استفاده از روش رنگ سنجی آلامار بلو جهت بررسی مقاومت چند دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

علیرضا محمدزاده[۱] - پریسا فرنیا[۲] - طاهره راشد[۳] - کیارش قزوینی[۴] - مهدی بهدانی[۵] - جواد قناعت[۶]

چکیده

زمینه و هدف: گسترش سویه های با مقاومت چند دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک مشکل عمده در بسیاری از قسمتهای دنیا بخصوص در کشورهای با درآمد کم می باشد. استفاده از روشهای استاندارد جهت بررسی حساسیت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بسیار وقت گیر است. در این مطالعه ما از روش آلامار بلو (روش رنگ سنجی) به عنوان یک روش سریع و ارزان قیمت جهت تعیین سویه های با مقاومت چند دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (مقاوم به ریفامپین و ایزونیازید) استفاده نمودیم.

روش تحقیق: این مطالعه به صورت تجربی روی ۲۳ نمونه از مرکز تحقیقات ملی بیماریهای ریوی و سل بیمارستان مسیح دانشوری تهران انجام گردید. ابتدا رقتهای آنتی‌بیوتیکی ریفامپین و ایزونیازید در محیط 7H9GCbroth تهیه شد. از محلول فوق ۱/۶۵ میلی‌لیتر به لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتر منتقل گردید. برای کنترل از محلول 7H9GCbroth فاقد دارو استفاده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از مخلوط تازه تهیه شده معرف Alamar Blue به لوله‌های حاوی آنتی‌بیوتیکی و کنترل اضافه شد. در تمامی لوله‌های آزمایش ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت باکتریایی 10^{-1} (3×10^6 CFU/ml) تلقیح گردید. لوله‌ها در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴ هفته انکوبه شدند.

یافته ها: در مقایسه با روش نسبی، ۱۱ مورد از ۱۲ مورد، توسط روش Alamar Blue به داروهای ایزونیازید و ریفامپین حساس تشخیص داده شدند. حساسیت و اختصاصی بودن این روش برای دو داروی ایزونیازید و ریفامپین به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۰٪ بود. طی این بررسی همخوانی بسیار خوبی بین روش آلامار بلو و روش نسبی دیده شد (kappa value = 0.93, P<0.001). در این مطالعه نتایج طی ۶ روز حاصل گردید که این مدت زمان نسبت به روش نسبی (۳۲-۲۸ روز) بسیار کمتر است.

نتیجه گیری: به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که ردیابی اکسیداسیون- احیاء ساده، قابل اعتماد و کم هزینه است که امکان نیاز به روشهای بررسی مقاومت گران قیمت بویژه در آزمایشگاه‌های تشخیص سل با منابع محدود را برطرف می‌نماید. در این مطالعه مشخص گردید که روش رنگ سنجی آلامار بلو میتواند به عنوان یک روش ساده، قابل اعتماد و سریع جهت بررسی حساسیت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بکار رود.

کلید واژه ها: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس؛ مقاومت دارویی؛ آلامار بلو

افق‌دانش؛ مجله دانشکده علوم‌پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی گناباد (دوره۱۳؛ شماره ۳؛ پاییز سال ۱۳۸۶)

