Archive of SID

مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران
سال سوم ● شماره ۳ ● صفحات ۶۱۵ تا ۶۱۸ ● پائیز ۱۳۸۴

اثر غلظت های پایین تر از MIC ونکومایسین در القاء اشکال L استافیلوکوکوس اورئوس و بررسی پایداری آنها در خون (در شرایط آزمایشگاهی)

* فرشاد نجومی[۱]، دکتر قربان بهزادیان نژاد[۲]، دکتر مرتضی ستاری[۳]، دکتر شهین نجار پیرایه[۳]

چکیده

سابقه و هدف: اشکال L، باکتریهای گرم مثبت یا گرم منفی هستند که دارای نقص در دیواره سلولی خود بوده و فاقد پپتید و گلیکان می باشند، ولی در محیط های هیپرتونیک توانایی رشد و تکثیر دارند. نقش اشکال L در ایجاد عفونت های انسانی بدرستی مشخص نیست، ولی تابحال این اشکال را از عفونتهایی همچون باکتریوری، مننژیت، تب روماتیسمی، اندوکاردیت و سپتی سمی از انسان جدا نموده اند. آنتی بیوتیک ها نیز از جمله القاء کننده های مهم اشکال L محسوب می شوند. هدف از انجام این تحقیق، بررسی ارتباط میان غلظت های مختلف ونکومایسین با القاء اشکال L استافیلوکوکی و بررسی پایداری یا ناپایداری آنها در خون کامل انسان می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، اثر غلظت های مختلف ونکومایسین بر روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC- ۲۵۹۲۳) آزمایش گردید. سپس رشد باکتریها در محیط های چهارگانه BHI Agar، BHI broth، LPM Agar و LPM broth مورد بررسی قرار گرفت. سپس با افزودن اشکال L القاء شده به خون، پایداری یا ناپایداری آنها در خون بررسی شد.

یافته ها: در غلظت های MIC و بالاتر از آن، باکتریهای طبیعی قادر به رشد و تکثیر نبودند، اما اشکال L پس از گذشت ۳ الی ۵ روز در محیط LPM broth القاء شدند. با تلقیح اشکال L استافیلوکوکوس اورئوس به خون کامل انسان، این اشکال پایدار نبوده وپس از چند روز تبدیل به باکتریهای طبیعی و دیواره دار گردیدند. در غلظت های پایین تر از MIC ونکومایسین، القاء اشکال L صورت نگرفت و پس از تلقیح به محیط های چهارگانه فوق، رشد استافیلوکوکهای معمولی در تمامی محیط ها مشهود بود.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه ایجاد اشکال L و سایر اشکال دارای نقص در دیواره سلولی، به عنوان یکی از راههای مقاومت دارویی باکتریها مطرح است و از طرفی، در غلظت های بالاتر از MIC ونکومایسین نیز امکان ایجاد اشکال L وجود دارد، لذا می توان چنین نتیجه گرفت که تجویز همزمان دو یا چند آنتی بیوتیک که اثرات ضد میکروبی یکدیگر را تقویت نمایند، یکی از راههای به حداقل رساندن القاء اشکال L و بروز مقاومت دارویی می باشد.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، اشکال L، حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، خون، ونکومایسین

مقدمه

اشکال L، واریانت هایی از باکتریهای معمولی اند که به دلیل فقدان پپتید و گلیکان تنها در حضور محافظت کننده های اسمزی مناسب قادر به رشد و تکثیر هستند(۱). از جمله القاء کننده های مهم اشکال L می توان به برخی آنتی بیوتیک ها، آنزیم ها، آنتی بادیها و نظایر آن اشاره کرد. در صورت ایجاد شرایط محیطی و اسمزی مناسب و نیز حذف فوری یا تدریجی ماده القاء کننده از محیط، برخی از این اشکال قادر به بازگشت به فرم دیواره دار و اولیه خود می باشند (۳،۲).

