مقاله پژوهشی

اثر غلظت‌های مختلف استرپتومایسین بر تقویت رشد سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

دکتر عزت ا... قائمی* - دکتر کیومرث قاضی سعیدی** - مایا بابائی کوچکسرائی***

چکیده

اثر غلظت‌های مختلف استرپتومایسین بر رشد سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در سویه‌های مقاوم به این دارو افزودن ۰/۱ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر استرپتومایسین به محیط لوون اشتاین ، می‌تواند زمان ظهور کلنی را ۵-۷ روز کاهش دهد و افزودن حساس ۰/۰۱ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر از این دارو به محیط پایه لوون اشتاین ، ظهور کلنی سویه‌ها را ۱-۵ روز تسریع نماید. سازوکار دقیق این عمل نامشخص است ولی ممکن است به علت اثر استرپتومایسین روی پورین‌ها باشد که نقش انتقال مواد غذائی را به عهده دارند. وجود غلظت‌های پایین(۰/۱ و ۰/۰۱ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر) استرپتومایسین در محیط لوون اشتاین سبب تغییر شکل کلنی در بعضی از سویه‌ها می‌شود.

واژه‌های کلیدی: مایکوباکتریوم - توبرکلوزیس - رشد - استرپتومایسین

* - استادیار دانشگاه علوم پزشکی گرگان

** - استاد دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

*** - کارشناس میکروبیولوژی بیمارستان مسیح دانشوری

مقدمه

بیماری سل یک مصیبت بزرگ تاریخ است که به نظر می‌رسد جهان باز باید در انتظار تکرار آن باشد . جهان و به خصوص آسیا امروز بر روی یک بمب ساعتی از سل مقاوم نشسته است (۱). صد سال پس از کشف ، هنوز سل در رأس بیماری‌های عفونی قرار دارد که به تنهایی مرگ آفرین می‌باشد. این بیماری عامل ۲۶درصد از مرگ‌های قابل پیشگیری در جهان می‌باشد (۲و۳). قریب یک میلیارد و هفتصد میلیون نفر یعنی $\frac{۱}{۳}$ جمعیت جهان به میکرب سل آلوده‌اند. سالانه بیش از ۸ میلیون مورد سل فعال و جدید بروز می‌کند که در سه میلیون مورد منجر به مرگ می‌شود (۳). یکی از مشکلات و دلایل اصلی ادامهٔ گسترش سل در جهان، تشخیص دیر هنگام این بیماری است (۴) ، که در طی این فاصلهٔ زمانی ، چون فرد از بیماری خویش آگاه نیست ، به راحتی با سایر افراد جامعه و نیز خانوادهٔ خود برخورد کرده ، بیماری را به سایرین منتقل می‌نماید . هر چه فاصلهٔ زمانی بین ابتلاء فرد به بیماری تا مراجعه آن به پزشک و نیز از زمان مراجعه تا تشخیص ، طولانی‌تر شود ،کنترل بیماری در جامعه مشکل‌تر خواهد شد، ولی باکوتاه کردن این زمان می‌توان تا حدّ زیادی به حلّ مشکل پرداخت. برای تشخیص بیماری، علاوه بر علائم بالینی و رادیولوژیایی، تشخیص آزمایشگاهی از اهمیّت ویژه‌ای برخوردار است . اساس تشخیص در آزمایشگاه برکشت استوار است ولی به علت کندی رشد این باکتری ،که ازکند رشدترین باکتری‌های با زندگی آزاد محسوب می‌شود (۱۵) ، ظهور کلنی و تشخیص ، با تأخیر امکان پذیر است. برای حل این مشکل ، روش‌های مختلفی طراحی شده است که از موفق‌ترین آن‌ها، فنون جدیدی مثل بکتک[1] و پی.سی.آر[2] (۱۰) می‌باشد که علی‌رغم سرعت نسبتاً زیاد در تشخیص ، به علت گرانی و نیاز به افراد کارآزموده و متخصص به جز در مراکز خاص ، قابل استفاده نمی‌باشند. به همین دلیل تلاش‌های گسترده‌ای برای بهبود محیط‌های کشت انجام شده است که در اکثر آن‌ها ، محققین تلاش کرده‌اند با تأمین بهترین منابع کربن ، نیتروژن و املاح و نیز بهبود شرایط فیزیکی محیط زیست ، زمان نسل باکتری را به حداقل ممکن برسانند و بر این اساس است که امروزه ده‌ها محیط کشت طراحی شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶). در این مطالعه ، ما تلاش کردیم که به طریقی دیگر روی رشد این باکتری تأثیر بگذاریم ، چون یکی از دلایل کندی رشد این باکتری ، نفوذ ناپذیری نسبی دیواره غیر معمول آن نسبت به ورود اکسیژن، مواد غذایی و املاح به داخل سلول می‌باشد. بنابراین عواملی که بتوانند به نحوی ، نفوذپذیری دیواره را زیاد نمایند ، می‌توانند راه ورود مواد غذایی را هموارتر نموده و امکان رشد را مهیاتر کنند.

