

## تأثیر محیط میدل بروک 7H9 بر کاربرد مواد دارویی ضدسلی حساس به حرارت

عباس علی ایمانی فولادی\*، دکتر مرتضی ستاری\*\*، دکتر کیومرث قاضی سعیدی\*\*\*

### چکیده

بروز مقاومت‌های دارویی سل موجب شده است تا جستجو در زمینه داروهای جدید گسترش یابد. محیط لون اشتاین جانسون به عنوان پایه‌ای برای کشت سویه‌های مایکوپلازما توپریکلوزیس در اکثر نقاط جهان کاربرد دارد. گروهی از مواد ضد میکروبی که در درمان سل کاربرد دارند، به حرارت حساس هستند و نمی‌توان آنها را در محیط لون اشتاین جانسون به کار گرفت. در تحقیق انجام شده با توجه به امکانات اولیه هر آزمایشگاه تحقیقاتی سل، روشی برای سنجش مقاومت دارویی این نوع داروها طراحی و به کار گرفته شد. در این روش تعداد پنج سویه مایکوپلازما توپریکلوزیس مقاوم به دارو جدا شده از بیماران، انتخاب شده و اثر داروهای اصلی برای درمان سل به روش ذکر شده به همراه روش استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج قرائت آنتی‌بیوگرام میانگینی از سه بار تکرار آزمایش بود که نشان‌دهنده این است که مجاورت اولیه مایکوپلازما توپریکلوزیس به مدت ۴۸ ساعت در محیط آبگوشنی میدل بروک 7H9 broth با داروهای ضد سلی و کشت مجدد روی محیط لون اشتاین جانسون فاقد آنتی‌بیوتیک و انکوبه گذاری به مدت ۴۱ روز، اختلاف معناداری با نتایج حاصل از روش استاندارد کشت روی محیط آگار دار میدل بروک 7H9 broth و لون اشتاین جانسون حاوی آنتی‌بیوتیک ندارد.

واژه‌های کلیدی: محیط لون اشتاین جانسون، داروی ضد سلی حساس به حرارت، مایکوپلازما توپریکلوزیس

\* - میکروپلاسماشناس، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اعلیه (عج)، دانشکده پزشکی، گروه میکروپلاسماشناسی، نمابر: ۰۲۱-۸۰۵۵۲۵۲

\*\* - دانشکده تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه آسیب-زیست‌شناسی

\*\*\* - دانشکده علوم پزشکی نوران، دانشکده پزشکی، گروه آسیب-زیست‌شناسی

## مقدمه

سل یکی از قدیمی ترین بیماری های شناخته شده است. این بیماری در دو دهه اخیر مجدداً شایع شده است و تلاش های جدی برای اصلاح برنامه های مبارزه با آن می طلبد (۱). از جمله این تلاش ها کشف داروهای ضدسلی است که برخی از آنها به حرارت حساس می باشند و با روش معمولی آنتی بیوگرام در آزمایشگاه های معمولی قابل انجام نیست. از جمله این داروها آلپسین است که اثر ضدباکتریایی آن اثبات شده است (۲-۴). بروز مقاومت دارویی به خصوص در مقابل داروهای ضد سل چهره این بیماری را وخیم تر کرده است. در حال حاضر مقاومت به یازده داروی ضدسلی هم گزارش شده است (۵و۶). نیاز دستیابی به داروهای جدید به خصوص در زمینه سل یکی از اولویت های بهداشتی جهان است.

در آزمایشگاه های تشخیصی بررسی اثر ضدسلی داروهای حساس به حرارت مورد آزمایش عمدتاً به روش استاندارد از محیط میدل بروک 7H10 agar انجام می شود، در حالی که محیط معمول تشخیصی محیط لون اشتاین جانسون است و این محیط به دلیل آن که در فرایند آماده سازی به حرارت نیاز دارد، مواد دارویی حساس به حرارت نظیر آلپسین را نمی توان به آنها اضافه کرد (۲و۳). در ضمن دوره انکوباسیون طولانی برای رزیت کلنی های مایکوباکتریوم مانع از حصول اطمینان در باره تماس باکتری ها با غلظت مشخصی از ماده ضد میکروبی را مطرح می سازد. بنابراین برای رفع این مشکل از محیط آبتگوشنی میدل بروک 7H9 broth استفاده می شود و با مجاورت اولیه مایکوباکتریوم توپرکلوزیس با دارو در این محیط، مشکل تماس باکتری با غلظت معین دارو تا حد بسیار زیادی مرتفع می شود. برای این کار، به دستگاه اتوماتیک بکتک<sup>۱</sup> نیاز است، تا سرعت رشد باکتری ثبت شود و از سویی دیگر در هر آزمایشگاهی نمی توان چنین امکانات پرخرجی را به کار گرفت. در روش ابداعی جدید از ادغام دو روش بالا برای بررسی حساسیت دارویی سل استفاده شده است. در این روش مشکل تماس باکتری با دارو در مقایسه با محیط لون اشتاین جانسون حل شده ولی امکان رشد باکتری

همچنان بعد از ۴۵ روز وجود دارد. همچنین این روش در کلیه مراکز تحقیقاتی، امکان بررسی فیزیولوژی رشد باکتری را میسر می سازد.

