تعیین حساسیت سویه های مختلف *Yersinia Pestis* بومی ایران نسبت به آنتی بیوتیک ها

نویسندگان:
حسن نکوئی دستجردی [1]، دکتر مهدی آسمار [1] ، محمدرضا رضوی [1]

خلاصه

بیماری طاعون یک بیماری عفونی است که در بین جوندگان دارای پایگاه محکمی است و انسان از طریق نیش کک های آلوده به عامل بیماری Yersinia Pestis مبتلا می شود.

علائم بیماری پس از یک دوره پنهانی به یکباره بروز می کند و بسرعت حال بیمار را وخیم می کند و در صورت عدم درمان سریع مرگ بیمار حادث می شود. با توجه به وجود کانون فعال بیماری در جوندگان در ایران آگاهی از وضعیت بیماری و چگونگی درمان آن ضروری است. این پژوهش نیز در این راستا بوده که اطلاعات بدست آمده از این آزمایشات جهت درمان بیماران آلوده به یرسینیا پستیس می باشد که آنتی بیوتیک مناسب در حداقل زمان ممکن برای درمان بیماران اهمیت حیاتی دارد.

در پژوهش انجام شده در انستیتو پاستور ایران، ۱۳۷ نمونه باکتری Yersinia Pestis که از منطقه طاعون خیز ایران (کردستان) بدست آمده است با روش استاندارد Tube Dilution، تراکم کمینه مهاری رشد [(MIC) Minimal Inhibitory Concentration] آنها تعیین و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های موجود در ایران مشخص گردیده است.

این مطالعه نشان می دهد که صد درصد این سویه ها نسبت به سه آنتی بیوتیک پنی سیلین، آموکسی سیلین و اریتروماپسین مقاوم و بیشترین حساسیت را به کاربنی سیلین (۱۰۰٪)، استرپتومایسین ، آمیکاسین و داکسی سیکلین ۹۲٪، جنتامایسین و کوتریموکسازول ۸۸٪ و تتراسیکلین ۸۲٪ دارند.

کلید واژه: طاعون، آنتی بیوتیک

مقدمه:

طاعون یک بیماری قدیمی است که احتمالاً از آسیای مرکزی منشاء گرفته است. احتمال دارد طاعون فلسطینی ها در سال ۱۳۲۰ قبل از میلاد مسیح که در انجیل از آن یاد شده است طاعونی با اتیولوژی اختصاصی بوده و پاندمی بزرگ در زمان امپراتور ژاستینین در سال ۵۴۲ بعد از میلاد مسیح طاعون حقیقی بوده باشد. در قرون وسطی طاعون در سراسر اروپا شایع بوده است. تخمین زده شده که ۲۵ میلیون نفر یعنی یک چهارم تمام ساکنان اروپا در قرن چهاردهم از طاعون تلف شدند (۱۳۴۹-۱۳۴۸) و آنرا مرگ سیاه نامیدند.

طاعون یکی از چند بیماری است که در تاریخ نشانه عمیقی از خود بجای گذاشته طوریکه در سال ۱۶۶۵ مرگ سیاه در لندن ۷۰۰۰۰ انسان را کشت. به دلایلی که فقط می توان حدس زد، طاعون دوره های نامنظمی از

۱- بخش انگل شناسی انستیتو پاستور ایران

سکون و برگشت مجدد داشته است. اروپای غربی عملاً از اواسط قرن هیجدهم به بعد عاری از طاعون بوده و این بیماری نخستین حمله بزرگ خود را در عصر جدید با ظاهر شدن در هنگ کنگ (۱۸۹۳) و در بمبئی (۱۸۹۶) شروع کرد. طاعون تلفات زیادی در هندوستان ببار آورده و آمار رسمی نشان می دهد که از سال ۱۸۹۶ تا ۱۹۱۸ بیش از ۱۰ میلیون مورد مرگ پدید آورده است (۱).

هم اکنون نیز در بسیاری از کشورها هر از چندگاهی اپیدمی ایجاد می کند که به علت رشد و سرعت ارتباط های عمومی امکان جهانی شدن آن بسیار زیاد است. نمونه بارز آن شیوع طاعون در جوامع انسانی در سال ۱۹۹۴ در کشور هندوستان می باشد.

