تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها بر میزان آزاد شدن آندوتوکسین از سالمونلاتیفی

دکتر غلامرضا شجری [*] ، دکتر بهمن تبرایی [**] ، دکتر قربان بهزادیان نژاد [***]

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به شیوع بالای تب‌های تیفوییدی و درمان آنتی‌بیوتیکی آنها که منجر به آزاد شدن میزان زیاد آندوتوکسین و عوارض بعدی آن می‌شود، تعیین نوع آنتی‌بیوتیکی که میزان آندوتوکسین کمتری آزاد کند الزامی است. با این هدف ، تحقیق در مجمع تولیدی - تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران در سال ۱۳۷۴ انجام گرفت.

مواد و روشها: جهت تعیین MIC و MBC آنتی‌بیوتیک‌های معمول در درمان تب تیفوییدی : آمپی سیلین ، کلرامفنیکل و کوتریموکسازول ، پژوهش حاضر با روش توصیفی از نوع اکتشافی و جهت تعیین میزان آندوتوکسین آزاد شده از هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های مذکور صورت پذیرفت.

کشت‌های میکروبی و نگهداری آنها، تهیه محلول‌های آنتی‌بیوتیکی و اندازه‌گیری میزان MIC و MBC آنها بر باکتری‌ها و نیز میزان آندوتوکسین آزاد شده توسط هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها به روش استاندارد و در سه تکرار بر حسب pg/ml تعیین و با آنالیزواریانس مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان MIC و MBC آمپی‌سیلین بر علیه باکتری در مقایسه با دو آنتی‌بیوتیک دیگر کمتر است (MIC=MBC= ۱/۲۵ μg/ml) و میزان آندوتوکسین آزاد شده از آمپی‌سیلین ۸±۱۱۳ ، کلرامفنیکل ۲/۵±۸۷ و کوتریموکسازول ۱۱/۶±۱۳۴ پیکوگرم در میلی‌لیتر به دست آمد (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: کلرامفنیکل میزان آندوتوکسین کمتری نسبت به دو آنتی‌بیوتیک دیگر تولید می‌کند. انجام تحقیق مشابه را در شرایط in vivo توصیه می‌نماید.

واژگان کلیدی: سالمونلا تیفی، آندوتوکسین ، کلرامفنیکل ، آمپی‌سیلین، کوتریموکسازول ، MIC ، MBC

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی کاشان ، گروه میکروب شناسی و ایمونولوژی

** انستیتو پاستور ایران

*** دانشگاه تربیت مدرس ، گروه میکروبیولوژی

مقدمه

انهدام سریع باکتری‌های گرم منفی که در معرض دُزهای موثر آنتی‌بیوتیک‌ها قرار گرفته‌اند منجر به آزاد شدن میزان قابل ملاحظه آندوتوکسین [Lipo Polysaccharide (LPS)] در بدن می شود (۱،۲).

عفونت‌های حادباکتریایی‌گرم‌منفی با میزان مرگ و میر بالایی‌نیز همراه می‌باشد (۳،۴،۵،۶). همین مساله باعث گردیده که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها حداقل در پیش‌گیری و یا درمان عفونت‌های باکتریایی‌گرم منفی‌با تردید جدی روبرو شود (۶،۷).

درمان آنتی‌بیوتیکی عفونت‌های باکتریایی گرم منفی در مدل‌های تجربی، سبب افزایش میزان قابل ملاحظه آندوتوکسین در خون و یا مایع مغزی نخاعی می‌گردد (۹، ۸).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که کشته شدن سریع باکتریهای گرم منفی با آنتی‌بیوتیک‌های باکتریوساید (Bacteriocide) فعال بر علیه دیواره باکتری، سبب آزادی میزان بالای آندوتوکسین به داخل مایعات بدن می‌شود (۹).

بنابراین دقت، در انتخاب نوع آنتی‌بیوتیک درمانی مناسب می‌تواند نقش بسزایی در جلوگیری از عوارض مذکور داشته باشد (۱۰، ۹).

