مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۱، شماره ۱ صفحات ۳۱ تا ۴۰ (۱۳۸۲)

بررسی اثر SUB-Minimal Concentration آمپی‌سیلین، جنتامایسین و نالیدیگزیک اسید بر رشد، تولید آمونیاک و فعالیت آنزیم اوره‌آز پروتئوس میرابیلیس

فرشته جبل‌عاملی*، عضو هیئت علمی،دکتر فریدون ملک‌زاده **(استاد)
*گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
**گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران

چکیده

مقدمه: در طی درمان طولانی عفونت‌ها، غلظت مؤثر آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است به مقدار کافی در بدن حفظ نشود و میزان آنها در طول دوره درمان کاهش یافته و نهایتاً غلظت آنتی‌بیوتیک در محل هدف به حد کمتر از MIC (حداقل غلظت بازدارندگی رشد (Minimal Inhibitory Concentration) برسد، همچنین شواهدی بدست آمد که غلظت آنتی‌بیوتیک ها پایین‌تر از MIC بر صفات ویرولانس باکتری اثر دارد. در این تحقیق اثر sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامایسین، نالیدیگزیک اسید بر بعضی از صفات پروتئوس میرابیلیس، که عامل مهم ایجاد آلودگی در مجاری ادرار می‌باشد، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: صفات مورد بررسی عبارت بودند از مرفولوژی، تولید آمونیاک و فعالیت آنزیم اوره آز. به منظور تعیین MIC از روش Serial Broth dilution (تعیین رقت‌های متوالی) طبق روشهای استاندارد (National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS Document M7-A2 استفاده گردید.

یافته ها: در حضور غلظت‌های کم آمپی‌سیلین، رشته‌های طویل از این باکتری تشکیل گردید ولی دو آنتی‌بیوتیک دیگر اثری بر شکل باکتری نداشتند. رشد باکتری تحت تأثیر غلظت‌های Sub-MIC آمپی‌سیلین و جنتامایسین بوده و در حضور این دو آنتی‌بیوتیک فاز تأخیری طولانی گردید. غلظت MIC $\frac{۱}{۲}$ از نالیدیگزیک اسید باعث کاهش سرعت رشد باکتری گشت ولی فاز تأخیری در حضور این آنتی‌بیوتیک تغییری نیافت. میزان تولید آمونیاک در حضور غلظت‌های sub-MIC آمپی‌سیلین و جنتامایسین افزایش یافت و در محیط‌های MIC $\frac{۱}{۲}$ از آمپی‌سیلین میزان تولید آمونیاک، ۳۰ برابر محیط کنترل افزایش پیدا کرد. در بررسی فعالیت ویژه اوره‌آز باکتری اختلاف بدست آمده بین نمونه‌های تحت تیمار آنتی‌بیوتیک و نمونه‌های شاهد بسیار جزئی بود. نالیدیگزیک اسید اثر قابل توجهی بر تولید آمونیاک و فعالیت ویژه اوره‌آز پروتئوس میرابیلیس نداشت.

نتیجه گیری و توصیه ها: با این دو آزمایش می‌توان نتیجه گرفت آمپی‌سیلین و جنتامایسین در واقع با اثر بر دیواره سلولی و تغییر نفوذپذیری آن، بر تولید آمونیاک و فعالیت اوره‌آز اثر می‌گذارد. در این تحقیق نشان داده شده که غلظت پایین آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌تواند اثرات گوناگون بر عوامل بیماریزا باکتریها داشته باشد و مهمترین جنبه کاربردی این نوع تحقیقات بررسی اثرات غلظت پایین آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری‌ها و کاهش دوز آنتی‌بیوتیک برای بیماران است و نتایج حاصل می‌تواند پیشنهاد کننده طرح‌هایی باشد که به منظور حداقل‌سازی اثرات زیان‌آور آنتی‌بیوتیک‌ها از برنامه‌های دوزبندی جدید با غلظت‌های کمتر استفاده گردد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

مقدمه

با توجه به اثرات زیان‌آور غلظت بالای آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز کاهش میزان آنتی‌بیوتیک در طی درمانهای طولانی در محل هدف، در چند دهه اخیر بررسی اثر غلظت پایین آنتی‌بیوتیکها بر باکتریها مورد توجه قرار گرفته است و بررسی این مطالب اهمیت پیدا کرد که آیا عوامل ویرولانس باکتریها تحت اثر مقادیر کم آنتی‌بیوتیکها تغییر می‌یابد.

پروتئوس میرابیلس یکی از عوامل شایع عفونتهای مجاری ادرار، پیلونفریت حاد و مزمن و عفونت‌های عود کننده کلیوی است. این باکتری عامل عفونت در زنان، کودکان، افراد پیر و بیماران دارای سوند به مدت طولانی و افرادی با مشکلات مادرزادی و غیر مادرزادی در مجاری ادرار می‌باشد. مکانیسم بیماریزایی این باکتری دقیقاً مشخص نیست، اما عوامل ویرولانسی مانند فعالیت آنزیم اوره آز، اتصال به سلولهای اوروپی تلیال، همولیزین، حرکت و قدرت تهاجم باکتری را در بیماری‌زائی آن مؤثر می‌دانند. از میان این عوامل، فعالیت آنزیم اوره آز دارای اهمیت زیادی است زیرا مستقیماً در تشکیل سنگهای عفونی نقش داشته و همچنین در عفونت کلیه، آنسفالوپاتی آمونیاکی، اغما کبدی، ایجاد رسوب در جداره های داخلی سوند دخالت دارد. مقادیر زیادی اوره دائماً در ادرار آزاد می‌شود. اوره ترکیبی ناپایدار بوده و در اثر عمل آنزیم اوره آز هیدرولیز می‌گردد و ترکیبات حاصل از تجزیه اوره در بیماریزائی و به ویژه در سنگهای عفونی نقش دارد. تحقیقات مختلف برروی باکتریها از جمله سودوموناس، اشریشیاکلی و کلستریدیوم نشان داده که غلظت پائین آنتی بیوتیکها بر فاکتورهای ویرولانس این باکتریها مؤثر میباشند(٣،٥،٦،٧،٩،١٢)

در این تحقیق با توجه به اهمیت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونتها و اهمیت اثر غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیکها، تأثیر Sub-MIC آنتی‌بیوتیکهای جنتامایسین، نالیدیگزیک اسید و آمپی‌سیلین بر فعالیت آنزیم اوره آز و همچنین رشد باکتری پروتئوس میرابیلیس، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

در این تحقیق، اثر غلظت‌های کمتر از MIC سه آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، جنتامایسین،نالیدگزیک اسید بر روی پروتئوس میرابیلیس مورد بررسی قرار گرفته است. در ابتدا سویه‌های پروتئوس میرابیلیس از عفونتهای مجاری ادرار جدا شده و با روشهای تشخیصی متداول مورد شناسائی قرار گرفتند.

