نتایج طراحی روش محیط آگار ویژه برای تعیین حساسیت دارویی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس به پیرازینامید در انیستیتو کشوری تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی تهران

دکتر محمد نجفی مصلح[۱*]، دکترکیومرث قاضی‌سعیدی[۲]، دکتر پریسا فرنیا[۳]، دکتر فروزان محمدی[۴]، دکترعلی‌اکبر ولایتی[۵]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی همدان ۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران ۳- بیمارستان مسیح دانشوری، انستیتو ملی تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، آزمایشگاه کشوری، تحقیقات مایکوباکتریولوژی ۴- بخش پاتولوژی، بیمارستان مسیح دانشوری، انستیتو ملی تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی ۵- بیمارستان مسیح دانشوری، انستیتو ملی تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی

دریافت: ۸۶/۱/۲۰ پذیرش: ۸۶/۸/۲۷

Title: *Results of developing a special agar medium method for pyrazinamide susceptibility testing of the Mycobacterium tuberculosis strains in National Research Institute of Tuberculosis & Lung Diseases, Tehran, Iran.*

Authors: *Najafimosleh M ,(PhD); Ghazi-Saiedi K, (PhD); Farnia P, (PhD); Mohammadi F, (MD); Velayati AA, (MD).*

Introduction: *Pyrazinamide (PZA) is one of the four front- line antituberculosis agents, which is very effective in eradicating the organism from the body by killing the active and non-active types of Mycobacterium tuberculosis in the acidic pH within macrophages, as well as in shortening the treatment course. Unlike the other antituberculosis agents, PZA is active in acidic pH, while the favorable pH for growth of the organism is 6.8. This fact makes the susbptibility testing of the organism to PZA very difficult.*

Methods: *With an appropriate and stable buffering system, pH of the 7H10 agar base medium was adjusted to be equal with 6. Moreover, the growth-inhibiting agents were omitted from the composition of the 7H10 agar base medium and it was highly enriched with special animal serum supplements, so that the organism could grow at a pH of 6 like the same way it would grow at the pH of 6.8. Using the Henderson-Hassle Bausch's equation, which determines the enzyme-substrate activity at different pH levels, individual critical concentrations of PZA were determined and added to the medium, and the results were traced using the proportional method. Standard PZA-susceptible and PZA-resistant strains were used as controls along with the specific strains under investigation. As additional control groups, the specific strains under study and the standard PZA-susceptible and PZA-resistant strains were also cultivated in PZA-free mediums. In addition to PZA-susceptibility testing, susceptibility of the specific strains under study to the other front-line antituberculosis agents was also assessed (rifampin, isoniazid, etambotul, and streptomycin).*

Results: *Approximately 6٪ of the clinically isolated strains were identified as PZA-resistant and about 1٪ of the strains were resistant only to PZA. Since the low pH of the cultivation medium was continuously controlled in order not to interfere with growth of the organism, and the Henderson-Hassle Bausch's equation is very accurate in determination of the enzyme-substrate activity, our study results are reliable.*

Conclusion: *An additional advantage of this method is feasibility of actual susceptibility or resistance determination based on different concentrations of the drug. It is also feasible to directly determine the susceptibility or resistance to PZA simultaneously with the primary sample culture.*

Keywords: *Mycobacterium, tuberculosis, pyrazinamide, 7H10 agar.*

Hakim Research Journal 2008; 11(1): 14- 21.

* نویسنده مسؤول: همدان، خیابان مهدیه، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی، کد پستی ۶۵۱۵۵ تلفن: ۰۹۱۸۸۱۳۱۱۸۹ نمابر: ۰۸۱۱-۸۲۷۶۲۹۹

پست الکترونیک: n_mosleh@yahoo.com

www.SID.ir

چکیده

مقدمه: *پیرازینامید یکی از چهار داروی خط اول ضدسلی است که علاوه بر کوتاه کردن دوره درمان با از بین بردن اشکال فعال و غیرفعال باسیل سل در محیط اسیدی درون ماکروفاژها، در ریشه‌کن کردن ارگانیسم در بدن بیمار بسیار مؤثر است. بر خلاف سایر داروهای ضدسلی فعال بودن پیرازینامید در pH اسیدی (در صورتی که pH مناسب برای رشد ارگانیسم ۶/۸ می‌باشد)، سنجش حساسیت باسیل سل به این دارو را با مشکل اساسی مواجه ساخته است.*

روش کار: *با یک سیستم بافری مناسب و پایدار pH محیط آگار پایه 7H10 برابر با ۶ تنظیم می‌گردد، از طرفی مواد مهارکننده رشد، از ترکیب محیط آگار پایه 7H10 حذف گردیده و محیط با مکمل‌های ویژه سرم حیوانی بسیار غنی می‌گردد به طوری که ارگانیسم در pH برابر با ۶ همانند شرایط pH برابر با ۶/۸ تکثیر نماید. با استفاده از معادله هندرسن- هسل باخ که فعالیت آنزیم- سوبسترا را در pH های مختلف مشخص می‌کند با توجه به غلظت بحرانی مقدار لازم دارو در مقادیر متفاوت به محیط افزوده شده و بر اساس روش تناسب نتایج قرائت می‌گردد. به همراه سویه‌های مورد بررسی از سویه‌های حساس و مقاوم استاندارد نیز به عنوان کنترل استفاده می‌گردد. جهت کنترل بیشتر سویه‌های مورد بررسی و کنترل در محیط فاقد دارو نیز کشت می‌گردد. حساسیت سویه‌های مورد بررسی علاه بر پیرازینامید در برابر سایر داروی خط اول ضدسل یعنی ریفامپین، ایزونیازید، اتامبوتول و استرپتومایسین نیز مورد مطالعه قرار گرفته است که در بخش نتایج متن مقاله ارایه شده است.*

