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

عباس‌علی 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 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در اکثر نقاط جهان کاربرد دارد. گروهی از مواد ضدمیکروبی 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 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس 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 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به مدت ۴۸ ساعت در محیط آبگوشتی 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 آگاردار میدل بروک 7H9 broth و لون اشتاین جانسون حاوی آنتی‌بیوتیک ندارد.

واژه‌های کلیدی : محیط لون اشتاین جانسون ، داروی ضد سلی حساس به حرارت ، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

---

* - میکروب‌شناس ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) ، دانشکده پزشکی ، گروه میکروب‌شناسی ، نمابر : ۸۰۵۵۷۵۲-۰۲۱

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

*** - دانشگاه علوم پزشکی تهران ، دانشکده پزشکی ، گروه آسیب-زیست‌شناسی

مقدمه

سل یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های شناخته شده است. این بیماری در دو دهۀ اخیر مجدداً شایع شده است و تلاش‌های جدی برای اصلاح برنامه‌های مبارزه با آن می‌طلبد (۱). از جمله این تلاش‌ها کشف داروهای ضدسلی است که برخی از آنها به حرارت حساس می‌باشند و با روش معمولی آنتی‌بیوگرام در آزمایشگاه‌های معمولی قابل انجام نیست. از جمله این داروها آلیسین است که اثر ضدباکتریایی آن اثبات شده است (۴-۲).

بروز مقاومت دارویی به خصوص در مقابل داروهای ضد سل چهره این بیماری را وخیم‌تر کرده است. در حال حاضر مقاومت به یازده داروی ضدسلی هم گزارش شده است (۶و۵). نیاز دستیابی به داروهای جدید به خصوص در زمینه سل یکی از اولویت‌های بهداشتی جهان است.

در آزمایشگاه‌های تشخیصی بررسی اثر ضدسلی داروهای حساس به حرارت مورد آزمایش عمدتاً به روش استاندارد از محیط میدل بروک 7H10 agar انجام می‌شود، 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 آلیسین را نمی‌توان به آنها اضافه کرد (۳و۲). در ضمن دوره انکوباسیون طولانی برای رؤیت کلنی‌های مایکوباکتریوم مانع از حصول اطمینان در باره تماس باکتری‌ها با غلظت مشخصی از ماده ضدمیکروبی را مطرح می‌سازد. بنابراین برای رفع این مشکل از محیط آبگوشتی میدل بروک 7H9 broth استفاده می‌شود و با مجاورت اولیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با دارو در این محیط، مشکل تماس باکتری با غلظت معین دارو تا حدبسیار زیادی مرتفع می‌شود. برای این کار، به دستگاه اتوماتیک بکتک[1] نیاز است، تا سرعت رشد باکتری ثبت شود و از سویی دیگر در هر آزمایشگاهی نمی‌توان چنین امکانات پرخرجی را به‌کار 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 می‌سازد.

وسایل و روش‌ها

الف) سویه‌های باکتری

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

ب) نگهداری سویه‌ها

سویه‌های جدا شده پس از جداسازی بلافاصله در محیط اسکیم میلک[2] در شرایط ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای مراحل بعدی نگهداری شدند.

ج) محیط لون اشتاین جانسون

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

د) محیط میدل بروک 7H10 agar

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

ه) محیط میدل بروک 7H9 broth

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

---

1 Bactec 2 - Skim milk

جدول ۱ : مشخصات سویه‌های انتخاب شده و نتایج آنتی‌بیوگرام به روش استاندارد در محیط میدل بروک 7H10 agar و انکوبه گذاری به مدت ۲۱ روز

کدسویه	مشخصات سویه	ریفامپین	ایزونیازید	اتامبوتول	استرپتومایسین	آلیسین (۱میلی‌گرم/میلی‌لیتر)
A	H37RV	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
B	جداشده‌ازبیمار	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس
C	جداشده‌ازبیمار	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
D	جداشده‌ازبیمار	مقاوم	حساس	حساس	مقاوم	حساس
E	جداشده‌ازبیمار	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس

جدول ۲ : مشخصات سویه‌های انتخاب شده و نتایج آنتی‌بیوگرام به روش استاندارد در محیط لون اشتاین جانسون و انکوبه گذاری به مدت ۲۱ روز

کدسویه	مشخصات سویه	ریفامپین	ایزونیازید	اتامبوتول	استرپتومایسین	آلیسین (۱میلی‌گرم/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 پاساژ روی محیط لون اشتاین جانسون و انکوبه گذاری به مدت ۲۱ روز

کدسویه	ریفامپین	ایزونیازید	اتامبوتول	استرپتومایسین	آلیسین (۱میلی‌گرم/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 (۲میکروگرم در میلی‌لیتر) ، ریفامپین (۴میکروگرم در میلی‌لیتر) ، اتامبوتول (۲میکروگرم در میلی‌لیتر) ، ریفامپین (۴میکروگرم در میلی‌لیتر) ، و آلیسین (۱میلی‌گرم 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 هریک 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 قرائت شد (جداول ۵و۴و۳و۲). نتایج قرائت 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	اتامبوتول	استرپتومایسین	آلبسین (۱میلی‌گرم/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	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	اتامبوتول	استرپتومایسین	آلبسین (۱میلی‌گرم/میلی‌لیتر)
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 آلبسین 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 ۴دارو مقاوم و به آلبسین 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 قرائت نتایج، پایداری آنتی‌بیوتیک ثابت است یا خیر؟ در مطالعه حاضر با توجه به تماس مستقیم اولیه دارو با باکتری در محیط میدل بروک 7H9 براث این مشکل مرتفع می‌گردد. در ضمن معلوم شد که داروهای ضدسلی در مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت قادر به تاثیر بر سویه مقاوم به دو دارو نیستند. ولی پس از گذشت ۴۸ ساعت نتایجی 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 به سزایی دارد. در مورد مواد ضدمیکروبی حساس به حرارت نیز، عملاً امکان استفاده از محیط لون اشتاین جانسون وجود ندارد زیرا این محیط برای انعقاد خود به حرارت

۹۰ درجه سانتی‌گراد احتیاج دارد (۷و۴). در روش اصلاح شده فعلی دوره مجاورت با کتری با ماده ضدمیکروبی به ۴۸ ساعت تخمین زده شد که به عبارت دیگر با احتساب زمان فاز سکون باکتری (Lag phase) حداقل باکتری دو بار تقسیم می‌شود و احتمال برخورد با ماده ضدمیکروبی و اثرپذیری آن در مراحل مختلف تکثیر باکتری 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 باکتری در محیط لون اشتاین جانسون به این روش ، دیگر نیازی به آنتی‌بیوتیک در محیط نیست و طبعاً سؤالی که در زمینه نیمه عمر آنتی‌بیوتیک در این محیط کشت در سال ۱۹۸۴ به وسیله میتی‌سیون (۶) مطرح بود با کاربرد این روش مرتفع می‌شود. در انتها کاربرد روش جدید ، امکان آزمایش مواد ضدمیکروبی حساس به حرارت را با حداقل امکانات موجود در آزمایشگاه‌های تشخیصی را مهیا 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.

منابع

۱ - رهبر محمد. بررسی مقاومت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در استان آذربایجان غربی و ارزیابی نقش مقاومت در سرعت رشد و ویرولانس باکتری . دانشکده پزشکی . دانشگاه تربیت مدرس . رساله جهت اخذ درجه دکتری ۱۳۷۵.

۲ - ایمانی فولادی عباس‌علی. بررسی اثر عصاره کلروفرمی 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 mycobactrium 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 ضدسل . مجموعه مقالات در باره سل کنگره سراسری سل کشور . زشت 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.