آنتی‌بیوتیکها:

آنتی بیوتیکهای آمپی‌سیلین تری هیدرات (Gist brocades, Holland) جنتامایسین سولفات (Meijiserka kaish, Japan) و نالیدیگزیک اسید (Merck) در این بررسی مورد استفاده قرار گرفت.

محیط کشت:

محیط‌های کشت بکار رفته در این تحقیق (Mueller Hinton Broth, Mueller Hinton Agar (Merck می‌باشد.

سوش‌های مورد آزمایش:

در این آزمایش دو سویه پروتئوس میرابیلیس که از بیماران مبتلا به عفونت‌های مجاری ادرار جدا شده بود استفاده گردید و سویه‌های مورد نظر برای تأیید تشخیص در آزمایشگاه با روشهای تشخیصی متداول مورد شناسائی قرار گرفتند.

تعیین MIC:

به منظور تعیین MIC از روش Serial Broth dilution (تعیین رقت‌های متوالی) طبق روشهای استاندارد (National Committee for Elinical Laboratory Stanclards Document M7-A2) NCCLS استفاده گردید که در این روش، pH محیط مولرهینون برات بین ٧/٢ تا ٧/٤(٢٥°c) تنظیم گردید. غلظت کاتیون‌های Ca^{2+} ، Mg^{2+} تنظیم گردید.

(١٢/٥-١٥mg/L Mg^{2+} ،٢٠-٢٥mg/ L Ca^{2+}) که در این حالت به آن (Cation Adjusted Mueller Hinton Broth)CAMHB گویند و سپس طبق روش تعیین رقت‌های متوالی MIC آنها تعیین گردید.

تعیین غلظت‌های Sub-MIC

پس از تعیین MIC، ابتدا برای هر آنتی‌بیوتیک محلول استوک که ١٠ برابر غلظت مورد نظر می‌باشد، تهیه و در هنگام استفاده با

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

رقیق سازی آنها و افزودن به محیط کشت M.H.B غلظت‌های ۱/۲، ۱/٤، ۱/۸ از MIC در هر یک از محیطهای کشت بدست آمد.

اثر غلظت‌های Sub-MIC بر رشد باکتری:

به شیشه‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط استریل مولر هینتون از غلظت‌های Sub-MIC آنتی بیوتیک‌های فوق و اوره فیلتر شده به میزان ۱/۲g/lit اضافه گردید.

از محیط کشت حاوی اوره و بدون آنتی‌بیوتیک نیز به عنوان محیط شاهد استفاده شد به هر شیشه ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۷}$ cfu/ml افزوده گردید در نتیجه غلظت حاصل در تمامی محیط‌های کشت $۱/۵\times۱۰^{۶}$cfu/ml و کدورت آنها نیز یکسان بود.

محیط‌های کشت بر روی شیکر بادور ۲۰۰rpm و در دمای ^{0}c ۳۷ گرما گذاری شد و در فواصل زمانی معین کدورت محیط کشت توسط اسپکتروفتومتر با طول موج ٦۲٥nm و همچنین شمارش تعداد باکتری‌ها با روش شمارش در پلت در ساعتهای ۰، ۸، ۱٦، ۲٤ انجام گرفت.

اثر غلظت‌های Sub-MIC بر آمونیاک تولید شده در محیط

سنجش میزان آمونیاک تولید شده در اثر فعالیت آنزیم اوره آز باکتری به روش زیر انجام گرفت: به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون برات حاوی gr/lit ۱/۲ اوره و غلظت‌های ۱/۲، ۱/٤، ۱/۸ MIC آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر و ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری ($۱/۵\times۱۰^{۷}$ cfu/ml) افزوده شد و محیط‌ها بر روی شیکر با rpm ۲۰۰ در درجه حرارت ^{0}c ۳۷ گرماگذاری شدند (نمونه شاهد نیز فقط واجد اوره و سوسپانسیون باکتری بود.

سپس در فواصل زمانی معین از هر شیشه ٤ میلی‌لیتر محیط کشت را برداشت نموده و به مدت ۲۰ دقیقه در درجه حرارت ^{0}c ٤ با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند سپس محلول روئی را با پی‌پت پاستور جدا نموده و با روش Indophenol assay میزان آمونیاک موجود در حجم معینی از آن تعیین گردید.

اثر غلظت‌های Sub-MIC بر فعالیت آنزیم اوره‌آز:

به این منظور ابتدا فعالیت آنزیم اوره آز باکتری در مراحل مختلف منحنی رشد (در زمانهای ۰، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۸، ۲۰، ۲٤، ۷۲) در محیط مولر هینتون برات فاقد آنتی‌بیوتیک اندازه‌گیری شد و این آزمایش در محیط‌های واجد و فاقد اوره صورت گرفت بدین ترتیب معلوم گردید که در چه زمانی از رشد باکتری، فعالیت اوره آز حداکثر می‌باشد. سپس سنجش فعالیت آنزیم در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک ارزیابی شد.

در این روش در زمانهای مورد نظر ٤ میلی‌لیتر از محیط کشت را برداشت و سانتریفوژ شد. پس از جدا کردن محلول روئی رسوب حاصل را ۲ مرتبه با ۲ میلی‌لیتر بافر PBS (فسفات بافر سالین) شستشو و از سلولهای شسته شده در ۲ میلی‌لیتر بافر PBS سوسپانسیون تهیه شد که بعد از هموژن کردن از دستگاه اولتراسیون برای شکست سلولها استفاده گردید. بعد از شکست سلولها عمل سانتریفوژ با دور rpm ۱۳/۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ^{0}c ٤ صورت گرفت و سپس محلول روئی را که حاوی آنزیم اوره آز آزاد شده از سلول بود با پی‌پت پاستور جدا و فعالیت آنزیم به روش Indophenol assay سنجش شد. برای تعیین فعالیت ویژه آنزیم اوره آز، سنجش پروتئین محلول به روش لوری انجام گرفت.