یافته‌ها: *نتایج به دست آمده در طی مدت بررسی نشان می‌دهد که حدود ۶٪ از سویه‌های باسیل سل جدا شده از بیماران به پیرازینامید مقاوم می‌باشد و تقریباً ۱٪ جدا شده‌ها نیز فقط به پیرازینامید مقاوم است. با توجه به این که به طور مداوم عدم تأثیر pH پایین محیط کشت مورد استفاده بر رشد ارگانیسم کنترل می‌گردد و معادله هندرسن- هسل باخ نیز در تعیین فعالیت آنزیم بر سوسترا بسیار دقیق می‌باشد، نتایج به دست آمده قابل اطمینان می‌باشد.*

نتیجه‌گیری: *مزیت دیگر این روش این است که با توجه به غلظت‌های مختلف دارو می‌توان حساسیت و مقاومت واقعی را تعیین نمود، ضمناً می‌توان به صورت مستقیم (همزمان به کشت اولیه نمونه) حساسیت و یا مقاومت به پیرازینامید را تعیین نمود.*

گل‌واژگان: *مایکوباکتریوم، توبرکولوزیس، پیرازینامید، آگار 7H10.*

مقدمه

پیرازینامید یکی از چهار داروی خط اول ضد سل در طی ۲ ماهه اول درمان بیماری محسوب می‌شود (۳ -۱). این دارو با از بین بردن اشکال فعال و غیرفعال باسیل سل در محیط اسیدی درون ماکروفاژها، علاوه بر کوتاه کردن دوره درمان، در ریشه‌کن کردن ارگانیسم در بدن بیمار نیز بسیار مؤثر است (۴ و ۵). نقش پیرازینامید در رژیم‌های درمانی استاندارد سل، از این نظر حایز اهمیت است که این دارو در شرایط اسیدی درون ماکروفاژها و مونوسیت‌ها بر علیه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس[1] بیشتر مؤثر می‌باشد (۸ -۶). بر خلاف سایر داروهای ضدسلی فعال بودن پیرازینامید در pH اسیدی (در صورتی که pH مناسب برای رشد ارگانیسم ۶/۸ می‌باشد)، سنجش حساسیت باسیل سل به این دارو را با مشکل اساسی مواجه ساخته است (۱۱ -۹) و به همین دلیل هم در غالب مراکز از این کار چشم‌پوشی می‌گردد و اکثر گزارش‌های مربوط به نتایج تعیین حساسیت داروهای ضدسلی فاقد نتایج مربوط به به پیرازینامید می‌باشد (۱۲ و ۱۳). تلقیح به خوبی کنترل نشده تعداد ارگانیسم نیز باعث افزایش pH محیط کشت مربوط به سنجش حساسیت شده و در نتیجه به نتایج مقاوم کاذب منجر می‌گردد. متأسفانه استفاده از انواع مختلف سیستم‌های رادیومتریک بک‌تک[2]، کشت سلولی (۱۴) و حتی تکنیک‌های مولکولی برای این امر دارای مشکلات و محدودیت‌های زیادی بوده و علی‌رغم هزینه بالا پاسخ‌های مورد انتظار را هم به دست نمی‌دهند

[1] Mycobucterium Tuberculosis (MTB)

[2] Bactec

Archive of SID
www.SID.ir

(۱۲ و ۱۷ -۱۵). با توجه به مشکلات فوق در آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی رفرانس کشوری سل با تلفیق چندین روش یک متد ساده، کم‌هزینه و در عین حال قابل اطمینان ابداع گردیده است و از دو سال پیش حساسیت و یا مقاومت سویه‌های باسیل سل جدا شده از بیماران به پیرازینامید، با این روش انجام می‌گردد.

روش کار

I- مواد و معرف‌های مورد نیاز

۱- تهیه محیط کشت حاوی پیرازینامید

الف- طرز تهیه محیط کشت پایه: ترکیبات زیر که همه آنها به طور مستقیم از شرکت سیگما تهیه شده است برای تهیه کردن مقدار مورد نیاز محیط پایه مورد استفاده قرار می‌گیرد مثلاً برای هر سری تهیه محیط از مقادیر ذکر شده در زیر استفاده می‌شود:

پودر آماده 7H10	۱۴/۴ گرم
مونو پتاسیم فسفات	۴/۷ گرم
کازبین	۰/۲۷ گرم
گلیسرول	۴ میلی‌لیتر
آب مقطر دیونیزه	۶۰۰ میلی‌لیتر

بدون هیچ‌گونه حرارت مواد فوق را حل نموده و به‌طور مساوی در چهار ارلن یا بشر تقسیم می‌کنیم و به مدت ۱۲ دقیقه در شرایط ۱۵ پوند فشار و ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد حرارت اتو کلاو می‌کنیم. (لازم است توجه شود که هرگونه ایجاد تغییر ناخواسته در ترکیب محیط باعث بروز اشکال در نتیجه خواهد شد. بنابراین ضروری است دقیقاً پارامترهای مربوط به شرایط اتوکلاو نیز رعایت گردد.