عامل بیماری طاعون باسیل گرم منفی از جنس یرسینیا Yersinia می باشد که قبلاً در خانواده پاستورلاسه دسته بندی می گردید ولی از آنجائیکه دارای آنتی ژن مشترک با آنتروباکتریاسه ها می باشد و با دو رگه سازی (DNA - DNA hybridization) وابسته به اشرشیاکلی است، این جنس هم اکنون در خانواده آنتروباکتریاسه قرار گرفته است. این جنس شامل یازده گونه مختلف می باشد (۲) که از آن میان Y.Pestis ارگانیسم عامل بیماری طاعون می باشد. در ابتدای بیماری باکتریمی وجود دارد و در این مرحله می توان عامل بیماری را با کشت خون جدا کرد. همچنین غدد لنفاوی متورم دارای مقدار زیادی باکتری می باشد. مرگ و میر در بیماران طاعونی درمان نشده به ۶۰ درصد می رسد. آزمایش های بیوشیمیائی برای این باکتری همانند Y.Pesudotuberculosis می باشد.

با توجه به اینکه ایران دارای دوکانون فعال طاعون وحشی و چند کانون خاموش می باشد و همچنین با کشورهائی که دارای مناطق طاعونی هستند همجوار است باید از هر نظر آمادگی لازم را احراز نمود.

انستیتوپاستور ایران تنها سازمان علمی و پژوهشی است که از سال ۱۹۴۷ بررسی های اپیزئولوژیک و اپیدمیولوژیک این بیماری را انجام داده و نتایج مطلوبی را کسب نموده است. این پژوهش نیز در همین راستا انجام گردیده است (۳).

روش کار:

سوش های باسیل Yersinia Pestis در منطقه کردستان (کانون وحشی طاعون ایران) از جوندگان آلوده جدا شده است. برای این کار در جلو لانه جوندگان جنس مریون Meriones شامل مریون پرسیکوس، مریون لیبیکوس، مریون وینوگرادوی و تریسترامی که مخازن اصلی طاعون در ایران هستند، تله های چوبی زنده گیر برای صید آنها گذاشته می شود. جوندگان صید شده را توسط پنس های بلند مخصوص مهار کرده و در منطقه ای دور از روستا و لانه جونده بوسیله شانه کردن و دمیدن به موهای جوندگان شکار شده کک های آنها را در سینی پر از آب جدا کرده و پس از کشتن جونده در آزمایشگاه، جهت از بین بردن کک های احتمالی در سطح بدنشان، آنها را در ظرف حاوی نفت قرار می دهیم و سپس آنها را جهت کالبد شکافی آماده می نماییم (۳).

پس از باز نمودن شکم جونده و اتوپسی، طحال آن نمونه را در ظرف مخصوص شیشه ای قرار داده با مقداری سرم فیزیولوژی آن را توسط میله ای شیشه ای کاملاً له کرده و یک سوسپانسیون یکنواخت بدست می آوریم.

مقدار ۰/۵ ml آن را بطور داخل صفاقی به موش سفید آزمایشگاهی تزریق کرده و مقدار ۰/۱ml از سوسپانسیون را بر روی محیط کشت جامد باکتوآگار (DIFCO) ریخته توسط آنس بطور خطی کشت می دهیم و در گرمخانه ۳۷ درجه قرار می دهیم (۴،۵). جوندگان تزریق

تراکم پایانی	تراکم میانی	حجم محیط	محلول ضدمیکروبی مورد استفاده
۵۱۲	۵۱۲۰	۰	۵۱۲۰
۲۵۶	۲۶۵۰	۱	۵۱۲۰
۱۲۸	۱۲۸۰	۳	۵۱۲۰
۶۴	۶۴۰	۱	۱۲۸۰
۳۲	۳۲۰	۳	۱۲۸۰
۱۶	۱۶۰	۰	۱۶۰
۸	۸۰	۱	۱۶۰
۴	۴۰	۳	۱۶۰
۲	۲۰	۰	۲۰
۱	۱۰	۱	۲۰
۰/۵	۵	۳	۲۰
۰/۲۵	۲/۵	۷	۲۰
۰/۱۲۵	۱/۲۵	۱	۲/۵

جدول ۱ : جدول تهیه رقت مواد ضدمیکروبی برای تست حساسیت در محیط مایع

شده را روزانه کنترل کرده چنانچه باکتری Y.Pestis در طحال موجود بود در بدن جونده رشد و تکثیر یافته باعث مرگ آن می شود که می توان با مشاهده طحال و نمونه برداری و تهیه لام مستقیم که توسط رنگ بلودوتولوئیدین رنگ شده است باسیل طاعون را مشاهده کرد. طحال جونده فوق را دوباره در سرم فیزیولوژی له کرده و در محیط جامد کشت داده و برای تأیید سوش طاعون در گوشه ای از محیط کشت یک قطره محلول باکتریوفاژ مخصوص می ریزیم و پس از جذب شدن آنها را در گرمخانه ۳۷ درجه قرار می‌دهیم. پس از ۴۸ ساعت کلنی های شفاف، برجسته و صاف طاعون را که می توان بدون متلاشی شدن حرکتش داد، مشاهده نمود که در تمام سطح محیط بجز قسمتی که باکتریوفاژ ریخته شده است، وجود دارد. به این ترتیب باسیل طاعون تأیید شده و می توان آن را به روش لیوفیلیزه و یا کشت خوابیده در سردخانه نگهداری نمود (۶).

