

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

دکتر محمد نجفی مصلح<sup>۱\*</sup>، دکتر کیومرث قاضی سعیدی<sup>۲</sup>، دکتر پرینا فرنی<sup>۳</sup>، دکتر فروزان محمدی<sup>۴</sup>، دکتر علی‌اکبر ولایتی<sup>۵</sup>

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 میکوباکتریولوژی 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 susceptibility 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-Hassel 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, etambutol, 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-Hassel 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: ۰۹۱۸۸۱۳۱۱۸۹-۰۹۱۱۱-۸۲۷۶۲۹۹-۸۱۱  
پست الکترونیک: n\_mosleh@yahoo.com

## 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 ارگانیزم در بدن بیمار بسیار مؤثر است. بر خلاف سایر داروهای ضدسلی فعال بودن پیرازینامید در pH اسیدی (در صورتی که pH مناسب برای رشد ارگانیزم 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 ارگانیزم در pH برابر با ۶ همانند شرایط pH برابر با ۶/۸ تکثیر نماید. با استفاده از معادله هندرسن- هسل باخ که فعالیت آنزیم- سوپسترا 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 علاوه بر پیرازینامید در برابر سایر داروی خط اول ضدسل یعنی ریفامپین، ایزونیازید، اتامبوتول و استرپتومايسين 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 ارگانیزم 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.

کل واژگان: 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 ارگانیزم 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<sup>۱</sup> بیشتر مؤثر می‌باشد (۸-۶). بر خلاف سایر داروهای ضدسلی فعال بودن پیرازینامید در pH اسیدی (در صورتی که pH مناسب برای رشد ارگانیزم 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 ارگانیزم 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<sup>۲</sup>، 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

<sup>۱</sup> Mycobacterium Tuberculosis (MTB)

<sup>۲</sup> Bactec

ج- طرز تهیه محیط کشت نهایی: ابتدا هر چهار ظرف حاوی محیط پایه اتوکلاو شده را در داخل بن‌ماری  $54^{\circ}\text{C}$  قرار می‌دهیم تا حرارت آنها به  $54^{\circ}\text{C}$  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 و ۴ مشخص می‌کنیم. به هر یک از ارلن‌ها ۲۰ ml سرم حیوانی استریل اضافه می‌کنیم. به ارلن شماره ۱، مقدار ۲۰ ml از محلول پیرازینامید با غلظت ۱۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به ارلن شماره ۲، مقدار ۲۰ ml از محلول پیرازینامید با غلظت ۹۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و به ارلن شماره ۳، مقدار ۲۰ ml از محلول پیرازینامید با غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه نموده و به ارلن شماره ۴، به جای محلول دارویی ۲۰ ml آب مقطر دیونیزه استریل اضافه می‌کنیم. سرم حیوانی و محلول دارویی را می‌توان 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  $15 \times 100$  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  $54^{\circ}\text{C}$  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 منقعد 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<sup>۲</sup> (درصد مناسب توئین ۸۰) و محرک رشد کشت می‌دهیم. همچنین با استفاده از یک

(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 اتوکلاو 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 غلظت‌های 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 $\mu\text{g/ml}$	۶۲/۵ ml	۷۵ mg
۹۰۰ $\mu\text{g/ml}$	۶۲/۵ ml	۵۷/۲۵ mg
۳۰۰ $\mu\text{g/ml}$	۶۲/۵ ml	۱۷/۵ mg

<sup>1</sup> FCS fetal Calf serum

<sup>2</sup> Clamp

سپس تعداد کلنی‌ها در لوله‌های با رقت‌های تلقیح  $1 \times 10^{-1}$ ،  $1 \times 10^{-3}$  و  $1 \times 10^{-5}$  خوانده شده و ثبت می‌گردد. 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  $1 \times 10^{-1}$ ،  $1 \times 10^{-3}$  و  $1 \times 10^{-5}$  تلقیح با توجه به فرمول زیر محاسبه می‌شد و بر اساس روش تناسب سویه مورد بررسی حساس و یا مقاوم محسوب می‌شد.

$$\frac{\text{تعداد کلنی در حضور آنتی‌بیوتیک}}{\text{تعداد کلنی در غیاب آنتی‌بیوتیک}} \times 100$$

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 ارگانسیم 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<sup>۳</sup> 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، ایزونیاژید، استرپتوماکسین، 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

استیرر پلیت و مگنت مناسب از ابتدا کشت با سرعت RPM ۱۲۰ در حالت چرخش قرار می‌گیرد تا از بروز توده جلوگیری گردد و تعداد تلقیح ارگانسیم 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  $1 \times 10^{-1}$ ،  $1 \times 10^{-3}$  و  $1 \times 10^{-5}$  تهیه می‌نماییم.

مقدار ml ۰/۱ از هر یک از  $1 \times 10^{-1}$ ،  $1 \times 10^{-3}$  و  $1 \times 10^{-5}$  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  $\text{CO}_2$  (۷٪) و دمای  $37^\circ\text{C}$  به مدت ۲۱ روز انکوبه می‌کنیم.