دریافت: ۱۳۸۶/۱۰/۲ اصلاح نهایی: ۱۳۸۷/۱/۳۰ پذیرش: ۱۳۸۷/۲/۲۹

۱- نویسنده مسؤول؛ کارشناس ارشد میکروب شناسی، عضو هیأت علمی دانشکده علوم پزشکی گناباد
آدرس: گناباد، دانشکده علوم پزشکی گناباد
تلفن: ۰۵۳۵-۷۲۲۳۰۲۸ نمابر: ۰۵۳۵-۷۲۲۳۸۱۴ پست الکترونیکی: alm13604@gmail.com
۲- دانشیار میکروب شناسی، مرکز تحقیقات ملی بیماریهای ریوی و سل بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- استاد میکروب شناسی، عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۴- استادیار میکروب شناسی، عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۵- دانشجوی Ph.D بیوتکنولوژی پزشکی، بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور تهران
۶- استاد میکروب شناسی، عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سل یکی از قدیمی‌ترین بیماریهای شناخته شده در دنیا است که در دو دهه اخیر مجدداً شایع گردیده است به طوری که حدود یک سوم جمعیت دنیا به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده هستند. اکثر موارد ابتلا به سل و مرگ و میرهای ناشی از این بیماری در کشورهای در حال توسعه دیده می‌شوند (۱). درمان عفونتهای مایکوباکتریومی، برخلاف اکثر عفونتهای باکتریایی، پیچیده و بحث برانگیز است. به طور کلی بیماران باید چندین آنتی‌بیوتیک را برای دوره‌های طولانی (حداقل از ۶ تا ۹ ماه) دریافت نمایند، در غیر اینصورت سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بوجود خواهند آمد (۲). درمان امروزی سل بر اساس تجویز داروهای مؤثر استوار است و به منظور پیشگیری از ایجاد موتانهای مقاوم به دارو حداقل به دو داروی مؤثر احتیاج می باشد. مهمترین داروهایی که علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بکار گرفته می شوند شامل ریفامپین، ایزونیازید، اتامبوتول، پیرازین آمید و استرپتومایسین است (۳). مشکل عمده در برنامه‌های درمانی سل، سهل‌انگاری بیماران در مصرف دارو است. سهل‌انگاری در مصرف دارو نه تنها باعث شکست درمانی می‌گردد، بلکه باعث ایجاد ارگانیسمهای مقاوم به دارو و انتقال آنها نیز می‌شود.

گسترش سویه های با مقاومت چند دارویی[1] مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک مشکل عمده در بسیاری از قسمتهای دنیا بخصوص در کشورهای با درآمد کم می باشد. امروزه دو روش به عنوان روش‌های استاندارد (Gold Standard) جهت بررسی تست حساسیت دارویی باسیل سل استفاده می‌شود که عبارتند از :

۱. Proportion Method در محیطهای LJ (لونشتاین جانسن) و میدل بروک 7H10

۲. BACTEC 460 System

این دو روش دارای معایب اساسی می‌باشند به طوری که روش نسبی (Proportion Method) نیاز به زمان زیادی دارد. (۶ـ۴ هفته) و روش BACTEC 460 System روش گران قیمت است. بنابراین جهت کاهش این زمان طولانی و کاهش هزینه‌ها نیاز به یکسری روش‌های سریع و ارزان قیمت می‌باشد. استفاده از روشهای استاندارد جهت بررسی حساسیت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بسیار وقت گیر است (۴).

بنابراین نیاز شدید به روشهای سریع و قابل اعتماد جهت تعیین حساسیت دارویی می باشد. در این مطالعه از روش آلامار بلو (روش رنگ سنجی) به عنوان یک روش سریع و ارزان قیمت جهت تعیین سویه های با مقاومت چند دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (مقاوم به ریفامپین و ایزونیازید) استفاده گردید. آلاماربلو یک اندیکاتور (معرف) اکسیداسیون ـ احیاء است که در حالت اکسیداسیون آبی‌رنگ بوده و پس از احیاء شدن توسط باکتری به رنگ صورتی در می‌آید. بنابراین در صورت رشد باکتری در محیط کشت مایع میدل بروک 7H9 حاوی آلامار بلو و آنتی بیوتیک رنگ محیط کشت از آبی به صورتی تغییر پیدا می کند که نشان دهنده مقاوم بودن باکتری به آنتی بیوتیک می باشد. در غیر این صورت باکتری به دارو حساس است (عدم تغییر رنگ محیط کشت). در نهایت این روش با روش نسبی (روش استاندارد بررسی حساسیت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) مقایسه گردید.

روش تحقیق

سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس: این مطالعه به صورت تجربی روی ۲۳ نمونه از مرکز تحقیقات ملی بیماریهای ریوی و سل بیمارستان مسیح دانشوری تهران انجام شد. حساسیت دارویی سویه ها به دو داروی ایزونیازید و ریفامپین توسط روش نسبی قبلا در مرکز تحقیقات ملی بیماریهای ریوی و سل مشخص شده بود، که از این تعداد ۱۱ سویه به ریفامپین و ایزونیازید مقاوم و ۱۲ سویه نسبت به این داروها حساس بودند.