برای انجام آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری، از محیط جامد و مایع (Hinton Difco Mueller) استفاده گردید. PH پایانی محیط کشت حدود ۷/۲ تنظیم گردید. پس از تقسیم لوله ها طبق جدول شماره ۱، رقت های مختلف آنتی بیوتیک ها تهیه گردید. مقدار نهایی باکتری مورد آزمایش برابر با 5×10^5 در هر میلی لیتر تنظیم گردید (۷) (قبل از مخلوط نمودن با محلول آنتی بیوتیک 10^6 در هر میلی لیتر). سپس برای مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در دمای ۳۵ درجه قرار داده شد. پس از آن ابتدا کنترل مثبت برای رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفت. رشد سایر لوله ها با مقایسه تیرگی آنها با لوله کنترل مقایسه گردید(۸،۹).

کمترین لوله ای که در آن رشد بصورت کامل در مقایسه با لوله کنترل متوقف گردید به عنوان تراکم کمینه مهاری رشد در نظر گرفته شد (۴).

نتایج:

جدول شماره ۲، متوسط تراکم کمینه مهاری رشد (MIC) مربوط به سویه های مختلف جدا شده Yersinia Pestis و تراکم سرمی را برای آنتی بیوتیک های پنی سیلین، آموکسی سیلین ،کار بنی سیلین، استرپتومایسین، جنتامایسین، آمیکاسین، تتراسیکلین، داکسی سیکلین، اریترومایسین، نالیدیکسیک اسید، کلرامفنیکل، تری متوپریم، سولفامتوکسازول و نئومایسین نشان می دهد.

متوسط تراکم کمینه مهاری رشد برای سویه های مختلف باکتری Y.Pestis برای پنی سیلین ۵ و آموکسی سیلین ۲/۵، کاربنی سیلین ۲/۵، استرپتومایسین ۱۲، جنتامایسین ۰/۲، آمیکاسین ۶، تتراسیکلین ۰/۴، داکسی سیکلین ۳/۵، اریترومایسین ۵، نالیدیکسیک اسید ۴، کلرآمفنیکل ۲، تری متوپریم ۱، و سولفامتوکسازول ۱۰ برحسب µg/ml (مخلوط با یکدیگر به نسبت ۱و ۴ و به ترتیب ۱و ۰/۱) می باشد.

صد درصد سویه های جدا شده به پنی سیلین، آموکسی سیلین، اریترومایسین ،نالیدیکسیک اسید و کلرامفنیکل مقاوم می باشند. تمام سویه های جدا شده به کاربنی سیلین حساس، ۹۲ درصد به استرپتومایسین، ۸۸ درصد به جنتامایسین، ۹۲ درصد به آمیکاسین و داکسی سیکلین و ۸۸ درصد به کوتریموکسازول و ۸۲ به تتراسیکلین حساس می باشند.

نام آنتی بیوتیک	g/ml MIC	تراکم سرمی g/ml
Penicillin	۶	۱-۶
Amoxycillin	۳/۴	۱-۶
Carbenicillin	۲/۵	۱-۶
Streptomycin	۱۲	۲۵
Gentamycin	۰/۲	۱-۲
Amikacin	۶	۵-۱۰
Neomycin	۰/۴	-
Tetracyclin	۲/۵	۳-۵
Doxycilin	۲/۵	۳-۵
Erytromycin	۵	۱-۲
Nalidixic acid	۴	۰/۳
Chloramphnicole	۲	۱-۰/۵
Cotrimoxazole	۰/۱+۱	۳/۲+۴۷/۳

جدول شماره ۲ : متوسط تراکم کمینه مهاری رشد (MIC) مربوط به سویه‌های Yersinia pestis و تراکم سرمی آنتی بیوتیک ها.

بحث و نتیجه گیری:

نزدیک به پنج دهه از آغاز کاربرد آنتی بیوتیک ها در مبارزه با بیماریهای عفونی می گذرد .اگرچه با گذشت زمان آنتی بیوتیکهای جدیدی شناخته و در مبارزه با باکتریهای بیماریزا بکار گرفته می شود، این ارگانیسم ها نیز در اثر برخورد با این آنتی بیوتیک به عنوان ارگانیسم های زنده سازگاری یافته و سویه هائی انتخاب می شود که دارای مکانیسم های مختلف مقاومت به آنتی بیوتیکها می باشند. این مکانیسم ها شامل غیرفعال شدن متابولیکی باکتری، از دست دادن تراوائی غشاء و دیواره، تغییر و یا از دست دادن اندام هدف، سنتز آنزیمهای تخریب کننده یا تغییر دهنده آنتی بیوتیک و تنظیم سنتز آنزیم محل اثر آنتی بیوتیک می باشد. فقط در موارد محدودی حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک

انتخابی تغییر نیافته ولی در بقیه موارد چنین مقاومتهائی به فراوانی دیده می شود.

