

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۱ شماره ۳ پاییز ۱۳۸۸ صفحات ۳۰-۲۷

اثر ترکیب نوسکاپین و افلوکساسین بر روی استافیلوکوک اورئوس

شبنم رضوی: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
عبدالعزیز رستگار لاری: گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران - نویسنده رابط
E-mail: lari@iums.ac.ir

کاظم موسوی زاده: گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
مسعود محمودیان: گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

دریافت: ۸۷/۱/۲۸، پذیرش: ۸۷/۴/۱۰

چکیده

زمینه و اهداف: پمپ NorA در ایجاد مقاومت استافیلوکوک اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک های فلوروکینولون از جمله افلوکساسین به واسطه‌ی خروج دارو از سلول، مشارکت می‌کند. در سالهای اخیر استفاده از آکالوئیدهای گیاهی برای افزایش فعالیت ضد میکروبی آنتی بیوتیکها مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته اند. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر ترکیب نوسکاپین و افلوکساسین بر روی سویه های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به چند دارو و جدا شده از بیماران بود.

روش بررسی: پس از تشخیص جنس و گونه ۹۵ نمونه استافیلوکوک اورئوس جدا شده از بیماران بستری و سرپایی سه بیمارستان شهر تهران و تعیین حساسیت این سویه ها به روش آنتی بیوگرام انتشار در آگار مطابق استاندارد CLSI ۴۹ سویه که بالاترین مقاومت را به مجموعه ای از آنتی بیوتیکها از جمله افلوکساسین داشتند، انتخاب شدند و با استفاده از روش رقت سریال میزان MIC (حداقل غلظت باز دارنده از رشد) افلوکساسین برای هر یک از سوشها به تنهایی و در ترکیب با نوسکاپین تعیین گردید.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده نشان داد که حداقل غلظت باز دارنده از رشد افلوکساسین برای ۴۹ سوش مورد مطالعه از ۳۲ تا ۶۴ میکروگرم در میلی لیتر بود. همچنین حداقل غلظت باز دارنده از رشد نوسکاپین روی این سویه‌ها ۰/۵ و ۱/۰ میکرومول در میلی لیتر بود. کاربرد ترکیب افلوکساسین و نوسکاپین موجب افزایش حداقل غلظت باز دارنده از رشد افلوکساسین شد.

نتیجه گیری: نوسکاپین اثر ضد باکتریایی افلوکساسین روی استافیلوکوک اورئوس را کاهش می دهد.

کلید واژه ها: استافیلوکوک اورئوس، نوسکاپین، افلوکساسین، مقاومت چند دارویی.

مقدمه

باکتری، استافیلوکوک اورئوس خصوصاً سویه های مقاوم به متی سیلین، به سرعت به این دسته از آنتی بیوتیکها نیز مقاوم شدند (۱-۳).

تحقیقات گسترده‌ای بر روی مکانیسم این مقاومت آغاز شد و محققین در نهایت به سه روش ایجاد مقاومت پی بردند. اولین راه مقاومت، ایجاد موتاسیون در آنزیم DNA ژیراز، که یک آنزیم مهم در تکثیر و ترمیم DNA است، می باشد (۴). دومین روش مقاومت

استافیلوکوک اورئوس یک پاتوژن مهم عامل عفونت‌های بیمارستانی است که می‌تواند به بسیاری از عوامل ضد باکتریایی مقاوم شود. این امر سبب انتخابهای محدود درمانی در بیماران مبتلا می گردد. کشف آنتی بیوتیکهای فلوروکینولون امکان درمان موثر بیماریهای خطرناک حاصل از استافیلوکوک اورئوس را حتی بصورت خوراکی امکان پذیر ساخت. اما متاسفانه کمی بعد از معرفی این دسته از داروها برای درمان عفونت‌های حاد ناشی از این

1×10^6 گرد (۸). برای هر سری تست، از سوش استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC 25923 بعنوان کنترل استفاده شد. سپس ۱۸ تا ۲۴ ساعت بعد میزان MIC آنتی بیوتیک افلوکسازین تعیین گردید. در مورد افلوکسازین MIC کمتر و مساوی $1 \mu\text{M}$ حساس و بیشتر از $4 \mu\text{M}$ بعنوان مقاوم در نظر گرفته شد.

برای تعیین MIC نوسکاپین (شرکت تماد) 0.2 گرم از پودر این دارو در 15 میلی لیتر محیط مولر هیتون برات حاوی اسید استیک گلاسیال حل شد و غلظتهای $16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125$ میکرومول در میلی لیتر حاصل شد. به هر کدام از لوله‌ها یک میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی معادل 1×10^6 cfu/ml از کشت ۲۴ ساعته هر کدام از باکتریها افزوده گردید و بعد از $18-24$ ساعت MIC نوسکاپین تعیین گردید (۸).