ب- طرز تهیه محلول دارو با غلظت های مورد نظر : غلظت‌های ۳۰۰ ، ۹۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پیرازینامید مورد نیاز است که با توجه به مقدار محیط کشت مورد نیاز برای هر بار تهیه، این غلظت‌ها را تهیه می‌کنیم. مثلاً برای تهیه ۱۰۰ لوله محیط کشت از الگوی زیر استفاده می‌کنیم:

غلظت مورد نظر	آب مقطر دیونیزه	مقدار دارو
۱۲۰۰ µg/ml	۶۲/۵ ml	۷۵ mg
۹۰۰ µg/ml	۶۲/۵ ml	۵۷/۲۵ mg
۳۰۰ µg/ml	۶۲/۵ ml	۱۷/۵ mg

ج- طرز تهیه محیط کشت نهایی: ابتدا هر چهار ظرف حاوی محیط پایه اتوکلاو شده را در داخل بن‌ماری $54^{\circ}C$ قرار می‌دهیم تا **حرارت** آنها به $54^{\circ}C$ برسد و تا پایان تقسیم محیط به لوله‌های کشت ارلن‌ها در همین دما قرار داده می‌شود. سپس هر یک از ارلن‌ها، را به ترتیب با شماره‌های ۱، ۲، ۳ و۴ مشخص می‌کنیم. به هر یک از ارلن‌ها ۲۰ ml سرم حیوانی[1] استریل اضافه می‌کنیم. به ارلن شماره ۱، مقدار ml ۲۰ از محلول پیرازینامید با غلظت ۱۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ، به ارلن شماره ۲ ، مقدار ml ۲۰ از محلول پیرازینامید با غلظت ۹۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و به ارلن شماره ۳، مقدار ml ۲۰ از محلول پیرازینامید با غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه نموده و به ارلن شماره ۴، به جای محلول دارویی ml ۲۰ آب مقطر دیونیزه استریل اضافه می‌کنیم. سرم حیوانی و محلول دارویی را می توان قبلاً مخلوط نموده و یک‌جا به هر یک از ارلن‌های حاوی محیط اضافه نمود (به ارلن شماره ۴ مخلوط سرم حیوانی و آب مقطر دیونیزه استریل اضافه می‌کنیم). محتویات هر ارلن را در مقادیر حدود ۱۰ میلی‌لیتری به لوله‌های کشت استریل از قبل آماده شده تقسیم می‌کنیم. (غلظت دارویی محیط بر روی هر سری لوله‌ها نوشته شود تا در غلظت‌های دارویی اشتباهی رخ ندهد). در حقیقت برای استفاده از این محیط بایستی از پلیت‌های چهار قسمتی خاص (پلیت‌های پلاستیکی ۱۵ × ۱۰۰ چهار قسمتی) استفاده نمود ولی در آزمایشگاه ملی مرجع کشوری از لوله‌های کشت استفاده می‌شود، بنابراین تا زمان پایان تقسیم محیط به لوله‌ها ارلن‌های حاوی محیط بایستی مدام در شرایط $54^{\circ}C$ باشند تا محیط داخل آنها سفت نشود. و لوله‌های حاوی محیط کشت مذاب بلافاصله به صورت خوابیده قرار داده شود تا سطح مایل مناسب به دست می‌آید. جهت جلوگیری از ایجاد حباب از تکان دادن ارلن حاوی محیط خودداری گردد. پس از منعقد شدن محیط، سری لوله‌ها را با توجه به میزان غلظت دارویی هر سری در بسته‌های جدا نگهداری نمایید. (هر سری با غلظت‌های دارویی ۳۰۰، ۹۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و نیز لوله‌های حاوی محیط بدون دارو).

د- تهیه سوسپانسیون از سویه‌های مورد بررسی: سویه‌های مورد نظر تست را به مدت ۴ تا ۷ روز در محیط 7H9 حاوی ماده جلوگیری کننده از ایجاد توده[2] (درصد مناسب توئین ۸۰) و محرک رشد کشت می‌دهیم. همچنین با استفاده از یک

[1] FCS fetal Calf serum
[2] Clamp

www.SID.ir
Archive of SID

استیرر پلیت[1] و مگنت مناسب از ابتدا کشت با سرعت RPM ۱۲۰ در حالت چرخش قرار می‌گیرد تا از بروز توده جلوگیری گردد و تعداد تلقیح ارگانیسم قابل کنترل باشد. با استفاده از محیط (مایع) 7H9 سوسپانسیونی از هر یک از سویه‌ها با غلظتی برابر با کدورت لوله شماره یک مک فارلن تهیه می‌نماییم. با استفاده از محیط 7H9 رقت‌های ۱×۱۰^{-۱}، ۱×۱۰^{-۳} و ۱×۱۰^{-۵} تهیه می‌نماییم.

