مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۱۷۶/هفته دوم فروردین ماه ۱۳۹۱

مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۱۵

بررسی حساسیت ایزوله‌های مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس نمونه‌های آب شهراصفهان به داروهای ضد مایکوباکتریایی رایج با استفاده از روش E-test

انسیه ساریخانی[۱]، دکتر بهرام نصر اصفهانی[۲]، نفیسه السادات حسینی[۳]، تهمینه نریمانی[۳]

چکیده

مقدمه: مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس که پیش‌تر تنها به عنوان مایکوباکتریوم‌های محیطی شناخته می‌شدند، به دلیل افزایش بیماری‌های نقص ایمنی در دهه‌های اخیر اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده‌اند. بنابراین بررسی حساسیت باکتری مایکوباکتریوم در جهت درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های مایکوباکتریال از اهمیت بسزایی برخوردار است.

روش‌ها: در این مطالعه نمونه‌های آب از منابع مختلف اصفهان جهت بررسی وجود مایکوباکتریوم‌های محیطی تهیه و کشت داده شد. پس از تعیین گونه، برای تعیین حساسیت ۱۴ ایزوله‌ی مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس (Non tuberculosis mycobacterium یا NTM) از روش E-test (Epsilometer test) استفاده گردید.

یافته‌ها: میزان حداقل غلظت مهاری (Minimal inhibitory concentration یا MIC) برای ۸ آنتی‌بیوتیک رایج علیه ایزوله‌های مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد مقاومت گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم غیر توبرکلوز نسبت به ریفامپین و ایزونیازید بالا و نسبت به سایر داروها بسته به گونه‌ی باکتری متفاوت می‌باشد.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم غیر توبرکلوز، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، E-test

مقدمه

مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوز (NTM یا Non tuberculosis mycobacterium) به صورت گسترده‌ای در محیط پراکنده هستند و می‌توانند از منابع طبیعی مختلفی مانند آب جدا شوند (۴-۱). آن ها می‌توانند کلونیزه شده، گاهی اوقات باعث ایجاد عفونت در انسان ها شوند. بیماری های مرتبط با این باکتری های فرصت طلب به طور فزاینده‌ای در حال گسترش است (۶-۵).

این پاتوژن‌های نوپدید می‌توانند مشکلات جدی به خصوص در بیماران دچار ضعف ایمنی ایجاد کنند. مطالعات مختلفی بر روی الگوهای حساسیت NTM انجام شده است که همه‌ی آن‌ها بر لزوم تعیین مقاومت این باکتری که منجر به کاهش مرگ و میر ناشی از عفونت‌های مایکوباکتریایی می گردد، تأکید می‌کنند. روش های متفاوتی از قبیل آگار دایلوشن، آگار دیسک و دیسک دیفیوژن جهت تعیین حساسیت MTN پیشنهاد شده است (۱۰-۷) که اغلب محدود به روش کیفی، گران قیمت، پر زحمت و زمان‌بر هستند و در بسیاری از موارد به تجربه‌ی بالا برای تفسیر نتایج نیاز

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر بهرام نصر اصفهانی
Email: nasr@hlth.mui.ac.ir

www.mui.ac.ir

دارند. بنابراین یک تکنیک آسان و به صرفه برای آزمایشگاه هایی که امکانات محدودتری دارند و فاقد افراد مجرب در این زمینه هستند، نیاز می باشد. E-test (Epsilometer test)، یک روش حساسیت سنجی کمی برای باکتری های مختلف است. نشان داده شده است که روش E-test امکان انجام سریع‌تر و راحت‌تر آنتی‌بیوگرام را نسبت به روش هایی نظیر آگار دایلوشن فراهم می‌کند (۱۱، ۸-۷). این تکنیک بر اساس تعیین حساسیت باکتری نسبت به غلظت کمی رو به افزایش یک آنتی‌بیوتیک بر روی یک نوار پایه‌ریزی شده است.

در این مطالعه برای ارزیابی حساسیت ۱۴ ایزوله NTM از منابع مختلف آب اصفهان و تعیین الگوی مقاومت آن‌ها از نوارهای مدرج E-test استفاده شد.