بر این اساس ما به بررسی اثر غلظت‌های مختلف استرپتومایسین در رشد این باکتری پرداختیم . استرپتومایسین علاوه بر اثر روی ترکیب پروتئین‌ها ، می‌تواند باعث افزایش نفوذپذیری در مایکوباکتریوم‌ها گردد (۵). بنابراین می‌تواند در غلظت‌های پائین‌تر از دُز کشنده با تغییر در نفوذپذیری ، امکان ورود مواد غذائی به داخل سلول را بیشتر کرده و سرعت رشد را افزایش دهد چون در پوشش این باکتری برای ورود مواد آب‌گریز (هیدروفوب)،

1 - (Bactec) محیط کشت برای تشخیص سریع مایکوباکتریوم
2 - (PCR) Polymerase Chain Reaction

پروتئین‌های انتقال (پورین‌ها) وجود دارند که می‌توانندتحت تأثیر استرپتومایسین قرار گیرند. در این مطالعه ، هدف اصلی ما یافتن بهترین غلظتی از استرپتومایسین است که قادر است رشد سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را تقویت نماید.

وسایل و روش‌ها

الف) تهیه و آماده سازی محیط کشت

محیط کشت پایه محیط لوون اشتاین می‌باشد که محیط معمول در آزمایشگاه‌های کشور است. بعد از آماده سازی محیط پایه (۷) از پودر خالص استرپتومایسین (شرکت سیگما) رقت‌های مناسب تهیه کرده تا بعد از افزودن به محیط پایه ، به غلظت‌های نهائی ۵ ، ۱ ، ۰/۵ ، ۰/۱ ، ۰/۰۵ ، ۰/۰۱ ، ۰/۰۰۵ میکروگرم در میلی لیتر *(µg/ml)* برسیم و نیز یک مجموعه محیط کنترل فاقد استرپتومایسین تهیه نمودیم بعد محیط‌ها را در کواگولاتور قرار داده تا به صورت شیب‌دار ، منعقد گردند.

ب) انتخاب سوش

علاوه بر سوش‌های معیار *H37Rv* و *H37Ra* ، از سوش‌های محلی نیز استفاده گردید که از نظر الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با یکدیگر تفاوت داشتند .

«الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های مورد مطالعه»

سوش	محل تهیه	الگوی حساسیت آنتی بیوتیک			
		INH	*RIF*	*Str*	*ETB*
H37Rv	دکتر ونسان (پاریس)	*S*	*S*	*S*	*S*
H37Ra	دکتر ونسان (پاریس)	*S*	*S*	*S*	*S*
۱	*بیمارستان (خلط)	*S*	*S*	*S*	*S*
۲	بیمارستان (خلط)	*R* (۲۰درصد)	*R* (۴۰درصد)	*S*	*R* (۴۰درصد)
۳	بیمارستان (زخم)	*R* (۱۰۰درصد)	*R* (۱۰۰درصد)	*R* (۱۰۰درصد)	*S*
۴	بیمارستان(مایع نخاع)	*R*	*R*	*R*	*R*
۵	بیمارستان (خلط)	*R* (۶درصد)	*S*	*S*	*S*
۶	بیمارستان (خلط)	*R* (۸۰درصد)	*R* (۶۰درصد)	*R* (۶۰درصد)	*R* (۱۰درصد)
۷	بیمارستان (خلط)	*R* (۲درصد)	*S*	*S*	*R* (۲درصد)
۸	سالیگن (هلند)	*R* (۱۰درصد)	*R* (۱۰درصد)	*S*	*S*