مقدار ml ۰/۱از هر یک از ۱×۱۰^{-۱}، ۱×۱۰^{-۳} و ۱×۱۰^{-۵} را به صورت جداگانه به چهار لوله حاوی محیط کشت به غلظت‌های دارویی ۳۰۰، ۹۰۰، ۱۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و لوله حاوی محیط کشت بدون دارو تلقیح می‌کنیم. پس از تلقیح، لوله‌ها را در شرایط جوی حاوی CO_2 (۷٪) و دمای $۳۷^{\circ}C$ به مدت ۲۱ روز انکوبه می‌کنیم.

توجه: اضافه شدن ناخواسته هرگونه مواد اضافی (مثل قطعات محیط لونشتاین جانسون) به همراه تلقیح سوش باعث به‌هم خوردن pH محیط کشت حاوی دارو گردیده و نتایج را به‌شدت تحت تأثیر قرار خواهد داد؛ میزان تلقیح بیش از اندازه تعیین شده باعث افزایش pH محیط می‌گردد.

در این بررسی علاوه بر پیرازینامید، حساسیت سویه‌های تست در برابر ریفامپین، اسرپتومایسین، اتامبوتول و ایزونیازید نیز مورد بررسی قرار گرفت که برای جلوگیری از طولانی شدن مطلب از ذکر جزییات روش خود داری می‌شود و فقط نتایج در بخش مربوطه ارایه خواهد شد.

II- ارگانیسم‌های مورد بررسی برای تعیین حساسیت در برابر پیرازینامید

در این بررسی تعداد ۱۰۰ سویه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران مراجعه‌کننده به مرکز کشوری سل، علاوه بر پیرازینامید در برابر چهار داروی خط اول ضدسلی دیگر یعنی ریفامپین، ایزونیازید، استرپتومایسین و اتامبوتول نیز تعیین حساسیت گردید.

III- نحوه خواندن نتایج و گزارش

روش خواندن نتیجه برای تمامی پنج داروی مورد تست از جمله پیرازینامید متد تناسب است[2].

خواندن نتایج: پس از ۲۸ و ۴۲ روز انکوباسیون رشد و یا عدم رشد باسیل سل روی محیط‌ها بررسی می‌شد. ابتدا میانگین کلنی‌های موجود در محیط شاهد خوانده شده و ثبت می‌شد. سپس تعداد کلنی‌ها در لوله‌های با رقت‌های تلقیح ۱×۱۰^{-۱}، ۱×۱۰^{-۳} و ۱×۱۰^{-۵} خوانده شده و ثبت می‌گردید. اگر در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک رشد مشاهده نمی‌شد مایکوباکتریوم حساس تلقی می‌شد.

در صورت مشاهده رشد کلنی تعداد آنها شمارش شده و درصد مقاومت در رقت‌های ۱×۱۰^{-۱} ، ۱×۱۰^{-۳} و ۱×۱۰^{-۵} تلقیح با توجه به فرمول زیر محاسبه می‌شد و بر اساس روش تناسب سویه مورد بررسی حساس و یا مقاوم محسوب می‌شد.

$$\frac{\text{تعداد کلنی در حضور آنتی‌بیوتیک}}{\text{تعدد کلنی در غیاب آنتی‌بیوتیک}} \times ۱۰۰$$

در مورد پیرازینامید نیز بر اساس روش تناسب مقاومت و یا حساسیت به شرح زیر محاسبه می‌شد: در صورتی که رشد باکتری در هر سه لوله حاوی محیط کشت 7H10 با غلظت‌های ۳۰۰ و ۹۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پیرازینامید (در مقایسه با لوله کنترل بدون دارو) مهار شده بود، سویه مورد بررسی حساس گزارش می‌گردید. همچنین در صورت رشد ارگانیسم در لوله حاوی محیط کشت 7H10 با غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پیرازینامید و عدم رشد در لوله حاوی محیط کشت 7H10 با غلظت‌های ۹۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پیرازینامید نیز حساس تلقی می‌شد. در صورتی که باکتری در هر سه لوله حاوی محیط کشت 7H10 با غلظت‌های ۳۰۰ و ۹۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پیرازینامید و یا در دو لوله حاوی ۹۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پیرازینامید رشد می‌نمود مقاوم شمرده می‌شد. در واقع با این روش میزان حداقل غلظت باز دارندگی[3] تعیین می‌گردید (منتهی با در نظر گرفتن غلظت بحرانی) که یکی از مزایای این روش است. لازم به ذکر است از تاریخ راه اندازی این روش برای اولین بار تست سنجش حساسیت به پیرازینامید در بیمارستان مسیح دانشوری تهران انجام می‌شود.