بدلیل اثر مهاری غلظتهای $0.5 \mu\text{M}$ و $1 \mu\text{M}$ نوسکاپین به تنهایی بر روی رشد باکتری، به رفتهای سریال افلوکسازین میزان 0.25 میکرومول در میلی لیتر نوسکاپین به تمام لوله‌ها افزوده شد. میزان MIC ترکیب افلوکسازین با نوسکاپین مورد بررسی قرار گرفت. تمام مراحل بر روی 10 نمونه اتروباکتریاسه‌ی مقاوم به فلوروکینولون و سوش استاندارد ATCC 27929 Ecoli نیز انجام گردید.

در این بررسی تمام آزمایشات حداقل ۲ بار تکرار شد و تکرار پذیری و صحت کار تایید گردید.

یافته‌ها

تعداد ۹۵ سوش استافیلوکوک اورئوس مقاوم به افلوکسازین از نمونه‌های جدا شده از بیماران انتخاب شد. از مجموع نمونه‌های مذکور ۲۹ نمونه از تراشه، ۲۲ نمونه از زخم، ۲۰ نمونه از چشم، ۵ نمونه از ادرار، ۵ نمونه از خون، ۴ نمونه از کاتتر و ۱۰ نمونه از سایر نمونه‌های بالینی بودند. از بیماران مورد مطالعه ۵۳ نفر زن و ۴۲ نفر مرد بودند.

ویژگی خاص تمام نمونه‌های میکروبی مقاوم آنها به آنتی بیوتیکهای افلوکسازین، اریترومایسین، سپروفلوکسازین، کوآموکسی کلاو، جنتامیسین، تتراسایکلین، سفالکسین، آموکسی سیلین و اگزاسیلین به میزان 100% بود. میزان مقاومت به ریفامپین 29% و کوتریموکسازول 29% می‌باشد. همه باکتریهای مورد نظر به وانکومایسین و سایر آنتی بیوتیکها حساس بودند.

میزان MIC بدست آمده در روش رفتهای سریال افلوکسازین در 20 مورد $16 \mu\text{M}$ و در 21 مورد $32 \mu\text{M}$ و 8 مورد $64 \mu\text{M}$ بود که نشان دهنده‌ی مقاومت آنها به افلوکسازین می‌باشد (نمودار شماره ۱).

MIC نوسکاپین در 23 نمونه از سوشهای مورد بررسی $1 \mu\text{M}$ و در 25 نمونه $1 \mu\text{M}$ و فقط در یک نمونه $2 \mu\text{M}$ بود و در هیچکدام از نمونه‌ها، غلظت‌های $0.25 \mu\text{M}$ مانع از رشد باکتریها نگردید.

به فلوروکینولونها مربوط به لوکوس cfx-ofx است که وجود این لوکوس سبب مقاومت خفیف‌تری نسبت به موتاسیون در آنزیم DNA ژیراز می‌گردد (۵). سومین روش مقاومت بدلیل خروج فلوروکینولونها از سلول با مکانیسم Efflux است و قسمتی از ژنوم که باعث این پدیده می‌شود norA نام دارد (۶). پدیده Efflux موجب خارج شدن میزان زیادی دارو از باکتری می‌گردد. در مطالعه‌ای بر روی استافیلوکوک اورئوس نشان داده شده است که ترکیبات حاوی باربرین که ماده $5'$ -متوکسی هیدوکاریپین ($5'-D$) (MHC-D) و فئوفوراید a را تولید می‌کنند، علیرغم اینکه اثر ضد میکروبی ندارند، اما بیان پمپهای Efflux عامل مقاومت چند دارویی (MDR) Multi Drug Resistance را مهار می‌کنند (۷). نوسکاپین یک آلکالوئید محلول در آب با سمیت کم است و از گیاه خشخاش تهیه می‌شود. نشان داده شده است که افلوکسازین و نوسکاپین روی اتروباکتریاسه‌های مقاوم به فلوروکینولونها، اثر سینرژیک داشته و نوسکاپین میزان MIC¹ افلوکسازین را برای این سوشها به میزان ۲ تا ۸ برابر کاهش می‌دهد (۸). هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر ترکیب نوسکاپین و افلوکسازین بر روی سوشهای استافیلوکوک اورئوس مقاوم به چند داروی جدا شده از بیماران بود.