در این روش کنترل‌های مورد سنجش عبارت بودند از ۱- آنزیم + سوبسترا (بدون گرماگذاری در ^{0}c ۳۷) ۲- آنزیم جوشیده + سوبستر ۳- آنزیم + بافر فاقد سوبسترا

یافته ها

تعیین MIC

در این آزمایشات به منظور بررسی اثر غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامایسین و نالیدیگزیک اسید بر باکتری پروتئوس میرابیلیس، حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) این سه آنتی‌بیوتیک برای سویه‌های باکتری مورد نظر تعیین گردید (جدول شماره ۱)

بر اساس نتایج حاصل هر دو سویه باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مذکور حساس می‌باشند سپس غلظت‌های Sub-MIC (۱/۲، ۱/٤، ۱/۸) برای آنها محاسبه گردید.

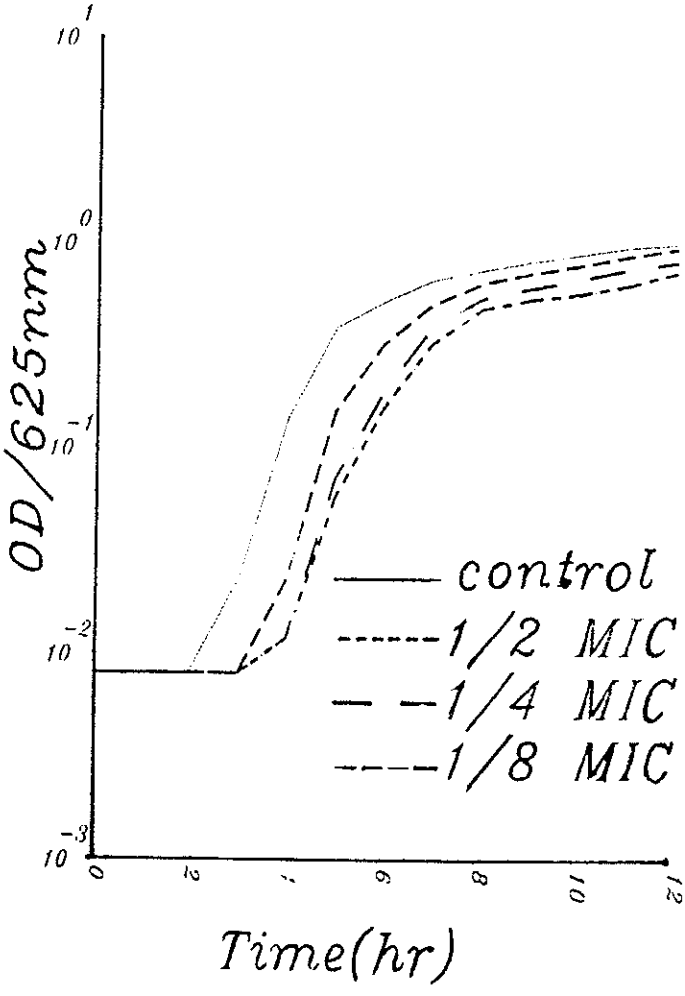
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

جدول ١- MIC تعیین شده آنتی‌بیوتیک‌ها علیه پروتئوس میرابیلیس ١و٢

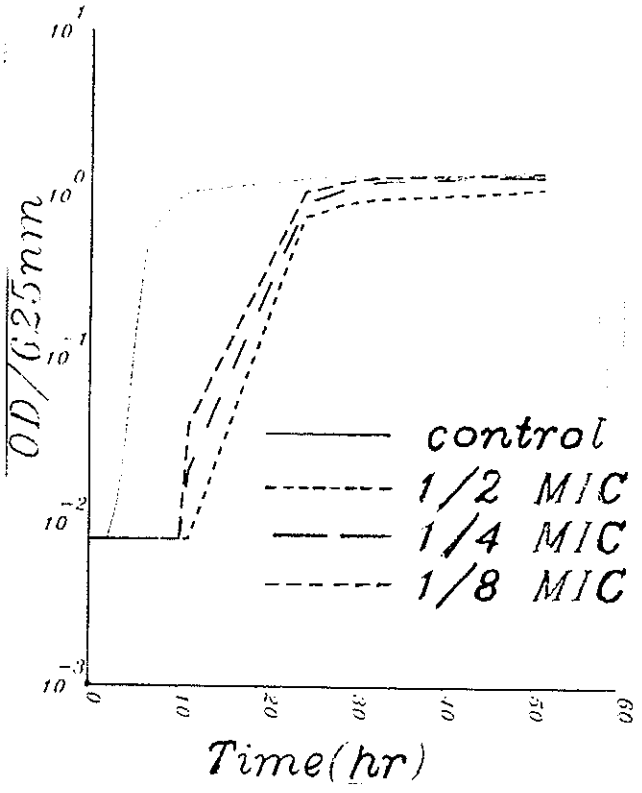
آنتی‌بیوتیک (µg/ml) / سویه باکتری	آمپی‌سیلین	جنتامایسین	نالیدیگزیک اسید
پروتئوس میرابیلیس ١	٠/٥	١	۴
پروتئوس میرابیلیس ٢	١	١	۴

رشد و مرفولوژی باکتری:

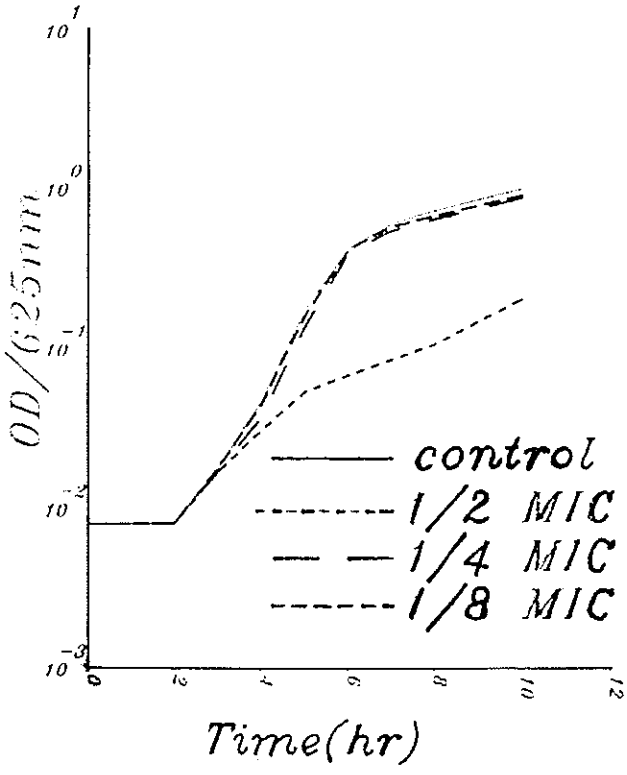
بـه مـنظور بررسی اثر غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسـین، آمپی‌سـیلین و نالـیدیگزیک اسـید بـر رشـد باکتری پروتـئوس میرابیلـیس، منحنی رشد این باکتری در حضور و فقدان این آنتی‌بیوتیک‌ها رسم گردید (نمودار ١ و ٢ و ٣).



نمودار (١) اثر Sub-MIC آمپی‌سیلین بر رشد پروتئوس میرابیلیس

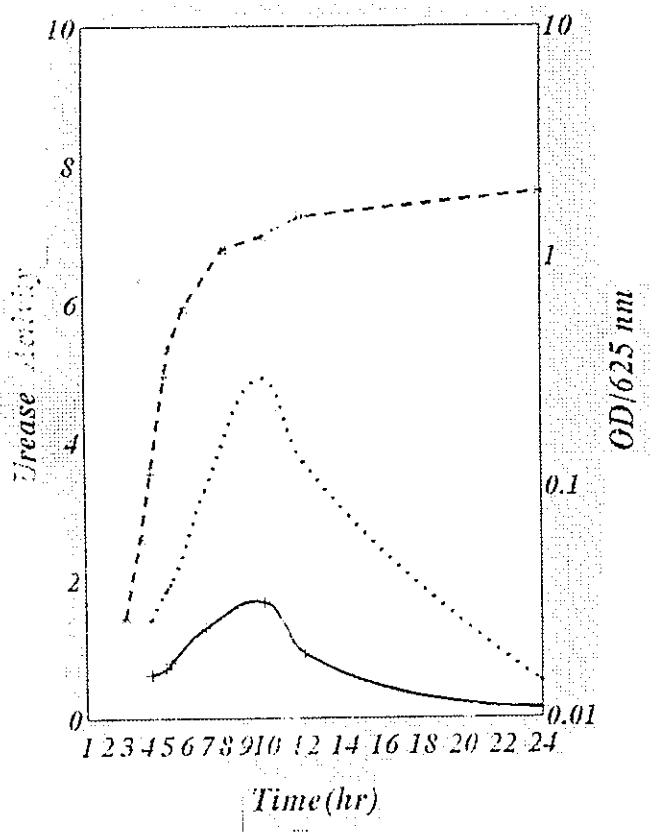


نمودار (٢) اثر Sub-MICs جنتامایسین بر رشد پروتئوس میرابیلیس



نمودار (٣) اثر Sub-MICs نالیدیگزیک اسید بر رشد پروتئوس میرابیلیس

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]



نمودار (۴) فعالیت اوره آز در حضور و فقدان اوره در محیط

ولی در باکتریهائی که در حضور آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و نالیدگزیک اسید رشد کرده بودند تغییرات قابل توجهی مشاهده نگردید.

تولید آمونیاک و فعالیت اوره آز:

در این آزمایشات، ابتدا فعالیت آنزیم اوره آز در محیط فاقد و واجد اوره اندازه‌گیری شد و نیز حداکثر فعالیت این آنزیم در دوره رشد باکتری بدست آمد و مشاهده گردید که در هر دو محیط، آنزیم اوره آز تولید می‌گردد ولی در محیط اوره‌دار فعالیت آن بسیار بیشتر می‌باشد و نیز نزدیک به اواخر فاز لگاریتمی این آنزیم دارای حداکثر فعالیت می‌باشد (شکل ٤) اثر غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی این آنزیم در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول فعالیت آنزیم بطور غیر مستقیم، با توجه به میزان آمونیاک حاصل در محیط مورد سنجش قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده غلظت‌های Sub-MIC آمپی‌سیلین باعث افزایش میزان آمونیاک در محیط گردید در مقایسه آماری بین میانگین مقدار آمونیاک تولید شده در محیط واجد آمپی‌سیلین با شاهد تفاوت معنی دار بدست آمد (جدول ۲).

طبق نتایج حاصل، آمپی‌سیلین در غلظت‌های پایین موجب کاهش سرعت رشد می‌گردد در منحنی رشد نیز نزول منحنی های رشد در حضور آمپی‌سیلین نسبت به شاهد مشاهده مگردد (شکل ۱). جنتامایسین نیز موجب کاهش رشد باکتری گردید بلکه این آنتی‌بیوتیک باعث طولانی شدن فاز تأخیری نیز می‌گردد به گونه‌ای که در حضور غلظت ۱/۲MIC جنتامایسین، فاز تأخیری در حدود ۱۸ ساعت بطول می‌انجامد در حالیکه مدت این فاز در محیط شاهد تقریباً ۲ ساعت می‌باشد (شکل ۲).

نالیدیگزیک اسید در غلظت ۱/۲MIC به شدت موجب کاهش رشد گردید اما غلظت‌های ۱/٤ و ۱/۸ از این آنتی‌بیوتیک اثر قابل توجهی بر رشد ندارند.