ETB: اتامبوتول *RIF: ریفامپین* *S: حساس*

STR: استرپتومایسین *INH: ایزونیازید* *R: مقاوم*

*بیمارستان مسیح دانشوری

ج) تهیه سوسپانسیون باکتری

بعد از اطمینان از خلوص سویه‌های مزبور ، از کلنی‌های موجود در محیط لوون اشتاین برای تهیه سوسپانسیون استفاده شد . برای این کار ۳-۵ کلنی انتخاب و در ۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل در لوله حاوی ۵-۶ پرل شیشه‌ای اضافه شد و چندین بار به شدت تکان داده شد تا توده یا کلامپ باکتری از هم جدا شود. سپس محلول را چند بار به شدت از سرنگ با سر سوزن شماره ۲۵ عبور دادیم تا باکتری‌ها از هم دیگر جدا شوند. آنگاه لوله‌ها را ۵ دقیقه در دمای اطاق قرار دادیم تا توده‌های احتمالی تجزیه نشده رسوب نمایند ، سپس از محلول رویی در یک لوله آزمایش دیگر ابتدا کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه کردیم و بعد با رقیق سازی مکرر (10^{-3}) ، به کدورتی معادل $1/5 \times 10^5$ باکتری رسیدیم.

د) تلقیح به محیط کشت

۲۰۰ لاندا (λ) از سوسپانسیون به دست آمده را به هریک از لوله‌های کنترل و لوله‌های تست افزودیم (۴) و لوله‌ها را در حرارت ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد قرار دادیم. هر ۲-۳ روز یک بار از نظر ظهور کلنی ، تعداد، شکل و رنگ کلنی آن‌ها را آزمایش کردیم و نتایج لوله‌های تست و لوله کنترل را با یک دیگر مقایسه و ثبت کردیم تا در مقایسه با محیط بدون آنتی‌بیوتیک، تأثیر غلظت‌های مختلف استرپتومایسین را روی رشد تعیین نماییم.

ه) مطالعه روی نمونه‌های بیماران

برای ارزیابی کارآئی غلظت مناسب استرپتومایسین روی نمونه بیمار ، ۲۰ نمونه خلط بیماران واجد اسمیر مثبت را انتخاب کرده و بعد از تیمارهای معمول ۲۰۰ لاندا از هر کدام آن‌ها را به سه مجموعهٔ محیط لوون اشتاین اضافه کردیم ، یک سری لوله کنترل ، یک سری حاوی ۰/۰۱ و دیگری حاوی ۰/۱ میکروگرم/میلی لیتر از استرپتومایسین. سپس جریان رشد را در طول زمان در این سه لوله با هم مقایسه نمودیم.

نتایج

با توجه به آن که استرپتومایسین یکی از چهار داروی اصلی ضد سل است و روز به روز میزان مقاومت علیه آن گسترش می‌یابد ، در این بررسی روی سویه‌هایی کار شد که بعضی مقاوم و بعضی حساس به آن هستند و بعضی علی‌رغم حساس بودن به آن به سایر داروهای ضدسل مقاومت نشان می‌دهند ، بر این اساس نتایج را به صورت ۳ گروه متفاوت ارائه می‌کنیم.

