تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز در سالمونلاهای مقاوم جدا شده از مدفوع گوساله‌ها

● رؤیا فیروزی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز ● هادی کیوانفر، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه‌تهران

✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۳۸، بهار ۱۳۷۷

چکیده

در تحقیق حاضر تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز توسط سالمونلاهای مقاوم جدا شده از مدفوع گوساله‌ها به دو روش سریع کاپیلری (لوله موئین) و اسیدومتری مورد آزمایش قرار گرفت. پاسخ مثبت در تولید آنزیم بتالاکتاماز به روش کاپیلری ۷۵/۸۶ درصد و با روش اسیدومتری ۴۸/۲۷ درصد گزارش گردید. مقایسه قدرت تولید آنزیم بتالاکتاماز با دو روش فوق از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P<0/05$). نتایج به دست آمده از تعیین میزان تولید آنزیم بتالاکتاماز نشان می‌دهد که با روش کاپیلری علاوه بر سرعت و سهولت روش کار، سویه‌های مولد بتالاکتاماز به میزان بیشتری شناسائی می‌شوند. بنابراین بکارگیری روش کاپیلری در استفاده معمول در آزمایشگاه‌های میکرب‌شناسی بالینی توصیه می‌گردد.

مقدمه

آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام از مهمترین گروه‌های آنتی بیوتیکی از نظر تاریخی و کاربرد پزشکی می‌باشند و معمول‌ترین علت مقاومت در برابر داروهای بتالاکتام، دگرگونی آنزیمی آنهاست. آنزیم‌های هیدرولیز کننده آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام سه دسته هستند که از میان آنها نقش بتالاکتامازها به عنوان مهمترین مکانیسم مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام شناخته شده است. براساس نقطه ایزوالکتریک، فعالیت سوبسترائی و قدرت مهار کنندگی و میل ترکیبی با سوبسترا، بتالاکتامازهای باکتریهای گرم منفی در ۵ کلاس (I-V) و آنزیم‌های باکتریهای گرم مثبت در چهار گروه متفاوت (A-D) مشخص شده‌اند. تاکنون بیش از ۵۰ نوع مختلف از این آنزیم‌ها شناسائی شده است که اکثریت آنها تحت کنترل پلاسمید باکتریائی می‌باشند، بتالاکتامازهای باکتریهای گرم منفی وابسته به کروموزوم و ژنهای پلاسمیدی هستند، احتیاج به انگیزه ندارند، همیشه سازنده‌اند، به سلول متصل هستند و به میزان کمی تولید می‌شوند. بر عکس بتالاکتامازهای باکتری‌های گرم مثبت انگیزه پذیرند و نسبت به ماده اولیه یعنی بتالاکتام‌ها تمایل زیادی دارند (۴ و ۵). بنابراین بتالاکتامازها به جهت غیر فعال کردن آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام و نیز قابل انتقال بودن بین باکتریها حائز اهمیت می‌باشند و تشخیص سویه‌هائی که قادر به تولید این آنزیم هستند می‌تواند کمک موثری برای درمان عفونت‌های باکتریائی باشد.

روش‌های مختلفی جهت تشخیص آنزیم بتالاکتاماز شناخته شده است که حساسیت، سرعت و سهولت کار در آنها متفاوت است (۱۱ و ۱۲). هدف از تحقیق حاضر مقایسه دو روش سریع تشخیص آنزیم یعنی روش کاپیلری (لوله موئین) و روش اسیدومتری می‌باشد.

مواد و روش کار

ابتدا از تعداد ۲۰۱۴ نمونه مدفوع گوساله‌ها ۳۸ مورد سالمونلا جداگردید که ۳۶ مورد آن نسبت به یک یا چند آنتی بیوتیک مقاوم بودند (با استفاده از روش انتشار از دیسک) در مرحله بعد قدرت تولید بتالاکتاماز در ۳۶ مورد سالمونلای مقاوم جدا شده از موارد اسهال گوساله‌ها به دو روش کاپیلری و اسیدومتری مقایسه گردید.