نتایج

از ۱۰۰ سویه مورد بررسی ۳۸ سویه به پنج داروی خط اول (یعنی ریفامپین، ایزونیازید، استرپتومایسین، اتامبوتول و پیرازینامید) حساس بود و ۶۲ سویه دیگر در برابر داروهای یاد شده مقاوم بودند که فراوانی مطلق (تعداد) و فراوانی نسبی (به صورت درصد) نتایج به ترتیب؛ به صورت سویه‌های مقاوم به یک دارو، سویه‌های مقاوم به دو دارو، سویه‌های مقاوم به سه

[1] Stirrer Plate
[2] Proportion Method
[3] Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Archive of SID
www.SID.ir

دارو، سویه‌های مقاوم به چهار دارو و سویه‌های مقاوم به به پنج دارو در جدول ۱ بیان شده است. به طور کلی نتایج به دست آمده در خصوص پیرازینامید در طی مدت بررسی نشان می‌دهد که حدود ۶٪ از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس جدا شده از بیماران به پیرازینامید مقاوم می‌باشد و تقریباً ۱٪ جدا شده‌ها نیز به صورت مونورسیستانت فقط به پیرازینامید مقاوم است. جهت کنترل از سویه‌های H37Rv استاندارد حساس و مقاوم به پیرازینامید استفاده گردید. هم‌چنین برای کنترل بیشتر، سویه‌های مورد بررسی و سویه‌های کنترل در محیط کشت فاقد دارو نیز کشت می‌گردید.

جدول ۱- تعداد سویه‌های مقاوم به یکی از داروهای خط اول و سویه‌های مقاوم به بیش از یک دارو را نشان می‌دهد

نام دارو یا داروها	تعداد سویه‌های مقاوم (فروانی مطلق)	فراوانی نسبی (درصد)
ریفامپین	۲	۳
ایزونیازید	۱۲	۲۰
اتامبوتول	۱	۱/۵
استرپتومایسین	۵	۸
پیرازینامید	۱	۱/۵
ریفامپین، اتامبوتول	۲	۳
ایزونیازید، اتامبوتول	۳	۵
ایزونیازید، استرپتومایسین	۸	۱۳/۵
ریفامپین، ایزونیازید، استرپتومایسین	۷	۱۱
ریفامپین، ایزونیازید، پیرازینامید	۱	۱/۵
ایزونیازید، پیرازینامید، استرپتومایسین	۱	۱/۵
ریفامپین، اتامبوتول،استرپتومایسین	۳	۵
ریفامپین، ایزونیازید، اتامبوتول، استرپتومایسین	۱۴	۲۲/۵
ریفامپین، ایزونیازید، پیرازینامید، استرپتومایسین	۱	۱/۵
ریفامپین، ایزونیازید، اتامبوتول، استرپتومایسین، پیرازینامید	۱	۱/۵
نتایج کلی	جمع کل سویه‌های مقاوم ۶۲	مجموع فراوانی نسبی ۱۰۰٪

بحث و نتیجه‌گیری

درمان مناسب بیماران توبرکولوزیس مستلزم تعیین حساسیت دارویی ارگانیسم جدا شده از بیمار قبل از شروع درمان می‌باشد (۴، ۱۸، ۱۹). سنجش حساسیت دارویی در مورد چهار داروی اول یعنی ایزونیازید، ریفامپین، اتامبوتول و استرپتومایسین با یکی از روش‌های روتین تعیین حساسیت دارویی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس (مثلاً با روش تناسب و کشت در روی محیط لونشتاین جانسون) قابل انجام بوده و مشکلی ندارد (۲۰)، اما تعیین حساسیت یا مقاومت ارگانیسم در برابر پیرازینامید با چهار داروی فوق کاملاً متفاوت است (۷). به عبارت دیگر تا این اواخر یک روش قابل اطمینانی برای بررسی حساسیت MTB به پیرازینامید ابداع نشده است. این مشکل به شرایط بسیار اختصاصی لازم برای اثر پیرازینامید مربوط می‌شود. می‌دانیم که پیرازینامید در pH برابر با ۵ تا ۵/۵ ، در درون مونوسیت‌ها و ماکروفاژها بر علیه ارگانیسم مؤثر است و pH مناسب برای رشد باسیل سل در آزمایشگاه بین ۶/۸ تا ۷ می‌باشد و به همین دلیل همانند سایر عوامل دارویی ضد توبرکولوزیس تعیین حساسیت MTB در برابر پیرازینامید امکان‌پذیر نیست. این مشکل زمانی بهتر مشهود است که خواسته باشیم با مقدار داروی مؤثر در حد خونی یا بافتی بر علیه MTB، اثر دارو را در آزمایشگاه به طور in-vitro مورد بررسی قرار دهیم (یعنی با میزان ۱۶ تا ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارو). دوز ۱۶ تا ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پیرازینامید به شرطی در in-vitro بر علیه MTB مؤثر است که pH محیط مورد استفاده برابر با ۵/۵ تا ۵/۶ باشد. از طرفی محیط کشت با pH برابر با ۵/۵ تا ۵/۶ کاملاً برای رشد باکتری نامساعد است، و بیشتر سویه‌های جدا شده MTB در محدوده این pH قادر به رشد نمی‌باشند. کوشش‌های فراوانی برای حل این مشکل به عمل آمده است که به طور خیلی مختصر به آنها اشاره می‌شود (۶ و ۷):

استفاده از سیستم‌های بک تک و مشکلات ناشی از آن:

با توجه به مشکلات ذکر شده استفاده از سیستم‌های بک‌تک از جمله Bactec-460 پیشنهاد و به کار گرفته شد که در آن از محیط مایع 7H12 با pH= 6 و 100 µg/ml از پیرازینامید استفاده می‌شد. بعد از ارایه این تکنیک، بسیاری از آزمایشگاه‌های کلینیکی به بررسی حساسیت MTB در برابر پیرازینامید اقدام نمودند که به موازات آن بحث‌ها و مشکلات غیرقابل حلی مطرح شد که مختصراً در زیر شرح داده می‌شود (۲۱- ۲۴).