جدول ۱ : رشد سویه‌های حساس به استرپتومایسین در حضور غلظت‌های مختلف استرپتومایسین (a)

غلظت * Str / شماره سویه	۵μg**	۱μg	غلظتی که سریع‌ترین رشد را دارد (b)	غلظت‌هایی که افزاینده رشد هستند به ترتیب اولویت
۱	--	--	۰/۰۱ (+۳)	۰/۱ و ۰/۰۵ و ۰/۰۱
RV	--	--	۰/۰۱ (+۴)	۰/۱ و ۰/۰۵ و ۰/۰۱
Ra	--	--	۰/۰۱ (+۳)	۰/۱ و ۰/۰۵ و ۰/۰۱

a) سویه‌های حساس به هر ۴ آنتی بیوتیک اصلی ضد سل

b) زمان ظهور کلنی در مقایسه با لوله کنترل (+ نشان دهنده ایجاد کلنی زودتر از لوله کنترل می‌باشد)

* استرپتومایسین ** میکروگرم

به خوبی مشخص است که در سویه‌های فوق غلظت ۰/۰۱ میکروگرم در هر میلی لیتر کارایی بیشتری در تقویت رشد دارد و به دنبال آن رقت ۰/۰۵ و ۰/۰۱ که تقریباً از نظم مشخصی پیروی کنند ، کارآیی متفاوتی نشان می‌دهند.

جدول ۲ : رشد سویه‌های مقاوم به استرپتومایسین در حضور غلظت‌های مختلف استرپتومایسین

غلظت Str / شماره سوش	(a) ۵μg	(b) ۱μg	غلظتی‌که‌سریع‌ترین رشد رادارد (b)	غلظت‌هایی که افزاینده رشد هستند به ترتیب اولویت
۹	دارد (۰)	دارد (+۵)	۰/۱ (+۶)	۰/۵و۰/۰۵و۰و۰/۱و۰/۰۱و۰/۱
۱۰	دارد (۰)	دارد (+۴)	۰/۱ (+۷)	۰/۱و۰و۰/۰۵و۰/۵و۰/۱
۱۲	دارد (+۱)	دارد (+۴)	۰/۱ (+۵)	۰/۵و۰/۰۵و۰و۰/۱و۰/۰۱و۰/۱

a) توانایی رشد در حضور غلظت مورد نظر و مقایسه زمان ظهور با لوله کنترل

b) زمان ظهور کلنی در مقایسه با لوله کنترل (+ نشان‌دهنده ایجاد کلنی زودتر از لوله کنترل می‌باشد)

در این سویه‌ها که به استرپتومایسین مقاومند رشد در تمامی غلظت‌های مورد استفاده اتفاق افتاد و در اکثر موارد وجود استرپتومایسین به عنوان مقوی رشد عمل کرده است به طوری که حتی در غلظت ۵ میکروگرم‌در میلی‌لیتر (μg/ml) نیز رشد یا معادل و هم‌زمان با گروه کنترل بود یا اندکی زودتر از این گروه آغاز شد. غلظت ۰/۱ میکروگرم با حداکثر ۷ روز کاهش زمان ظهور کلنی ، بهترین کارایی را در کاهش زمان رشد این سویه‌ها داشت و یک انتخاب کاملاً مناسب می‌باشد ؛ رقت‌های بالاتر و پایین‌تر نیز چنین اثرات مفیدی دارند .

جدول ۳: الگوی رشد سویه‌های حساس به استرپتومایسین (a) در حضور غلظت‌های مختلف استرپتومایسین

غلظت Str / شماره سویه	(a) ۵μg	(b) ۱μg	بهترین غلظت افزاینده رشد	غلظت‌هایی که افزاینده رشد هستند به ترتیب اولویت
۶	---	---	۰/۰۵ (+۳)	۰/۱و۰/۰۱و۰/۰۵
۱۱	---	+(-۱۵)	۰/۰۱ (+۵)	۰/۱و۰/۰۵و۰/۰۱
۱۳	---	+(-۱۵)	۰/۰۱ (+۳)	۱و۰/۱و۰/۰۵و۰/۰۱
۱۴	---	+(۰)	۰/۰۱ (+۳)	۱و۰/۱و۰/۰۵و۰/۰۱

a) سویه‌هایی مد نظر است که به استرپتومایسین حساسند ولی حداقل به یکی از داروهای اصلی ضد سل مقاومت نشان می‌دهند.