از آن‌جایی که تب‌های تیفوییدی در ایران یکی از معضلات بهداشتی و درمانی است، تعیین نوع آنتی‌بیوتیکی که در عین موثر بودن ، میزان آندوتوکسین کمتری آزاد کند الزامی به نظر می‌رسد. به‌همین‌جهت پس‌ازارزیابی‌های علمی با متخصصان بخش عفونی بیمارستان امام خمینی تهران، متداول‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های معمول در درمان تب تیفوییدی در ایران، آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و کوتریموکسازول تعیین شدند که ابتدا میزان MIC و MBC آنها تعیین و سپس میزان آندوتوکسین آزاد گردیده توسط هریک از آنتی‌بیوتیک‌های فوق در مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران طی سال ۱۳۷۴ اندازه‌گیری شد.

موادو روشها

جهت تعیین MIC و MBC آنتی‌بیوتیک‌های موثر بر علیه سالمونلاتیفی، تحقیق به روش اکتشافی از نوع توصیفی و برای تعیین میزان آندوتوکسین آزاد گردیده ، این تحقیق با روش توصیفی (Descriptive) از نوع اکتشافی صورت پذیرفت.

کشت‌های میکروبی - در تحقیق ، سویه استاندارد سالمونلاتیفی TY2-5536 (CSBPI=B-190) که حساسیت آن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان تب تیفوییدی کاملاً شناخته شده است ، به کار رفت. همزمان یک سویه استاندارد اشریشیاکلی E.CK12-QD5003 (CSBPI=D-190) به عنوان شاهد و یک سویه سالمونلاتیفی پاتوژن که از بیمار بستری در بخش عفونی بیمارستان امام خمینی ایزوله گردیده بود به عنوان شاهد مورد آزمایش قرار گرفتند.

نگهداری کشت‌ها- کشت‌های میکروبی طبق روش Le Minor (۱۱) به صورت استوک‌های کاری در لوله‌های در پیچ دار کوچک محتوی محیط نیمه جامد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

تهیه محلول‌های استوک آنتی‌بیوتیک‌ها- پس از تهیه پودرهای آنتی‌بیوتیکی ؛ کلرامفنیکل (الحاوی،ایران) آمپی‌سیلین (جابربن حیان، ایران) و کوتریموکسازول (تهران دارو، ایران) به‌کمک حلال‌های خاص هر آنتی‌بیوتیک محلول‌های استریل از آنها را به غلظت ۱۰ برابر MICهای پیشنهادی تهیه و به صورت استوک در ویال‌های ۵ میلی‌لیتری در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردیدند.

روشها

اندازه گیری MIC و MBC آنتی‌بیوتیک‌ها- MIC

(حداقل دوز متوقف کننده رشد باکتری‌ها = Minimal Inhibitory Concentration) و MBC (حداقل دوز کشنده باکتری‌ها= Minimal Bactericidal Concentration) آنتی‌بیوتیک‌ها به روش تهیه رقت‌های متوالی در آبگوشت مناسب غذایی، براساس دستورالعمل Nccls تعیین شدند(۱۲).

کشتن باکتریها - از ارگانیسم‌های فاز لگاریتمی رشد (10^6 Cfu/ml) به لوله‌های استریل و عاری از آندوتوکسین حاوی PRMI 1640 همراه با آنتی‌بیوتیک اضافه نموده به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد قرار گرفتند.

میزان آنتی‌بیوتیک اضافه شده در مورد آمپی‌سیلین ۱/۲۵ μg/ml، کلرامفنیکل ۱۶۰ μg/ml و کوتریموکسازول ۵ μg/ml بود. برای تمام آنتی‌بیوتیک‌های مذکور، این شرایط سبب کشته شدن تمامی باکتریهای موجود در نمونه‌ها گردیدندکه با روش‌های کشت کمّی مشخص شدند.