مواد و روشها

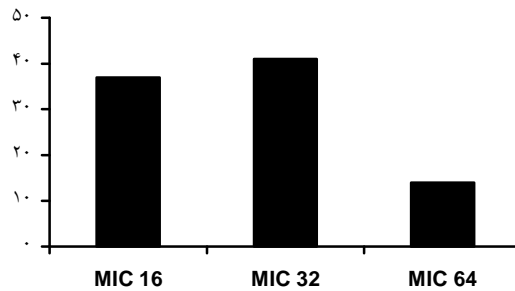
تعداد ۹۵ نمونه استافیلوکوک اورئوس از بیماران بستری و سرپایی سه بیمارستان شهر تهران به صورت تصادفی جمع آوری و در محیط مولر هیتون آگار حاوی 2% NaCl کشت داده شد. به کمک دیسک‌های آنتی بیوتیک (شرکت MAST) به طریقه‌ی انتشار در آگار مطابق استاندارد CLSI، مقاومت سوشها به آنتی بیوتیکهای اریترومایسین، ریفامپین، افلوکسازین، نوویوسین، جنتامیسین، کوتریموکسازول، کلرامفنیکل، تتراسایکلین، سفالکسین، سپروفلوکسازین، آموکسی سیلین، فسفومایسین، اگزاسیلین، فوزیدیک اسید و وانکومایسین تعیین گردید. برای هر سری تست از سوش استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC 25923 بعنوان کنترل استفاده گردید. میزان مقاومت در مورد افلوکسازین قطر هاله کوچکتر از 16 میلی‌متر و حساسیت با قطر هاله مساوی یا بزرگتر از 2 میلی‌متر در نظر گرفته شد.

از مجموع سوشهای مورد مطالعه، تعداد ۴۹ عدد استافیلوکوک اورئوس که مقاومت آنها به روش انتشار در آگار نسبت به افلوکسازین تایید شد، و نسبت به همه آنتی‌بیوتیکها نیز میزان مقاومت بالاتری را نشان می‌دادند، انتخاب و مورد مطالعه‌ی بعدی قرار گرفتند.

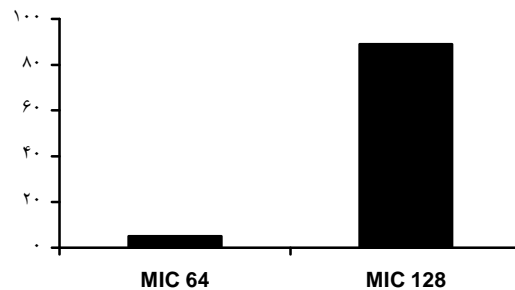
با استفاده از محیط مولر هیتون برات یک سری لوله حاوی یک میلی‌لیتر از محلول آنتی‌بیوتیکی افلوکسازین با رفتهای مختلف $256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5$ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد، سپس از کشت ۲۴ ساعته 49 سوش مقاوم، رقتی معادل 10^6 لوله نیم مک فارلند تهیه شد تا غلظت نهایی باکتریها 10^6 cfu/ml

با استفاده از غلظت $0/25 \mu\text{M}$ نوسکاپین که به رفتهای مختلف افلوکساسین اضافه گردید، MIC افلوکساسین بر روی سوشهای مورد مطالعه در حضور نوسکاپین در ۲ مورد $64 \mu\text{M}$ و در ۴۷ مورد $128 \mu\text{M}$ بود (نمودار شماره ۲). قابل ذکر است که MIC افلوکساسین برای سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس شماره ATCC 25923 به تنهایی معادل

۱ μM بوده که نشان دهنده حساسیت این سویه به افلوکساسین است و نتیجه حاصل از آنتی بیوگرام با دیسک افلوکساسین (منطقه‌ی ممانعت از رشد = ۳۸ mm) مبنی بر حساس بودن را تایید می‌نماید. اما MIC افلوکساسین در ترکیب با $0/25 \mu\text{M}$ نوسکاپین به ۴ برابر افزایش پیدا کرد.



نمودار ۱: میزان MIC افلوکساسین



نمودار ۲: میزان MIC افلوکساسین و نوسکاپین

(۱۰-۱۴) بنابراین، برای مبارزه با سوشهای مقاوم به چند دارو باید استراتژی درمان ترکیبی را در نظر گرفت. مقاومت به کینولونها منجر به مشکلاتی در درمان شده است. این مقاومت به حدی رسیده که دیگر اطمینانی به درمان با کینولونها به تنهایی در عفونتهای بیمارستانی حاصل از باکتریهای گرم مثبت نیست (۱۵).

در مطالعه‌ای که بر روی سوشهای انتروباکتریاسه‌ی مقاوم به فلوروکینولون در ایران انجام گرفت اثر سینرژیستیک نوسکاپین بر فعالیت ضد باکتریایی افلوکساسین گزارش شد (۸). در پژوهش حاضر هم برای تایید این نتایج، آزمایش بر روی ۱۰ سویه‌ی

استافیلوکوک اورئوس یکی از مهمترین عوامل بیماریزا در عفونتهای بیمارستانی است که مکرراً "سبب اپیدمی‌های بیمارستانی می‌گردد. مقاومت استافیلوکوکها به چند عامل ضد میکروبی به طور همزمان ممکن است عاملی برای بقاء آنها در محیط بیمارستان و پخش در بین بیماران گردد که این امر خصوصاً در بین استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) بیشتر مشاهده می‌شود (۹).