b) زمان ظهور کلنی در مقایسه با لولهٔ کنترل

در این سویه‌ها بهترین غلظت بین ۰/۰۱ - ۰/۰۵ میکروگرم/میلی‌لیتر می‌باشد که از این نظر بسیار شبیه سویه‌های حساس جدول یک هستند. در این گروه ظهور کلنی در سویه ۱۴ در حضور غلظت ۱ میکروگرم هم زمان با لوله کنترل آغاز شد ولی الگوی رشد آن در سایر غلظت‌ها مشابه سویه‌های جدول یک می‌باشد .

در این بررسی ما متوجه شدیم که رقت ۰/۱ میکروگرم/میلی‌لیتر در سویه‌های مقاوم و ۰/۰۱ میکروگرم/میلی‌لیتر در سویه‌های حساس به استرپتومایسین بهترین کارایی را در رشد دارند و تقویت رشد در حضور استرپتومایسین برای سویه‌های مقاوم بیشتر از سویه‌های حساس است . از نکاتی که در مورد کشت در حضور استرپتومایسین بسیار جالب توجه می‌شود ایجاد شکل خاصی از کلنی در بعضی سویه‌ها بود که تفاوت زیادی با شکل طبیعی کلنی داشت ، یعنی به جای ایجاد کلنی نخودی کلنی‌های شیری رنگ پهن و گاهی تخت ایجاد می‌شد و بعضاً حالت موکوئید نیز داشت. این پدیده در بسیاری از سویه‌ها از جمله *RV* ، *Ra* ۱ و ۱۰ و در غلظت‌های مختلف مشاهده گردید .

در ادامه کار ما برای ارزیابی و مقایسه بین دو غلظت ۰/۱ و ۰/۰۱ میکروگرم در تقویت رشد، به مطالعه روی ۲۰ سویه محلی پرداختیم. نتایج به ما نشان داد که در اکثر سویه‌های محلی و در اولین جداسازی آن‌ها از نمونه بالینی ، کارایی رقت ۰/۰۱ میکروگرم/میلی‌لیتر استرپتومایسین بسیار بیشتر از رقت ۰/۱ می‌باشد . در حضور رقت ۰/۰۱ بین ۱-۵ روز رشد تقویت شده بود در حالی که در رقت ۰/۱ اصولاً رشد کندتر از لوله‌های کنترل و نیز لوله ۰/۰۱ بود. البته علت اصلی آن بود که تنها ۳ سویه از ۲۰ سوش مورد مطالعه به استرپتومایسین مقاوم بودند و مقاومت آنها بین ۱۰-۴۰ درصد بود و بقیه سویه‌ها اصولاً به تمام آنتی‌بیوتیک های اصلی ضد سل حساسیت داشتند . بر این اساس یافته ما بر این نکته تأکید دارد که در طراحی محیط‌های کشت ، افزودن ۰/۰۱ میکروگرم در هر میلی لیتر محیط لوون اشتاین برای تسریع رشد سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکولزیس بسیار مفید است .

بحث

مایکوباکتریم توبرکلوزیس ازکند رشدترین باکتری‌های با زندگی آزاد محسوب می‌شود، به خصوص در مواردی که تعداد میکرب در نمونهٔ بیمار ، کم باشد ، سرعت رشد آن بسیار کندتر است و گاهی تا چندین هفته وقت برای ظهور کلنی نیاز دارد . در توجیه کندی رشد این باکتری ، دلایل متعددی عنوان شده که بعضی از آن‌ها عبارتند از : کم بودن اوپرن *rDNA* (۸) ، کم بودن نقاط آغاز نسخه برداری از اوپرن *rDNA* (۹) ، کم بودن نسبت *RNA* به *DNA* (۱۰) و ... و وجود پوشش ضخیم و چند لایه اختصاصی در مایکوباکتریوم‌ها.

