Epidemiol., 1997 Jan, 13(1); PP: 95-7.
- 14- Anjali Tikoo., Dv, Sinch., S.C. Sanyal., *Influence of animal passage on beamolysin and enterotoxin production in vibrio cholerae C: brotype EL Tor strains*, J. Med Microbiol Vol 40; 1994; PP: 246-5.
- 15- Kamal AM., the seventh pandemic of cholerae in Bbarua D, Burrowsw (eds) cholerae. Philadelphia, W.B. Saunders company., 1974; PP: 1-14.
- 16- Barret TJ., Blake P.A. *Epidmeiological usefulness of changes in hemolytic activity of vibrio cholerae biotype El Tor during the seventh pandemic.*, J. clin. Microbiol., 1981, 13; PP: 126-129.
- 17- *Bergeys Manual of systemic Bacteriology*, 1984, Vol;1, section 5, Vibrionaceae, PP: 531-533.
- 18- Chakrabararti MK., Bhattacharya MK., sinha AK., *Evaluation of the efficacy of different antibiotic in inhibiting colonisation of vibrio cholerae 01 in the rabbit intestin*, Int. J. Med Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis., 1993 Feb, 278(1); PP: 69-72.
- 19- Lin CJ., chiu CT., lin DY., et al., *Non 01 vibrio cholerae bacteremia in patients with cirrhosis; 5-yr; experience from a single medical center*, Am. J. Gastro. Enterol., 1996, Feb, 91(2): PP: 336-40.
- 20- Karbyshev GL., Lomov Ium. *The characteristics of the antibacterial therapy for cholerae in Dagestan*, Zh. Mikrobiol. Immunobiol., 1990 Mar-Ape, Supp, 2: PP: 71-4.
- 21- Pourshafie M.R. Grimont F., saifi M. et al. *Molecular epidemiological study of vibrio cholerae isolates frow infected patients in Tehran*. Iran. Med. J. Microbiol. 2000, 49; PP: 1085-1090.
- 22- Cavallo JD., Niel L. Talarmin A., *Antibiotic sensitivity to epidemic strains of vibrio cholerae and cholerae and shigella dysenteriae 1 isolated in Rawanda refugee camps in Zair*, Med. Trop. Mars., 1995, 55(4); PP: 351-3.
- 23- Materu Sf., Lema OE., Mukunza HM., et al., *Antibiotic resistance pattern of vibrio cholerae and shighlla causing diarrhoea outbreaks in eastern region 1994-1996*. East. Afr. Med.J., 1997 Mar, 74(3); PP: 193-7.

