سلسله درسهای باکتری‌شناسی

حساسیت و مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها

دکتر رضا میرنژاد، باکتریولوژیست- استادیار دانشگاه

سمیت انتخابی

یکی از عوامل اصلی که اجازه اثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر ضد باکتری‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد، این است که باکتری‌ها پروکاریوت می‌باشند و بنابراین بطور متمایزی با سلول‌های انسانی متفاوتند. این تفاوت‌ها شامل ساختمان و عمل سلولی می‌باشد که آنتی‌بیوتیک‌ها برعلیه آنها عمل می‌کنند و همین امر است که به آنتی‌بیوتیک‌ها خاصیت سمیت انتخابی را می‌دهد. همانطور که در دستورالعمل جدول 1 و به طور کلی ارائه شده، چهار دسته اصلی آنتی‌بیوتیک وجود دارد که اهداف عمل متفاوتی دارند:

(1) آنتی‌بیوتیک‌هایی که بر پوشش سلولی تأثیر می‌گذارند.

(2) آنتی‌بیوتیک‌هایی که مانع سنتز پروتئین می‌شوند.

(3) آنتی‌بیوتیک‌هایی که بر روی ساختمان و سنتز اسید نوکلئیک تأثیر می‌گذارند.

(4) آنتی‌بیوتیک‌های آنتی‌متابولیک.

عموماً آنتی‌بیوتیک‌های دسته اول و سوم سیدال هستند، دسته دوم ممکن است سیدال یا استاتیک باشند و دسته چهارم استاتیک هستند.

تعداد آنتی‌بیوتیک‌های ضد باکتریائی، خیلی بیشتر از آنتی‌بیوتیک‌های ضد قارچی، انگلی و ویروسی می‌باشد، چرا که قارچ‌ها و انگل‌ها شباهت زیادی با سلول‌های انسانی دارند و ویروس‌ها نیز از مکانیسم‌های تکثیری سلول‌های انسانی استفاده می‌کنند. متأسفانه بدلیل شباهت‌های زیاد با سلول‌های یوکاریوتی، آنتی‌بیوتیک‌هایی که ضد قارچ‌ها و انگل‌ها و ویروس‌ها عمل می‌کنند، برای انسان بسیار سمی می‌باشند. حتی

آنتی‌بیوتیک‌های ضد باکتری نیز برای انسان سمی هستند. در تعدادی از داروها نظیر آمینوگلیکوزیدها، مرز درمانی (Therapeutic Margin) (مرز بین دوز مؤثر و دوز سمی) کوچک است، بنابراین سطح خونی این آنتی‌بیوتیک‌ها باید با دقت اندازه‌گیری و مراقبت شود.

جدول 1: تقسیم‌بندی آنتی‌بیوتیک‌ها بر اساس مکان اثر آنها

آنتی‌بیوتیک‌هایی که روی پوشش سلولی اثر می‌گذارند

عوامل مهار دیواره سلولی:

آنتی‌بیوتیک‌های بتالا کتام:

پنی‌سیلین‌های طبیعی

1- پنی‌سیلین G

2- پنی‌سیلین V

پنی‌سیلین‌های نیمه سنتتیک و آنالوگ‌ها

1- پنی‌سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز (کلوکساسیلین، دی کلوکساسیلین، فلوکساسیلین، متی‌سیلین، نفیسیلین و اگزاسیلین)

2- پنی‌سیلین‌های با طیف گسترده (آمیدینوسیلین، آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین و بک‌آمپی‌سیلین)

3- پنی‌سیلین‌های ضد سودوموناسی (آزلوسیلین، کاربنی‌سیلین، پیپراسیلین، مزلوسیلین و تیکارسیلین)

4- آنالوگ‌ها (کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام)

- سایر آنتی‌بیوتیک‌های شبه پنی‌سیلین

1- کارباپنم‌ها (ایمی‌پنم و مروپنم)

2- مونوباکتام‌ها (آزترونام)

- سفالوسپورین‌ها، سفامایسین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های وابسته

1- سفالوسپورین‌های نسل اول (سفادوراکسیل، سفپروزیل، سفازولین، سفالکسین، سفالوتین، سفاپیرین و سفرادین)

2- سفالوسپورین‌های نسل دوم (سفاکلور، سفامندول، سفونیسید، سفورانید و سفوروکسیم)