لوله‌های شاهد مثبت، حاوی RPMI همراه با باکتری بدون آنتی‌بیوتیک و لوله‌های کنترل منفی حاوی RPMI و آنتی‌بیوتیک بدون باکتری بودند. پس ازاتمام مرحله انکوباسیون، سوسپانسیون‌های باکتریایی با فیلترهای ۰/۲۲μm صاف شدند و فیلترها جهت مطالعات بعدی در ویال‌های شیشه‌ای استریل و عاری از آندوتوکسین ۲/۵ میلی‌لیتری در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

اندازه گیری آندوتوکسین آزاد در فیلترها- جهت اطمینان از وجود آندوتوکسین آزاد در فیلترها، آنها را علیه آب دوبار تقطیر شده و عاری از آندوتوکسین که حاوی مرتیولات به نسبت ۱۰۰۰۰ :۱ بود دیالیز نموده سپس در دسیکاتور حاوی پنتااکسید فسفر (P2O5) به میزان ۲۰ برابر تغلیظ گردید و پس از آن طبق روش USP ۱۹۹۰، قدرت تب‌زایی آنها در خرگوش تعیین شد (۱۳).

میزان آندوتوکسین آزاد موجود در فیلترها به روش LAL کروموژنیک (Chromogenic Limulus (Amebocyte Lyssate assay=LAL (کروموژنیکس، سوئد) (۱۴) به روش میکروپلیت و هر نمونه به صورت سه تایی اندازه‌گیری گردیدند.

شاهد منفی حاوی آب مقطر استریل و عاری از آندوتوکسین و شاهد مثبت حاوی آندوتوکسین اشریشیاکلی استاندارد تا غلظت‌های ۱۰۰pg/ml بود. مقادیرآندوتوکسین آزاد شده در مجاورت آنتی‌بیوتیک‌های فوق در سه نوبت تکرار گردید و مقادیر به دست آمده به روش آنالیز واریانس مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

میزان MIC و MBC حاصل از اثر آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و کوتریموکسازول بر علیه سالمونلاتیفی استاندارد، سالمونلاتیفی پاتوژن و اشریشیاکلی استاندارد در جدول (۱) ارایه شده است و نشان می‌دهد که آمپی‌سیلین در مقایسه با دو آنتی‌بیوتیک دیگر دارای کمترین میزان MIC و MBC بر علیه باکتری‌های مذکور است به گونه‌ای که این میزان در مورد سالمونلاتیفی استاندارد MIC=MBC=۱/۲۵μg/ml و در مورد سالمونلاتیفی پاتوژن و اشریشیاکلی استاندارد MIC=MBC=۲/۵μg/ml به دست آمد.

میزان MIC و MBC کلرامفنیکل بر علیه سالمونلاتایفی استاندارد به ترتیب برابر با ۲/۵ μg/ml و ۱۶۰ μg/ml و در مورد دو باکتری دیگر به ترتیب برابر با ۵ μg/ml و ۱۶۰ μg/ml به دست آمد.

میزانMIC و MBCکوتریموکسازول‌برعلیه سالمونلاتیفی استاندارد به ترتیب برابر با ۱/۲۵ mg/ml و ۵ mg/ml به دست آمد.

جدول ۱ـ میزان MIC و MBC آنتی‌بیوتیک بر روی باکتریها در انستیتوپاستور ایران (تهران) طی سال ۱۳۷۴