استافیلوکوکوس اورئوس، نوعی کوکوس گرم مثبت بیهوازی اختیاری است که فاقد تاژک و اسپور بوده، در ایجاد بیماریهای عفونی مختلف

۱- مربی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی (* نویسنده مسئول)
۲- دانشیار، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی
۳- استادیار، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی

www.SID.ir

Archive of SID

و متعددی ازقبیل کورک ، گل مژه ، مننژیت ، اندوکاردیت ، سپتی سمی، ذات الریه ، سینوزیت ،آبسه های احشایی و غیره در انسان دخالت دارد . امروزه این باکتری در برابر اکثر آنتی بیوتیک های موجود مقاوم شده ، ولی هنوز اکثر سویه های آن نسبت به ونکومایسین حساس می باشند.ونکومایسین ، سنتز پپتید و گلیکان را در مرحله دوم یعنی هنگامیکه واسطه های لیپیدی به غشاءسیتوپلاسمی باکتری متصل می شوند ، تحت تاثیر قرار داده و در ایجاد و القاء اشکال L در برخی از باکتریهای گرم مثبت نقش دارد (۵،۴). هدف از این تحقیق، یافتن پاسخ های مناسبی برای این دو پرسش است که با توجه به ارزش زیاد ونکومایسین در درمان عفونتهای استافیلوکوکی بویژه در مواردی از قبیل سپتی سمی و اندوکاردیت حاد از یک سو و تجویز و مصرف نادرست آن از سوی دیگر(۱) ؛ آیا خطر ایجاد اشکال L استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت های پایین تر از MIC ونکومایسین وجود دارد ؟ (۲) آیا چنین اشکالی در شرایط آزمایشگاهی در خون پایدار باقی می مانند یا خیر ؟

مواد و روشها

ابتدا سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس(ATCC-۲۵۹۲۳) از آزمایشگاه رفرانس بیمارستان بوعلی تهیه گردید . از خصوصیات بیوشیمیائی مهم این سویه می توان به کوآگولاز(+) ، مانیتول(+) و DNase (+) بودن آن اشاره کرد که تمامی این ویژگیها پس از دریافت سویه استاندارد و با انجام آزمایش های مربوطه مورد تایید قرار گرفت ودر ونکومایسین نیز پس از تهیه از شرکت داروسازی زکریای تبریز ۳ بار مورد آزمایش تعیین MIC (حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد) قرار گرفت و در هر سه بار، لوله شماره ۷ که دارای غلظت آنتی بیوتیکی معادل ۲ میکروگرم درلیتر بود، به عنوان غلظت MIC در نظر گرفته شد. لوله های شماره ۸الی ۱۱ به عنوان غلظت های پایین تر از MIC ، لوله های شماره ۱ الی ۶ به عنوان غلظت های بالاتر از MIC ونکومایسین و لوله های ۱۲ و ۱۳ نیز به عنوان شاهد مثبت و شاهد منفی انتخاب گردید . محیط کشت های چهارگانه بکار رفته برای این آزمایشات عبارت بود از: (۱)BHI Agar ، (۲)LPM Agar ،(۳)BHI broth، (۴)LPM broth. برای القاء اشکال L استافیلوکوکوس اورئوس از محیط LPM جامد و مایع استفاده گردید که ترکیبات این محیط ها به شرح زیر بود:

BHI broth(۳۸ گرم در لیتر) ، ساکاروز (۲۰۰ گرم در لیتر) ، گلوکز (۱۰گرم در لیتر)، ال- سیستئین (۰/۲ گرم در لیتر) ، سولفات منیزیم (۰/۵ گرم در لیتر) ، کلرید کلسیم (۷/۵ گرم در لیتر) ، فنل رد (۰/۰۲ گرم در لیتر) ، آگار(۰/۸ یا ۱/۲ درصد) و سرم اسب (۱۰۰ میلی لیتردر لیتر). Ph این محیط قبل از اتوکلاو کردن بر روی ۷ تنظیم می شد . سرم اسب استریل پس از اتوکلاو شدن به محیط افزوده می گردید(۸-۶). در مرحله بعد ، از غلظت های MIC، پایین‌تر از MIC و باکتریساید ونکومایسین برداشته و به محیط های چهارگانه مذکور تلقیح می کردیم . پس از اینکار ، محیط ها را تا حداکثر ۶ شبانه روز در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری می نمودیم . محیط ها هر روز بررسی شده و به عنوان کارهای تکمیلی از روش های طیف سنجی نوری و شمارش کلنی نیز جهت بررسی و مقایسه رشد یا عدم رشد در محیط های چهارگانه استفاده می شد .