Archive of SID
www.SID.ir

الف- مطمئن‌ترین راه در روش بک‌تک برای تعیین سویه‌های حساس و مقاوم MTB به پیرازینامید استفاده از 300 تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (µg/ml) از دارو می‌باشد (به عنوان غلظت بحرانی[1] نه 100µg /ml که در این تکنیک استفاده شده است.

ب- فاکتور دیگری که نتایج بک‌تک را تحت تأثیر قرار می‌دهد میزان تلقیح ارگانیسم است. ژانگ[2] و همکاران نشان داده‌اند که میزان تلقیح اضافی 10 CFU/ml، pH محیط را از ۵/۶ به ۶/۶ یا بیشتر از ۶/۶ افزایش می‌دهد (۴). مسلم است که در این شرایط، میزان 100µg/ml پیرازینامید بر علیه MTB مؤثر نخواهد بود. بنابراین افزایش میزان تلقیح، محیط کشت بک‌تک را قلیایی می‌کند که این امر یکی از دلایل گزارش سویه‌های مقاوم کاذب به پیرازینامید در روش بک‌تک می‌باشد (۶، ۲۲، ۲۳، ۲۵)، که بسیار حایز اهمیت می‌باشد.

ج- استفاده از سیستم Bactec 460 برای هر آزمایشگاهی مقدور نمی‌باشد. کما این که تاکنون در ایران مورد استفاده قرار نگرفته است بنابراین با توجه به اهمیت راه اندازی یک روش مناسب برای سنجش حساسیت سویه‌های باسیل شل جدا شده به پیرازینامید (با توجه به این که این دارو جزو اساسی دو ماهه اول رژیم درمانی ضد توبرکولوزیس است)، از ضرورت‌های اجتناب‌ناپذیر می‌باشد(۲۳، ۲۷،۲۶).

مزایا و معایب استفاده از تکنیک‌های مولکولی: بعد از کامل شدن تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژنوم مایکوباکتریوم توبرکولوزیس؛ ژن‌های حساسیت به پیرازینامید به خصوص ژن PncA یعنی ژن کُدکننده آنزیم پیرازینامیداز نیز تعیین گردید (۱، ۳۲، ۳۳). با تکنیک‌های مولکولی از جمله روش‌های SSCP - PCR؛ دات بلات هیبریداسیون و سکانسینگ امکان تعیین بروز موتاسیون در ژن‌های مربوط به پیرازینامید فراهم شد (۲، ۵، ۷). با این وجود نتایج حاصل از این تکنیک‌ها هنوز به خوبی مورد ارزیابی قرار گرفته نشده و علاوه بر این روش‌های مولکولی دارای معایبی است که از جمله می‌توان به موارد فوق اشاره نمود: هزینه بالا، عدم امکان به کارگیری در آزمایشگاه‌های روتین، متعدد بودن ژن‌های مربوط به بیان پیرازینامیداز به طوری که در حال حاضر استفاده از این روش به آزمایشگاه‌های اندک تحقیقاتی محدود می‌باشد (۳۴).

آیا مشکل قابل حل است؟نشان داده شده است که PZA در غلظت‌های بالای ۳۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در محیط 7H12 با pH برابر با ۶ تا ۶/۲ دارای اثر بازدارندگی مناسبی بر علیه MTB می‌باشد (یعنی تقریباً برابر با مقادیر داروی به کار برده شده در تکنیک بک‌تک). با توجه به ترکیب محیط کشت 7H12 مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در pH = 6– 6.2 در محیط 7H12 به خوبی قادر به رشد می‌باشد (۲۱). با اضافه کردن سرم جنین گاوی[3] یا سرم گوساله[4] محیط 7H12 آن چنان غنی و مناسب می‌شود که حتی اغلب سویه‌های MTB در این محیط در pH برابر با 6.2 –6 بهتر از محیط کشت‌های دیگر با pH=6.8 رشد می‌کند (۴). با توجه به این که فاکتور اصلی در تأثیر پیرازینامید بر روی سویه‌های MTB فعال بودن آنزیم پیرازینامیداز می‌باشد، بنابراین می‌توان بر اساس معادله هندرسن– هسل باخ[5] در pHهای متفاوت، غلظت‌های مختلف پیرازینامید قادر به مهار رشد MTB را محاسبه نمود (۲۱). با استفاده از این معادله در pH=6.2، MIC پیرازینامید بایستی 300 µg/ml باشد. بر اساس همین محاسبه ما در استفاده از روش محیط کشت آگار ویژه 7H10 به کار برده شده در آزمایشگاه (که حاوی ۱۰٪ فتال بوین سرم (FBS) و با pH نهایی برابر با ۶/۲ می‌باشد) از غلظت‌های ۳۰۰، ۹۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پیرازینامید استفاده نموده‌ایم و با کنترل دقیق میزان تلقیح ارگانیسم ودر نتیجه از به هم خوردن رابطه آنزیم– سوبسترا جلوگیری به عمل آمد. در واقع با این روش میزان حداقل غلظت باز دارندگی تعیین می‌گردد (منتهی با در نظر گرفتن غلظت بحرانی)که یکی از مزایای این روش است. با توجه به کنترل‌های لازم در این مطالعه نتایج قابل‌توجهی به دست آمده است. نتایج حاصل از بررسی سویه‌های تست با سویه‌های استاندارد H37Rv حساس و مقاوم به پیرازینامید به شدت کنترل می‌گردید. البته استاندارد طلایی در این روش تعیین بروز موتاسیون در توالی‌های مربوط به ژن PncA یعنی ژن کُدکننده آنزیم پیرازینامیداز در DNA کروموزومی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس می‌باشد، و نتایج به دست آمده در این روش بایستی باتعیین موتاسیون به خصوص در ژن PncA مورد کنترل نهایی قرار گیرد که این کار به عنوان یک طرح تحقیقاتی در حال انجام است. به هر حال با توجه به این که سویه‌های تست شده با روش ارایه شده در این تحقیق به دو طریق: با سویه‌های استاندارد حساس و مقاوم به پیرازینامید و با کشت موازی ارگانیسم‌های تست و کنترل در محیط کشت بدون دارو به شدت کنترل گردیده است، نتایج حاصل از روش ارایه