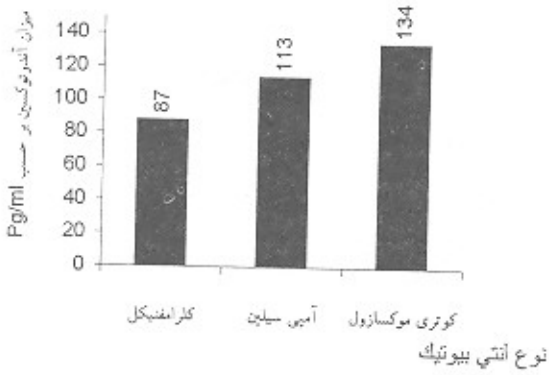
نوع باکتری / آنتی‌بیوتیک	سالمونلاتیفی استاندارد		سالمونلاتیفی پاتوژن		اشریشیاکلی استاندارد	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
آمپی‌سیلین	۱/۲۵ μg/ml	۱/۲۵ μg/ml	۲/۵ μg/ml	۲/۵ μg/ml	۲/۵ μg/ml	۲/۵ μg/ml
کلرامفنیکل	۲/۵ μg/ml	۱۶۰ μg/ml	۵ μg/ml	۱۶۰ μg/ml	۲/۵ μg/ml	۱۶۰ μg/ml
کوتریموکسازول	۱/۲۵ mg/ml	۵mg/ml	۲/۵ mg/ml	۱۰ mg/ml	mg/ml ۰/۱۲۵	۱ mg/ml

آزمایش تب زایی در خرگوش، سبب افزایش درجه حرارت طبیعی بدن حیوان به میزان ۱/۲ درجه سانتی‌گراد شد که مؤید وجود آندوتوکسین آزاد در نمونه‌ها بود.

میزان آندوتوکسین آزاد موجود در فیلترها در جدول (۲) و نمودار (۱) ارایه گردیده است که نشان می‌دهد میزان آندوتوکسین حاصل از آمپی‌سیلین علیه باکتری به میزان ۲۶/۵ واحد و یا حدود ۳۰/۷ درصد بیشتر از کلرامفنیکل ومیزان‌آندوتوکسین حاصل از کوتریموکسازول ۲۰/۸ واحد و یا حدود ۱۸/۴ درصد بیشتر از آمپی‌سیلین بود و آنالیزواریانس بیانگر آن می‌باشد که این‌اختلافات‌به لحاظ‌آماری‌معنی‌دار است($P<0/05$).

جدول ۲ـ میزان آندوتوکسین آزاد شده از سالمونلاتیفی استاندارد در مجاورت آنتی‌بیوتیک‌هادر انستیتوپاستورایران (تهران)طی سال ۱۳۷۴

آنتی‌بیوتیک	میزان آندوتوکسین (بر حسب pg/ml)
فیلتر باکتری بدون آنتی‌بیوتیک (شاهد)	۱۸/۲۶±۱/۱۳
فیلتر باکتری همراه با آنتی‌بیوتیک:	
ـ کلرامفنیکل	۸۶/۶۸±۲/۵۳
ـ آمپی‌سیلین	۱۱۳/۳۳±۸/۰۷
ـ کوتریموکسازول	۱۳۴/۱۸±۱۱/۵۹



نمودار ۱ـ توزیع میزان آندوتوکسین آزاد شده از سالمونلاتایفی استاندارد بر حسب نوع آنتی‌بیوتیک در انستیتو پاستور ایران (تهران) طی سال ۱۳۷۴

بحث

تحقیق نشان داد که میزان MIC و MBC آمپی‌سیلین بر علیه باکتری‌ها مورد بررسی یکسان است. در مورد اکثر آنتی‌بیوتیک‌های باکتریوساید میزان MIC آنها برابر تا نزدیک به میزان MBC آنها می‌باشد (۱۵). میزان MIC و MBC کلرامفنیکل بر علیه سالمونلاتیفی استاندارد به ترتیب برابر با ۲/۵ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد که گرچه میزان MIC کلرامفنیکل تفاوت چندانی با میزان MIC آمپی‌سیلین ندارد، میزان MBC آن تفاوت قابل ملاحظه‌ای با میزان MBC آمپی‌سیلین دارد. بدیهی

است که در مورد آنتی‌بیوتیک‌های باکتریواستاتیک مانند کلرامفنیکل که سبب توقف رشد باکتری‌ها می‌شوند، جهت انهدام کامل باکتری، تراکم‌های بالاتری از آنتی‌بیوتیک مورد نیاز می‌باشد.