روش رنگ آمیزی اشکال L

ابتدا ۰/۹ میلی لیتر از هر یک از کشت های مایع مورد مطالعه را بطور جداگانه در لوله های مخصوص سانتریفوژ ریخته و به هر یک از لوله ها نیز مقدار ۰/۱ میلی لیتر فرمالدئید ۳۰ درصد اضافه می شد . سپس به مدت ۲۰ دقیقه لوله ها با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می گردید . پس از این مدت و در پایان کار مایع فوقانی لوله ها تخلیه شده و از سلولهای ته نشین شده ، در یک قطره سرم فیزیولوژی گسترش تهیه می شد .پس از خشک شدن لام ها و تثبیت آنها با استفاده از حرارت ، اشکال L با استفاده از روش گرم ، رنگ آمیزی شده و مورد بررسی و مطالعه با میکروسکوپ نوری قرار می گرفت(۱۰،۹).

جهت مطالعه پایداری یا ناپایداری اشکال L القاء شده در خون ، غلظت های MIC ، پایین تر از MIC و بالاتر از آن را به نسبت۱ به ۱۰ و یا ۱ به ۵ به داخل لوله های حاوی خون استریل انسان تلقیح نمودیم . لوله ها تا ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داشته و بصورت روزانه بررسی می گردید . بدین ترتیب که هر ۲۴ ساعت یکبار از این لوله ها برداشت شده و به محیط کشت های‌چهارگانه تلقیح صورت می‌گرفت . کشت ها نیز به نوبه خود تا ۴ شبانه روزدر گرمخانه گذاشته شده و مطالعه آنها به صورت روزانه انجام می شد.برای بررسی رشد یا عدم رشد باکتریها درمحیط های مایع یعنی BHI broth و LPM broth از روش طیف سنجی نوری استفاده می گردید . در مورد کلنی های جدا شده از خون نیز مجددا آزمایش های بیوشیمیائی تاییدی صورت

www.SID.ir

Archive of SID

می گرفت تا از عدم آلودگی ثانویه و یا جهش ژنتیکی در سویه اصلی اطمینان حاصل آید .

یافته ها

پس از تلقیح غلظت های MIC ونکومایسین و نیز شاهد مثبت به محیط کشت های چهارگانه و گرمخانه گذاری آنها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد ، بعد از گذشت ۲۴ الی ۷۲ ساعت نتایج زیر حاصل شد : کلنی های طبیعی استافیلوکوکوس اورئوس پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت بر روی LPM Agar و BHI Agar ظاهر گردیده و کدورت و تغییر رنگ محیط های LPM broth و LPM Agar نیز بخوبی مشهود بود .

هر یک از این نتایج حکایت از آن داشت که در غلظت های پایین تر از MIC ونکومایسین ، اشکال L بوجود نیامده است .

نتیجه جالب توجه این بود که بعد از تلقیح غلظت های MIC و یا بالاتر (لوله های شماره ۴،۵،۶،۷) به محیط های چهارگانه و پس از گذشت ۶ شبانه روز ، محیط BHI broth کاملا شفاف بود، ولی محیط LPM broth پس از تلقیح لوله های ۵ الی ۷ تغییر رنگ داده و کدر گردید و با تلقیح لوله ۴ نیز هیچ تغییری در هیچیک از محیط ها رخ نداد . نتایج حاصل از طیف سنجی نوری محیط های BHI broth و LPM broth در جدول شماره ۱ نمایش داده شده است .

جدول ۱ - مقایسه میانگین نتایج حاصل از طیف سنجی نوری دو محیط BHI broth و LPM broth پس از تلقیح رقت های سریال ونکومایسین به آنها (طول موج: ۴۲۰nm ، حداکثر جذب نوری: ۲۰)

شماره لوله	BHI broth	LPM broth
۱۲ (شاهد مثبت)	۷/۲۵۲	۷/۶۱۷
۱۱	۰/۹۱۹	۷/۵۸۶
۱۰	۰/۸۰۳	۷/۳۹۷
۹	۰/۶۸۷	۷/۱۱۴
۸	۰/۳۲۲	۰/۹۲۳
۷(MIC)	۰/۰۱۷	۰/۵۰۱
۶	۰/۰۰۳	۰/۲۵۳
۵	۰/۰۰۱	۰/۱۲۱
۴	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱
۱۳(شاهد منفی)	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰

در صورت بکارگیری رنگ آمیزی گرم ویژه اشکال L در فاصله روزهای سوم تا چهارم ، کوکوس های گرم منفی تک یا دوتایی قابل رویت بود ، ولی اگر رنگ آمیزی گرم در فاصله روزهای چهارم تا ششم صورت می گرفت ، کوکوس های گرم مثبت تک ، دوتایی و خوشه ای در زیر میکروسکوپ مشاهده می گردید. تلقیح لوله های۱ تا ۴ و نیز شاهد منفی به محیط های چهارگانه ، حکایت از عدم رشد باکتریها اعم از طبیعی و یا اشکال L داشت و تمامی محیط ها حتی پس از گذشت یک هفته کاملا بدون تغییر مانده بود . در مرحله بعد ، در نتیجه تلقیح غلظت های پایین تر از MIC ونکومایسین (لوله های ۸ تا۱۱) به همراه شاهد مثبت به لوله های حاوی خون کامل و استریل انسان ، رشد طبیعی استافیلوکوکها پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت در هر چهار محیط گزارش شد.با اینحال پس از تلقیح غلظت های MIC و بالاتر (لوله های ۵ تا ۷) به لوله های حاوی خون و سپس کشت مجدد آنها بر روی محیط های چهارگانه ، نتایج زیر حاصل آمد:بر روی محیط های جامد هیچ اثری ازکلنی های اشکال طبیعی و یا اشکال L استافیلوکوکوس اورئوس و باکتریهای دیگر دیده نمی شد ، ولیکن در فاصله زمانی ۶۴ الی ۹۶ ساعت ، تنها لوله های حاوی LPM broth کاملا تغییر رنگ داده و کدر گردیدند . در اینحالت اگر کشت از این محیط مایع بر روی یک محیط جامد معمولی مثل BHI Agar صورت می گرفت، کلنی های طبیعی استافیلوکوکوس اورئوس بر روی آن ظاهر می گردید . آزمایشهای بیوشیمیایی تاییدی نیز حکایت از این داشت که کلنی ها مربوط به همان سویه استاندارد اولیه بوده و هیچ آلودگی یا جهش ژنتیکی در این میان رخ نداده است .

بحث و نتیجه گیری

باید توجه داشت که یکی از راههای مقاومت دارویی باکتریها ، ایجاد اشکال L و سایر اشکال دارای نقص در دیواره سلولی می باشد . زیرا این اشکال به دلیل فقدان پپتیدوگلیکان در برابرآنتی بیوتیک های ممانعت کننده ازسنتز پپتیدوگلیکان نظیر پنی سیلین ها وسفالوسپورین ها مقاومند . از طرفی ، بازگشت مجدد آنها به فرم دیواره دار پس از حذف دارو از محیط نیز می تواند توجیهی برای دخالت اشکال L در ایجاد عفونتهای مزمن و یا عود مجدد عفونتها پس از توقف مصرف آنتی بیوتیک ها و یا به دلیل عدم مصرف صحیح و به موقع آنها باشد. در محیط کشت LPM broth علاوه بر ایجاد اشکال L ، باکتریهای عادی نیز در مدت حداکثر ۴۸ ساعت قادر به رشد هستند ، ولی اشکال L پس از گذشت ۳ تا ۶ شبانه روز در این محیط رشد می نمایند . از طرفی در محیط BHI broth تنها باکتریهای عادی و دیواره دار قادر به رشد و تکثیر هستند و چنانچه پس از تلقیح یک لوله معین به این دومحیط ،