3- سفالوسپورین‌های نسل سوم (سفکسیم، سفوپرازون، سفوتاکسیم، سفودوکسیم، سفتازیدیم، سفتی‌زوکسیم و سفتریاکسون)

4- سفالوسپورین‌های نسل چهارم (سفی‌پیم و سفپیرون)

5- سفامایسین‌ها (سفامتازول، سفوتتان و سفوکسیتین)

6- آنتی‌بیوتیک‌های وابسته (لورکارابف و موگسالاکتام)

آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپتیپدی (تیکوپلانین و وانکومایسین)

باسیتراسین

سیکلوسرین

عوامل برهم زننده یکپارچگی غشاء سلولی

پلی‌میکسین B

پلی‌میکسین E

آنتی‌بیوتیک‌های ممانعت کننده از سنتز پروتئین

عوامل مؤثر بر زیرواحد 50 s ریبوزوم

کلرامفنیکل

ماکرولیدها (آزیترومایسین، کلاریترومایسین، دیریتومایسین، اریترومایسین و ترولیندومایسین)

لینکوزامیدها (کلیندامایسین و لینکومایسین)

عوامل مؤثر بر زیرواحد 30s ریبوزوم

آمینوگلیکوزیدها (آمیکاسین، جنتامایسین، کانامایسین، نتیل‌مایسن، اسپکتینومایسین، استرپتومایسین و توبرامایسین)

تتراسایکلین‌ها (کلرتتراسایکلین، دمکلوسایکلین، داکسی‌سایکلین، مینوسایکلین، اکسی تتراسایکلین، تتراسایکلین)

سایر عوامل مهار سنتز پروتئین

موپیروسین و داروهای دیگر

آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر ساختمان و سنتز اسیدهای نوکلئیک

ریفامیسین‌ها (ریفابوتین و ریفامپین)

نالیدیکسیک اسید

فلوروکینولون‌ها (سیپروفلوکساسین، انوکساسین، لومفلوکساسین، نورفلوکساسین و افلوکساسین)

نووبیوسین

مترونیدازول

کلوفازیمین

آنتی‌بیوتیک‌های آنتی‌متابولیک

سولفانامیدها (سولفاسیتین، سولفادیازین، سولفامرازین، سولفامتازین، سولفامتی زول، سولفامتاکسازول سولفاسالازین و سولفیسوکسازول)

تری متوپریم

آمینوسالیسیلات سدیم

داپسون

ایزونیازید

اتیونامید

اتامبوتول

سایر عوامل ضد باکتریایی

متینامین

نیتروفورانتوئین

پیرازین آمید

حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها

بعضی باکتری‌ها در پاسخ به عوامل ضد میکروبی، به یک شکل عمل نمی‌کنند، لذا بایستی حساسیت باکتری‌های جدا شده زیر از خون، ادرار، خلط یا مایع مغزی نخاعی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مناسب، مورد آزمایش قرار گیرند: باکتری‌های گرم منفی (شامل انتروباکتر، اشریشیا کلی، کلبیسلا، پروتئوس، سالمونلا، سراشیا، شیگلا و یرسینیا)، انتروکوکوس فکالیس، هموفیلوس انفلوانزا، سودوموناس ائروژینوزا و استافیلوکوک اورئوس.

بعلاوه باکتری‌های کواگولاز منفی و پنوموکوک‌های جدا شده از خون اغلب تست تعیین حساسیت می‌شوند و در مورد سایر باکتری‌ها، وقتی پزشک چنین تست‌هایی را درخواست کند، تعیین حساسیت می‌گردند.