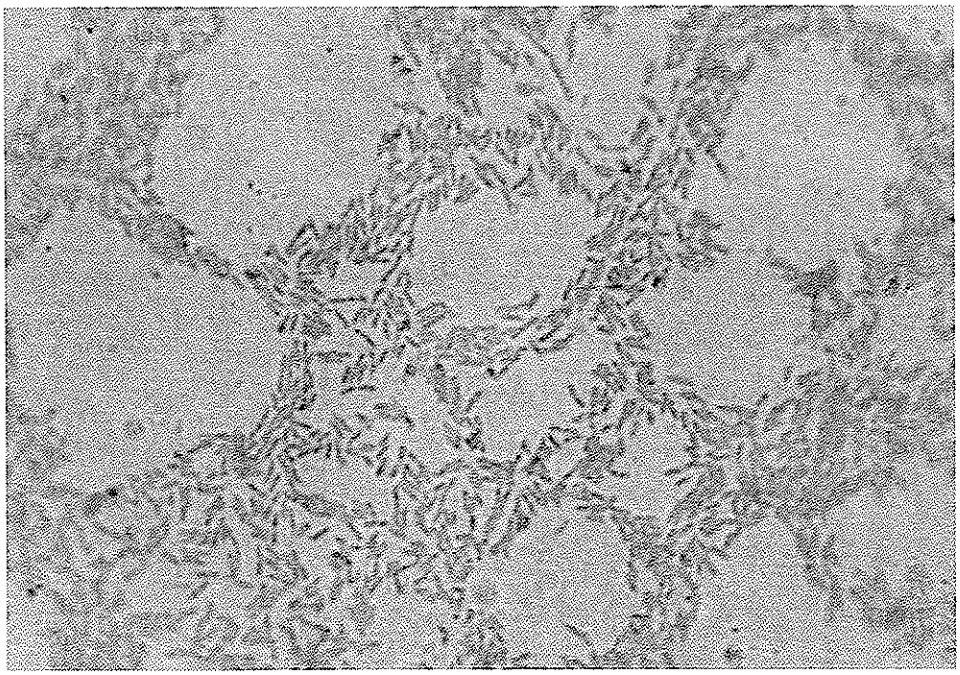
همانطور که در منحنی رشد نیز مشاهده می‌کنیم منحنی‌های این دو غلظت و شاهد تقریباً مجاور یکدیگر می باشند (شکل ۳).

در این آزمایشات مشاهده گردید که باکتریهای تحت اثر آمپی‌سیلین، در حضور این آنتی‌بیوتیک اشکال رشته‌ای بدست می‌آورند و در غلظت‌های بالاتر از آن، رشته‌ها بسیار بلند خواهد بود (۱/۲MIC) و در غلظت‌های ۱/٤ و ۱/۸ به ترتیب طول رشته‌ها نیز کمتر می‌باشد اشکال (۱ و ۲ و ۳ و ٤).

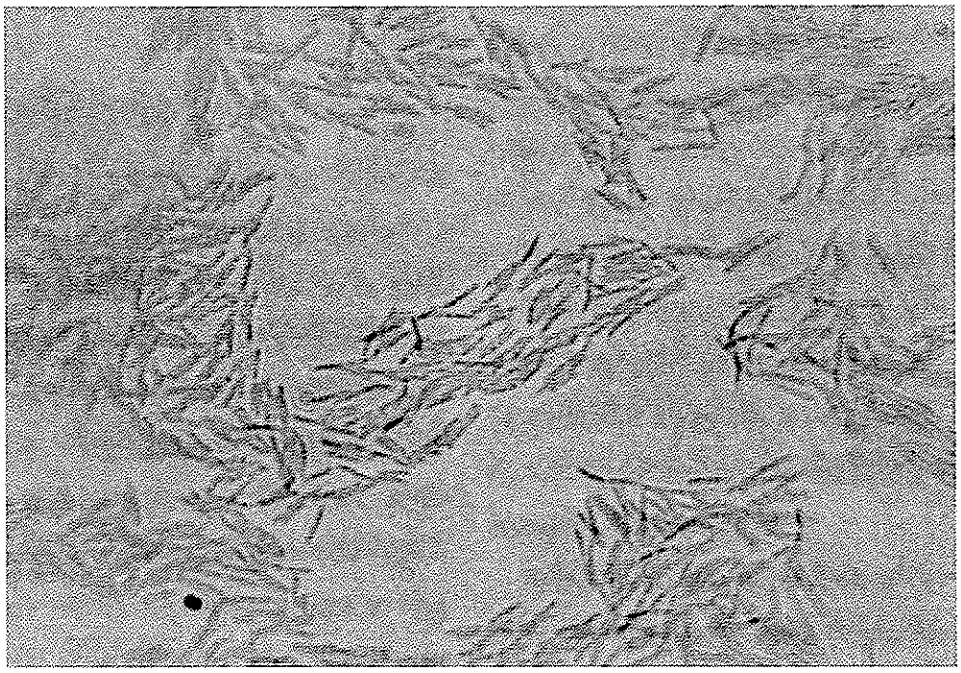
بنابراین در محیطی که میزان این آنتی‌بیوتیک بیشتر است مقدار فعالیت اوره آز نیز بیشتر می‌باشد. آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نیز اثر افزایشی بر میزان آمونیاک تولید شده در محیط دارد اما میزان این افزایش نسبت به اثر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کمتر است. محاسبات آماری با توجه به ارزش P بدست آمده، نشان داد که اختلاف بدست آمده هر یک از غلظت‌ها با شاهد معنی‌دار می‌باشد غلظت‌های پایین از آنتی‌بیوتیک نالیدیگزیک اسید، اثر قابل توجهی بر تولید آمونیاک در محیط نداشتند و بر اساس نتایج آماری، اختلافات جزئی بدست آمده بین میانگین مقدار آمونیاک تولید شده در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک و در محیط شاهد، فاقد معنی می‌باشد. در مرحله دوم، فعالیت ویژه اوره آز (Specific activity) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳).

فعالیت کل این آنزیم نیز با شکستن سلول سنجیده شد. در این حالت فقط در حضور آمپی‌سیلین افزایش تولید اوره آز به مقدار کمی مشاهده شد که قابل ذکر است این افزایش نسبت به مرحله قبل (سنجش آمونیاک در محیط) بسیار کمتر می‌باشد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