www.SID.ir

Archive of SID

تغییر رنگ و کدورت در محیط BHI broth مشاهده نشود ، ولی در محیط LPM broth مشاهده گردد ، حکایت از وجود باکتریهای غیرطبیعی دارد .از طرفی ، رنگ آمیزی گرم ویژه اشکال L نیز وجود کوکوس های گرم منفی را نشان می دهد که حاکی از وجود استافیلوکوکهای فاقد دیواره سلولی در محیط است . بعلاوه ، اگر ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد، رنگ آمیزی گرم صورت گیرد، اثری از کوکوس های گرم منفی تک ودوتایی نبوده، کوکوسهای گرم مثبت تک ، دوتایی و یا خوشه ای در زیر میکروسکوپ قابل رویت هستند. حال چنانچه از باکتریهای مذکور کشت به عمل آمده و آزمایشات بیوشیمیایی تاییدی بر روی آنها صورت گیرد ، مشاهده می شود که هیچ آلودگی و یا جهش ژنتیکی در سویه اصلی رخ نداده است . از طرفی ، تلقیح اشکال L القاء شده توسط ونکومایسین به خون کامل و استریل انسان نیز بازگشت مجدد این اشکال به فرم دیواره دار اولیه را در پی دارد. این باکتریها که تا قبل از تلقیح به خون، قادر به رشد و تکثیر در روی محیط کشت های معمولی نبودند، پس از تلقیح به خون و انجام کشت مجدد به راحتی بر روی این محیط ها رشد نمودند و این امر نشاندهده ناپایداری این اشکال در خون می باشد. از تمامی موارد فوق می توان چنین نتیجه گیری کرد که اگرچه استفاده از یک آنتی بیوتیک قوی مثل ونکومایسین به تنهایی در بسیاری از عفونتهای استافیلوکوکی می تواند موثر باشد ، ولی باید توجه داشت که به دلیل امکان ایجاد اشکال L حتی در غلظت های بالاتر از MIC ونکومایسین ، منطقی تر است که بجای یک آنتی بیوتیک از دو یا چند آنتی بیوتیک که اثرات ضد میکروبی یکدیگر را تقویت می نمایند استفاده شود تا احتمال بروز مقاومت های دارویی و ایجاد اشکال L به حداقل برسد . بعلاوه توصیه می شود که مصرف و تجویز آنتی بیوتیک های با ارزشی مثل ونکومایسین تحت شرایط خاصی صورت گیرد تا طی چند سال آینده شاهد گسترش روز افزون مقاومت های دارویی در برابر این آنتی بیوتیک و نظایر آن نباشیم .

Refrences

1. Balows A , Duerden IA . Topley and Wilson's Microbiogy and Microbial infections. USA: Arnold publisher, 1998.P: 577-633.

2. Owens WE . Morphologic study of S. aureus L-form , reverting and intermediate colonies In situ. J Clin Microb. 1997; 97 (6):389 – 86.

3. Allan EJ. Induction and cultivation of astable L – form of Bacillus subtilis . Journal of Applied acteriology .1991; 15(7):339-43.

4. Walker TS. Microbiology. New York: W.B Saunders company,1999. P:129-133.

5. Watana K . Mode of action and In vitro activity of vancomycin .Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2001; 13(4):7-18.

6. Takahashi T . Adaptation of a stable L – form of S.aureus to the medium osolarity . Jpn J Exp Med. 1995; 86(1):73 –77.

7. Beaman BL . Induction of L – phase Variants of S.aureus within intact murine lungs. lungs Infect Immun. 1990; 29(1):244-51.

8. Owens WE . Morphologic study of S.aureus L – forms. J Clin Microb. 1999; 35(7):1650-54.

9. Allan EJ . A novel method for differentiating L – form bacteria from using the Huscker Gram Staining technique. Lett .Appl Microb. 2003:193-96.

10. Schmid EN . Vancomycin – induced protoplasts and L – forms of S.aureus . Chemotherapy. 2001; 63(1):35-39.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of sub-minimal inhibitory concentrations of vancomycin in induction of S. aureus L-forms and study of their stability in blood (in vitro)

*Nojoomi F;MSc[1], Behzadian- Nejad Q; PhD[2] , Sattari M; PhD[2] , Najar-Pirayeh S; PhD[3]

Abstract

Background : L – forms of S. aureus are cell wall –defective bacteria that grow and multiply in hypertonic media. Vancomycin is an effective antibiotic for remedy of staphylococcal infections an important inducer of L – froms. The present study investigated whether staphylococcal L – forms induction is related to concentration of vancomycin and whether these forms are stable in blood or not .

Materials and methods: In this study , effect of different concentrations of vancomycin on standard strain of S.aureus (ATCC 25923) were tested ; Then growth of bacteria in four media (BHI Agar, BHI broth , LPM Agar and LPM broth) were studied . After induction of L – forms in LPM broth , these forms were injected to human complete blood .

Results: In bactericidal and minimal inhibitory concentrations of vancomycin, no growth of bacteria in three media was observed , but growth of bacteria in LPM broth after 72 hours was observed. Injection of S.aureus L – forms in to human blood caused changes of these forms to natural bacteria .

Conclusions:The results confirm that use of one cell wall affecting Antibiotic alone for remedy of staphylococcal infections , may increase the risk of induction of L – forms and drug resistant bacteria .

Key words : Blood, L-forms, MIC, S.aureus, Vancomycin

1- (* Corresponding author) MSc graduate, Army University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Departemnt of Microbiology
2- Associate professor, Tarbiat-Modarres University, Faculty of Medicine, Department of Bacteriology
3- Assistant professor, Tarbiat-Modarres University, Faculty of Medicine, Department of Bacteriology

www.SID.ir