روش کاپیلری (۸)

این روش براساس تغییر رنگ معرف فنل رد در لوله موئین در اثر کاهش pH استوار است. در این روش ابتدا محلول پنی‌سیلین فنل رد مورد نیاز تهیه می‌گردید. سپس لوله موئین در داخل محلول پنی‌سیلین فنل رد قرار داده می‌شد تا ارتفاع ۲-۱ سانتیمتر از لوله با معرف پرشود. در مرحله بعد نوک لوله موئین از طرف محلول پنی سیلین فنل رد بر روی چند پرگنه از باکتری مقاوم مورد آزمایش قرار داده می‌شد تا نوک لوله توسط پرگنه‌ها مسدود گردد. در مرحله آخر انتهای خالی لوله روی شعله بسته می‌شد و لوله در وضعیت قائم به مدت ۱۵-۵ دقیقه در حرارت اتاق قرار می‌گرفت. نتیجه مثبت به صورت ظهور رنگ مشخص می‌گردید. محلول پنی‌سیلین - فنل رد مورد نیاز جهت انجام این آزمایش به روش زیر تهیه می‌گردید.

ابتدا به یک میلیون واحد پنی‌سیلین - جی حاوی پتاسیم به میزان ۴/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به آن ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول یکنواخت فنل رد نیم درصد اضافه گردید. سپس سود یک مولار به صورت قطره قطره اضافه می‌شد تا pH محلول معادل ۸/۵ ثابت گردد.

روش اسیدومتری (۹)

این روش براساس سنجش تغییر pH توسط اندیکاتور رنگی مثل بروموکرزول بنفش صورت می‌گیرد. سویه‌های مولد بتالاکتاماز باعث کاهش pH و تغییر رنگ اندیکاتور می‌گردد. در این روش ابتدا باکتری مقاوم در داخل یک پلیت استریل بر روی یک کاغذ صافی آغشته به محلول پنی‌سیلین بروموکرزول بنفش قرار داده می‌شد و پلیت مزبور به مدت ۳۰ دقیقه در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفت. در صورت مثبت بودن نتیجه آزمایش، در محل حضور باکتری رنگ زرد مشاهده می‌گردید. محلول پنی‌سیلین - بروموکرزول بنفش موردنیازاین آزمایش به روش زیر تهیه می‌گردید:

ابتدا محلول بافر فسفات ۰/۰۵ مول در لیتر و pH معادل هشت تهیه شد. سپس به محلول فوق به میزان ۵ درصد کریستال بنزیل پنی‌سیلین اضافه گردید و در مرحله بعد ۰/۲ درصد معرف بروموکرزول - بنفش نیز اضافه شد و پس از حل شدن کامل در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری و مورد مصرف قرار گرفت.

آنالیز نتایج

آنالیز نتایج به دست آمده با روش آماری - Chi square مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

در این بررسی از ۳۶ مورد سالمونلای مقاوم جدا شده از موارد اسهال گوساله‌ها که تحت آزمایش تشخیص تولید یا عدم تولید آنزیم بتالاکتاماز قرار گرفتند تعداد ۲۹ مورد (۸۰/۶ درصد) قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند. از این تعداد باکتری مولد بتالاکتاماز ۲۲ مورد (۷۵/۸۶ درصد) به روش کاپیلری (لوله موئین) و ۱۴ مورد (۴۸/۲۷ درصد) به روش اسیدومتری پاسخ مثبت دادند. در مجموع ۷ مورد (۱۹/۴ درصد) نیز قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز نبودند. مقایسه قدرت تولید آنزیم بتالاکتاماز با دو روش فوق از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P<0/05$) جدول و دیاگرام شماره (۱). نتایج مثبت حاصل از دوروش فوق نشان دهنده قابلیت زیاد روش کاپیلری در مقایسه با روش اسیدومتری در تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز می‌باشد.

بحث

با کشف آنزیم پنی‌سیلیناز به عنوان یکی از آنزیم‌های بتالاکتاماز برای اولین بار در سال ۱۹۴۰ و نمایش نقش آن در سویه‌های *Sta. aureus* مقاوم به پنی سیلین، روشهای متعددی برای سنجش و تشخیص این آنزیم ابداع و معرفی شده است (۱). با توجه به روش‌های متعدد تعیین تولید آنزیم بتالاکتاماز و اختلاف در میزان حساسیت، سرعت و سهولت روش کار، اختلاف در میزان تولید این آنزیم به دو روش فوق در تحقیق حاضر امری طبیعی به نظر می‌رسد. تاکنون

هیچکدام از روش‌های کار شده به طور مطلق از حساسیت و ویژگی یکسان برخوردار نبوده‌اند (۱۰).