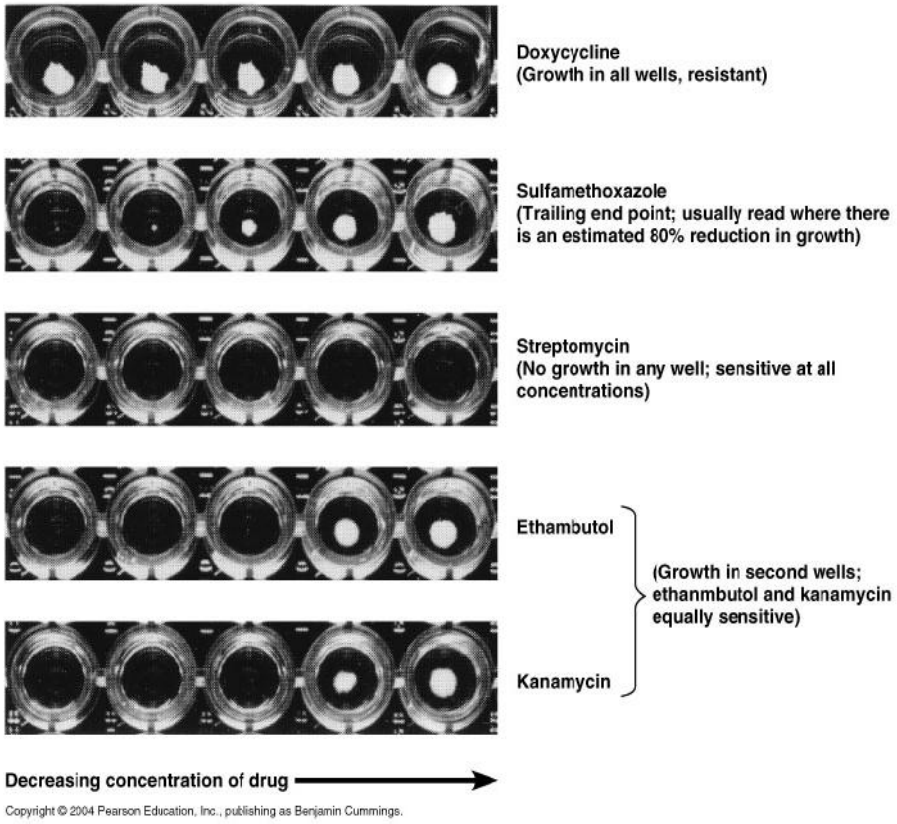
انواع تست‌های تعیین حساسیت

روش تعیین رقت یا میکرودیلوشن (Microdilution):

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها، روش تعیین رقت، معمولی‌ترین روشی است که استفاده می‌شود. چاهک‌های میکروپلیت، حاوی سری رقت‌های دوتائی از آنتی‌بیوتیک‌ها و غلظت استانداردی از باکتری می‌باشد (شکل 1). یک شب این میکروپلیت انکوبه شده و سپس چاهک‌ها از نظر رشد باکتری بررسی می‌گردند. کمترین غلظت از آنتی‌بیوتیکی که مانع رشد باکتری می‌گردد، بعنوان حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration(MIC)) آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته می‌شود (شکل 2).

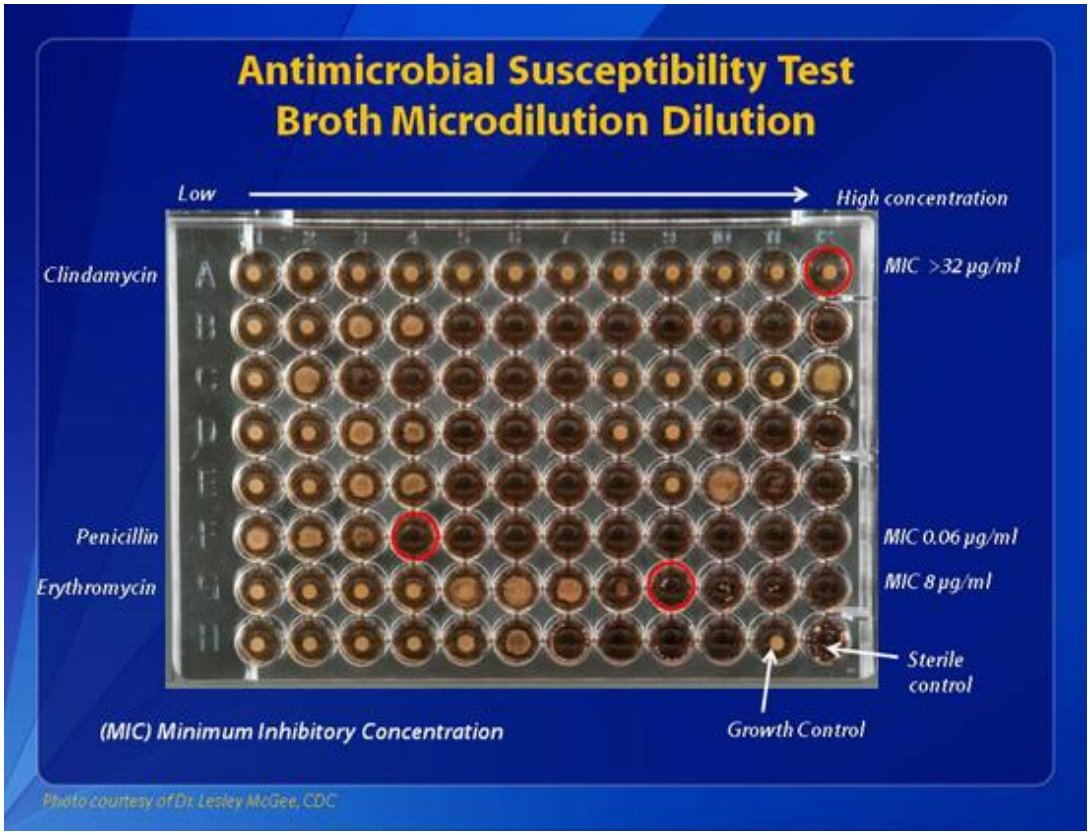
بطور معمول در بیشتر بیمارستان‌ها، حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration (MBC) آنتی‌بیوتیک‌ها تعیین نمی‌شود، اما در مورد برخی نمونه‌های خاص، وقتی پزشک درخواست می‌کند، این غلظت تعیین می‌گردد. MBC با کشت دادن مایع رویی چاهک‌هایی که رشد باکتری را نشان ندادند، تعیین می‌شود و MBC به صورت کمترین غلظتی از آنتی‌بیوتیک که 99/9 درصد از باکتری‌هایی که به چاهک تلقیح شده‌اند را کشته است، تعریف می‌گردد.