## وسایل و روش ها

### الف) سویه های باکتری

در این تحقیق، از ۵ سویه مایکوباکتریوم توپرکلوزیس مقاوم به داروهای مختلف جدا شده از بیماران ریوی مراجعه کننده به مرکز تحقیقات سل و مرکز بیماری های ریوی مسیح دانشوری تهران همراه با سویه استاندارد H37RV استفاده شد. سویه های جدا شده براساس روش های تشخیصی استاندارد مورد شناسایی قرار گرفتند (جدول ۱).

### ب) نگهداری سویه ها

سویه های جدا شده پس از جداسازی بلافاصله در محیط اسکیم میلک<sup>۲</sup> در شرایط ۸۰- درجه سانتی گراد برای مراحل بعدی نگهداری شدند.

### ج) محیط لون اشتاین جانسون

برای ساختن این محیط از ترکیب تخم مرغ، گلیسرول، آسپاراژین و نشاسته سیب زمینی حاوی سبب مالاشیت استفاده شد (۷).

### د) محیط میدل بروک 7H10 agar

از محیط میدل بروک 7H10 agar ساخت شرکت دیفکوک به ازای هر ۱۸۰ میلی لیتر آن ۲۰ میلی لیتر مکمل غنی کننده OADC (اسید اولئیک - آلبومین گاوی - دکستروز - سیترات) لازم است، بهره گرفته شد (۸). آلپسین (۱ میلی گرم / میلی لیتر) به عنوان داروی حساس به حرارت، در حرارت ۴۵ درجه سانتی گراد قبل از بسته شدن آگار به محیط اضافه شد، چون به دمای بالاتر از ۵۸ درجه سانتی گراد حساس است (۲-۴).

### ه) محیط میدل بروک 7H9 broth

از محیط میدل بروک 7H9 broth ساخت شرکت دیفکوک با افزودن ۲۰ میلی لیتر از مکمل غنی کننده به ازای هر ۱۸۰ میلی لیتر محیط استفاده شد (۸).

جدول ۱. مشخصات سویه‌های انتخاب شده و نتایج آنتی‌بیوگرام به روش استاندارد در محیط میدل بروک 7H10 agar و انکوبه‌گذاری به مدت ۴۱ روز

کد سویه	مشخصات سویه	ریفامپین	ایزونیازید	اتامبوتول	استرپتومايسين	آلیسین (۱ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)
A	H37RV	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
B	جداشده از بیمار	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس
C	جداشده از بیمار	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
D	جداشده از بیمار	مقاوم	حساس	حساس	مقاوم	حساس
E	جداشده از بیمار	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس

جدول ۲. مشخصات سویه‌های انتخاب شده و نتایج آنتی‌بیوگرام به روش استاندارد در محیط لون اشتاین جانسون و انکوبه‌گذاری به مدت ۴۱ روز

کد سویه	مشخصات سویه	ریفامپین	ایزونیازید	اتامبوتول	استرپتومايسين	آلیسین (۱ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)
A	H37RV	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
B	جدایه بیمار	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس
C	جدایه بیمار	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
D	جدایه بیمار	مقاوم	حساس	حساس	مقاوم	حساس
E	جدایه بیمار	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس

جدول ۳. نتایج مجاورت باکتری با آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط میدل بروک 7H9 broth به مدت ۱۲ ساعت

و با ساز روی محیط لون اشتاین جانسون و انکوبه‌گذاری به مدت ۴۱ روز

کد سویه	ریفامپین	ایزونیازید	اتامبوتول	استرپتومايسين	آلیسین (۱ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)
A	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
B	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
C	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
D	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
E	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم

#### و) تهیه رقت‌های آنتی‌بیوتیک‌ها

محیط‌های میدل بروک 7H9 broth و میدل بروک 7H10 broth حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ایزونیازید (۲ میکروگرم در میلی‌لیتر)، ریفامپین (۴ میکروگرم در میلی‌لیتر)، اتامبوتول (۲ میکروگرم در میلی‌لیتر)، ریفامپین (۴ میکروگرم در میلی‌لیتر)، و آلیسین (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مطابق روش استاندارد WHO و CDC در محیط‌های آگاردار میدل بروک 7H10 و آبگوشتی میدل بروک 7H9 تهیه شدند (۹).