نتایج حاصل در مورد میزان MIC و MBC کلرامفنیکل و آمپی‌سیلین علیه سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه، قابل مقایسه با نتایج به دست آمده توسط سایر محققان است (۱۶).

بالابودن میزان MIC و MBC کوتریموکسازول علیه سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه، مساله بروز مقاومت بالای باکتری‌ها در برابر این آنتی‌بیوتیک را مطرح می‌سازد که البته بروز مقاومت در برابر این آنتی‌بیوتیک از نقاط دیگر جهان نیز گزارش شده است (۱۷،۱۸).

میزان آندوتوکسین آزاد شده توسط کلرامفنیکل کمتر از میزان آندوتوکسین آزاد گردیده از آمپی‌سیلین و میزان آندوتوکسین آزاد شده از آمپی‌سیلین کمتر از میزان آندوتوکسین آزاد گردیده توسط کوتریموکسازول می‌باشد. تفاوت در میزان آندوتوکسین آزاد شده توسط آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌تواند مربوط به تفاوت در خواص فارماکودینامیک این داروها باشد (۱۰،۱۹). آنتی‌بیوتیک‌های باکتریوساید مانند آمپی‌سیلین و سایر آنتی‌بیوتیک‌های بتا- لاکتام با نفوذ در دیواره سلولی باکتری و اتصال به پروتئین‌های غشایی، مراحل نهایی سنتز دیواره سلولی (پپتیدوگلیکان) باکتری را متوقف کرده، در نهایت سبب لیزباکتری در اثر آنزیم‌های اتولیتیک باکتری و در نتیجه آزاد شدن محصولات باکتریایی از قبیل آندوتوکسین (LPS) و دیگر اجزا باکتری به داخل محیط می‌گردند (۲،۴). از آنجایی که محل اثر آنتی‌بیوتیک‌های باکتریواستاتیک مانند کلرامفنیکل، به طور اختصاصی دیواره سلولی باکتری نیست، سبب آزاد کردن میزان آندوتوکسین کمتری می‌شوند (۱۰،۱۶).

محققان دیگر نشان دادند که آنتی‌بیوتیک‌های باکتریوساید باعث آزاد گردیدن میزان بیشتر آندوتوکسین نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های باکتریواستاتیک می شوند (۱۶،۱۹) و نتایج حاصل در این تحقیق در مورد آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل با یافته‌های این تحقیقات مشابهت دارد.

آزاد گردیدن میزان بالاتر آندوتوکسین از سالمونلاتیفی در اثر لیز شدن با کوتریموکسازول به این علت است که کوتریموکسازول یک آنتی‌بیوتیک آنتی‌متابولیت می‌باشد و با پارا- آمینوبنزوییک اسید (PABA) که یک متابولیت ضروری برای سنتز اسید فولیک در باکتری‌ها است ، رقابت می‌کند ولی تا زمانی که ذخیره PABA در سلول باکتری به اتمام نرسیده، باکتری به طور ناقص به رشد خود ادامه می‌دهد که این رشد غیرطبیعی باکتری می‌تواند منجر به آزادی آندوتوکسین بیشتری گردد (۲۰).

در یک جمع بندی کلی، قابل ذکر است که کلرامفنیکل آندوتوکسین کمتری نسبت به دو آنتی‌بیوتیک دیگر آزاد می‌کند. انجام تحقیق مشابه به روش in vivo را توصیه می‌نماید تا در صورت حصول نتایج مشابه ، بتوان در درمان تب تیفوییدی و پیش‌گیری از آلودگی‌های ناشی از جراحی‌های داخلی از کلرامفنیکل استفاده نموده تا بدن با میزان کمتر آندوتوکسین روبرو شود و در نتیجه عوارض پاتولوژیک کمتری در بیمار به وجود آید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران و کارکنان محترم مجتمع تولیدی - تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، استادان و کارکنان محترم بخش ایمنوژنتیک دانشکده پزشکی تهران، مدیر محترم اجرایی مجله علمی - پژوهشی فیض کاشان و جناب آقای مهندس ناصر ولایی که در تنظیم مقاله ما را راهنمایی فرمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