[1] Critical concentration
[2] Zhang
[3] Fetal bovine serum (FBS)
[4] Fetal calf serum (FCS)
[5] Henderson– Hessel bach

Archive of SID
www.SID.ir

شده در این کار قابل استناد می‌باشد (۴، ۲۱، ۲۷). مزیت دیگر این روش این است که با توجه به غلظت‌های مختلف دارو می‌توان حساسیت و مقاومت واقعی را تعیین نمود، ضمناً می‌توان به صورت مستقیم (همزمان به کشت اولیه نمونه) حساسیت و یا مقاومت به پیرازینامید را تعیین نمود. گرچه در این گزارش مسأله بسیار حیاتی بروز مقاومت دارویی در باسیل سل در برابر داروهای خط اول مورد بررسی و تحلیل قرار نمی‌گیرد و هدف اصلی معرفی کاربردی یک روش برای سنجش مقاومت پیرازینامید می‌باشد، اما گزارش نتایج حساسیت دارویی MTB به داروهای خط اول ضد سلی که اجباراً در قالب گزارش نتایج مربوط به پیرازینامید در جدول‌ها ارایه شده است، مسأله افزایش مقاومت به چندین دارو[1] در کشور را گوشزد نموده و به خصوص این امر زمانی زنگ خطر است که گزارش جدا شدن سویه‌ها باسیل سل مقاوم به داروهای خط اول و داروهای خط دوم ضدسلی[2] افزایش نشان بدهد (۱۸، ۲۱). بنابراین مشاهده همین آمار در حاشیه گزارش این مطالعه ایجاب می‌کند که افزایش مقاومت دارویی باسیل سل در کشور بایستی بسیار جدی تلقی شود.

پیشنهاد می‌شود که امکانات لازم جهت انجام تست‌های دقیق سنجش حساسیت دارویی در آزمایشگاه‌های مجهز به امکانات ایمنی از جمله امکانات مولکولی و تعیین توالی ژنوم تجهیز گردد تا امکان بررسی‌های مستمر و دقیق فراهم گردد و گزارش‌های قابل اعتماد در دسترس متخصصین بیماری‌های عفونی و مسؤولین بهداشتی در امر کنترل سل قرار گیرد. مراجعه آزادانه بیماران اتباع کشور افغانستان چه ساکن ایران و چه به صورت مراجعه مستقیم از آن کشور برای درمان سامان دهی شود. متأسفانه تعداد بسیار قابل توجهی از سویه‌های مقاوم به چندین دارو از این بیماران جدا می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از انستیتو ملی تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی (بیمارستان دکتر مسیح دانشوری) به خاطر هزینه‌های این مطالعه و همچنین از آزمایشگاه کشوری تحقیقات مایکوباکتریولوژی تشکر و قدردانی می‌شود.

[1] Multi drugs tuberculosis MDR- TB
[2] Extensively drugs resistance tuberculosis XDR-TB

References

1- Heifets L, Cangelosi J. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: a neglected problem at the turn of the century. Int. J.Tuberc. Lung Dis.1999; 3:564–581. chemotherapy, 2005: 804–807.

2- Scarparo C, Ricordi PP, Ruggiero P, et al. Evaluation of the fully automated Bactec MGIT 960 System for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and Comparison with the radiometric Bactec 460TB method J Clinical Microbiol 2004: 1109–1114.

3- Fuursted K. Comparison of growth and susceptibility esting of pyrazinamide in different Bactec media using strains of the Mycobacterium tuberculosis complex. APMIS 1993;101(2):154-9.

4- Zhang Y, Permar S. Condition that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide J med microbial. 2002;51: 42-49.