دلایل متعددی وجود دارد که بر نقش دیوارهٔ سلولی به عنوان یک سد نسبتاً نفوذناپذیر در مقابل عوامل مختلف به خصوص ترکیبات آب دوست (هیدروفیل) ، اکسیژن و املاح معدنی دلالت دارند . هم چنین نفوذپذیری دیواره در مقاومت این باکتری‌ها نسبت به اسیدها ، بازها و آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل انواع بتالاکتام نقش دارند (۱۱) به همین دلیل مطالعه برای استفاده از عواملی که با غلبه بر سد نفوذناپذیر دیواره ، اجازهٔ ورود به داخل باکتری را بدهد ، برای افزایش حساسیت در

سویه‌های [1]م.دی.آر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ، مدت‌هاست که مورد بررسی قرار گرفته است، مثلاً با استفاده از اتامبوتول (۱۲و۱۳) و دی متیل سولفوکساید حساسیت سویه‌های مقاوم، را نسبت به ایزونیازید ۸ برابر و نسبت به ریفامپین و استرپتومایسین ۱۶-۶۴ برابر افزایش دادند (۱۴). هم‌چنین در حضور غلظت‌های پائین ایزونیازید و اتامبوتول ، نفوذ موادی مثل بتاسایتواسترول به داخل سلول ۲-۳ برابر افزایش نشان می‌دهد (۱۵). اما مطالعه خاصی در زمینه استفاده از این عوامل برای افزایش سرعت ورود مواد به داخل سلول و کاهش زمان رشد در محیط‌های کشت انجام نشده است. از بین عوامل مختلفی که می‌توانست به این منظور مورد استفاده قرار گیرد ، در این مطالعه از استرپتومایسین استفاده شد که از داروهای اصلی ضد سل است و در سال ۱۹۳۹ توسط واکسمن کشف گردید و زمانی که مشخص شد روی بیماری سل اثر درمانی دارد ، به عنوان اولین داروی مجاز ضد سل به سرعت مورد استفاده قرار گرفت. این آنتی‌بیوتیک در غلظت‌های باکتری‌کُش خود باعث مهار ترکیب پروتئین در باکتری می‌گردد و نیز روی زنجیره‌های پروتئینی درحال ترکیب ، باعث غلط خوانده شدن[2] زنجیره می‌شود، یعنی زنجیره‌های پروتئینی تغییر یافته و عموماً غیرفعال ، ایجاد می‌کند که می‌تواند باعث مهار فعالیت باکتری گردد. یکی از اثراتی که به استرپتومایسین نسبت می‌دهند، افزایش نفوذپذیری دیوارهٔ مایکوباکتریوم‌هاست که به نظر می‌رسد علّت آن، همین پروتئین‌های تغییر یافته باشند (۵) چون ورود بسیاری از ترکیبات، بخصوص ترکیبات قطبی و آب‌دوست از طریق پروتئین‌های خاصّ انتقال (پورین) موجود در دیواره غنی از لیپید ، انجام می‌شود و چون این پورین‌ها نفوذپذیری کمی دارند (۱۶)، بعید نیست که با تغییر ساختمان پروتئین‌های فوق، قطر منافذ و مجاری ایجاد شده بیشتر گردیده و راه نفوذ موادّ غذایی به داخل سلول را هموارتر نماید. مطالعه حاضر، نشان داد که در غلظت‌های خاص، استرپتومایسین، نه تنها از رشد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، جلوگیری نمی‌کند بلکه باعث تقویت رشد باکتری نیز می‌گردد، ولی غلظتی که باعث تقویت رشد می‌شود، در سویه‌های حساس و مقاوم متفاوت است. بهترین غلظت دارو برای تقویت رشد سویه‌های مقاوم، که حتّی در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین نیز رشد می‌نمایند، غلظت ۰/۱ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر می‌باشد ولی در سویه‌های حساس، این غلظت ۱۰ برابر رقیق‌تر یعنی حدود ۰/۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر است. بنابر این نمی‌توان غلظت مشخصّی را برای تقویت رشد تمامی سویه‌ها، پیشنهاد نمود ولی مطالعه روی ۲۰ سوش محلی که برای اولین بار از بیمار جدا می‌شد (ایزولاسیون اولیّه) نشان داد که افزودن ۰/۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین به محیط لوون اشتاین در تمامی سویه‌ها می‌تواند تا حدودی سرعت رشد را زیاد کرده و ظهور کلنی را ۱-۵ روز از لولهٔ کنترل فاقد استرپتومایسین سریع‌تر نماید. بنابراین، طبق یافتهٔ خود، تأکید می‌کنیم ، که یکی از راه‌های کوتاه کردن زمان جداسازی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، افزودن ۰/۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین به محیط لوون اشتاین است. این مطالعه اگر چه روی تعداد معدودی از سویه‌ها انجام شده، مشخص کرد که غلظت