آزمایش آلامار بلو: ابتدا رقتهای آنتی‌بیوتیکی ریفامپین ۲ µg/ml و ایزونیازید ۰/۲ µg/ml در محیط 7H9GCbroth [۴/۷ گرم محیط پایه مایع میدل بروک 7H9، ۲۰ میلی‌لیتر گلیسرول ۱۰٪، ۱ گرم Bacto Casitone، ۸۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱۰۰ میلی‌لیتر اولئیک اسید، آلبومین، دکستروز و کاتالاز (OADC)] تهیه شد. از محلول فوق ۱/۶۵ میلی‌لیتر به لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتر منتقل گردید. برای کنترل رشد یا عدم رشد باکتریها از محلول 7H9GCbroth فاقد دارو استفاده شد.

1- Multi-Drug Resistant (MDR)

Archive of SID

www.SID.ir

سپس ۲۵۰ میکرولیتر از مخلوط تازه تهیه شده معرف Alamar Blue×10 و توئین ۸۰ ۱۰٪ با نسبت ۱ به ۱، به لوله‌های حاوی آنتی‌بیوتیکی و کنترل (فاقد آنتی‌بیوتیک) اضافه شد. در تمامی لوله‌های آزمایش ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت باکتریائی 10^{-1} (3×10^{6} CFU/ml) تلقیح گردید.

لوله‌ها در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴ هفته انکوبه شدند و تغییر رنگ محیطها به صورت روزانه طی ۴ هفته قرائت شدند. رشد باکتری در لوله های حاوی دارو (تغییر رنگ آلامار بلو از آبی به صورتی) نشان دهنده مقاومت باکتری به دارو می باشد و در صورت عدم تغییر رنگ لوله ها، حساس بودن باکتری را مشخص می نماید. برای کنترل تغییر رنگ، از محیطهای 7H9GCbroth حاوی آنتی‌بیوتیک و فاقد آنتی‌بیوتیک و باکتری که به آنها ۲۵۰ میکرولیتر Alamar Blue اضافه شده بود استفاده گردید.

یافته ها

در مقایسه با روش نسبی، ۱۱ مورد از ۱۲ مورد، توسط روش Alamar Blue به داروهای ایزونیازید و ریفامپین حساس تشخیص داده شدند. در شکل ۱ حساس بودن باسیل سل به داروی ریفامپین دیده می‌شود. در مقایسه با روش نسبی، ۱۱ مورد از ۱۱ مورد، توسط روش Alamar Blue به داروهای ایزونیازید ریفامپین مقاوم تشخیص داده شدند. در شکل ۲ مقاوم بودن باسیل سل به داروی ریفامپین دیده می‌شود. حساسیت و اختصاصی بودن این روش برای دو داروی ایزونیازید و ریفامپین به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۰٪ بود. در این بررسی همخوانی بسیار خوبی بین روش آلامار بلو و روش نسبی دیده شد (kappa value = 0.93, p<0.001). طی این مطالعه نتایج در مدت ۶ روز حاصل گردید، که این مدت نسبت به روش نسبی (۳۲-۲۸ روز) بسیار کمتر است.

شکل۱: عدم تغییر رنگ آلاماربلو در محیط حاوی ریفامپین (سویه حساس)
C: کنترل مثبت، C_1: کنترل منفی

شکل۲: تغییر رنگ آلاماربلو در محیط حاوی ریفامپین (سویه مقاوم)
C: کنترل مثبت، C_1: کنترل منفی

www.SID.ir

بحث

به طور کلی برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی از روش‌های روتین و روش‌های سریع استفاده می‌شود. روش‌های روتین نیاز به زمان زیادی دارند از جمله این روشها، روش نسبی است که به صورت متداول در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص سل بخصوص در کشورهای در حال توسعه بکار گرفته می‌شوند.

این روش با وجود اینکه از مقبولیت بیشتری برخوردار است ولی دارای معایبی نیز می‌باشد، به طوری که بسیار وقت‌گیر و پرزحمت است، برای بررسی حساسیت دارویی توسط این روش ابتدا نیاز به کشت، جداکردن و سپس انجام حساسیت آنتی بیوتیکی می‌باشد. با توجه به مراحل فوق نیاز به زمان زیادی در حدود ۸ تا ۱۰ هفته دارد. از روش‌های سریع می‌توان به روش رادیومتری و روش‌های مولکولی اشاره نمود، این روشها با توجه به اینکه سریع هستند ولی نیاز به تجهیزات گران قیمت دارند، بنابراین بسیاری از آزمایشگاه‌ها، بخصوص در کشورهای فقیر یا در حال توسعه قادر به استفاده از این روش‌ها نمی‌باشند، پس بکارگیری روش‌هایی که ارزان و سریع باشند مورد نیاز می‌باشد.

