

بررسی تأثیر روش های مختلف ایجاد جهش بر روی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و وجود پلاسمید در اشریشیا کلی و استافیلوکوک اورئوس

دکتر جمیله نوروزی^۱، دکتر غلامرضا والی^۲، هما یوسفی^۳

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها به ویژه اشریشیا کلی و استافیلوکوک اورئوس، و متفاوت بودن الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در کشورهای مختلف، این بررسی به منظور تعیین اثر روش های مختلف ایجاد جهش بر روی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و مشاهده وجود پلاسمید در اشریشیا کلی و استافیلوکوک در آزمایشگاه محمودیه دانشگاه آزاد اسلامی انجام گرفت.

مواد و روش ها: در این تحقیق تجربی ۶ سوش باکتری استافیلوکوک اورئوس و اشریشیا کلی به دست آمده از زخم پوستی، عفونت ادراری و مدفوع بیماران و باکتری های استاندارد جمع آوری شد و مقاومت آنتی بیوتیکی هر یک از آنها به روش دیسک انجام گرفت. سپس با ایجاد جهش توسط نور ماورای بنفش، افزایش مقدار آنتی بیوتیک و رقیق کردن محیط کشت، تأثیر هر یک از آنها بر روی الگوی مقاومت آنتی بیوتیک تعیین شد. در پایان، پلاسمید هر یک از آنها جداگانه بر روی ژل آگاروز، الکتروفورز گردید و وجود یا عدم وجود پلاسمیدها مشاهده شد.

یافته ها: نور ماوراء بنفش و افزودن آنتی بیوتیک به محیط کشت موجب شد که باکتری های مورد بررسی به آنتی بیوتیک ها مقاوم شوند و باندهای پلاسمیدی موجود در اشریشیا کلی نیز حذف گردید. با افزایش رقت محیط کشت نیز کلنی باکتری ها بزرگتر شدند و در محیط نیمه جامد به خوبی پخش شدند، اما تغییری در مقاومت آنتی بیوتیکی و باندهای پلاسمیدی این باکتری ها مشاهده نگردید.

نتیجه گیری و توصیه ها: نور ماوراء بنفش و وجود آنتی بیوتیک در محیط بر روی مقاومت آنتی بیوتیکی و تعداد باندهای پلاسمیدی بر روی باکتری اشریشیا کلی تأثیر بیشتری در مقایسه با استافیلوکوک اورئوس دارد که ممکن است به علت تفاوت در دیواره سلولی این دو باکتری باشد. به علت افزایش سریع مقاومت باکتری ها به داروها، توصیه می شود که برخی از آنتی بیوتیک ها را در بیمارستان ها به موارد شدید بیماری ها محدود کنند یا به صورت دوره ای مصرف نمایند تا این داروها برای مدت زمان طولانی تری مفید و با ارزش باقی بمانند.

واژگان کلیدی: جهش، نور ماوراء بنفش، پلاسمید، مقاومت آنتی بیوتیک.

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۲- گروه بیوشیمی و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران - شمال

مقدمه

در سال‌های اخیر، به دلیل مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها، عفونت‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک به طور نگران‌کننده‌ای افزایش یافته‌اند. زمانی که اولین بار آنتی‌بیوتیک‌ها شناخته شدند، گمان می‌رفت که استفاده از آنها به ریشه‌کنی و نابودی انواع عفونت‌ها منجر می‌شود ولی به زودی مشخص شد که برخی از باکتری‌ها به طور ذاتی نسبت به گروهی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومند و یا به علت مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، به آن مقاوم می‌شوند (۱).

دو مکانیزم عمده، مسئول پیدایش و گسترش سویه‌های باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند: یکی جهش و دیگری انتقال ژن‌های مقاومت.

در میان باکتری‌ها انتقال ژن‌های مقاومت اغلب از طریق پلاسمید انجام می‌گیرد. مقاومت ذاتی به ساختار باکتری مربوط بوده و در اکثر موارد به وجود ژن‌های کروموزومی بستگی دارد.

مقاومت در اثر جهش که اغلب به وسیله عوامل جهش‌زای شیمیایی یا فیزیکی مانند نور ماوراء بنفش (UV) صورت می‌گیرد، در ژنوم باکتری رخ داده و باکتری از واکنش با ماده ضد میکروبی ناتوان می‌شود (۲).