1 - *(M.D.R) Multiple Drug Resistance*
2 - *Miss-reading*

۱ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر میکرب از رشد سویه‌های حساس به خوبی جلوگیری می‌کند ولی نمی‌تواند مانع رشد سویه‌های مقاوم گردد، حتّی غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر میکرب نیز مهارکنندهٔ رشد سویه‌های مقاوم نمی‌باشد و در این موارد، درمان کاملاً بی فایده است. از طرفی می‌توان پیش‌بینی نمود که مصرف نامنظم دارویی مثل استرپتومایسین باعث کاهش دُز دارو در خون شده و در نتیجه اگر مصرف دارو با تأخیر و به طور نامنظم انجام شود، ممکن است غلظت پائین دارو در بافت هدف نه تنها از رشد باکتری جلوگیری نکند، بلکه باعث تقویت رشد باکتری نیز شود و احتمال بروز مقاومت داروئی را تشدید نماید.

از جمع‌بندی نتایج مربوط به استرپتومایسین به این نتیجه می‌رسیم که وجود مقاومت نسبت به سایر داروهای اصلی ضدّ سل مثل ایزونیازید، اتامبوتول و ریفامپین، اگرچه ممکن است با بروز تغییراتی در دیوارهٔ سلولی همراه باشد ولی این تغییر در حدی نیست که بتواند روی نفوذ استرپتومایسین به داخل باکتری اثر داشته باشد، چون رشد این سویه‌ها در حضور غلظت‌های مختلف استرپتومایسین مثل سویه‌های کاملاً حساس به هر ۴ آنتی بیوتیک می‌باشد (جدول ۳) این مسأله بیانگر این نکته است که اوّلاً مقاومت نسبت به این ۴ دارو با هم ارتباطی ندارد، که این مسأله با یافتهٔ محققین دیگر نیز تطابق دارد (۱۷). ثانیاً ، احتمالاً بروز مقاومت نسبت به این داروها در اکثر سویه‌ها، ژنتیکی است و کمتر ناشی از تغییر در دیواره می‌باشد. که این نیز با نظریات و آزمایش‌های سایر محققین تطابق دارد، زیرا مثلاً در مورد مقاومت به استرپتومایسین مشخّص شد که در بیش از ۶۵درصد سویه‌ها، مقاومت ، ژنتیکی است و تنها در ۲۵-۳۵درصد سویه‌ها، علت مقاومت، تغییر نفوذپذیری دیواره می‌باشد. در مورد سایر داروهای ضدّسل ، مقاومت ناشی از تغییر نفوذپذیری دیواره از این هم کمتر است (۱۸). یکی از یافته‌های قابل توجّه در مطالعهٔ اثر استرپتومایسین روی رشد مایکوباکتریوم‌ها، تغییر ریخت کلنی باکتری به خصوص در حضور غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۱ میکروگرم/میلی‌لیتر استرپتومایسین است. این تغییر به حدّی است که در نظر اوّل، احتمال آلودگی را مطرح می‌کند و تنها پس از تهیهٔ لام و نیز کشت مجدد آن در محیط کشت فاقد دارو، مشخص می‌شود که کلنی مربوط به سوش اصلی می‌باشد و ناشی از آلودگی نیست. تغییرات ایجاد شده به صورت کلنی پهن، شیری و تخت است که در بعضی از سویه‌ها مشاهده شده است .