روش‌ها

۱۴ نمونه‌ی NTM از ۸۵ نمونه‌ی آب که از منابع مختلف شامل آب لوله کشی غیر شرب (۱۴/۱ درصد)، آب فواره‌های سطح شهر (۱۱/۸ درصد)، آب لوله کشی شرب (۱۴/۱ درصد)، آب سرد کن (۱۱/۸ درصد)، یونیت‌های دندان‌پزشکی (۱۰/۵ درصد)، استخر شنا (۸/۲ درصد)، همودیالیز (۸/۲ درصد)، آب معدنی (۸/۲ درصد)، رودخانه (۷/۱ درصد) و آبگرم‌کن(۵/۹ درصد) جمع‌آوری شده بود، جدا شدند. ۵۰۰ سی سی از نمونه‌ها از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. فیلترها به طور مستقیم به محیط کشت Middlebrook-7H10 شامل ۱۵ درصد OADC (Oleic acid, albumin, dextrose, catalase) انتقال داده شدند. پلیت ها هفته ای یک بار تا ۸ هفته برای مشاهده‌ی کلنی بررسی شدند. هنگامی که کلنی ها ظاهر شدند، رنگ آمیزی اسیدفست بر روی کلنی انجام گردید و کلنی های اسیدفست به محیط کشت Lowenstein–Jensen (LJ) تلقیح شدند و در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. ایزوله‌های مایکوباکتریوم توسط روش‌های مرسوم فنوتیپی و بیوشیمیایی شامل رشد در ۲۵ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، تولید پیگمان، تست کاتالاز نیمه کمی، هیدرولیز توئین ۸۰، آریل سولفاتاز (۳ و ۱۴ روزه)، کاتالاز مقاوم به حرارت (۶۸ درجه ی سانتی گراد، pH = ۷)، پیرازین آمیداز (۴ و ۷ روزه)، اوره‌آز، احیای نیترات و مورفولوژی کلنی شناسایی شد. نتایج توسط تکنیک ملکولی hsp65-RFLP تأیید شد. از سویه ی استاندارد *M. smegmatis* (PTCC 1307) و *M. fortuitum* (ATCC 6841) در تمام مراحل به عنوان کنترل کیفی استفاده گردید.

برای انجام E-test، کلنی‌های تازه از کشت باکتری بر روی محیط LJ به PBS استریل برای تهیه‌ی سوسپانسیون با کدورت استاندارد ۱ مک فارلند انتقال یافت. پلیت نهایی با رقت 10^9 CFU (Colony-forming units) در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به سطح دیش با ۱۰ سانتی متر قطر حاوی محیط مولر هنیتون آگار تلقیح شد. این محیط با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سیکوهگزامید و ۱۰ درصد OADC بدون گلیسرول غنی شد. دو نوار E-test در سطح محیط هر پلیت قرار داده شد. پلیت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. MIC، ۷۲ ساعت پس از گرماگذاری مورد خوانش و بررسی قرار گرفت. برای باکتری های کند رشدتر ۷۲ ساعت پس از دیده شدن کلنی ها نتیجه خوانده شد و پلیت ها حداکثر ۴ هفته برای مشاهده ی کلنی گرماگذاری شدند. نتایج MIC (Minimal inhibitory concentration) بر اساس

www.mui.ac.ir

دستور سازنده و در نظر گرفتن قطر هاله‌ی ممانعت از رشد در اطراف نوار مدرج که نشان دهنده‌ی غلظت مؤثر آنتی‌بیوتیک بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر است، گزارش گردید. از سویه *E. coli* (ATCC 25922) به عنوان کنترل کیفی استفاده شد.

از نقطه ی تمایز حساسیت و مقاومت در برابر سیپرو فلوکساسین و ایمی‌پنم از سایر مطالعات که بر روی باکتری‌های هوازی غیر از هموفیلوس آنفولانزا و نایسریا گونوره انجام شده است، استفاده گردید (جدول ۱). همچنین برای آمیکاسین، سفوکسی‌تین، کلاریترومایسین و داکسی‌سیکلین همان گونه که در سایر مقالات گزارش شده است، استفاده گردید (۱۱، ۸-۷).