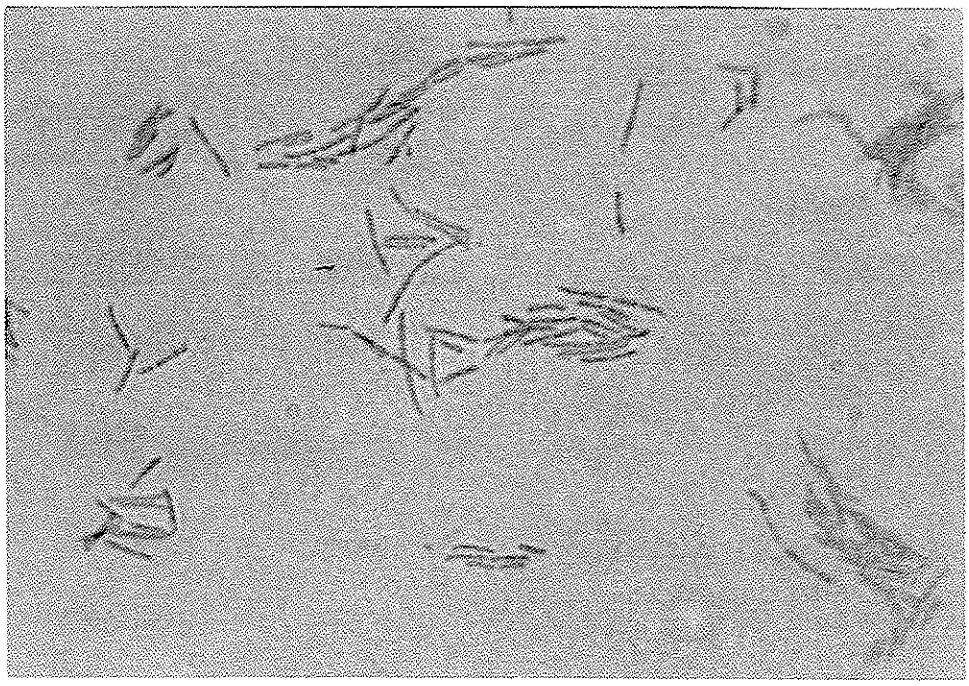


شکل ۱) باکتریهای رشد یافته در محیط شاهد (فاقد آنتی‌بیوتیک)

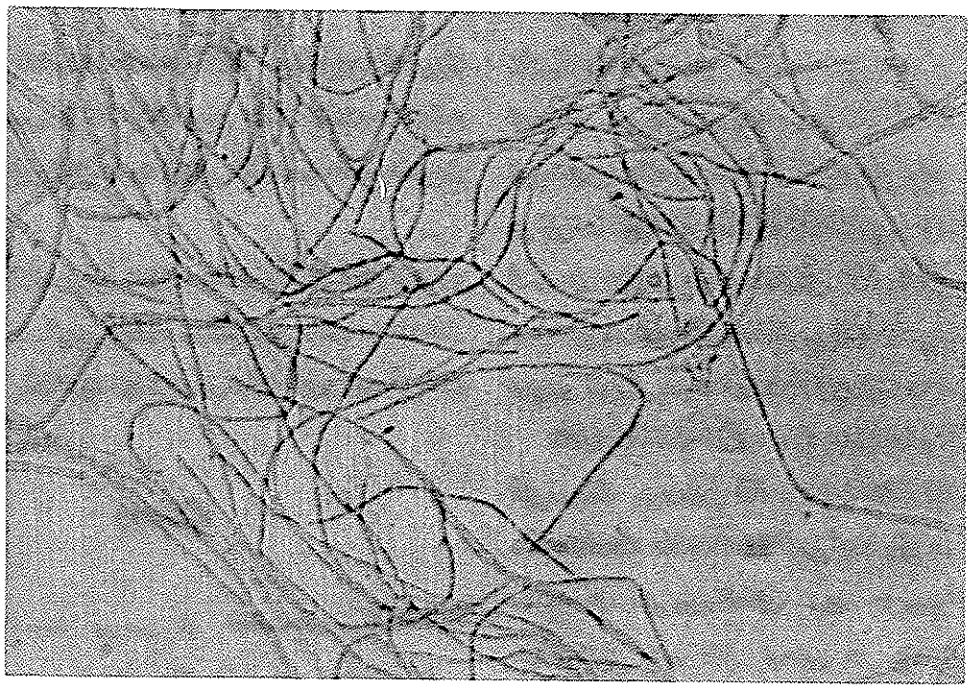


شکل ۲) باکتریهای رشد یافته در محیط واجد غلظت $\frac{1}{8}$ از آمپی‌سیلین

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]



شکل ۳) باکتریهای رشد یافته در محیط واجد غلظت $\frac{1}{4}$ از آمپی‌سلین



شکل ۴) باکتریهای رشد یافته در محیط واجد غلظت $\frac{1}{2}$ از آمپی‌سیلین

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

جدول ٢- اثر غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌ها بر تولید آمونیاک توسط پروتئوس میرابیلیس

غلظت آنتی‌بیوتیک	µmol $NH_4^+10^7$cells±SD[1]	P value[2]
شاهد	۰/۲۱۳±۰/۰۱۸[1]	
۱/۲ آمپی‌سیلین	٦/٤٤±۰/۵۹۹	۰/۰۰۰۵
۱/۴ آمپی‌سیلین	۱/۵۱٦±۰/۳٦۸	۰/۰۰۰۵
۱/۸ آمپی‌سیلین	۰/۷۲٦±۰/۰۸۱	۰/۰۰۱
۱/۲ جنتامایسین	۰/۹٦٤±۰/۱۲۲	۰/۰۰۱
۱/۴ جنتامایسین	۰/۷٦۳±۰/۰۷	۰/۰۰۱
۱/۸ جنتامایسین	۰/۲٦۷±۰/۰٦۹	
۱/۲ نالیدیکسیک اسید	۰/۲٦۱±۰/۰۳۸	NS[4]
۱/۴ نالیدیکسیک اسید	/۳۳۳±۰/۰۳۹	NS
۱/۸ نالیدیکسیک اسید	۰/۲۸٦±۰/۰۳۱	NS

۱) انحراف معیار ۲) ارزش P در مقایسه با شاهد ۳) فاقد معنی

در غلظت های ۱/۲، ۱/٤، ۱/۸ از MIC این آنتی‌بیوتیک میزان فعالیت آنزیم به ترتیب ۱/۲،٤، ۱/۲۷ برابر حالت شاهدبود که این افزایش از نظر آماری با توجه به ارزش P بدست آمده معنی‌دار می‌باشد.

آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بر خلاف حالت قبل اثر قابل توجه و معنی‌داری بر فعالیت آنزیم نداشته و همچنین مانند مرحله قبل آنتی‌بیوتیک نالیدیگزیک اسید نیز اثری بر تولید آنزیم اوره آز نشان نداد (جدول ٣).