استفاده از نور UV در جوامع مختلف میکروبی و سپس انجام الکتروفورز جهت مشاهده بروز تغییرات (ایجاد جهش) توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است. به عنوان مثال از نور ماوراء بنفش برای ایجاد جهش و یافتن موتانت‌هایی از باکتری لاکتوباسیل گاسری مقاوم به کلرور سدیم و نترات سدیم به عنوان آغازگر تخمیر گوشت استفاده کرده‌اند (۳) یا نور ماوراء بنفش به عنوان

عامل ایجادکننده جهش برای یافتن موتانتی از استرپتومایسس جهت تولید بیشتر آنتی‌بیوتیک به کار رفته است (۴).

موتانت‌های مقاوم اشیریشیا کلی و استافیلوکوک نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف توسط پژوهشگران زیادی گزارش شده است که به عنوان مثال می‌توان به گزارش Saenz و همکاران در سال ۲۰۰۱ اشاره کرد (۵). مقاومت کروموزومی اشیریشیا کلی به چندین آنتی‌بیوتیک مختلف (تتراسایکلین، کلرامفنیکل، بتالاکتام‌ها، کینولون‌ها) نیز مشاهده شده است (۶). Macias و همکاران در سال ۲۰۰۲ با روش استاندارد دیسک آنتی‌بیوتیکی، میزان مقاومت E.coli مدفوع کودکان سالم مکزیکی را مورد بررسی قرار دادند. ۴۵۶ سویه E.coli از کودکان ۱۰ مؤسسه ایزوله گردید. بالاترین میزان مقاومت در برابر تتراسایکلین، آمپی‌سلین و کوتریموکسازول یافت شد. نتایج این پژوهشگران نشان داد که باکتری‌های ساپروفیت قادرند مقاومت را هم از طریق مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک و هم از محیط اطراف به دست آورند (۷). با توجه به اینکه استافیلوکوک اورئوس و اشیریشیا کلی، دو پاتوژن مهم انسانی هستند و بیماری‌های مختلفی را ایجاد می‌کنند، به منظور تعیین تأثیر روش‌های مختلف جهش (استفاده از نور ماوراء بنفش، افزایش تدریجی مقدار آنتی‌بیوتیک و افزایش رقت محیط کشت) بر روی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، این بررسی در سال ۱۳۸۰ در آزمایشگاه محمودیه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های مورد استفاده در این بررسی تجربی، استافیلوکوک اورئوس استاندارد

(PTCC1337)، اشیریشیاکلی استاندارد (PTCC1338) خریداری شده از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، اشیریشیا کلی ادراری و استافیلوکوک اورئوس از زخم بیماران بستری در بیمارستان شهید مطهری، استافیلوکوک اورئوس ادراری از بیمارستان لبافی نژاد و اشیریشیا کلی ادراری و مدفوعی از آزمایشگاه تشخیص طبی بودند.

ابتدا مقاومت و حساسیت هر یک از باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین، استرپتومایسین و آمپی سیلین به وسیله تست آنتی بیوگرام تعیین گردید. سپس به روش های مختلف (استفاده از نور ماوراء بنفش، افزایش تدریجی مقدار آنتی بیوتیک و افزایش رقت محیط کشت) در باکتری های فوق جهش ایجاد گردید. در تمام روش های فوق از محیط کشت BHI استفاده شد.

برای ایجاد جهش توسط نور ماوراء بنفش، ابتدا یک کلنی از هر باکتری روی محیط BHI آگار به صورت متراکم کشت داده شد. سپس پلیت به صورت در باز به مدت ۵ دقیقه در مقابل نور ماوراء بنفش قرار داده شد و پس از گذاشتن در پلیت، در حرارت C ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت، از کلنی های باقی مانده برداشته شد و به مدت ۲۰، ۳۰ الی ۱۲۰ دقیقه در برابر نور ماوراء بنفش قرار گرفت. سپس، آنتی بیوگرام جهت بررسی جهش ایجاد شده در تک کلنی های باقی مانده انجام شد.