توجه: اضافه شدن ناخواسته هرگونه مواد اضافی (مثل قطعات محیط لونشتاین جانسون) به همراه تلقیح سوش باعث بهم خوردن pH محیط کشت حاوی دارو گردیده و نتایج را به شدت 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، استرپتوماکسین، اتامبوتول و ایزونیاژید نیز مورد بررسی قرار گرفت که برای جلوگیری از طولانی شدن مطلب از ذکر جزئیات روش خود داری می‌شود و فقط نتایج در بخش مربوطه ارائه خواهد شد.

## II- ارگانسیم‌های 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، ایزونیاژید، استرپتوماکسین 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<sup>۲</sup>.

**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.

<sup>1</sup> Stirrer Plate

<sup>2</sup> Proportion Method

<sup>3</sup> Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

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.

دارو، سویه‌های مقاوم به چهار دارو و سویه‌های مقاوم 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 ۰.۶٪ از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس جدا شده از بیماران به پیرازینامید مقاوم می‌باشد و

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 (فراوانی 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 ارگانیزم 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 ارگانیزم 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 مونسیت‌ها و ماکروفاژها بر علیه ارگانیزم 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 بک تک 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 می‌شود. بعد از ارزیابی 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 (۲۴-۲۱).

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 یا سرم گوساله<sup>۳</sup> محیط 7H12 آن چنان غنی و مناسب می‌شود که حتی اغلب سویه‌های MTB در این محیط در pH برابر با 6-6.2 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 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 ارگانسیم و در 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 گدکننده آنزیم پیرازینامیداز در DNA کروموزومی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس می‌باشد، و نتایج به دست آمده در این روش بایستی با تعیین 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 ارائه شده در این تحقیق به دو طریق: با سویه‌های استاندارد حساس و مقاوم به پیرازینامید و با کشت موازی ارگانسیم‌های تست و کنترل در محیط کشت بدون دارو به شدت کنترل گردیده است، نتایج حاصل از روش ارائه

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 نه 100µg/ml که در این تکنیک استفاده شده است).

ب- فاکتور دیگری که نتایج بک‌تک را تحت تأثیر قرار می‌دهد میزان تلقیح ارگانسیم است. ژانگ 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 مقدر 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، ۲۶، ۲۷).

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 گدکننده آنزیم پیرازینامیداز نیز تعیین گردید (۱، ۳۲، ۳۳). با تکنیک‌های مولکولی از جمله روش‌های PCR - SSCP؛ ذات 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

<sup>3</sup> Fetal bovine serum (FBS)

<sup>4</sup> Fetal calf serum (FCS)

<sup>5</sup> Henderson-Hesselbach

<sup>1</sup> Critical concentration

<sup>2</sup> Zhang

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 مسئولین 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.

<sup>1</sup> Multi drugs tuberculosis MDR- TB

<sup>2</sup> Extensively drugs resistance tuberculosis XDR-TB

## References

- 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.
- Scarpato 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.
- Fuursted K. Comparison of growth and susceptibility testing of pyrazinamide in different Bactec media using strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *APMIS* 1993;101(2):154-9.
- 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.
- Hewlett D, Horn D, Alfalla C. Drug-resistant tuberculosis: inconsistent results of pyrazinamide susceptibility testing. *JAMA* 1995 273:916–917
- Takemasa T, Hamasaki S, Hirano K, et al Simple fibroblast-based assay to test the pyrazinamide susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* antimicrobial agents and
- 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.
- Glenn P, Morlock, Jack T. Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000: 2291–2295.
- Scorpio A, Zhang A. Mutations of *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in *tubercle bacillus*. *Nat. Med.* 1996; 2: 662–667.
- Mestdagh M, Fontyne P, Rfalini R. Relationship between Pyrazinamide Resistance, Loss of Pyrazinamidase Activity, and Mutations in the *pncA* Locus in Multidrug-Resistant results of pyrazinamidase test. *Rinsho Byori* 1998; 46(5): 479-85.
- 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
- Heifets L, Sanches T. new agar medium for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J clinical microbiol*, 2000:1498-1501.
- 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.
- 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.
- 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

- 16- CHENG JI, Thibert L, Heifets L, et al. *pncA* Mutations as a Major Mechanism of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Spread of a Monoresistant Strain in Quebec, Canada Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2000; 528–532.
- 17- Editorial note. susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide J Med Microbiol 2002; 51: 11-12.
- 18- Margaret M., Edward P. Desmond, 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 Susceptibility of *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 chemotherapy, 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 J 2002; 20: Suppl. 36, 78s–86s
- 32- Somoskovi A, Wade MM, Sun Z, et al. Iron enhances the antituberculous activity of pyrazinamide. J of Antimicrobial chemotherapy 2004; 53: 192–196.
- 33- Butler WR, Kilburn JO. Improved method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. J Clin microbiol 1982; 16:1106–1109.
- 34- Raynaud C, Antoinette M, Lane e, et al. Mechanisms of pyrazinamide resistance in *Mycobacteria*: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity *Microbiology*, 1999; 145: 1359–1367.