بحث

با توجه به اهمیت بررسی اثر غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌ها بر عوامل بیماریزائی باکتریها، در این تحقیقات اثر

جدول ٣- اثر غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌ها بر فعالیت اوره‌آز در پروتئوس میرابیلیس

غلظت آنتی‌بیوتیک	µmol NH_4^+/min/mg/protein±SD[1]	P value[2]
شاهد	۲/٤۸±۰/۳۰٤	
۱/۲ آمپی‌سیلین	٤/۹۹±۰/٤۲۹	۰/۰۰۱
۱/۴ آمپی‌سیلین	۳/٤٦۲±۰/۲۸۷	۰/۰۰۱
۱/۸ آمپی‌سیلین	۳/۱۷±۰/۵۲	۰/۰۱
شاهد	۲/٦۷±۰/۱۰۳	
۱/۲ جنتامایسین	۳/۰۱۲±۰/۳۵۳	NS
۱/۴ جنتامایسین	۳/۱۵±۰/۰٤۱	NS
۱/۸ جنتامایسین	۳/۰۲±۰/۰۲۷	NS
شاهد	۲/۹۵±۰/۱۸۷	NS
۱/۲ نالیدیکسیک اسید	۲/۸۷٦±۰/۰۷۷	NS[3]
۱/۴ نالیدیکسیک اسید	۳±۰/۱	NS
۱/۸ نالیدیکسیک اسید	۲/۹۹±۰/۱٤۸	NS

۱) انحراف معیار ۲) ارزش P در مقایسه با شاهد ۳) فاقد معنی

sub-MIC سه آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، آمپی‌سیلین و نالیدیگزیک اسید را بر رشد و تغییرات در مرفولوژیکی و فعالیت اوره آز این باکتری مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که این خصوصیات تحت اثر غلظت‌های پایین این آنتی‌بیوتیکها قرار می‌گیرند. غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌های مختلف ممکن است در مواردی موجب کاهش رشد باکتری گشته و در بعضی موارد نیز در این غلظت‌ها اثر بر رشد باکتری ندارد. گزارشاتی نیز مبنی بر افزایش سرعت رشد باکتری نیز وجود دارد (١٠).

Jacques (٤) نشان داد که غلظت‌های ۱/۲ و ۱/٤ از MIC آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین G، باعث کاهش قابل توجهی در تعداد Pasteurella multocida می‌گردد ولی در حضور غلظت‌های مشابه از آنتی‌بیوتیک‌های تری متوپریم/سولفامتوکسازول و تتراسیکلین، تغییر قابل توجهی در رشد این باکتری گزارش نگردیده است.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

در این تحقیق اثر غلظت‌های ۱/۲، ۱/٤، ۱/۸ آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامایسین و نالیدیگزیک اسید بر رشد پروتئوس میرابیلیس بررسی گردید.

همانطور که در نمودار ۲ مشاهده شد آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در غلظت‌های پایین موجب کاهش رشد می‌گردد ولی تأثیر کمی بر فاز تأخیری منحنی رشد دارد.

آنتی‌بیوتیک جنتامایسین اثر قابل توجهی بر روی فاز تأخیری در منحنی رشد دارد بطوریکه در حضور غلظت ۱/۲MIC جنتامایسین فاز تأخیری ۱۸ الی ۱۹ ساعت بطول می‌انجامد بنابراین بیشترین اثر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بر فاز تأخیری رشد باکتری می‌باشد.

نالیدیگزیک اسید اثری بر فاز تأخیری باکتری ندارد در حضور غلظت ۱/۲MIC این آنتی‌بیوتیک رشد باکتری به شدت کاهش یافت در حالیکه غلظت‌های MIC ۱/٤، ۱/۸ اثر قابل توجهی بر رشد باکتری ندارد.

آنتی‌بیوتیک‌ها در غلظت‌های پایین می‌توانند منجر به تغییرات شکلی در باکتری گردند. اشکال غیر طبیعی باکتریها از ادرار و سایر نمونه‌های بیماران (مانند خون) تحت درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها نیز جدا شده است.

اشکال رشته‌ای و طویل شده پروتئوس میرابیلیس، اشرشیاکلی و سالمونلاتیفی از مایع صفاقی خرگوش هائی بدست آمد که در آنها حضور مداوم آنتی‌بیوتیک‌ها B- لاکتام در محدوده ۵۰ تا ۱۲/۵ درصد MIC وجود داشت (۱).

گزارش شده است که پروتئوس میرابیلیس تحت اثر سفالوریدین، سلولهای گرد و تخم‌مرغی شکل ایجاد می‌کند در حالیکه در حضور S- آمینوپنیسیلانیک اسید سلولهایی با اشکال نامنظم بوجود می‌آید (۸).

در این آزمایشات تغییرات شکلی پروتئوس میرابیلیس در حضور غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌های بکار برده شده با میکروسکوپ نوری بررسی گردید این باکتری در حضور غلظتهای پایین آمپی‌سیلین، اشکال رشته‌ای بوجود می‌آورد و در بعضی از مناطق این رشته‌ها، گره‌های بیضی شکل مشاهده گردید. تفاوت در ایجاد تغییرات در مورفولوژی توسط آنتی‌بیوتیک‌های B- لاکتام نشان دهنده متفاوت بودن تمایل آنها به PBPs های مختلف (Penicillin Binding Proteins) می‌باشد و این مسئله نیز می‌تواند تأییدی بر نقش مهم PBPs در حفظ اشکال سالم در باکتریها باشد. در این تحقیق در حضور جنتامایسین و نالیدیگزیک اسید تغییرات مرفولوژیکی قابل مشاهده با میکروسکوپ نوری در باکتری پروتئوس میرابیلیس دیده نشد.

با توجه به اهمیت اوره‌آز، این آنزیم به عنوان یک عامل مهم ویرولانس در پروتئوس میرابیلیس می‌باشد و همانطور که آزمایش گردید فعالیت این آنزیم تقریباً در اواخر فاز لگاریتمی به حداکثر مقدار خود می‌رسد و در فاز سکون به شدت فعالیت آن کاهش می‌یابد و همچنین فعالیت اوره آز در حضور اوره، بیشتر می‌باشد. در تأثیر آنزیم اوره آز باکتری بر اوره، مراحل ورود اوره به داخل سلول، هیدرولیز اوره، خروج یون آمونیوم از سلول به محیط صورت می‌گیرد بنابراین سرعت تجزیه اوره، به غلظت اوره در محیط، سرعت انتقال اوره، سرعت و میزان تجزیه اوره آز سلولی و سرعت انتقال یون‌های آمونیوم به محیط خارج سلولی بستگی دارد. در این تحقیق مشاهده گردید که در مرحله اول آزمایش، جنتامایسین تا حدودی و آمپی‌سیلین بشدت موجب تحریک و افزایش تولید آمونیاک در محیط می‌گردد و نالیدیگزیک اسید اثر قابل توجهی بر تولید آمونیاک ندارد.