در روش افزایش تدریجی مقدار آنتی بیوتیک، ابتدا باکتری ها در محیط آگار حاوی غلظت بسیار اندک آنتی بیوتیک های فوق کشت داده شدند و در

حرارت C ۳۷ نگهداری گردیدند. پس از ۳ روز، باکتری های رشد کرده در محیط کشت حاوی غلظت های زیادتر آنتی بیوتیک کشت داده شدند. این عمل آنقدر تکرار شد تا باکتری های مقاوم به غلظت بیشتر آنتی بیوتیک به دست آمد.

در روش تابش نور UV، ابتدا یک کلنی از هر باکتری روی محیط BHI آگار به صورت متراکم کشت داده شد. سپس پلیت به صورت در باز به مدت ۵ دقیقه مقابل نور ماوراء بنفش قرار داده شد و پس از گذاشتن در پلیت، در حرارت پس از گذشت ۲۴ ساعت از کلنی های باقیمانده برداشته شد و به ۲۰، ۳۰، ... الی ۱۲۰ دقیقه در برابر نور ماوراء بنفش قرار گرفت سپس آنتی بیوگرام جهت بررسی جهش ایجاد شده در تک کلنی های باقیمانده انجام شد.

در روش افزایش رقت محیط کشت، ابتدا محیط آگار نیمه جامد تهیه شد (۲۶ گرم پودر BHI در یک لیتر آب مقطر) پس از خنک شدن، محیط در پلیت ریخته شد تا به حالت جامد تبدیل گردد. سپس، کلنی باکتری با لوپ استریل برداشته شد و به صورت نقطه ای به قطر ۳ تا ۵ میلی متر روی محیط کشت قرار داده شد. بعد از آن، پلیت ها به مدت ۳ روز در C ۳۷ به دلیل رشد در محیط رقیق کاملاً تغییر یافت. در این بررسی، پلیت ها به صورت افقی (نه واژگون) نگهداری شدند، در ضمن برای اطمینان از عدم آلودگی پلیت ها، هر بار کلنی ها را قبل و بعد از آزمایش به روش گرام رنگ آمیزی کرده و از تست های بیوشیمیایی اختصاصی برای شناسایی آنها استفاده شد. سپس، آنتی بیوگرام جهت بررسی جهش ایجاد شده در تک کلنی های باقی مانده انجام شد. سپس استخراج پلاسمید با متلاشی کردن تمام باکتری های فوق به روش قلیایی انجام گرفت.

در نهایت وجود یا فقدان پلاسمید در تمام نمونه های اولیه و جهش یافته در روی ژل آگاروز به وسیله الکتروفورز جستجو گردید.

یافته ها

نتایج الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدول شماره یک نشان داده شده است. پس از تابش نور UV بعد از ۱۲۰ دقیقه بر روی باکتری های حساس، قطر هاله عدم رشد در برابر آنتی بیوتیک های تتراسایکلین (استافیلوکوک زخم و اشیشیا کلی استاندارد) و استرپتومایسین (اشیشیا کلی استاندارد و اشیشیا کلی ادراری) کاهش یافت و سایر باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک های مورد بررسی مقاوم شدند.

در روش افزایش تدریجی مقدار آنتی بیوتیک، باکتری های حساس تحت القای آنتی بیوتیک در غلظت 30cg/l تتراسایکلین و غلظت 10cg/l آمپی سیلین هنوز حساس بودند اما قطر هاله عدم رشد باکتری ها از ۳۰ میلی متر به ۱۰ میلی متر کاهش یافت.

در تصویر شماره ۱ حساسیت استافیلوکوک اورئوس استاندارد در برابر آنتی بیوتیک های تتراسایکلین، استرپتومایسین و آمپی سیلین قبل از ایجاد جهش نشان داده شده است.

تصویر ۱ - حساسیت استافیلوکوک اورئوس استاندارد در برابر آنتی بیوتیک های تتراسایکلین، استرپتومایسین و آمپی سیلین قبل از ایجاد جهش

تصویر شماره ۲ مقاومت استافیلوکوک
اورئوس استاندارد را در برابر آنتی بیوتیک
تتراسایکلین بعد از تابش نور UV نشان داده
است.

تصویر ۲ - مقاومت استافیلوکوک اورئوس استاندارد را در برابر آنتی بیوتیک تتراسایکلین بعد از تابش نور UV.

در محیط رقیق شده کشت، باکتری ها دچار
تغییر شدند. به نحوی که پس از انتقال این باکتری ها
به محیط کشت معمولی، کلنی ها به صورت پخش و
گسترده ای در روی محیط کشت رشد کردند.