عفونتهای حاصل از پاتوژنهای مقاوم عامل مهمی در مرگ و میر و افزایش هزینه‌های درمان هستند و سالانه بسیاری از عفونتهای بیمارستانی بدلیل پاتوژنهای مقاوم به آنتی بیوتیک رخ می‌دهند که این موارد در ICU بسیار بیشتر از سایر بخشها هستند

بحث

بنابراین در سوشهای استافیلوکوک اورئوس مقاوم به چند داروکه در مطالعه‌ی حاضر بررسی شده اند، نوسکاپین نه تنها با افلوکساسین اثر سینرژیک ندارد بلکه می‌تواند اثر آنتاگونیستی داشته باشد. شاید بتوان این یافته را این گونه تفسیر کرد که مکانیزمهای ایجاد مقاومت بغیر از Efflux در سوشهای مورد مطالعه ما نقش دیگری هم داشته‌اند. پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی اثر ترکیب نوسکاپین و فلوروکینولونها روی سایر باکتریها ارزیابی شود و مکانیزم اثرات سینرژیک یا آنتاگونیستیک آن با جزئیات بیشتری بررسی گردد.

انتروباکتریاسه‌ی مقاوم به فلوروکینولون تکرار شد و نتایج مشابهی حاصل گردید.

نتیجه‌گیری

استفاده از ۰/۲۵ میکرومول بر میلی لیتر نوسکاپین همراه با افلوکساسین نه تنها سبب کاهش در میزان MIC افلوکساسین روی استافیلوکوک اورئوسهای مقاوم به چند دارو نشد بلکه سبب افزایش قابل ملاحظه MIC این آنتی‌بیوتیک به میزان ۳ تا ۴ برابر روی ۳۹ نمونه و به میزان ۲ برابر روی ۱۰ نمونه شد. این افزایش MIC در سوش استاندارد استافیلوکوک اورئوس نیز مشاهده شد.

References

- Harnett N, Brown S, Krishnan C. Emergence of quinolone resistance among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**: 1911-1913.
- Peterson LR, Quick JN, Jensen B, Homann S, Johanson S, Gerding. Emergence of ciprofloxacin resistance in nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Arch Intern Med* 1990; **150**: 2151-2155.
- Shalit I, Berger SA, Gorea A, Frimerman H. Widespread quinolon resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in a general hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; **33**: 593-594.
- Wang JC. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 1985; **45**: 665-697.
- Trucksis M, Wolfson JS, Hooper DC. A novel locus conferring fluoroquinolone resistance in staphylococcus aureus. *J Bacterial* 1991; **173**:5854-5860.
- Kaatz G, Seo WM. Inducible S. Nor A Mediated MDR in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob agents Chemother* 1995; **39**(12): 2650-2655.
- Musumeci R, Special A, Costanzo R, Annino A, Ragusa S, Rapisarda A, et al. Berberis aetnesis C. Presl Extracts: Antimicrobial properties and interaction with ciprofloxacin. *Inter J Antimicrob Agent* 2003; **22**: 48-53.
- Rastegar Lari A, Mohammadi H, Msjdyan F, Mahmoodian M. Nvskapyn synergistic effect with the Aflvksasyn Antrvbaktryas-h resistant to fluoroquinolones, *Journal of Research and Scientific Research and aromatic plants of Iran* 2008; **24**(1): 94-100.
- Sierra JM, Marco F, Ruiz J, Jimenez Deanta MT, Vila J. Correlation between the activity of different fluoroquinolones and the presence of mechanisms of quinolone resistance in epidemiologically related & unrelated strains of methicillin – susceptibility & -resistant *Staphylococcus aureus*. *CMI* 2002; **8** (12): 781-790.
- Jones RN. Resistance patterns among nosocomial pathogens. Trends over the past few years. *Chest* 2001; **119**: 397-404.
- Hooper DC. Flouroquinolone resistance among gram positive cocci. *Lancet Infect Dis* 2002; **6**: 530-538.
- Fridkin SK, Hill HA, Volkova NV. Temporal changes in prevalence of antimicrobial resistance in 23 US hospitals. *Emerg Infect Dis* 2002; **8**: 697-701.
- Neuhauser MM, Weinstein RA, Raymond R. Antibiotic resistance among gram negative bacilli. *JAMA* 2003; **28**: 885-888.
- Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation & DNA gyres production. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**:1109-1117.
- Jones RN, Paller MA. Bacterial resistance: A world wide problem. *Diagn Microbial Infect Dis* 1998; **31**: 379-388.