یافته‌ها

۸ آنتی‌بیوتیک آمیکاسین (AK)، ریفامپین (RI)، سیپرفلوکساسین (CI)، اتامبوتول (EB)، تتراسایکلین (TS)، داکسی‌سیکلین (DC)، آزیترومایسین (AZ) و ایزونیازید (IZ) جهت تست تعیین حساسیت دارویی برای ۱۴ ایزوله ی NTM از منابع مختلف استفاده شد. مقاومت گونه‌های NTM به ریفامپین، ایزونیازید و اتامبول بالا بود؛ به طوری که ۷۱ درصد از گونه‌ها به ایزونیازید، ۶۴ درصد به ریفامپین، ۵۷ درصد به اتامبوتول، ۳۵ درصد به تتراسایکلین، ۱۴ درصد به آزیترو مایسین و ۷/۱ درصد به آمیکاسین مقاوم بودند (شکل ۱).

نتایج به دست آمده در این بررسی در خصوص میزان MIC ایزوله‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده در جدول ۱ خلاصه شده است. ۳۵/۷ درصد از باکتری‌های NTM متعلق به M. chelonae like organism و M. chelonae، ۲۱/۴ درصد M. fortuitum، ۱۴/۲ درصد M. mucogenicum، M. smegmatis و ۷/۱ درصد M. duvalii و M. flavescense بود.

شکل ۱. تست حساسیت به داروی آمیکاسین ایزوله‌ی مایکوباکتریوم اسمگماتیس با استفاده از روش E-test

بحث

تعیین الگوی مقاومت NTMبه عنوان یک تهدید جدید در تشخیص کلینیکی، موضوع حیاتی به شمار می‌رود (۱۰). درمان آنتی‌بیوتیکی برای NTM اغلب مشابه درمان مایکوباکتریوم توبرکلوز است (۷). E-test دقت، سرعت و سهولت مورد نیاز را جهت این هدف مهیا می‌کند (۸-۷). در این مطالعه E-test بر روی ۱۴ گونه‌ی NTM انجام گرفت.

در زمینه ی مقاومت مایکوباکتریوم ها به تفکیک گونه‌ها برای اظهار نظر در این باره، نیاز به داده‌های گسترده تر و تعداد باکتری بیشتری است، اما بررسی اجمالی نمونه‌های مورد مطالعه و مقایسه‌ی آن‌ها با جداول تعیین کمی مقاومت، نشان داد که مقاومت در م.فورچوئیتوم نسبت به سایر گونه‌ها بالاتر بود و مقاومت مطلق به آمیکاسین تنها در این گونه دیده شد و مقاومت به آزیترومایسین نیز از سایرین بیشتر بود.

www.mui.ac.ir

جدول ۱. میزان **MIC** آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در مطالعه بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر و گونه‌های ایزوله شده

شماره	گونه‌ی مایکوباکتریوم	AK	RI	CI	EB	TS	DC	AZ	IZ
۱	*M. chelonae like organism*	۰/۱۲۵	R	۰/۷۵	۰/۰۶۴	۰/۰۳۲	۰/۰۹۴	۰/۵	R
۲	*M. chelonae*	۰/۵	۱/۵	۰/۱۹	R	۰/۰۰۶	۰/۰۶۴	۰/۵	R
۳	*M. chelonae like organism*	۱/۵	۰/۰۰۲	۰/۲۵	R	۰/۰۲۳	۰/۰۴۷	۱/۵	R
۴	*M. mucogenicum*	۰/۱۹	R	۰/۱۲۵	۱	R	۰/۰۴۷	۵/۱	R
۵	*M. chelonae like organism*	۱	R	۰/۰۳	R	R	۸	۴	R
۶	*M. duvalii*	۳	R	۰/۱۹	R	۰/۱۲۵	۱	۲	R
۷	*M. mucogenicum*	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۳۸	R	۰/۰۰۲	۰/۰۱۶	۱/۵	R
۸	*M. smegmatis*	۰/۱۲۵	R	۰/۰۴۷	۰/۰۹۴	۰/۰۰۲	۰/۰۶۴	۰/۵	۸
۹	*M. fortuitum*	R	۲	۴	R	۰/۵	۶	R	R
۱۰	*M. smegmatis*	۲	۱۲	۰/۰۲۳	R	R	۳	۲	R
۱۱	*M. fortuitum*	۸	R	۰/۷۵	R	R	۰/۰۲۳	۸	R
۱۲	*M. flavescense*	۱۲۸	R	۰/۰۲۳	۰/۵	R	۰/۵	۱۲۸	۰/۲۵
۱۳	*M. fortuitum*	۸	R	۰/۰۹۴	۰/۱۹	۰/۳۸	۰/۱۲۵	۸	۶۴
۱۴	*M. chelonae like organism*	۰/۵	R	۱	۰/۰۳۲	۰/۰۹۴	۲۵۶	۰/۵	۲
۱۵	*E. coli*, ATCC 25922	۲	۴	۰/۰۶۴	R	R	۱	۶۴	R