روی پلاسمید. زیرا پس از اینکه باکتری ها در معرض تابش نور ماوراء بنفش قرار گرفتند، پلاسمیدهای خود را از دست دادند، در حالی که در الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها، تغییر چندانی حاصل نشد. با افزایش رقت محیط کشت، کلنی باکتری ها بزرگتر شد و در محیط نیمه جامد به خوبی پخش شدند، اما تغییری در مقاومت آنتی بیوتیکی و باندهای پلاسمید در دو باکتری فوق مشاهده نگردید.

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که مقاومت آنتی بیوتیکی با در معرض قرار دادن باکتری ها در برابر تابش نور UV و افزایش تدریجی غلظت آنتی بیوتیکی در محیط کشت، افزایش می یابد و باندهای پلاسمیدی در اشریشیا کلی حذف شدند.

به طور کلی، نتایج نشان داد که نور ماوراء بنفش و افزودن آنتی بیوتیک به محیط کشت موجب می شود که باکتری ها به آنتی بیوتیک مقاوم شوند.

پس از جدا کردن سویه های باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک با روش افزایش تدریجی غلظت آنتی بیوتیک، این باکتری ها به همراه نمونه های حساس به آنتی بیوتیک و نمونه های تحت تابش نور UV که دچار جهش شده بودند تحت استخراج پلاسمید و الکتروفورز قرار گرفتند.

نتایج الکتروفورز حاکی از وجود دو باند مجزای پلاسمید در تمام نمونه های اولیه حساس به آنتی بیوتیک اشریشیا کلی و عدم وجود باند پلاسمیدی در کلیه نمونه های حساس به آنتی بیوتیک استافیلوکوک اورئوس بود. نمونه های تحت تابش UV دچار جهش شده بودند و پلاسمید خود را از دست داده بودند. به طور کلی، نتایج الکتروفورز نشان داد که احتمالاً ژن عامل مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری ها بر روی کروموزوم قرار دارد نه بر

جدول ۱- توزیع موارد مقاومت یا حساسیت امی بیوتیکی با سری ها قبل و بعد از ایجاد جهش توسط ماورای بنفش و افزودن آنتی بیوتیک به محیط کشت

تعداد باند پلاسمیدی	مقاومت یا حساسیت باکتری ها قبل از ایجاد جهش و هم چنین افزایش رقت محیط کشت				اورئوس اداری	اورئوس استاندارد	استافیلوکوک	اشریشیا کلی مدفوع
	Amp (10mcg)	Str (10mcg)	Tet (30mcg)	اداری				
-	S(30mm)	S(20mm)	S(20mm)	S(20mm)	R	S(23mm)	S(20mm)	R
-	R	R	S(16mm)	S(20mm)	R	S(23mm)	S(20mm)	R
2	S(18mm)	S(22mm)	S(19mm)	S(22mm)	R	S(23mm)	S(20mm)	R
2	R	S(20mm)	R	S(20mm)	R	S(23mm)	S(20mm)	R
2	R	R	R	R	R	S(23mm)	S(20mm)	R

S = حساسیت باکتری ها به آنتی بیوتیک
R = مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک
Amp = دیسک آمپی
Str = دیسک استرپتومایسین
Tet = دیسک تتراسایکلین
سیلین

مقاومت یا حساسیت پس از تابش نور اولتراولترابولت	تعداد باند پلاسمیدی	Amp (10mcg)	Str (10mcg)	Tet (30mcg)
		R	R	R
مقاومت یا حساسیت بعد از افزایش تدریجی آنتی بیوتیک ها	تعداد باند پلاسمیدی	Amp (10mcg)	Str (10mcg)	Tet (30mcg)
		S(10mm)	R	R
		R	R	R
		R	R	R

و مقاومت با مصرف گسترده آنتی بیوتیک افزایش و با مصرف دوره ای کاهش می یابد (۸). بنابراین، به علت افزایش سریع مقاومت باکتری ها به داروها، توصیه می شود که برخی از آنتی بیوتیک ها را در بیمارستان ها به موارد شدید بیماری ها محدود کنند یا به صورت دوره ای مصرف نمایند تا این داروها برای مدت زمان طولانی تری مفید و با ارزش باقی بمانند. در این پژوهش پس از انجام الکتروفورز، تمام باکتری های اشریشیا کلی حساس به آنتی بیوتیک دارای باندهای پلاسمیدی بودند ولی استافیلوکوک ها فاقد باندهای پلاسمید بودند. این حالت در مورد اشریشیا کلی و استافیلوکوک های مقاوم شده به آنتی بیوتیک نیز صدق می کرد و این امر، نشان دهنده

در واقع با این روش ها، سویه های حساس به آنتی بیوتیک به مرور از بین رفتند و سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک ها باقی ماندند که این امر نشان دهنده زنگ خطر مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها در بدن نیز می باشد.