با اطلاعاتی که از فراوانی مطالعه میکروارگانیسم ها حاصل گردیده مشخص شد، که این تغییرات در باکتریهای گرم منفی افزونتر از گرم مثبت ها بوده و فاکتورهای مقاومت و ترانسپوزونها اهمیت بسزایی در ایجاد اینگونه مقاومت ها دارند. چنین عوامل پویائی موجب گردیده با توجه به آنتی بیوتیک های بکار گرفته شده در هر محدوده جغرافیائی خاص، شاخص های مقاومت به آنها در آن محل انتخاب شوند، از این رو شناسائی و سنجش حساسیت هر میکروارگانیسم بیماریزای خاص، قبل از انتخاب آنتی بیوتیک و شروع درمان اهمیت بسزائی دارد.

تحقیق انجام شده نشان می دهد برای درمان بیماری طاعون ۱۰۰ درصد سویه های جدا شده به کاربنی سیلین حساس می باشد. ۹۲ درصد سویه های جدا شده به آمیکاسین، داکسی سیکلین و استرپتومایسین حساس هستند و ۸ درصد به داکسی سیکلین مقاومند و بقیه به این چهار آنتی بیوتیک نیمه مقاوم می باشند و همچنین ۸۸ درصد سویه های جدا شده به کوتریموکسازول حساس و ۱۲ درصد مقاومند. ۸۸ درصد نیز به جنتامایسین حساس و ۱۲ درصد آن نیمه مقاومند. برای تتراسیکلین ۸۲ درصد حساس و ۱۸ درصد نیمه مقاوم هستند. کلیه سویه های جدا شده به پنی سیلین، اریترومایسین، آموکسی سیلین و کلرامفنیکل مقاومند و در درمان بیماری طاعون نمی توان از آنها کمک گرفت.

با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش گونه های باسیل طاعون بومی ایران نسبت به اکثر آنتی بیوتیک های مورد آزمایش حساس بوده و تراکم کمینه مهاری (MIC) آنها مشخص گردیده است که در جداول آمده است. آنچه قابل توجه می باشد این است که در بعضی از منابع باسیل طاعون را نسبت به کلرامفنیکل حساس نوشته اند(۳)، در حالیکه در این بررسی صد درصد گونه های Y.Pestis نسبت به این دارو مقاوم بوده است واین دارو را همانند پنی سیلین ،اریترومایسین و آموکسی سیلین نمی توان علیه طاعون در ایران استفاده کرد و داروهای انتخابی شامل استرپتومایسین ، تتراسیکلین ، آمیکاسین و داکسی سیکلین می باشند.

تشکر و قدردانی :

این بررسی با همکاری آقایان حامد حنیفی ، ابوطالب غضنفری ، محمد حنیفی و مصطفی امیری انجام شده است که بدین وسیله از محبت های ایشان تشکر میشود.

منابع:

۱ـ ملک زاده فریدون ،میکروب شناسی ، ۱۳۷۵، انتشارات دانشگاه تهران ،(۳۰۷ - ۳۲۱) .

2 - Murray , Drew, Kobayashi , Thompson, Medical Microbiology, 1990,103 -104.

۳ـ کریمی یونس ، طاعون و همه گیر شناسی آن ، ۱۳۵۵ ،انتشارات انستیتو پاستور،(۱۱ـ۱۱۶) .

4 - Pearson,R.D., Method for retiable determination of minimal lethal antibiotic concentrations, Antimicrob. Agents Chemother., 1980,18:699-708.

5 - Bahmanyar,M.,Cavanaugh,D.C.,Plague manual world health organization,1976.

6 - Baron,Samuel,MedicalMicrobiology,1991 ,314-416.

7 - Backer C.N., Inoculumization in antimicrobial susceptibility test evaluation of the over night agar cultures and the rapid inoculum standardizationsystem.J.Clin.Microbiol.1993.17:450 - 457.

8- Bamberger,D.M.,Ciprofloxacin, Azlocilin, Ceftizoxim & Amikacin alone and in combination against gram negative bacilli in an infected chamber model, J.Antimicrob. Chemother.,1986, 18:51-63

9 - Remer,L.G., Minimal inhibitory and bactericidal concentrations of 44 antimicrobial agents against three standard control strains in broth with and without human serum,Antimicrob. Agents,Chemother.,1981,19:1050-1055.