از دهه ۱۹۴۰ که مقاومت آنتی‌بیوتیکی شناخته شد هنوز به عنوان یک تعیین کننده اصلی در انتخاب آنتی بیوتیک مناسب برای درمان مطرح می‌باشد (۷). در کشورهای در حال توسعه که دارو به آسانی در دسترس است و نظارتی بر استفاده آنتی‌بیوتیک در جیره دام وجود ندارد مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌های جدید بخصوص از میزان بالائی برخوردار است (۶). براساس یک مطالعه دوره‌ای که توسط Sykes و Mathew (۱۹۷۶) انجام گرفته نشان می‌دهد که عواملی در ارتباط با فعالیت مهارکنندگی رشد توسط اجرام گرم منفی وجود دارد که عبارتند از: ۱- غلظت آنتی بیوتیک در تماس با سلول باکتری. ۲- قابلیت انتشار آنتی بیوتیک از غشاء خارجی باکتری. ۳- تمایل آنزیم برای آنتی بیوتیک. ۴- میزان آنزیم تولیدی توسط باکتری.

همچنین نامبردگان یادآور شده‌اند که بتالاکتاماز از سویه‌هائی که هرگز در مجاورت آنتی‌بیوتیک قرار نگرفته‌اند نیز تولید شده است (۱۰).

در سال ۱۳۷۲ در تحقیقی که در ایران بر روی باکتریهای جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان بوعلی قزوین انجام گرفته نشان داده شده است که با استفاده از روش اسیدومتری ۶۰/۵۶ درصد سویه‌های جدا شده مولد بتالاکتاماز بوده‌اند. در تحقیق فوق از روش دیگری جهت مقایسه استفاده نشده است (۱۵).

در سال ۱۳۷۵ در یک بررسی دیگر که بر روی باکتریهای جدا شده از نمونه‌های ارسالی به مراکز تشخیص طبی در اهواز صورت گرفته و فور بیش از ۵۰ درصد تولید بتالاکتاماز درسوش‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش شده است. ۳۹ درصد از سالمونلاهای جدا شده در این تحقیق قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بوده‌اند. روش تشخیص بتالاکتاماز به روش اسیدومتری بوده است (۱۴). در سال ۱۳۷۵ بررسی تولید آنزیم بتالاکتاماز در باکتریهای جدا شده از گوسفندان مبتلا به ورم پستان با دو روش کاپیلری و اسیدومتری توسط ناظر صورت گرفته است که نتایج بهتر روش کاپیلری با نتایج این تحقیق مشابهت دارد (۱۳).

Bellon (۱۹۹۲) با مطالعه‌ای که بر روی سویه‌های جدا شده آنتروباکتریاسه از بیماران‌بستری در بیمارستان از نظر تولید بتالاکتاماز انجام داده است نشان می‌دهد که کل ۳۷ سویه جدا شده از بیماران که با روش میکروبدومتری مورد آزمایش قرار گرفته‌اند مولد بتالاکتاماز می‌باشند (۳).

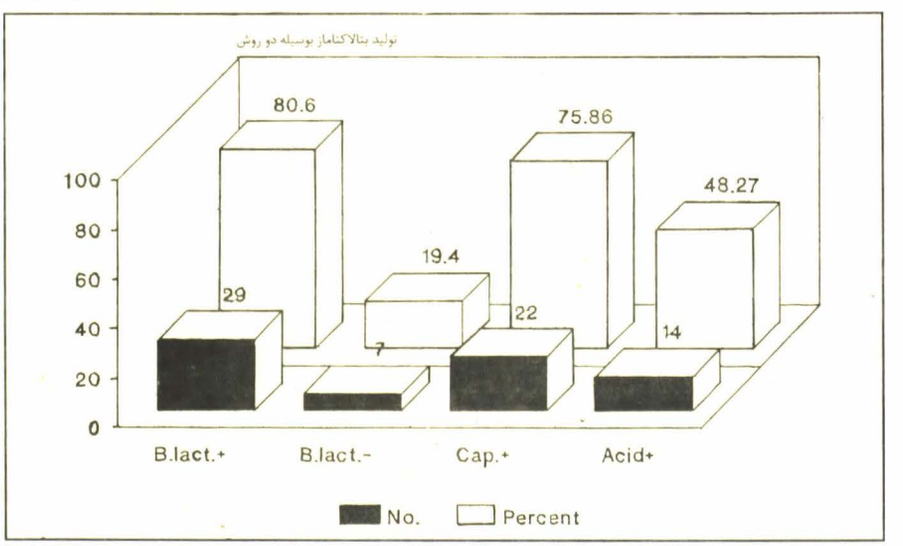
نتایج مطالعه گسترده‌ای که در سال ۱۹۹۲ در حوزه کشورهای خاورمیانه از جمله عربستان سعودی، امارات متحده عربی، کویت، بحرین و قطر انجام گرفته است نشان می‌دهد که ۶۵ درصد سویه‌های جدا شده قادر به تولید انزیم بتالاکتاماز بوده‌اند که از این میزان ۶۱ درصد مربوط به باکتریهای گرم منفی و ۷۵ درصد مربوط به باکتریهای گرم مثبت می‌باشد. روش به کار گرفته شده در تحقیق فوق استفاده از نوارهای آغشته به نیتروسفین بوده است (۲).