قدردانی

این تحقیق در مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی کشور انجام شده است، و بدین وسیله از مسؤولین محترم مرکز و به خصوص اعضاء آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی که در تمامی مراحل همراه و همگام ما بوده‌اند تشکر و قدردانی می‌کنیم.

منابع

1-world Health organization . Report on the tuberculosis epidemic."TB STOP". WHO, Jeneva, 1995;6-8

2 -Fernandes ND. Kolattukudy PE. Clonning sequencing and characterizating of fatty acid synthetase encoding gene from

M.tuberculosis var bovis BCG Gene 1996; 170: 95-99

3 -Kochia. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the world health organization." Tubercle 1991; 72:1-6.

4 -Idigoras P, Perez - trallero E, Alcorta M. etal Rapid detection of Tuberculous and non tuberculous Mycobacteria by microscopic observation of growth on middlebrook 7HII Agar.Eur J clin microb infect dis. 1995; 14:6-10.

5-ROM WM, Garay SM. "Tuberculosis". litle brown company; 1996. chap 2,13

6-Ratladge C. Nutrition, growth and metabolism. In Biology of Mycobacteria, by Ratladge & Stanford J.Academic press : 1982; p. 53-92

7-willett HP."Mycobacterium". in zinsser microbacteriology by Joklik W.K Willet H.P & etal. Appleton & Lange inc; 1992. p. 497-525

8 -Bremer H, Davis pp. Modulation of chemical composition and other Parameters of the cell growth rate. In E.coli and salmonella typhimurium. cellular and molecular biology by neidhart J.L washington D.C : A.S.M; 1987. p. 1527-42

9 -Genzales JA, Colston MJ. Cox RA. The rRNA operons of mycobacterium smegmatis and mycobacterium tuberculosis. comparision of promotor elements and of neighbouring upstream genes Microbiol. 1996; 142(3):667-674.

۱۰- ضیاء ظریفی ، ابوالحسن : زیست‌شناسی و باکتری‌شناسی میکوباکتریوم‌ها، انتشارات ابوریحان، چاپ اول ۱۳۶۶: فصول ۱۸ ، ۱۴ ، ۵ ، ۳ ، ۲ ، ۱

11-ortals MA, Dupont MA, Lemassu A, et al. "Molecular composition of the outermost capsular material of the Tubrcle bacilli." Microbiology 1995; 141(7):1609-10.

12-Taniguchi H, etal. "Rifampicin renistance and mutation of the rPOB gene in M.Tub," FEMS Microb letter,1996; 144: 103-8.

13 -Hoffner SE, Kratz M, Olsson LB, etal. Invitro synergistic activity between ethambutal and fluorinated quinolones against M.avium." J Antimicrob Agent & chemo 1989; 24:317-24.

14 -Jagnannath C, Reddy VM, Gangadharam P.R.Enhancement of drug susceptibility of MDR strains of mycobaterium tuberculosis by ethombutol and DMSO."J Antimicrob Agent & chem 1995; 35(3):381-90.

15-Sedlaczed L, Gormiski BM, lisowska K. Effect of inhibitors of cell envelope synthesis

level in streptomycin - Resistant M-tub Antimicrob Agent & chem 1996; 40(11) : 2452-4.

18-sreevatsan S, etal. Characterization of rPSL and rrs mutations in streptomycin resistant M.Tub isolates from divers geographic Localities."Antimicrob Agent & chemo 1996; 40(4) : 1024 - 26.

17 -Meier A, sander P, Schaper KJ, etal. correlation of Molecular resistance mechanismes and phenotypic Resistance

16-Trias J, Jarlier V, Benz R. Porins in the cell wall of Mycobacteria. science 1992; 258: 1479-81.

on beta - sitotrol side chain degredation by Mycobacterium SP.NRRL MB3683," J Basic Microb 1994; 34(6) : 387-99.