در بیشتر موارد، MBC و MIC آنتی‌بیوتیک‌های سیدال برابرند، در این حالت چاهک‌ها فاقد رشد باکتری هستند، زیرا همه باکتری‌ها کشته شده‌اند، البته برخی از باکتری‌ها در آنزیم‌های اتولیتیک خود نقص دارند و غلظتی از آنتی‌بیوتیک که برای کشتن آنها لازم است 32 برابر غلظتی است که سبب توقف رشد آنها می‌گردد. این باکتری‌ها را بعنوان باکتری‌های تولرانس به آنتی‌بیوتیک می‌شناسند.



شکل 1: روش تعیین رقت یا میکرودیلوشن

نوعی از روش تعیین رقت را می‌توان در آزمایش نمونه‌های سرمی، برای تعیین سطح باکتروسیدال آنتی‌بیوتیک مصرفی، برای درمان خاص مورد استفاده قرار داد.

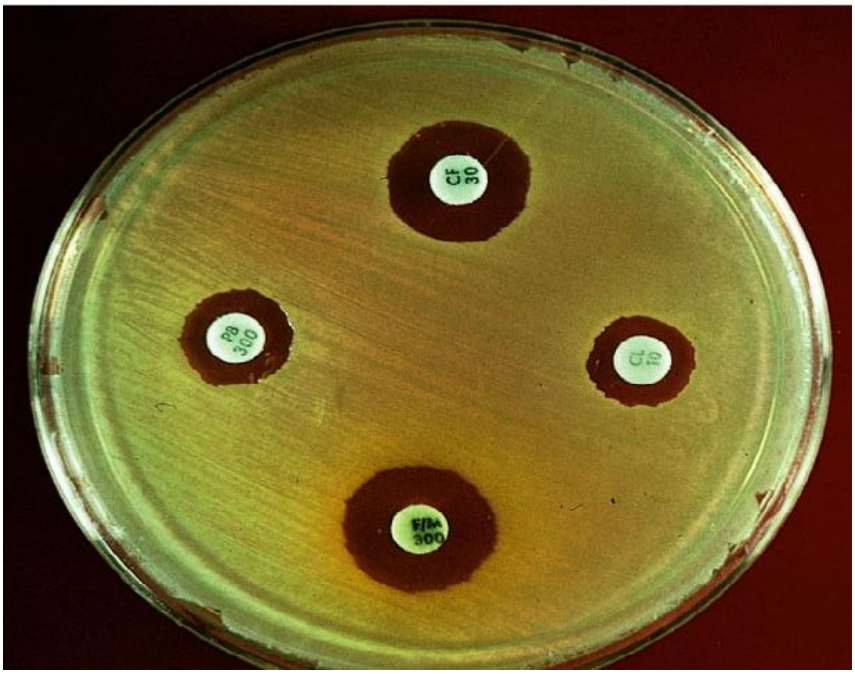


شکل 2: روش تعیین رقت که با آن می‌توان MIC آنتی‌بیوتیک‌ها را تعیین کرد

روش انتشار دیسک (تست کربی- بایر):