فرنیا در سال ۲۰۰۳ به منظور ارزیابی زنده بودن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در نمونه‌های خلط بیماران از آلامارلو استفاده نمود (۵).

در سال ۱۹۹۵ یاجکو و همکاران، از ردیابی Alamar Blue در میکروپلیت به منظور تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده کردند. در مطالعه او همخوانی تفسیری میان ردیابی با روش نسبی تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای ایزونیازید و ریفامپین و اتامبوتول ۹۵٪ و برای استرپتومایسین ۹۴٪ بود (۶).

در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۲ Luz Caviedes جهت بررسی حساسیت دارویی باسیل سل از آزمایش میکروپلیت آلامارلو[1] استفاده نمود و نشان داد که این روش می‌تواند در طول ۶ تا ۷ روز نتایج قابل قبولی ارائه دهد (۷).

همچنین Scott در مطالعه‌ای مشابه در سال ۱۹۹۷ جهت تعیین MIC[2] دارویی باسیل سل از آزمایش MABA استفاده کرد. نتایج او برای تمام نمونه‌ها در طول ۸ روز بدست آمد. او نشان داد که همخوانی و توافق بین MIC بدست آمده توسط MABA و نتایج بدست آمده از سیستم BACTEC460 (روش استاندارد) ۸۷/۶٪ می‌باشد که نتیجه قابل قبولی می‌باشد و می‌توان آن را به عنوان روش آسان و کم هزینه در کشورها در حال توسعه استفاده نمود (۸).

بررسی‌های ما در این مطالعه نشان داد که همخوانی و توافق میان نتایج لوله‌های کشت آلامارلو با روش نسبی تعیین حساسیت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس برای دو داروی ایزونیازید و ریفامپین ۹۱/۳٪ می‌باشد. میانگین مدت زمان برای این بررسی توسط آلامارلو ۶ روز بود، در حالیکه همین زمان در روش نسبی ۳۵ روز بود (P> ۰/۰۱). این گزارش سریع نتایج بوسیله آلامارلو بسیار مفید است و به نظر می‌رسد که روش آلامارلو در تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی، روش سریع و ارزان باشد.

نتیجه گیری

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که ردیابی اکسیداسیون-احیاء، ساده، قابل اعتماد و کم هزینه است که امکان نیاز به روشهای بررسی مقاومت گران قیمت بویژه در آزمایشگاه‌های تشخیص سل با منابع محدود را برطرف می‌نماید. در این مطالعه مشخص گردید که روش رنگ سنجی آلامار بلو میتواند به عنوان یک روش ساده، قابل اعتماد و سریع جهت بررسی حساسیت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بکار رود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از مرکز تحقیقات ملی بیماریهای ریوی و سل بیمارستان مسیح دانشوری تهران و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد می نمائیم.

1- Microplate Alamar Blue Assay (MABA)
2- Minimum Inhibitery Concentration (MIC)

Archive of SID
www.SID.ir

منابع:

1- Grange J.M. Mycobactria and human disease. Lonod; 1996.

2- Friedman Loyd N. Tuberculosis. Current concepts and treatment. Boca Raton, Florida: CRC press LLC; 2001: 1-106.

3- WHO. Global Facts about TB from " Global Tuberculosis control: WHO Report, 2000". http://www.who-int/.

4- WHO. Anti–tuberculosis drug resistance in the world. The WHO/IUA TLD global project on anti–tuberculosis surveillance. Geneva, Switzerland 1997.

5- Farnia P, et al. Bacteriological follow–up of pulmonary tuberculosis treatment: a study with a simple colorimetric assay. Microbes and Infections 2004; 972-976: www.elsevier.com/locate/micinf.

6- Luz Caviedes, et al. Tetrazolium micro plate assay as a rapid and in expensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbial Maryland 2002; 40(5): 1873-74.

7- Scott G, et al. Rapid, low – technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the Micro plate Alamar Blue Assay. J. Clin. Microbial. 1997.

8- Yojko, DMJ, Made MV, Lan caster. Colorimetric method for determining of MIC of antimicrobial agent for M.tuberculosis. J. Clin. Microbiol 1995, 33: 2324-27.

Archive of SID

www.SID.ir