#### ز) مجاورت باکتری‌ها با آنتی‌بیوتیک‌ها

پس از رشد هر یک از سویه‌ها روی محیط لون اشتاین جانسون مطابق روش ارائه شده، از کلنی‌های باکتری، رقتی برابر با کدورت لوله شماره یک مک فارلند تهیه گردید و ابتدا روش آنتی‌بیوگرام معمولی طبق روش WHO روی محیط میدل بروک 7H10 و

محیط لون اشتاین جانسون انجام شد (۹). در روش تغییر یافته نیز از لوله شماره یک مک فارلند رقت‌های  $10^{-1}$ ،  $10^{-3}$  و  $10^{-5}$  باکتری در یک میلی‌لیتر تهیه شد و به محیط‌های میدل بروک 7H9 broth حاوی آنتی‌بیوتیک اضافه گردید. پس از تلقیح باکتری‌ها در ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، از محیط‌ها نمونه‌برداری و به منظور حذف آنتی‌بیوتیک از روی باکتری سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد و مجدداً روی محیط لون اشتاین جانسون کشت داده شد تا قدرت رشد و خصوصیات کلنی‌ها روی محیط در طول زمان نگهداری مورد بررسی قرار گیرند. نتایج پس از ۲۴ و ۴۸ روز فرانت شد (جداول ۴ و ۵). نتایج فرانت آنتی‌بیوگرام میانگینی از سه بار تکرار آزمایش به دست آمد.

جدول ۴: نتایج مجاورت باکتری با آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط میدل بروک 7H9 broth به مدت ۲۴ ساعت

و پاساژ روی محیط لون اشتاین جانسون و انکوبه گذاری به مدت ۴۱ روز

کد سویه	ریفامپین	ایزونیازید	اتامپوتول	استرپتومايسين	آلیسین (۱ میلی گرم / میلی لیتر)
A	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
B	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
C	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
D	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
E	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس

جدول ۵: نتایج مجاورت باکتری با آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط میدل بروک 7H9 broth به مدت ۴۸ ساعت

و پاساژ روی محیط لون اشتاین جانسون و انکوبه گذاری به مدت ۴۱ روز

کد سویه	ریفامپین	ایزونیازید	اتامپوتول	استرپتومايسين	آلیسین (۱ میلی گرم / میلی لیتر)
A	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
B	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس
C	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
D	مقاوم	حساس	حساس	مقاوم	حساس
E	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس

#### یافته‌ها

در این روش پس از مجاورت آنتی‌بیوتیک‌ها با مایکوباکتریوم به مدت ۱۲ ساعت معلوم شد که سویه‌های A و C نسبت به آنتی‌بیوگرام به روش استاندارد هیچ‌گونه تغییری ندارند، ولی سویه B نسبت به آلیسین مقاوم بود و نیز سویه‌های D و E به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت داشتند (جدول ۳). در جدول ۴ تغییرات مقاومتی سویه E پس از گذشت ۲۴ ساعت مجاورت اولیه نتایج مشابه با آنتی‌بیوگرام استاندارد را بروز داد، در حالی که سویه B و D همچنان مقاوم باقی ماند. در جدول ۵ نتایج به دست آمده پس از گذشت ۴۸ ساعت مجاورت سویه‌ها با آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط مایع را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده کاملاً مشابه نتایج استاندارد بود. برای حصول اطمینان قطعی از نتایج به دست آمده، مدت مجاورت تا ۵۶ ساعت دیگر نیز ادامه یافت. این نتایج، مشابه زمان ۴۸ ساعت بود. در واقع سویه B که در حالت استاندارد به ۴ دارو مقاوم و به آلیسین حساس بود و نیز سویه D که در حالت استاندارد به ۲ دارو مقاوم بود، در این مدت نیز نتیجه مشابه با روش استاندارد داشتند.