اگر باکتری در محیط‌های روش میکرودیلوشن رشد ضعیفی داشته باشد، تست حساسیت آنها به آنتی‌بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن که به تست کربی- بایر نیز معروف است، انجام می‌شود. در این مورد، سوسپانسیون استانداردی از باکتری بر روی یک پلیت استاندارد بزرگ که حاوی محیط کشت مولرهینتون آگار است را پخش می‌کنند. سپس دیسک‌هایی از جنس کاغذ صافی که حاوی مقادیر استانداردی از آنتی‌بیوتیک است، بر روی سطح پلیت‌ها قرار داده و پلیت‌ها در شرایط مناسب انکوبه می‌گردند. باکتری بصورت یک لایه در روی سطح آگار رشد می‌کند، ولی در محل‌هایی که رشد باکتری مهار شده است، هاله‌های دایره‌ای در اطراف آن دیسک آنتی‌بیوتیک ظاهر می‌شود (شکل 3). میکروبیولوژیست‌ها قطر این هاله را اندازه‌گیری کرده و این هاله را با

استانداردهای موجود مقایسه می‌کنند. باکتری‌ها نسبت به هر آنتی‌بیوتیک بصورت حساس، اینترمدییت یا مقاوم طبقه‌بندی می‌شوند.



شکل 3: روش انتشار دیسک (تست کربی- بایر)

تست‌های کالریمتریک (رنگ سنجی):

برای تست برخی از گونه‌های باکتری مثل نایسریا گونوره‌آ، طیف کاملی از حساسیت به آنتی‌بیوتیک لازم نیست، بلکه این مهم است که بدانیم آیا باکتری‌های جدا شده فعالیت بتالاکتاماز را دارند یا خیر. تست‌های ساده کالریمتری برای تشخیص سریع سویه‌های مولد بتالاکتاماز یک گونه باکتریایی موجود می‌باشد.

تفسیر نتایج

تست‌های حساسیت یکی از مفیدترین آزمایش‌ها برای پزشکان است، اما چندین دلیل وجود دارد که باید تست‌ها با احتیاط تفسیر شوند. اولاً، تست‌ها به تغییرات روش‌ها حساسند؛ مثلاً نتایج آزمایشگاه‌های مختلف به

علت شرایط متفاوت از جمله دما، pH یا میزان تلقیح تا حدودی متفاوت می‌باشد. ثانیاً، تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی تحت شرایط استانداردی طراحی شده که ممکن است کاملاً با شرایط داخل بدن فرق داشته باشد، برای مثال از آنجائی که تأثیر آمینوگلیکلوزیدها نسبت به pH موجود، متفاوت است، عجیب نیست که وقتی باکتری در pH 7/4 آزمایشگاه به آمینوگلیگوزید حساس می‌باشد، در محیط اسیدی بدن به آنتی‌بیوتیک حساس نباشد. ثالثاً، مقادیر استانداردی که جهت تعیین حساسیت و مقاومت به آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود، به میزان آنتی‌بیوتیکی بستگی دارد که بتواند در خون حاصل شود. بنابراین، تست‌های تعیین حساسیت اغلب تأثیر آنتی‌بیوتیک برعلیه پاتوژن‌های موجود در مجاری ادراری را، کم تخمین می‌زنند، زیرا در این محل بسیاری از داروها تغلیظ می‌شوند. رابعاً، حساسیت در شرایط آزمایشگاهی، تنها عاملی نیست که بر نتیجه درمان آنتی‌بیوتیکی در داخل بدن تأثیرگذار باشد. سایر عوامل شامل مکان و وسعت عفونت، حضور بیماری‌های زمینه‌ای که سیستم ایمنی را مختل می‌کند، وجود عفونت‌های مخلوط، صحت تشخیص، دوز مناسب، سن بیمار، کسب مقاومت توسط باکتری در طول درمان و احتیاج به اعمال جراحی یا تخلیه محل عفونت می‌باشد.

مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

الگوهای مقاومت

علیرغم وجود آنتی‌بیوتیک‌های فراوان و کارخانه‌های چندین میلیارد دلاری داروسازی، راه درازی تا تحت کنترل در آوردن بیماری‌های باکتریایی وجود دارد. یک دلیل اصلی این امر، آن می‌باشد که بسیاری از باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند. یک آنتی‌بیوتیک برای اعمال اثر خود چه کاری باید انجام دهد؟ باید یک هدف مناسب را شناسایی کند، در آن هدف به غلظت مناسب برسد و در همان غلظت برای مدت زمان مشخصی باقی بماند.

بعضی از مشکلات درمانی زمانی رخ می‌دهد، که آنتی‌بیوتیک انتخابی، بدلیل عدم توانایی عبور از سد مغزی- خونی نمی‌تواند به هدف برسد یا نمی‌تواند به باکتری‌های درون یک آبسه دسترسی پیدا کند. مشکل دیگر مربوط به غلظت آنتی‌بیوتیک است. در بعضی از موارد آنتی‌بیوتیک سریعاً دفع یا متابولیزه می‌شود و باعث می‌گردد که سطح خونی دارو فقط بصورت مختصر در بالاترین حد باقی بماند. این حالت، آنتی‌بیوتیک را در درمان عفونت‌هایی که در اثر باکتری‌هایی بوجود می‌آیند که فقط در مواجهه طولانی با میزان بالای دارو کشته می‌شوند، بی‌اثر می‌کند. در بعضی از موارد، آنتی‌بیوتیک سریعاً در عضو یا بافت خاصی تغلیظ می‌شود و آنتی‌بیوتیک نمی‌تواند به سایر محل‌های عفونت دسترسی پیدا کند.

مکانیسم غیرژنتیکی مقاومت

باکتری‌ها معمولاً به سه روش نسبت به اثر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند. اولاً، بعضی باکتری‌ها آنزیمی تولید می‌کنند که یک آنتی‌بیوتیک را با اتصال یک گروه متیل، آسیل یا فسفات یا با شکستن یک باند کلیدی (مثل حلقه بتالاکتام پنی‌سیلین) غیرفعال می‌کنند. ثانیاً، وقتی که نفوذپذیری برخی از باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک تغییر نماید، به آنتی‌بیوتیک نسبتاً مقاوم می‌شوند.

این تغییر در نفوذپذیری اغلب بدلیل تغییر در مولکول‌های پورین یا اجزاء لیپوپلی‌ساکارید می‌باشد. تغییر درلیپوپلی‌ساکارید برروی نفوذپذیری یا تغییر شارژ سطحی ارگانیسم، تأثیر می‌گذارد. برای مثال در مورد مقاومت به تتراسایکلین، دفع (Efflux) دارو بشدت افزایش می‌یابد. ثالثاً، ممکن است هدف آنتی‌بیوتیک طوری تغییر نماید که دیگر توسط آنتی‌بیوتیک قابل تشخیص نباشد. دو مثال مهم از این مکانیسم عبارتست از:

(1) مقاومت استافیلوکوک‌ها به متی‌سیلین با از دست دادن تمایل پروتئین‌های باند کننده به پنی‌سیلین برای متی‌سیلین رخ می‌دهد.

(2) توانایی برخی از سویه‌های اشریشیا کلی، برای مقاوم شدن به استرپتومایسین، پروتئین S_{12} خود را تغییر می‌دهند.

این تغییرات، الگوی حساسیت بسیاری از باکتری‌ها را تغییر داده و بر روش‌های درمانی تأثیر عظیمی گذاشته است. در دهه 1960 میلادی، درمان استاندارد سوزاک، تزریق 1/2 میلیون واحد پنی‌سیلین G بود. در اوایل دهه 1970 گنوکک بطور پیشرونده‌ای نفوذپذیری خود را به دارو کاهش داد. بنابراین دوز تجویزی پنی‌سیلین G به 2/4 میلیون واحد افزایش یافت. سپس مقدار مصرفی به 4/8 میلیون واحد پنی‌سیلین G رسید. نایسریا گونوره‌آ تولید کننده پنی‌سیلیناز ابتدا در اواخر سال1970 مشاهده شد و حالا آنقدر زیاد شده است که دیگر از پنی‌سیلین G برای درمان معمول سوزاک استفاده نمی‌شود، به جای آن بیماران با سفالوسپورین‌های نسل سوم (معمولاً سفتریاکسون یا سفکسیم)، فلوروکینولون‌ها یا استرپتومایسین درمان می‌شوند. بنظر می‌رسد، باکتری‌های تولید کننده پنی‌سیلیناز در حال افزایش هستند، زیرا احتمال می‌رود یک فاکتور R (TME-I) از باکتری‌های روده‌ای به گنوکوک‌ها منتقل شده است.