با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیقات مختلف، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و روند رو به رشد آن از مشکلات عمده در درمان بیماریهای عفونی در انسان و دام است. بررسی تولید آنزیم بتالاکتاماز که به عنوان عمده‌ترین راه بروز مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام (پر مصرف‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها) مطرح است می‌تواند وضعیت مقاومت در یک منطقه را ترسیم نماید. از طرفی با استفاده از روش‌های سریع و قابل اطمینان جستجوی این آنزیم‌ها می‌توان در مدت کمتر از یک ساعت به چنین مقاومتی پی برد.

جدول شماره ۱- مقایسه قدرت تولید بتالاکتاماز در ۳۶ مورد سالمونلای مقاوم جدا شده از موارد اسهال گوساله‌ها به دو روش کاپیلری و اسیدومتری.

موارد بتالاکتاماز مثبت		موارد بتالاکتاماز منفی		کاپیلری مثبت		اسیدومتری مثبت	
تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۲۹	۸۰/۶	۷	۱۹/۴	۲۲	۷۵/۸۶	۱۴	۴۸/۲۷

$X^2=P$ ۰/۰۵



منابع مورد استفاده

1- Abraham E.P. and Chain E., 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin (letter). Nature, 146, 837.

2- Atef M.S. and middle eastern study group. 1992. Incidence of β-lactamase production among out patient clinical isolates in middle eastern countries and their antibiotic susceptibilities. Chemotherapy. 38: 324-329.

3- Bellon J., Mouton R.P., 1992. Distribution of β-lactamases in enterobacteriaceae: indoor versus outdoor strains. Chemotherapy, 38: 78-81.

4- Davis B.D., Dubbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S., 1990. Microbiology, 4th edition. J.B. Lippicott company. PP: 201-227.

5- Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A., 1989. Review of medical microbiology. 18th edition. Lang medical population. PP. 130-153.

6- Murray B.E., Moellering R.C., 1978. Patterns and mechanisms of antibiotic resistance. Med. Clin. North. Am. 62: 899-923 .

7- O, Brien, T.F. and members of task force 2: Resistance of bacteria to antibacterial agents: Report of task force 2. Rev. Infect Dis. 1976; 9 (suppl 3): 5244-5260.

8- Rosen IRA. G., Jacobson J. and Rudderman, 1972. Rapid capillary tube method for detecting penicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Applied microbiology, 23: 649-650.

9- Sng E.H., Yeo K.L. and Rajan V.S., 1981. Simple method for detecting penicillin producing *Neisseria gonorrhea* and *Staphylococcus aureus*. Br. J. Veneral Dis. 57: 141-142.

10- Sykes R.B. and Mathew M., 1976. The β-lactamase of gram-negative bacteria and their role in resistance to B-lactam antibiotics. Journal of antibacterial chemotherapy. 2. 115-157.

11- Thornsberry C. and Kirven L.A., 1974. Ampicillin resistance in *Haemophilus influenza* as determined by a rapid test for β-lactamase production Antimicrob. Agents chemother. 6: 653-654.

12- Thornsberry C., Gavan T.L. and Gerlach E.H. In Sherris, J.C. Editor, 1977. New developments in antimicrobial agent susceptibility testing cumitech. 6. Washington, D.C. ASM.

۱۳- حسین خان ناظر، عبداله و زاهدی، افشین، ۱۳۷۵. بررسی تولید انزیم بتالاکتاماز در باکتریهای جدا شده از گوسفندان مبتلا به ورم پستان با دو روش کاپیلری و اسیدومتری، مجله پژوهش و سازندگی شماره ۳۰، صفحات ۱۲۰-۱۱۶.

۱۴- کحیاف، محمدجواد و مشهدی‌زاده، محمدعلی، ۱۳۷۵. بررسی وفور بتالاکتاماز در باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی در اهواز، مجله علمی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز شماره ۲۱ ص ۲۲-۱۸.

۱۵- موسوی، میراسماعیل، ۱۳۷۲. بررسی میزان باکتریهای لاکتاماز مثبت از نمونه بیماران بیمارستان بوعلی قزوین. دارو درمان سال دهم شماره ۱۱۴، صفحات ۱۴-۹.