5-Hewlett D, Horn D, Alfalla C. Drug- resistant tuberculosis: inconsistent results of pyrazinamide susceptibility testing. JAMA 1995 273:916–917

6- Takemasa T, Hamasaki S, Hirano K, et al Simple fibroblast-based assay to test the pyrazinamide susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* antimicrobial agents and

7- Zhang Y, Scorpio A, Hiroshi N. Role of Acid pH and Deficient Efflux of Pyrazinoic Acid in Unique Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Pyrazinamide J bacteriology, 1999: 2044–2049.

8-Glenn P, Morlock, Jack T. Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000: 2291–2295.

9- Scorpio A, Zhang A. Mutations of *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamidein tubercle bacillus. Nat. Med. 1996; 2: 662–667.

10- Mestdagh M, Fontyne P, Rfalini R. Relationship between Pyrazinamide Resistance, Loss of Pyrazinamidase Activity, and Mutations in the *pncA* Locus inMultidrug-Resistant results of pyrazinamidase test. Rinsho Byori 1998; 46(5): 479-85.

11- Nguyen D, Brassard P, Westley J, et al,.Wide spread pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* family in a low-incidence setting. J Clinical Microbiol. 2003: 2878–2883

12- Heifets L, Sanches T. new agar medium for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. J clinical microbiol, 2000:1498-1501.

13- Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, et al. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 52: 790–795.

14- Chika M, Nobuhisa Y, Bhusal Y, et al. Genetic and phenotypic characterization of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Japan Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2004; 48: 111–116.

15-Tsi-S H, Shin S - Lee J, et al. Correlation between Pyrazinamide Activity and *pncA* Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Taiwan . Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Nov. 2003, p. 3672–3673

Archive of SID
www.SID.ir

16- CHENG JI, Thibert L, Heifets L, et al**.** *pncA* Mutations as a Major Mechanism of PyrazinamideResistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Spread of aMonoresistant Strain in Quebec, Canada Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2000**:** 528–532.

17- Edotrial note. susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide J Med Microbial 2002; 51: 11-12.

18- Margaret M., Edeward P. Desond, Glenn P. Pyrazinamide-monoresistant *mycobacterium tuberculosis*in the United States J of clin. microb., 2001 Feb., p. 647–650

19 -Freixo M, Caldas CS, Said A, et al. Antimicrobial susceptibility determined by the E test, Löwenstein-Jensen proportion, and DNA sequencing methods among *Mycobacterium* tuberculosis isolates– discrepancies, preliminary results Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004**;** 99(1): 107-110.

20- Sanders CA, Nieda RR, Desmond EP**.** Validation of the Use of Middlebrook 7H10 Agar, BACTEC MGIT960, and BACTEC 460 12B Media for Testing the Susceptibilityof *Mycobacterium tuberculosis* to Levofloxacin J Clin Microbiol, 2004: 5225–5228.

21- Masjedi MR, Farnia P, Sorooch S, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis: 2 years of surveillance in Iran .Clin Infect Dis. 2006 ;143(7): 841-7.

22-Yamane N, Nakasone I, Okazawa Y. Determination of pyrazinamide susceptibility for Mycobacterium tuberculosis by use of Middlebrook culture media and comparison with

Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1999: 2317–2319.

23-Heifets L; Simon J; Pham V. Capreomycin is active against non-replicating *Mycobacterium tuberculosis.* Annals of Clinical Microb. & Antimicrobials 2005; 4:64-6.

24- Miller MA, Thibert L, Desjardins F**.** Testing of susceptibility of *mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide: comparison of Bactec method with pyrazinamidase assay J Clinical Microbiol, 1995:2468–2470.

25- Salfinger M, Heifets L**.** Determination of pyrazinamide MICs for *Mycobacterium tuberculosis* at different pHs by the radiometric method antimicrobial agents & chemotherapy, 1988: 1002-1004.

26- Liu YP, Behr MA, Small PM. Genotypic determination of *Mycobacterium tuberculosis* antibiotic resistance using a novel mutation detection method,the branch migration inhibition J Clin Microbiol. 2000;38 (10): 3656-62.

27- Fyffer EP, Frantiska P.Testing of susceptibility of mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide with the non radiometric Bactec MGIT 960 system J Clinical Microbiol. 2002:1670–1674.

28- Portugal I, Barreiro L, Moniz-P J, et al. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal Antimicrobial Agents and hemotherapy, 2004: 2736–2738.

29- Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review**:** International J Tuberculosis & Lung Dis. 2003; 7(1): 6-21.

31-Angelo S, Pamela L, Leonid H. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis.* J *of antimicrobial chemotherapy;* 1997. 540–543

30- Cole S.T,. Comparative *mycobacterial* genomics as a tool for drug target and antigen discovery Eur Respir J2002; 20: Suppl. 36, 78s–86s

32- Somoskovi A, Wade MM, Sun Z, et al**.** Iron enhances the antituberculous activity of pyrazinamide. *J of Antimicrobial hemotherapy* 2004**;** 53: 192–196.

33- Butler WR, Kilburn JO. Improved method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. J Clin icrobiol 1982; 16:1106–1109.

34- Raynaud C, Antoinette M, Lane e, et al**.** Mechanisms of pyrazinamide resistance in Mycobacteria: importance of lack of uptake inaddition to lack of pyrazinamidase activity *Microbiology*, 1999**;** 145: 1359–1367.

Archive of SID

www.SID.ir