جنتامایسین از گروه آمینوگلیکوزیدها می‌باشد و بر روی غشا نفوذپذیری آن اثر می‌گذارد (۲). با توجه به اینکه در حضور غلظت بالای جنتامایسین میزان تولید آمونیاک نیز بیشتر می‌باشد و اختلاف معنی‌دار بین تیمار و شاهد وجود دارد، ولی در مرحله دوم آزمایش که فعالیت اوره آز را در سلولهای شکسته شده بررسی شد اختلاف قابل توجه و معنی‌دار بین میانگین فعالیت آنزیم در تیمارهای تحت اثر جنتامایسین و شاهد بدست نیامد بنابراین می‌توان گفت که احتمالاً جنتامایسین با اثر بر نفوذپذیری غشا باکتری و سیستم انتقال اوره (سوبسترا) در غشا موجب نفوذ بیشتری از سوبسترا به درون سلول گشته و در نتیجه مقدار آمونیاک رها شده در محیط نیز افزایش می‌یابد ولی این آنتی‌بیوتیک بر تولید و سنتز اوره آز باکتری اثر نمی‌گذرد در گزارشات نیز آمده است که غلظت Sub-MIC کلوهگزیدین، موجب افزایش فعالیت دهیدروژناز در اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس گشته که این امر به علت آسیب به غشا توسط کلروهگزیدین و نفوذ بیشتر سوبسترا به درون سلول می‌باشد (۱۰).

در این تحقیق مشاهده گردید که آنتی‌بیوتیک B- لاکتام بشدت باعث افزایش فعالیت اوره آز در محیط می‌گردد. باکتریهای تحت

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

تیمار با آمپی‌سیلین تولید اشکال رشته‌ای کردند که در نتیجه فعالیت آنزیم اوره آز در اشکال رشته‌ای بیشتر از سلول‌های کوتاه می‌باشد.

Tianru فعالیت آنزیم اوره آز را در سلول‌های swarmer و کوتاه پروتئوس میرابیلیس مورد مقایسه قرار دارد و مشاهده کرد که سلولهای بلند نسبت به سلولهای کوتاه دارای فعالیت اوره آز بیشتری می‌باشد (١٣) اما دلایل قطعی در مورد این مشاهدات هنوز ارائه نشده است همانطور که در نتایج مشاهده گردید تولید آمونیاک و فعالیت آنزیم اوره آز در باکتریهای تحت بیمار با نالیدیگزیک اسید تغییر قابل توجهی را نشان نمی‌دهد و این آنتی‌بیوتیک بر فعالیت اوره آز و تغییر در نفوذپذیری غشا نسبت به سوبسترا و محصول این آنزیم بی‌اثر می‌باشد.

بطور کلی مطالعات گوناگونی که توسط محققان در این زمینه صورت گرفته است، شامل یک سری پاسخ‌های مختلف می‌باشند (١٣). نتایج گردآوری شده نشان می‌دهد که میزان پایین و یا دوز واحد آنتی‌بیوتیک در اجرای برنامه آنتی‌بیوتیک برای درمان موفقیت‌آمیز آلودگی‌های باکتریائی خاص می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. مهمترین جنبه کاربردی این تحقیقات، بررسی اثر غلظت‌های پایین آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتریها و کاهش دوز آنتی‌بیوتیک برای گروهی از بیماریها می‌باشد (١٣).

منابع

1. Chopra I. A., Linton 1986. The antibiotic effects of low concentration. Adv. Microb. Physiol. (28): 211-256.

2. Davis B.D. 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycoside. Microgiogial Review. (51): 341-350.

3. Di Martinop , Rebier-Huety, 2000. Effects of antibiotics on adherence of Pseudomonas aeroginosa and Pseudomonas fluorescens to A 549 premocyt cells. Chemotherapy 46(2): 129-34.

4. Jacques M. , A. Lebrum B, foiry et al. 1991. Effects of antibiotics on the growth and morphology of pasteurella multicida. Journal of general Microbiology 137: 2663-2668.

5. Kondo F, Kuuoki H. 2001. The effects of subminimal inhibitory concentrations of beta-lactam antibiotics against Clostridium perferingens. Microbes 105(412): 163-74.

6. Latrache H, Bourlioux D, Karroua M. 2000. Effects of subinhibitory concentrations of nitroxiline on the surface properties of Escherchia coli. Folia Microiol 45(6): 485-90.

7. Lo Bue Am, et al. 1999. Sub-MIC ciprofoxin effect on fibrial production by urpathogenic Esherchia coli strain J. Chemother. 11(5): 357-62.

8. Lorian V. 1980. Effect of sub-inhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. Chapter 12. In V. Lorian (ed) Antibiotics in Laboratory Medicine. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.

9. Majtan V, Majtanova L. 1997. Postantibiotic effects and Postantibiotic sub-MIC effects of ciprofloxin, pefloxacin and amikacin on the biological properties of salmonella strains. Folia Microbial 42(4): 327-32.

10. Milward T.A. and M. Wilson 1990. The effect of subinhibitory concentrations of chlorohexidine on the proteolytic activity of antimicrobial chemotherapy 25: 31-37.

11. Odenholt I 2001. Phrmacodymamic effects of subinhibitory concentrations. Int.J. Antimicrob. Agents 7(1): 1-8.

12. Tateda K, Ishii Y, Matsumoto T, et al. 2000. Potential of macrolide antibiotics to ingibit protein synthesis of Pseudomonas aeroginosa: suppression of virulence factors and stress respons. J. Infect ch mither. 6(1): 1-7.

13. Tianra J. and R.G.E Murray, 1986. Ureuse activity related to the growth and differention of swarmer cell of proteus mirabilis. Canadian Jurnal Microbiology 33: 300-303.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]