AK: آمیکاسین، **RI**: ریفامپین، **CI**: سیپروفلوکساسین، **EB**: اتامبوتول، **TS**: تتراسیکلین، **DC**: داکسی‌سیکلین، **AZ**: آزیترومایسین، **IZ**: ایزونیازید

MIC:Minimal inhibitory concentration

بر طبق نتایج، مقاومت گونه های NTM بـه ریفـامپین، ایزونیازید و اتامبول بالا بود؛ به طوری که ۷۱ درصد از گونه‌ها به ایزونیازید، ۶۴ درصد به ریفامپین، ۵۷ درصد به اتامبوتول، ۳۵ درصد به تتراسایکلین، ۱۴ درصد بـه آزیترو مایسین و ۷/۱ درصد به آمیکاسین مقاوم بودند. امـا مقاومـت بـالایی نسـبت بـه سیپروفلوکساسـین و داکسی‌سیکلین دیده نشد. بنابراین به نظر می‌رسـد کـه استفاده از ریفامپین، ایزونیازید و اتـامبوتول بـه عنـوان داروی منفرد برای درمان عفونت NTM مفید نخواهـد بـود. در میـان آنتـی‌بیوتیـک‌هـای اسـتفاده شـده سیپروفلوکساسین و داکسی‌سـیکلین بیشـترین تـأثیر را روی عفونت‌های NTM خواهند داشت.

داکسی‌سیکلین در دوز پایین تر از سیپروفلوکسا سین و آزیترومایسـین مـؤثر بـود و در نتیجـه اسـتفاده از داکسی‌سیکلین، آمیکاسین، آزیترومایسین، سیپروفلوکسـا سین، تتراسایکلین یا دوز ترکیبی از آن ها می‌تواند بـرای درمان عفونت‌های NTM مؤثر باشد.

در نظر گرفتن مقاومت بـالای NTM بـه ریفـامپین، اتامبوتول، ایزونیازید و مقاومت تقریبی بـه تتراسـایکلن نشان می‌دهـد کـه اسـتراتژی‌هـای جدیـدی در شـیمی درمانی علیه ماکوباکتریوم ها مورد نیاز است کـه ممکـن است شامل طراحی داروهای جدید یا ترکیب دو یا چند دارو بـرای درمـان بیمـاران باشـد (۱۴-۱۱). در نهایـت انجام E-test در این مطالعه نشان داد کـه ایـن روش بـه خاطر سهولت و سرعت انجام کـار، از آلـوده شـدن بـا ارگانیسم های دیگر و اتلاف وقت جلـوگیری مـی کنـد. همچنین عدم نیاز به تجربه‌ی بـالا و امکانـات خـاص و تفسـیر پیچیـده در آزمایشـگاه‌هـای تشخیصـی، سـبب سرعت بخشیدن به تصـمیمات کلینیکـی بـرای تجـویز داروی مناسـب بـه بیمـاران مبـتلا بـه مایکوبـاکتریوم و