مکانیسم‌های ژنتیکی مقاومت

مثال نایسریا گونوره‌آ نشان می‌دهد، که چگونه باکتری‌ها ابتدا، یک نوع از مکانیسم مقاومت (در این مورد تغییر در نفوذپذیری) را نشان داده و بعداً، نوع دیگری از مکانیسم مقاومت (در این مورد تشکیل یک بتالاکتاماز) را از طریق انتقال ژن نشان می‌دهند. نه تنها ترانسفورمیشن در کسب مقاومت پنی‌سیلین در پنوموکک‌ها دخیل است، بلکه استافیلوکوک‌هایی دیده شده که بتالاکتاماز، حاوی فاکتور R را از طریق ترانسداکشن کسب می‌کنند. بسیاری از باکتری‌های گرم منفی فاکتور R را از طریق کونژوگیشن مبادله می‌کنند. بعضی از فاکتورهای R دامنه بسیار محدودی از میزبان‌ها را دارند (نظیر آنهایی که در سالمونلا تیفی و ویبریو کلرا یافت می‌شوند)، اما سایر فاکتورهای R در باکتری‌های گوناگون به فراوانی یافت می‌شوند. برای مثال پلاسمید مقاومت pAMB1 از باسیلوس، کلستریدیوم، انتروکوک، لاکتوباسیلوس، استافیلوکوک و استرپتوکوک جدا شده است و فاکتور R دیگر (RP4) در بین اسینتوباکتر و سودوموناس و باسیل‌های روده‌ای وجود دارد.

بعضی از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در پلاسمید غیرکانژوگاتیو وجود دارند که می‌توانند با پلاسمید کانژوگاتیو منتقل شوند (پلاسمید به نادرستی درطی کونژوگیشن منتقل می‌شود). همچنین این ژن‌ها ممکن است، از طریق نوترکیبی وابسته به RecA یا ترانسپوزون از یک پلاسمید به پلاسمید دیگر منتقل شوند. بنظر می‌رسد که ژن‌های Tem-1 از باسیل‌های روده‌ای به گنوکک‌ها از طریق نوترکیبی ترانسپوزونی منتقل شده باشند. پلاسمید روده‌ای، در آنجا نمی‌توانست تکثیر یابد، اما ژن Tem-1 از پلاسمید روده‌ای به روی پلاسمید گنوککی "پریده است". این امر سبب انتشار ژن‌های مقاومت و جاودانی شدن در یک جمعیت جدید را می‌شود.

در گذشته محققین تصور می‌کردند که مقاومت نمی‌تواند از باکتری‌های گرم منفی به گرم مثبت‌ها یا بالعکس منتقل شود. اما امروزه با آزمایش‌های کلونینگ مشخص شده که این انتقال صورت می‌گیرد و دلایلی وجود دارد که حدس زده می‌شود که در شرایط بدن این حالت رخ دهد. اولاً، فاکتور TetM R ابتدا فقط در انتروکوک گرم مثبت، وجود داشت، اما حالا در گنوکک‌ها و هموفیلوس‌ها (که گرم منفی می‌باشند) نیز یافت می‌شود. ثانیاً، ترانسپوزون انتروکوکی *tn917* دارای ژن مقاومت به اریترومایسین می‌باشد (این ژن *ermB* نیز نامیده می‌شود) که بنظر می‌رسد شبیه ژن *ermBc* در اشریشیا کلی و کلبیسلا و ژن *Tn1545* استرپتوکوک پنومونیه و ژن *ermAM* در استرپتوکوک سانگوئیس باشد و بالاخره *tn4400* که حامل ژن مقاومت به کلیندامایسین می‌باشد از باکتروئیدس فراژیلیس به اشریشیا کلی(باکتری که بتالاکتاماز تجزیه کننده سفوکسیتین و ایمی‌پنم را کد می‌کند) منتقل می‌گردد.

نکته: در مقالات بعدی به طور کامل انواع تست‌های تعیین حساسیت و مقاومت (آنتی‌بیوگرام) ارائه خواهد شد.