#### بحث

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس باکتری اسیدفاست می‌باشد که دوره تقسیمات سلولی آن در خارج از بدن حدود ۲۰-۱۷ ساعت گزارش شده است (۷). افزودن آنتی‌بیوتیک‌ها به محیط کشت لون اشتاین جانسون همواره این سؤال را مطرح می‌سازد که در طول دوره انکوباسیون ۴۱ روزه تا زمان قرانت نتایج، پایداری آنتی‌بیوتیک ثابت است یا خیر؟ در مطالعه حاضر با توجه به تماس مستقیم اولیه دارو با باکتری در محیط میدل بروک 7H9 برات این مشکل مرتفع می‌گردد. در ضمن معلوم شد که داروهای ضدسلولی در مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت قادر به تأثیر بر سویه مقاوم به دو دارو نیستند. ولی پس از گذشت ۴۸ ساعت نتایج مشابه با روش استاندارد به دست می‌آید که با نتایج دلاها و گاراگوس مطابقت دارد (۴). پس می‌توان گفت زمان تقسیم سلولی مایکوباکتریوم‌ها در میزان اثر دارو بر باکتری تأثیر به‌سزایی دارد. در مورد مواد ضد میکروبی حساس به حرارت نیز، عملاً امکان استفاده از محیط لون اشتاین جانسون وجود ندارد زیرا این محیط برای انعقاد خود به حرارت

محیط نیست و طبعاً سؤالی که در زمینه نیمه عمر آنتی‌بیوتیک در این محیط کشت در سال ۱۹۸۴ به وسیله میتی سیون (۶) مطرح بود با کاربرد این روش مرتفع می‌شود. در انتها کاربرد روش جدید، امکان آزمایش مواد ضد میکروبی حساس به حرارت را با حداقل امکانات موجود در آزمایشگاه‌های تشخیصی راه می‌سازد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقایان دکتر علی اکبر ولایتی و دکتر محمدرضا مسجدی مسؤولین محترم مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی که در جهت پیشبرد این پژوهش از هیچ کوششی دریغ نفرموده‌اند، متشکریم.

۹۰ درجه سانتی‌گراد احتیاج دارد (۴۷). در روش اصلاح شده فعلی دوره مجاورت با کتری با ماده ضد میکروبی به ۴۸ ساعت تخمین زده شد که به عبارت دیگر با احتساب زمان فاز سکون با کتری (Lag phase) حداقل با کتری دو بار تقسیم می‌شود و احتمال برخورد با ماده ضد میکروبی و اثرپذیری آن در مراحل مختلف تکثیر با کتری وجود خواهد داشت. از طرفی با ادامه زمان از ۴۸ ساعت به ۵۶ ساعت نتایج تغییری نکرده است. ضمن آن که در طول ۴۸ ساعت نیمه عمر آنتی‌بیوتیک‌ها نسبت به طول زمان ۴۱ روز بیشتر است و در طول زمان انکوباسیون با کتری در محیط لون اشتاین جانشین به این روش، دیگر نیازی به آنتی‌بیوتیک در

### منابع

- ۱ - رهبر محمد. بررسی مقاومت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در استان آذربایجان غربی و ارزیابی نقش مقاومت در سرعت رشد و پروتانس باکتری. دانشکده پزشکی. دانشگاه تربیت مدرس. رساله جهت اخذ درجه دکتری ۱۳۷۵.
- ۲ - ایمانی فولادی عباس‌علی. بررسی اثر عصاره کلروفومی حاوی آلیسین سیر بر روی مایکوباکتریوم‌های جدا شده از بیماران ریوی در شرایط آزمایشگاهی. دانشکده بهداشت. دانشگاه علوم پزشکی تهران. پایان نامه کارشناسی ارشد ۱۳۷۶. صص ۶۸-۵۹.
- 3 - Company Merk Index. Allicin. 1996; pp: 44.
- 4 - Delaha EC. Garagus VF. Inhibition of mycobacterium by garlic extract (Allicin). Antimicrob Agent Chemother. 1985; (27): 485-8.
- ۵ - قاضی سعیدی کیومرث و همکاران. گزارش وضعیت مقاومت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نسبت به داروهای ضد سل. مجموعه مقالات در باره سل کنگره سراسری سل کشور. رشت سال

۱۳۷۴. صص: ۴۱-۴۰.

6 - Mithison DA. Drug resistance in mycobacterium. Br Med Bull. 1984 (4): 74-90.

7 - RC Good TM. Staphylococcus. Leslie Collier-Albertbalous, Max Sussman, Tapley and Wildon. Microbiology and Microbial Infection. vol 2. 9th Ed. Oxford - New York. Junwiely. 1999; pp: 549-71.

8 - Ellenjo B, Sydney M. Fingold Bailey and Scotts. Formulas and preparation of culture media and reagents. Diagnostic Microbiology. 8th Ed. Mosby Company. 1996; p: A16-A17.

9 - PAHO/WHO. Advisory committe on tuberculosis. Manual of technical standards and procedures for tuberculosis bacteriology. Technical Note. 1983; 5-11.