www.mui.ac.ir

تسریع روند درمان می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی شماره ی ۱۸۶۰۵۶ بود که به عنوان پایان‌نامه مورد تصویب و توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مورد حمایت مالی قرار گرفت. بدین‌وسیله از حمایت معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در اجرای این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). Indian J Med Res 2004; 120: 290-304.
2. Doucet-Populaire F, Buriankova K, Weiser J, Pernodet JL. Natural and acquired macrolide resistance in mycobacteria. Curr Drug Targets Infect Disord 2002; 2(4): 355-70.
3. Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN. Occurrence of Nontuberculous Mycobacteria in Environmental Samples. Applied and environmental microbiology 1999; 65(6).
4. Gitti Z, Neonakis I, Fanti G, Kontos F, Maraki S, Tselentis Y. Use of the GenoType Mycobacterium CM and AS assays to analyze 76 nontuberculous mycobacterial isolates from Greece. J Clin Microbiol 2006; 44(6): 2244-6.
5. Le DC, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. Appl Environ Microbiol 2002; 68(3): 1025-32.
6. Le DC, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. Appl Environ Microbiol 2002; 68(11): 5318-25.
7. Hoffner SE, Klintz L, Olsson-Liljequist B, Bolmstrom A. Evaluation of Etest for rapid susceptibility testing of Mycobacterium chelonae and M. fortuitum. J Clin Microbiol 1994; 32(8): 1846-9.
8. Biehle JR, Cavalieri SJ, Saubolle MA, Getsinger LJ. Evaluation of Etest for susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol 1995; 33(7): 1760-4.
9. Trilli A, Michelini V, Mantovani V, Pirt SJ. Development of the agar disk method for the rapid selection of cephalosporin producers with improved yields. Antimicrob Agents Chemother 1978; 13(1): 7-13.
10. Drew WL, Barry AL, O'Toole R, Sherris JC. Reliability of the Kirby-Bauer disc diffusion method for detecting methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus. Appl Microbiol 1972; 24(2): 240-7.
11. Utrup LJ, Moore TD, Actor P, Poupard JA. Susceptibilities of nontuberculosis mycobacterial species to amoxicillin-clavulanic acid alone and in combination with antimycobacterial agents. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(7): 1454-7.
12. Bermudez LE, Inderlied CB, Kolonoski P, Wu M, Aralar P, Young LS. Telithromycin is active against Mycobacterium avium in mice despite lacking significant activity in standard in vitro and macrophage assays and is associated with low frequency of resistance during treatment. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(8): 2210-4.
13. Hoffner SE, Hjelm U, Kallenius G. Susceptibility of Mycobacterium malmoense to antibacterial drugs and drug combinations. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37(6): 1285-8.
14. De Groote MA, Huitt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. Clin Infect Dis 2006; 42(12): 1756-63.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 30, No 176, 2nd week, April 2012 Received: 23.8.2011 Accepted: 4.2.2012

Evaluating the Sensitivity of Nontuberculous Mycobacterial Species Isolated from Water Samples to Conventional Antimycobacterial Drugs Using E-Test Method

Ensieh Sarikhani[1], Bahram Nasr Isfahani PhD[2], Nafiseh Sadat Hosseini MSc[3], Tahmineh Narimani MSc[3]

Abstract

Background: Nontuberculous mycobacteria were only known as environmental bacteria. However, they have recently been identified as important pathogens due to the increased prevalence of immunodeficiency diseases. Mycobacterial susceptibility testing is thus vital in management of patients with mycobacterial infections.

Methods: In this study, different samples were collected from different water sources in Isfahan, Iran. The samples were then cultured to detect environmental mycobacteria. After confirming the species, E-test was used to determine the sensitivity of 14 nontuberculous mycobacterial isolates.

Findings: Minimal inhibitory concentrations of 8 current routine antibiotics against mycobacterial infections were examined.

Conclusion: This study showed different nontuberculous mycobacteria to be highly resistant to rifampin and isoniazid. Resistance to other drugs was species-dependent.

Keywords: Nontuberculous mycobacteria, Antibiotic resistance, E-test

[1] MSc Student, Student Research Committee, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[3] Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Bahram Nasr Isfahani PhD, Email: nasr@hlth.mui.ac.ir