در مطالعه ای تغییر حساسیت آنتی بیوتیک اعضای خانواده انتروباکتریاسه (کلبسیلا، اشریشیا کلی، انتروباکتر، سریشیا) و استافیلوکوک اورئوس ایزوله شده از مکان های مختلف ایتالیا در بررسی های اپیدمیولوژی از سال ۱۹۹۷ تا ۱۹۹۹ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنها نشان داد که حساسیت و مقاومت این باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف با گذشت زمان تغییر می یابد

با توجه به مطالب فوق، پیشنهاد می شود برای جلوگیری از ایجاد و گسترش سویه های باکتری مقاوم، از مصرف نامناسب و نابجای آنتی بیوتیک ها خودداری شود. برای مقابله با باکتری هایی که در ژنوم خود دارای عامل مقاومت هستند، آنتی بیوتیک های جدید و نیمه سنتزی تهیه شود یا برای مقابله با عفونت های ناشی از باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها، از عوامل درمانی دیگری مانند باکتریوفاژ استفاده شود.

در پایان، این بررسی نشان داد که نور ماوراء بنفش، وجود آنتی بیوتیک در محیط و افزایش رقت محیط کشت بر روی مقاومت آنتی بیوتیک و تعداد باندهای پلاسمیدی بر روی باکتری اشیریشیا کلی تأثیر بیشتری در مقایسه با استافیلوکوک اورئوس دارد که ممکن است به علت تفاوت در دیواره سلولی آنها باشد.

احتمالی وجود عامل مقاومت آنتی بیوتیکی در کروموزوم استافیلوکوک ها بوده است.

نتایج الکتروفورز باکتری های تحت تابش UV حاکی از ایجاد جهش و از بین رفتن پلاسمید موجود در تمام باکتری ها بود. به علاوه نتایج حاصل از تست آنتی بیوگرام تمام باکتری های تحت تابش UV نشان داد که در اکثر باکتری ها، میزان مقاومت آنتی بیوتیکی بدون تغییر بوده است. پس با توجه به عدم مشاهده باندهای پلاسمیدی در باکتری های اشیریشیا کلی تحت تابش UV، در هنگام الکتروفورز و با در نظر گرفتن نتایج آزمایش آنتی بیوگرام، دو فرضیه زیر مطرح می شود:

- ۱- عامل مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری ها احتمالاً همانند استافیلوکوک ها، کروموزومی است.
- ۲- عامل مقاومت پلاسمید است و نور UV فقط موجب کاهش شدید تعداد کپی های پلاسمید شده است، به حدی که در هنگام استخراج پلاسمید، به اندازه کافی به دست نیامد.

References:

- 1- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Medical Microbiology*. 22nd ed; Appleton and Lange, 2001
- 2- Virella G. *Microbiology and infectious disease*. 3rd ed, Waverly PVt . Ltd. 1997
- 3- Arihara K, Itoh M. UV-induced Lactobacillus gasseri mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation. *Int J Food Microbiol* 2000 56(2-3): 327-30.
- 4- Zvenigorodskii VI, Tiaglov BV, Voeikova TA. Isolation of peptide antibiotic virginamycin components and selection of their producer Streptomyces virginiae. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 2001; 37(3): 301-8.
- 5- Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Antibiotic resistance in Escherichia coli isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18(4): 353-8.
- 6- Randall LP, Woodward MJ. The multiple antibiotic resistance (mar) locus and its significance. *Res Vet Sci* 2002; 72(2): 87-93.
- 7- Macias A E, Herrera LE, Munoz J, et al. Antibiotic resistant fecal Escherichia coli in healthy children Induced by the use of antibiotics? *Rev Invest Clin* 2002 54(2): 108-12.