1. Maury E. Barakett V. Blanchard H. Guitton C. Circulating endotoxin during initial antibiotic treatment of sever gram negative bacteremic infections. J Infect Dis. 1998; 178: 270-273.
2. Morrison DC. Antibiotic mediated release of endotoxin and pathogenesis of gram negative sepsis . Prog Clin Biol Res. 1998; 397: 199-207.
3. Kromery V. Etiology and pathogenesis of septic shock. Vnitr Lek. 1996; 42: 467-469.
4. Preiti P. Mazzei T. Antibiotic induced release of bacterial cell wall component in the pathogenesis of sepsis and septic shock. J Chemother. 1998; 10: 427-448.
5. Shenep JL. Septic shock. Adv Pediatr Infect Dis. 1996; 12: 209-241.
6. Morrison DC. Bucklin SE. Evidence for antibiotic mediated endotoxin release as a contributing factor to lethality in exprimental gram negative sepsis. Scand J Infect Dis (Suppl). 1996; 101: 3-8.
7. Kuenneke M. Stinner B. Celik I. Cardiovascular adverse effects of antimicrobial in complex surgical cases. Eur Surg (Suppl). 1996; 579: 24-28.
8. Hubsch AP. Casas AT. Dornae JE. Protective effects of reconstituted high-desity lipoprotein in rabbit gram negative bacteremia models. J Lab Clin Med. 1995; 126: 548-558.
9. Roseman C. Westerveld GJ. Van-Overen W. Effect of intraperitoneal antimicrobial on the concentration of bacteria endotoxin TNF in abdominal fluids and plasma in Rats. Eur Surg Res. 1996; 28: 351-360.
10. Nitsche D. Schulze C. Oesser S. Impact of the different class antimicrobial agents on plasma endotoxin activity. Arch Surg. 1996; 131: 192-199.
11. Le Minor. Popoff MY. Microbial Culture Methods. Int J Sys Bacteriol. 1995; 37: 465.
12. NCCLS expertees. National committee for clinical laboratory standards methods for dilution antimicrobial suseptibility tests for bacteria that grow aerobically. Publication M7-A. Villanova- PA. Ed 2: 173-178.
13. U.S. Pharmacopoeia. Biological tests/Pyrogen test. 1990; <151>: 1515;1527.
14. Eperon S. De-Groote D. Werner - felmayer G. Jungi TW. Human monocytoid cell lines as indicators of endotoxin with chromogenic Limulus Amoebocyte Lysate assay (LAL). J Immunol Methods. 1997; 207: 135-145.

15. Baron E. Finegold SM. Diagnostic microbiology. 8th ed. Philadelphia: Chapman Hall; 1990: 171-193.

16. Ibe SN. Wariso BA. Drug - suseptibitity profile of salmonella typhi blood isolates in port Harcourt Nigeria. W Afr J Med . 1996; 15: 219-222.

17. Hasan Z. Rahman KM. Alam MN. Role of plasmid in mediation of multiple drug resistance in salmonella typhi and paratyphi A in Bangladesh. Bangladesh Med Res Couns Bull. 1995; 21: 50-54.

18. Panigrahi D. Al-Aneziz AH. West PW. Plasmid mediated multidrug resistance in salmonella typhi in Kuwait. Trop Med Int Health. 1996; 1: 439-442.

19. Chang HR. Valdo TR. Pechere JC. Effects of ampicillin, chloramphenicol, ceftriaxone and trimethoprim- sulphametoxazole on salmonella typhi with in human monocyte- derived macrophages. J Antimicrob Chemother. 1990; 26: 689-694.

20. Shenep JL. Morgan KA. Kinetics of endotoxin release during antibiotic therapy for exprimental gram- negative bacterial sepsis. J Infect Dis. 1984; 150: 380-388.